

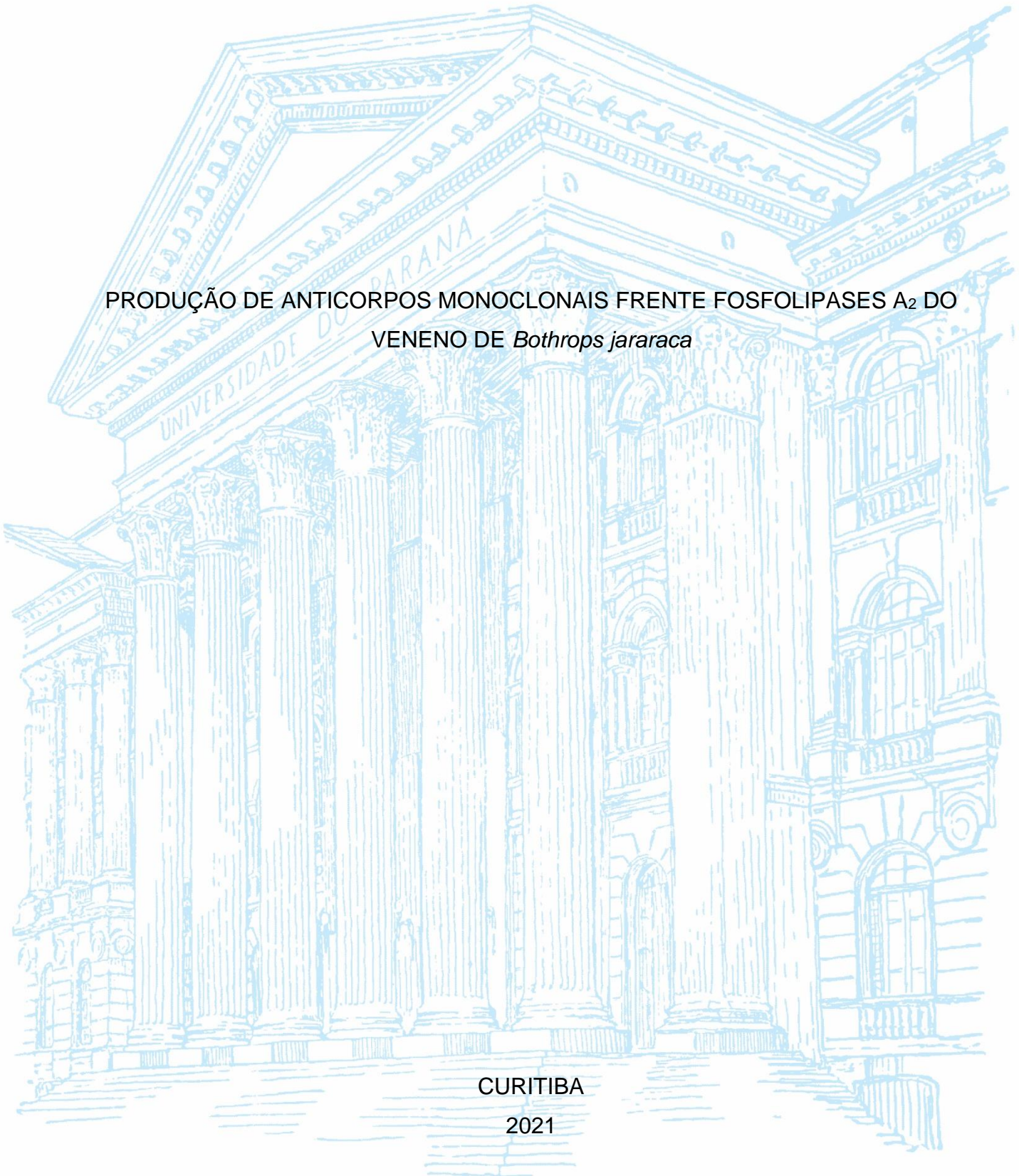
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FERNANDES FONSECA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FRETE FOSFOLIPASES A₂ DO
VENENO DE *Bothrops jararaca*

CURITIBA

2021



MARIANA FERNANDES FONSECA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FRENTE FOSFOLIPASES A₂ DO
VENENO DE *Bothrops jararaca*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga

Co-orientadores: Isabella Gizzi Jiacomini e Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CURITIBA

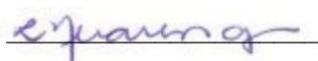
2021

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA FERNANDES FONSECA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS FRENTE FOSFOLIPASES A₂ DO
VENENO DE *Bothrops jararaca*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de biomédico
pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga
Orientadora – Departamento de Patologia Básica
Setor de Ciências Biológicas - UFPR



Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Departamento de Patologia Básica
Setor de Ciências Biológicas - UFPR



Dra. Alessandra Becker Finco

Curitiba, 22 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Larissa Alvarenga, agradeço pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Imunoquímica (LIMQ), por todo conhecimento compartilhado, por toda paciência e apoio nos momentos de dificuldade. Te admiro muito como cientista, professora e mulher e serei eternamente grata por tudo.

À minha coorientadora Isabella Jiacomini agradeço por todo conhecimento compartilhado e toda confiança depositada em mim. Seu apoio, otimismo, fé e amizade foram essenciais para a execução desse projeto.

Ao meu coorientador Ricardo Andrez agradeço a oportunidade de poder trabalhar no laboratório de Biotecnologia aplicada (BIOTECH) e por toda disponibilidade e auxílio sempre.

A todos do LIMQ que me ajudaram de alguma forma, Prof Ale, Prof Ju, Bianca, Marti, Bruna, Bruno e William obrigada pelos ensinamentos, companheirismo e risadas compartilhadas.

À minha mãe, Nadir Fernandes, minha maior incentivadora e meu maior modelo, serei eternamente grata por todos os seus esforços para tornar esse momento possível.

Às minhas tias Arcília e Ciça, minhas segundas mães, agradeço pelo amor incondicional e por nunca duvidarem de mim.

Aos meus tios, Levi e Israel e meu pai, Vitor, por me ensinarem o valor da educação e por todo o apoio ao longo desses anos.

A minha irmã, Fernanda, e meu cunhado, James, pelo amor, pelo apoio e por sempre estarem dispostos a me ouvir falar sobre a minha pesquisa.

Aos meus amigos da vida, Nathalia, Bianca, Ana, André, Marlon, Leo e Teco agradeço pela amizade verdadeira e por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial.

Aos meus amigos da faculdade, Nathalie, Gabriel, Gabriela, Letícia e Antônio agradeço pelo companheirismo durante todos esses anos de faculdade, por todos os trabalhos em grupo, mas principalmente pela jornada compartilhada. Tenho a certeza de que serão profissionais excelentes.

Ao meu namorado, Lucas, por tornar esse período mais leve e feliz, agradeço pelas idas nos sábados ao laboratório e por todo carinho e paciência.

Aos membros da banca Breno Beirão e Alessandra Becker por aceitarem avaliar meu trabalho com muita prontidão e consideração.

À Universidade Federal do Paraná e a todos os docentes da Biomedicina pela oportunidade e por propiciarem meu crescimento pessoal e intelectual com muita dedicação.

E, por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

“Compartilhe o seu conhecimento.

É uma forma de alcançar a imortalidade”

(Dalai Lama)

RESUMO

Venenos são uma mistura complexa de componentes biologicamente ativos que afetam diversos sistemas biológicos. A ação das toxinas presentes no veneno de serpentes pode gerar uma série de efeitos, desde edema e lesões teciduais até choque cardiovascular e morte. No mundo, estima-se que 2,7 milhões de pessoas são envenenadas todo ano por serpentes e 90% dos acidentes ofídicos são causados pelo gênero *Bothrops sp.* No Brasil, *Bothrops jararaca* é uma das espécies de maior relevância nesse contexto. Dentre os componentes tóxicos presentes no veneno de *B. jararaca* estão as hidrolases Fosfolipases A₂ (svPLA_{2s}), enzimas cuja atividade acarreta principalmente em dano tecidual. Atualmente, a soroterapia é o único tratamento eficaz para o tratamento dos efeitos sistêmicos do envenenamento. No entanto, os anticorpos presentes no soro contêm baixa especificidade em relação às proteínas mais antigênicas do veneno. Nesse contexto, o uso de anticorpos monoclonais (mAbs), os quais são altamente específicos e puros, está sendo discutido para neutralização de proteínas tóxicas do veneno de animais peçonhentos. Além disso, os mAbs são ferramentas essenciais para a investigação de diversos mecanismos fisiopatológicos. Tendo isso em vista, esse estudo objetivou a produção e caracterização de mAbs frente fosfolipases A₂. Nesse contexto, foi observado que a cromatografia de troca catiônica foi insuficiente para o isolamento da PLA₂ do veneno total de *B.jararaca* e são necessárias mais etapas cromatográficas para o isolamento completo da proteína. Apesar disso, foi possível identificar a presença da PLA₂ nas frações obtidas por cromatografia de troca catiônica por meio de SDS-PAGE e ensaio de atividade fosfolipásica. Ademais, observou-se que o programa de imunização dos camundongos para produção dos anticorpos policlonais foi eficiente, confirmada pela alta reatividade dos anticorpos produzidos para os componentes presentes no veneno, verificados por testes de ELISA e Western Blot. Além disso, o protocolo de fusão demonstrou-se eficiente para a produção dos hibridomas, visto que foi possível a obtenção de 16 hibridomas funcionais e secretores de anticorpos específicos para os componentes presentes no veneno, verificado por ELISA e Western Blot. Por fim, a partir do método de clonagem por diluição limitante, foi possível isolar 47 subclones capazes de secretar imunoglobulinas específicas para componentes do veneno total, incluindo fosfolipases. Desses, 16 subclones foram selecionados com base na microscopia ótica e ensaios de ELISA para serem expandidos para garrafas de cultivo e subsequentemente caracterizados por testes imunológicos. Ensaio para caracterização funcional dos anticorpos ainda precisam ser realizados para confirmar o potencial de neutralização dos mesmos.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, veneno, anticorpo monoclonal, fosfolipase A₂.

ABSTRACT

Venoms are a complex mixture of biologically active components that affect many biological systems. The action of toxins present in snake venom can generate a series of effects, from edema and tissue damage to cardiovascular shock and death. Worldwide, it is estimated that 2.7 million people are poisoned every year by snakes and 90% of snakebites are caused by the genus *Bothrops sp.* In Brazil, *Bothrops jararaca* is one of the most relevant species in this context. Among the toxic components present in the venom of *B. jararaca* are the hydrolases phospholipases A₂ (svPLA₂s), enzymes whose activity mainly causes tissue damage, induced by the cleavage of membrane phospholipids, but it can also cause myotoxicity and neurotoxicity. Currently, serum therapy is the only effective treatment for treating the systemic effects of poisoning. However, the production of antivenoms is expensive and the antibodies present in the serum have low specificity in relation to the more antigenic proteins in the venom. In this context, the use of monoclonal antibodies (mAbs), which are highly specific and pure, is being discussed for the neutralization of toxic proteins from the venom of venomous animals. Furthermore, mAbs are essential tools for the investigation of different pathophysiological mechanisms. Therefore, this study aimed to produce and characterize mAbs against phospholipases A₂. In this context, it was observed that cation exchange chromatography was insufficient for the isolation of PLA₂ from the total venom of *B. jararaca* and more chromatographic steps are necessary for the complete isolation of the protein. Despite this, it was possible to identify the presence of PLA₂ in the fractions obtained by cation exchange chromatography using SDS-PAGE and phospholipase activity assay. Furthermore, it was observed that the immunization program of the mice for the production of polyclonal antibodies was efficient, confirmed by the high reactivity of the antibodies produced for the components present in the venom, verified by ELISA and Western Blot tests. Furthermore, the fusion protocol proved to be efficient for the production of hybridomas, since it was possible to obtain 16 functional hybridomas that secrete antibodies specific to the components present in the venom, verified by ELISA and Western Blot. Finally, using the limiting dilution cloning method, it was possible to isolate 47 subclones capable of secreting specific immunoglobulins for components of the total venom, including phospholipases. Of these, 16 subclones were selected based on light microscopy and ELISA assays to be expanded to culture flask and subsequently characterized by immunochemical tests. Assays for functional characterization of antibodies still need to be performed to confirm their neutralization potential.

Keywords: *Bothrops jararaca*, venom, monoclonal antibody, phospholipase A₂.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTOGRAFIAS DE <i>Bothrops jararaca</i>	20
FIGURA 2 - NÍVEL DAS TOXINAS NO VENENO DE VIPERÍDEOS	21
FIGURA 3 - ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DE <i>Bothrops jararaca</i>	23
FIGURA 4 - SÍTIOS DE CLIVAGEM DE DIVERSAS FOSFOLIPASES EM UM DADO FOSFOLIPÍDIO DE BASE X	24
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA TÍPICA FOSFOLIPASE A ₂ (SVPLA ₂) MONOMÉRICA DE VENENO DE SERPENTE	26
FIGURA 6A - INCHAÇO E BOLHA PROVOCADO APÓS UMA MORDIDA NO DORSO DO PÉ POR <i>Bothrops jararaca</i> NO BRASIL.....	27
FIGURA 6B - MANIFESTAÇÃO LOCAL RESULTANTE DE MORDIDA POR <i>Bothrops sp</i>	27
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DO VENENO BRUTO DE <i>Bothrops jararaca</i>	40
FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DO VENENO DE <i>Bothrops jararaca</i> DO DIA 26	43
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DO VENENO DE <i>Bothrops jararaca</i> DOS DIAS 22, 24 E 11	43
FIGURA 10 - ATIVIDADE DE FOSFOLIPASE INDUZIDA PELO VENENO DE <i>B. jararaca</i>	45
FIGURA 11 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PELOS CAMUNDONGOS FRENTE O VENENO TOTAL DE <i>B. jararaca</i> E FRENTE A FRAÇÃO 1 DO VENENO DE <i>B. jararaca</i> POR ENSAIO ELISA	47
FIGURA 12 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRESENTES NO SORO FRENTE COMPONENTES DA FRAÇÃO 1 POR WESTERN BLOT	48
FIGURA 13 - NÚMERO DE CLONES REATIVOS FRENTE O VENENO TOTAL DE <i>B. jararaca</i> E A FRAÇÃO DO 1 VENENO DE <i>B. jararaca</i> POR ENSAIO DE ELISA....	50

FIGURA 14 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PELOS CLONES FRENTE O VENENO TOTAL DE <i>B. jararaca</i> E A FRAÇÃO 1 POR ENSAIO DE ELISA	50
FIGURA 15 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PELOS CLONES FRENTE OS COMPONENTES DA FRAÇÃO 1	52
FIGURA 16 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PELOS SUBLCLONES FRENTE O VENENO TOTAL DE <i>B. jararaca</i>	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO DE NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES POR SERPENTES, SEGUNDO ANO DO ACIDENTE E REGIÃO DO BRASIL.....	19
TABELA 2 - NÚMERO DE NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES POR SERPENTES DO GÊNERO <i>Bothrops sp.</i> SEGUNDO ANO DO ACIDENTE E REGIÃO DO BRASIL	19
.....	19
TABELA 3 - CRONOGRAMA DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS.....	36
TABELA 4 - HIBRIDOMAS SELECIONADOS PELO TESTE DE ELISA	53
TABELA 5 - HIBRIDOMAS SELECIONADOS PELO TESTE DE ELISA E ANÁLISE MICROSCÓPICA	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico

AdPLA₂ - fosfolipases específicas de tecido adiposo específica

AMBIC – tampão de bicarbonato de amônio

Asp49PLA₂ - fosfolipases que possuem um resíduo de aspartato na posição 49

CDRs - regiões determinantes de complementariedade

cPLA₂ - fosfolipases citosólicas

CRiSP - proteínas secretórias ricas em cisteína

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

F1 – fração 1 obtida por cromatografia de troca catiônica

F2 - fração 2 obtida por cromatografia de troca catiônica

F3 - fração 3 obtida por cromatografia de troca catiônica

F4 - fração 4 obtida por cromatografia de troca catiônica

iPLA₂ - fosfolipases independentes de cálcio

LAOO - L-aminoácido oxidase

Lys49PLA₂ - fosfolipases que possuem um resíduo de lisina na posição 49

mAbs - anticorpos monoclonais

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - ortofenilenodiamino

PAF-AH - acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas

PBS - tampão fosfato-salino

PLA₂ - fosfolipase A₂

PL - fosfolipases

PLA₁ - fosfolipase A₁

PLAB - fosfolipase B

PLC - fosfolipase C

PLD - fosfolipase D

SAC - Soro anticrotático

SABC - soro antibotrópico-crotático

SABL - soro antibotrópico-laquéico

SAE - soro antielapídico

scFv - fragmento variável de cadeia única

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

sPLA₂ - fosfolipases secretadas

SVMP - metaloproteinase do veneno de serpente

SVSP - serinoproteinase do veneno de serpente

svPLA₂ - fosfolipase A₂ do veneno de serpente

3FTX - toxinas de três dígitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Epidemiologia.....	18
2.2 <i>Bothrops sp.</i>	19
2.2.1 <i>Bothrops jararaca</i>	20
2.3 Veneno Botrópico	21
2.4 Fosfolipases	23
2.4.1 Fosfolipases A ₂ (PLA _{2s})	24
2.4.2 Fosfolipases do Veneno de serpentes (svPLA _{2s})	26
2.5 Diagnóstico e Tratamento	28
2.6 Uso de biossensores para estudo, diagnóstico e tratamento do ofidismo.....	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5 METODOLOGIA	34
5.1 Venenos e Soros	34
5.2 Isolamento da PLA ₂ por cromatografia de troca iônica	34
5.3 Eletroforese SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia	34
5.4 Teste de atividade de PLA ₂	34
5.5 Produção do anticorpo monoclonal pela tecnologia de hibridoma	35
5.5.1 Cultivo de células de mieloma de camundongo (PX-X63-Ag8)	35
5.5.2 Cronograma de Imunização	35
5.5.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para avaliação do título dos anticorpos no soro dos camundongos	36
5.5.4 Verificação da reatividade do soro frente os componentes da fração 1 por Western Blot	37
5.5.5 Fusão dos esplenócitos e células PX-X63-Ag8	37

5.5.6 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por ELISA	38
5.5.7 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por Western Blot	38
5.5.7 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos subclones por ELISA	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Separação da PLA ₂ do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	40
6.2 SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia	42
6.3 Teste de atividade fosfolipásica das frações obtidas por cromatografia	44
6.4 Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros frente o veneno total de <i>B.jararaca</i> e frente a fração 1	45
6.5 Verificação da reatividade do soro frente os componentes da fração 1 por Western Blot	48
6.6 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por ELISA	49
6.7 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por Western Blot	51
6.7 Avaliação dos anticorpos produzidos pelos subclones por ELISA	53
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Venenos são misturas complexas compostas majoritariamente por proteínas, carboidratos e lipídeos capazes de afetar diversos sistemas biológicos. Animais peçonhentos são aqueles que produzem veneno e são capazes de injetá-lo em presas ou predadores (SESA E MINISTÉRIO DA SAÚDE, [s.d.]). Quando o animal inocula o veneno na vítima, a ação das toxinas presentes no veneno desencadeia uma série de efeitos biológicos, como lesões teciduais e edema e, em casos de maior gravidade, choque cardiovascular e morte. No mundo, estima-se que 2,7 milhões de pessoas são envenenadas anualmente por serpentes, 1,2 milhões são vítimas de escorpionismo (WHO, [s.d.]) e no Brasil, apenas em 2020, foram notificados 29.087 casos de acidentes por aranhas (Ministério da Saúde/SVS, 2021). O principal gênero responsável pelos acidentes ofídicos é o gênero *Bothrops sp.*, que, apenas no Brasil, foi responsável por 20.720 casos notificados no ano de 2020. Entre as espécies de maior relevância no país está a *Bothrops jararaca*, conhecida popularmente como jararaca.

Dentre os componentes tóxicos presentes no veneno de *B. jararaca* encontram-se as fosfolipases A₂ (svPLA_{2s} - *snake venom phospholipases A2*), enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 do esqueleto fosfolipídico (SMITH et al., 1973). A atividade das svPLA_{2s} acarreta diversos efeitos pró-inflamatórios, determinados principalmente pelas características funcionais de cada svPLA₂. Seu principal efeito deletério é o dano tecidual induzido pela clivagem de fosfolipídeos de membrana (ZAMBELLI et al., 2017), no entanto PLA_{2s} específicas para certos substratos lipídicos podem provocar danos mais direcionados, como miotoxicidade e neurotoxicidade (DIXON E HARRIS, 1996; ROSSETO E MONTECUCCO, 2008).

Atualmente, a soroterapia é considerada o único método eficaz para tratar os efeitos sistêmicos do envenenamento, visto que ela pode ser direcionada às espécies causadoras da mordida, o que não ocorre em outras terapias (GUTIÉRREZ et al., 2017). No entanto, o custo de produção de antivenenos é alto e, por não serem drogas lucrativas, poucas farmacêuticas têm interesse em produzi-los (MORAIS E MASSALDI, 2006). Ademais, a maioria dos anticorpos presentes no soro não são específicos para os componentes do veneno (KNUDSEN E LAUSTEN, 2018), sendo uma população ainda

mais restrita de moléculas efetivamente neutralizantes. Nesse contexto, o emprego de anticorpos monoclonais, altamente específicos e com elevado grau de pureza, tem sido discutido tanto para neutralização de proteínas tóxicas quanto para o estudo dos mecanismos de ação das toxinas presentes no veneno de animais peçonhentos. Dessa forma, o presente estudo objetivou a produção de anticorpos monoclonais frente fosfolipases A₂ do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, a fim de avaliar seu potencial neutralizante e sua utilização no estudo das atividades biológicas destas Fosfolipases.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

No mundo, estima-se que por ano 5.400.000 de indivíduos são mordidos por serpentes, resultando em 1.800.000 até 2.700.000 de casos de envenenamento, 400.000 pessoas permanentemente debilitadas e entre 81.000 e 137.000 mortes (WHO, 2021). Essa taxa de mortalidade corresponde à metade das mortes por HIV/AIDS na Índia (THE LANCET, 2015), país com a terceira maior epidemia de HIV no mundo (CASTRO, 2017). O principal gênero responsável pelos acidentes ofídicos peçonhentos é o das serpentes *Bothrops sp.* (Jararacas), seguido de *Crotalus sp.* (Cascavéis), sendo raros os causados por *Lachesis sp.* (Surucucus) e *Micrurus sp.* (Corais verdadeiras).

A maioria dos acidentes ofídicos ocorrem na África, Ásia e na América Latina (WHO, 2021). Nesses continentes o contato entre serpentes e humanos é relativamente comum, especialmente em épocas de chuva. Em contraposição, habitantes de continentes como a América do Norte e a Europa não são tão expostos a serpentes venenosas e, por isso, desconhecem a dimensão desse problema de saúde pública (GUTIÉRREZ et al., 2017). Além disso, a maioria dos envenenamentos ocorrem com mulheres, crianças e agricultores em comunidades rurais pobres, em países de baixa e média renda (WHO, 2021). No oeste da África, o envenenamento por serpentes é uma causa significativa de morbidade materna e perda gestacional entre mulheres que habitam áreas rurais (HABIB et al., 2008). Devido a essa baixa visibilidade, apesar de sua grande relevância epidemiológica, o envenenamento ofídico recebe pouca atenção de autoridades públicas e indústrias farmacêuticas (GUTIÉRREZ et al., 2006) e só foi incluído na lista de doenças tropicais negligenciadas em 2009, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WARREL et al., 2010; XIAO et al., 2017).

No Brasil, em 2018, 2019 e 2020 foram notificados 28.667, 31.685 e 29.728 acidentes por serpentes no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), respectivamente, e as regiões com maior prevalência foram as regiões Norte, Nordeste e Sudeste (Tabela 1) (Ministério da Saúde/SVS, 2021). Nos três anos, o gênero *Bothrops sp.* foi o maior causador dos acidentes por serpentes, sendo responsável por 69,46% dos

casos em 2018, 68,77% dos casos em 2019, e 69,7% dos casos em 2020 (Tabela 2). Por fim, no Paraná, em 2019 e 2020 foram registrados 818 e 769 acidentes por serpentes, respectivamente (Ministério da Saúde/SVS, 2021).

TABELA 1. NÚMERO DE NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES POR SERPENTES, SEGUNDO ANO DO ACIDENTE E REGIÃO DO BRASIL.

Ano	Número de casos notificados de acidentes por serpentes					Total
	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	
2018	9.457	7.326	2.648	6.974	2.262	28.667
2019	10.649	8.895	3.084	6.757	2.300	31.685
2020	10.364	8.751	2.812	5.706	2.095	29.728

FONTE: Adaptado do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net.

TABELA 2. NÚMERO DE NOTIFICAÇÕES REGISTRADAS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES POR SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops sp.* SEGUNDO ANO DO ACIDENTE E REGIÃO DO BRASIL.

Ano	Número de casos notificados de acidentes por <i>Bothrops sp.</i>					Total
	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	
2018	7.989	3.847	1.983	4.601	1.491	19.911
2019	8.868	4.771	2.269	4.343	1.539	21.790
2020	8.796	4.859	2.084	3.599	1.382	20.720

FONTE: Adaptado do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

2.2 *Bothrops sp.*

Bothrops sp. é um gênero pertencente à família Viperidae e as espécies desse gênero são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos peçonhentos nas Américas. As espécies diferem em seu padrão de coloração, tamanho e ação do veneno (CAMPBELL E LAMAR, 2004). No Brasil, as espécies de maior relevância no Brasil são *B.alternatus* (urutu, urutu-cruzeiro, cruzeira), *B.atrox* (jararaca, jararaca-do-norte, jararaca-do-Amazonas), *B.cotiara* (cotiara), *B. erythromelas* (jararaca-da-seca, jararaca-do-sertão), *B.jararaca* (jararaca, jararaca-preguiçosa), *B. jararacussu* (jararacuçu), *B.*

leucurus (jararaca) *B. moojeni* (caiçara) e *B. neuwiedi* (jararaca-pintada, jararaca-de-rabo-branco) (CARDOSO, 2009).

2.2.1 *Bothrops jararaca*

Bothrops jararaca é uma espécie pertencente ao gênero *Bothrops sp* que está distribuída no Brasil nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e no leste do Mato Grosso do Sul. É encontrada em diversos habitats, como florestas tropicais, florestas semi-tropicais, campos abertos, cerrados (GOMES E PUORTO, 1993) e até mesmo grandes centros urbanos, onde habitam pequenas áreas de mata (MORAES, 2008 apud PUORTO et al., 1991). Essas serpentes permanecem ativas durante a maior parte do ano, principalmente nos meses mais quentes e úmidos, e apresentam atividade majoritariamente noturna. Cada espécime pode alcançar até 160 centímetros de comprimento (CAMPBELL E LAMAR, 2004), possuem coloração variável e apresentam manchas escuras triangulares espalhadas nas laterais do corpo e manchas claras mais difusas às quais não seguem um padrão específico (Figura 1). Essa coloração torna as serpentes pouco visíveis no ambiente e, aliado a variedade de habitats, contribui para o aumento da ocorrência de acidentes ofídicos (SAZIMA E MANZANI, 1995).

A**B**

FIGURA 1. Fotografias de *Bothrops jararaca*. FONTE: (A) Klimanaturali; (B) Moraes (2008).

2.3 Veneno Botrópico

A composição dos venenos das serpentes é extremamente diversa e complexa (CALVETE, 2011), 90% do veneno botrópico é composto por proteínas, incluindo toxinas enzimáticas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas e os outros 10% são constituídos por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (BLANCO E MELO, 2014). Essa diversidade na composição dos venenos leva a uma ampla gama de manifestações clínicas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Venenos de serpentes pertencentes à família Viperidae podem causar danos locais no tecido, como necrose de tecidos moles, bolhas, edema e hemorragias, mas também podem provocar hemorragia sistêmica, que juntamente com o aumento da permeabilidade vascular pode levar a choque hipovolêmico (GUTIÉRREZ et al., 2017). As principais famílias de proteínas com atividades tóxicas no veneno de viperídeos são as fosfolipases A_2 (svPLA₂, do inglês *snake venom phospholipases A₂*), metaloproteinases (SVMP, do inglês *snake venom metalloproteinases*), serino-proteinases (SVSP, do inglês *snake venom serine-proteinases*), hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAAO), toxinas de três dígitos (3FTX do inglês, *three-finger toxins*), lectinas do tipo C, desintegrinas, peptídeos vasoativos e proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSP, do inglês *cysteine rich secretory protein*) (GUTIÉRREZ et al., 2017) (Figura 2a). Uma análise proteômica realizada por Tasoulis e Isbister (2017) com 10 espécies do gênero *Bothrops sp.* demonstrou que a maior parte do veneno dessas espécies é composto por svPLA₂s, SVSPs e SVMPs (Figura 2b).

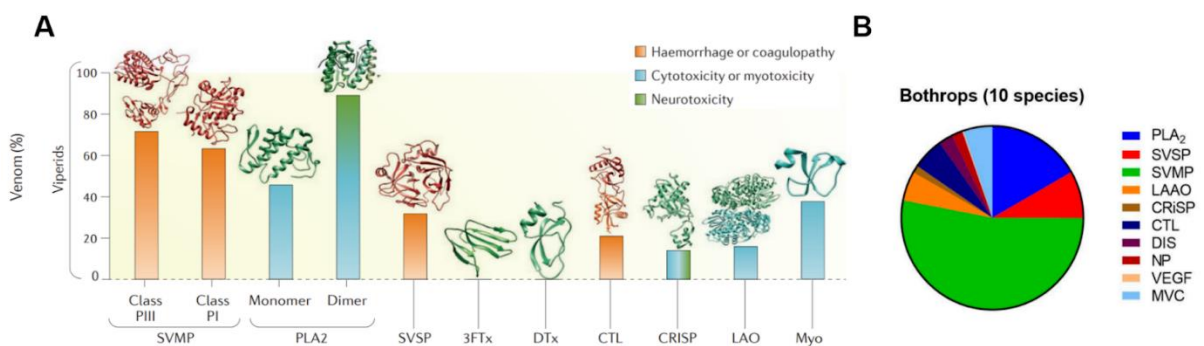


FIGURA 2. (A) Nível das toxinas no veneno de viperídeos. O gráfico ilustra os níveis de proteínas (expressos como % do proteoma do veneno total). As cores das barras representam as atividades

biológicas mais relevantes da família da toxina correspondente. As estruturas cristalográficas ou de ressonância magnética nuclear de alguns membros de cada família são mostradas acima das barras. Fonte: Adaptado de Gutiérrez et al., (2017). **(B)** Composição do veneno do gênero *Bothrops sp.* com base na análise proteômica de 10 espécies (Adaptado de Tasoulis e Isbister, 2017). SVMP: Metaloproteinase do veneno de serpente; PLA₂: Fosfolipase A₂; SVSP, Serinoprotease de veneno de serpente; LAAO/LAO: L- aminoácido oxidase; CRiSP: proteína secretória rica em cisteína; CTL: Lectinas tipo C; DIS: Desintegrinas; NP: Peptídeo Natriurético; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; MVC: componentes menores do veneno; DTx: dendrotoxina; 3FTx: Toxinas de três dígitos.

As Metaloproteinases do veneno de serpentes compõem um grupo diverso de proteínas de múltiplos domínios com atividades biológicas variadas. Essas proteínas são divididas em três classes, P-I (20-30kDa), P-II (30-60kDa) e P-III (60-100kDa) com base na massa e na composição de domínios (OLAoba et al., 2020). As SVMPs são zinco dependentes (FOX E SERRANO, 2008) e promovem a hidrólise dos componentes da membrana basal dos capilares e da matriz extracelular, perturbando a estabilidade dos vasos sanguíneos e induzindo a hemorragia (ESCALANTE et al., 2011). Por sua vez, a hemorragia sistêmica pode causar hipovolemia e choque cardiovascular (WARRELL, 2010). Essas enzimas também possuem outras atividades biológicas, como degradação de fibrinogênio e fibrina, indução da apoptose e inibição da agregação plaquetária (OLAoba et al., 2020).

As serino-proteinases do veneno de serpentes são proteínas que possuem massa molecular entre 26-67 kDa, dependendo da quantidade de glicosilações (SERRANO E MAROUN, 2005) e que apresentam uma tríade catalítica conservada (Ser195, His57, Asp102) (PERONA E CRAIK, 1995). As SVSPs, no geral, interferem com as vias da cascata de coagulação, através da degradação proteolítica ou ativando componentes envolvidos com os processos de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária (SERRANO E MAROUN, 2005).

Já no veneno de *B. jararaca*, análises proteômicas revelaram que as classes de proteínas mais abundantes são SVMPs, SVSPs, lectinas do tipo C, CRiSPs, svPLA₂s e L-aminoácido oxidases (Figura 3) (NICOLAU et al., 2016; FARIAS et al., 2017; SOUSA et al., 2013).

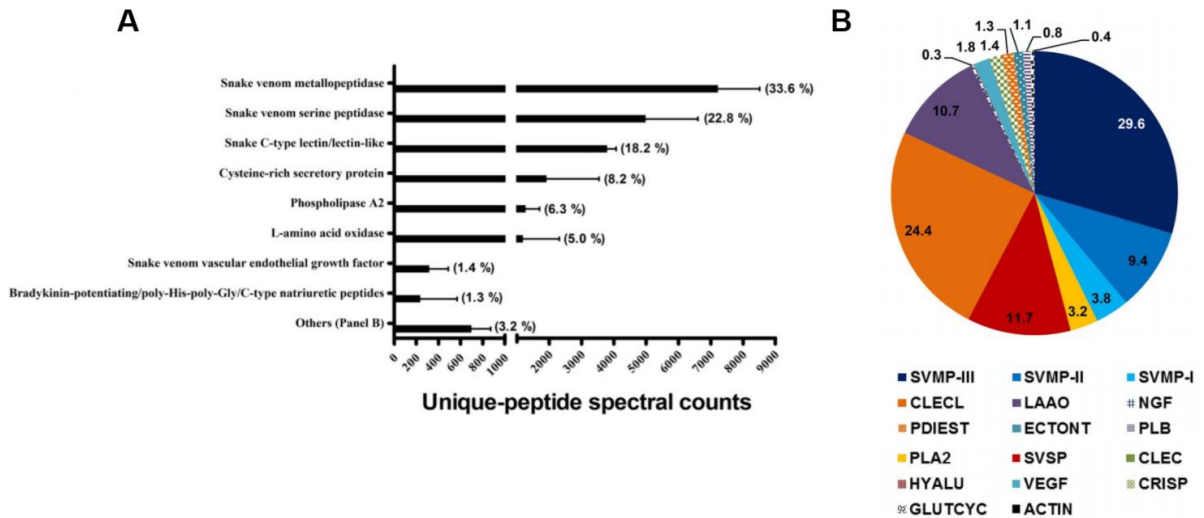


FIGURA 3. **(A)** Análise proteômica do veneno de *Bothrops jararaca*. Foram identificados 8 grupos de proteínas mais abundantes (a % corresponde a contribuição relativa dessas proteínas à composição do veneno). Fonte: Nicolau et al., (2017). **(B)** Distribuição das famílias de proteínas no veneno de *Bothrops jararaca*. Fonte: Adaptado de Sousa et al., (2013) SVMP I, II, III: Metaloproteinase classe P-I, P-II e P-III; PLA₂: Fosfolipase A₂; SVSP, Serinoprotease; LAAO: L- aminoácido oxidase; CRiSP: proteína secretória rica em cisteína; CLEC: Lectinas tipo C; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; NGF: fator de crescimento nervoso; HYALU: hialuronidase; PDIEST: fosfodiesterase 1; ECTONT: ecto-50-nucleotidase; PLB: fosfolipase B; GLUTCYC: glutaminil ciclase; ACTIN: actina;

2.4 Fosfolipases

As Fosfolipases (PL) são uma família de proteínas presentes desde organismos do reino Protista até organismos mais complexos do reino Animalia e estão envolvidas em vários processos, como homeostase de membranas, aquisição de nutrientes e geração de moléculas bioativas (KÖHLER et al., 2006). As PLs pertencem à classe das hidrolases e clivam majoritariamente acil-ésteres e fosfo-ésteres em diversos fosfolipídios (DENNIS, 2015). São classificadas em 4 grupos de acordo com o sítio de clivagem no substrato fosfolipídico (Figura 4) (ALOULOU et al., 2012).

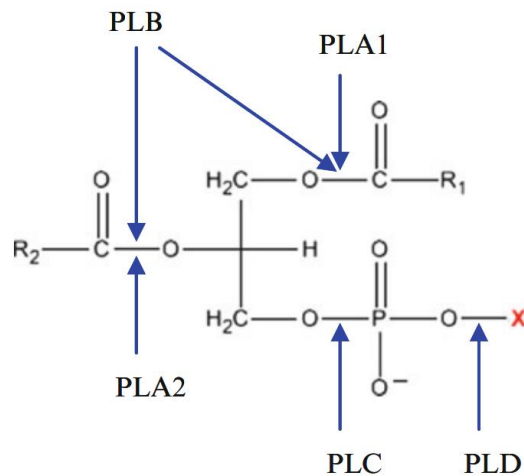


FIGURA 4. Sítios de clivagem de diversas fosfolipases em um dado fosfolípido de base X (E.g. colina, etanolamina, inositol). Os sítios de clivagem hidrolítica de cada família de fosfolipases estão indicados pelas setas em azul. Fonte: Adaptado de Aloulou et al., 2012.

As fosfolipases A (PLA₁) e as fosfolipases A₂ (PLA₂) catalisam a hidrólise da ligação éster na posição sn-1 (INOUE et al., 2005) e sn-2 do esqueleto fosfolipídico, respectivamente, e podem ser distinguidas pelo lisofosfolípido formado após a hidrólise (SMITH et al., 1973). As PLA₁s produzem ácidos graxos livres e 2-acil-lisofosfolípdeos, enquanto as PLA₂s produzem ácidos graxos livres e 1-acil-lisofosfolípdeos. Já os ácidos graxos ligados aos lisofosfolípdeos são clivados pelas fosfolipases B (PLB). As fosfolipases C (PLC) são definidas como fosfodiesterases e clivam a ligação glicerofosfato do fosfolípido e as fosfolipases D (PLD) clivam a ligação fosfodiéster terminal, liberando o grupo base dos fosfolípdeos (ALLOULOU et al., 2012).

2.4.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

A superfamília das PLA₂s é a mais estudada dentre as PLs e os genomas de mamíferos contêm genes codificantes para mais de 30 PLA₂s ou enzimas relacionadas. Essa superfamília é dividida em diversas classes, com base em seu mecanismo catalítico (His/Asp, Ser/Asp, ou Ser/His/Asp hidrolase), localização, relações evolutivas, sequência aminoacídica, recursos funcionais e recursos estruturais, como massa molecular e padrões de ligações dissulfeto. As 6 principais classes são as fosfolipases citosólicas (cPLA₂), fosfolipases secretadas (sPLA₂), fosfolipases independentes de cálcio (iPLA₂),

acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), fosfolipases lisossomais e as fosfolipases específicas de tecido adiposo específica (AdPLA₂). (MURAKAMI et al., 2010).

As sPLA₂ são as PLs mais bem descritas. Elas possuem uma massa molecular entre 14 e 18 kDa e geralmente contêm entre 6-8 ligações dissulfeto (SCHALOSKI E DENNIS, 2006). Em geral, as sPLA₂ apresentam maior atividade com lipídeos aniônicos, como o fosfatidilglicerol, fosfatidiletolamina e fosfatidilserina (DENNIS et al., 2011). Já foram identificadas 17 formas sPLA₂ em mamíferos, insetos, moluscos, répteis, plantas e bactérias e essas apresentam diferentes padrões de distribuição nos tecidos e funções fisiológicas distintas (SIX E DENNIS, 2000). As sPLA₂ são divididas nos grupos: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII,, XIII e XIV com base nos seus padrões de ligações dissulfeto e na ordem de suas descobertas (SCHALOSKI E DENNIS, 2006; FILKIN; LIPKIN; FEDOROV, 2020).

Uma característica das sPLA₂ é a capacidade de ativação interfacial, isto é, apresentam atividade aumentada em soluções oligoméricas em comparação com os mesmos substratos em soluções monoméricas (VERGER, 1997). Esse grupo de enzimas utiliza como sítio ativo uma díade Asp/His e requer Ca⁺² para sua atividade catalítica. Por isso, a maioria das sPLA₂ possuem o sítio catalítico e a região de ligação ao Cálcio (*Ca⁺² binding loop*) altamente conservados (Figura 5). O cálcio é altamente necessário para hidrólise. As sPLA₂ utilizam o sítio catalítico His, assistido pelo Asp para polarizar uma molécula de H₂O ligada que, por sua vez, ataca o grupo carbonila. O cálcio estabiliza o estado de transição coordenando o grupo carbonil e a carga negativa do oxigênio do fosfato (DENNIS et al., 2011).

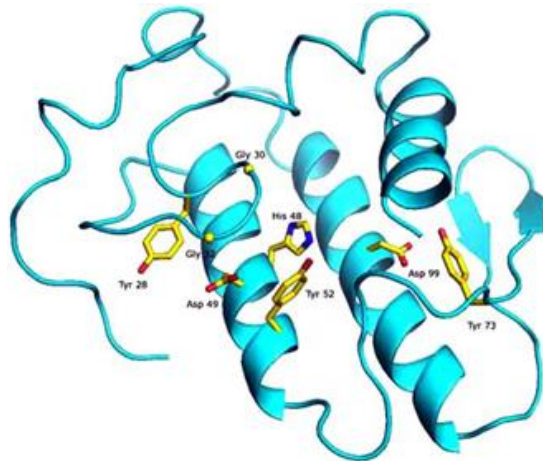


FIGURA 5. Representação esquemática da estrutura tridimensional de uma típica Fosfolipase A₂ (svPLA₂) monomérica de veneno de serpente. Os íons Ca²⁺ se ligam ao resíduo de ácido aspártico, aos oxigênios carbonílicos da tirosina e à glicina do cálcio binding loop. Destacados estão os aminoácidos essenciais para a ligação de Ca²⁺ (Y28, G30, G32, D49) e os pertencentes ao sítio catalítico (H48, D99, Y73). Fonte: Adaptado de Marcussi et al., 2007.

2.4.2 Fosfolipases do veneno de serpentes (svPLA₂s)

As fosfolipases de serpentes pertencem à classe das sPLA₂ e fazem parte do grupo IA (PLA₂s presentes no veneno de elapídeos), do grupo IIA (PLA₂s presentes no veneno de viperídeos e crotalíneos) e do grupo IIB (PLA₂s do veneno de *Bitis gabonis*) (WARD et al., 2000). O grupo IIA ainda pode ser dividido em subgrupos com base no aminoácido que ocupa a posição 49 na sequência aminoacídica. Dentre os aminoácidos que ocupam essa posição estão a Asp49, Lys49, Arg49 ou Ser49, sendo o ácido aspártico e a lisina os aminoácidos mais comuns (MATSUI et al., 2019). Embora as PLA₂s apresentem semelhança na sequência aminoacídica, essa alteração no resíduo -49 acarreta atividades fosfolipásicas distintas. PLA₂s que apresentam um resíduo de Asp na posição 49 (Asp49PLA₂) possuem a atividade clássica de fosfolipase, catalisando a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 do esqueleto fosfolipídico (INOUE et al., 2005). Contudo, PLA₂s que apresentam um resíduo de Lys na posição 49 (Lys49PLA₂) possuem pouca ou nenhuma atividade fosfolipásica (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004), pois perdem a capacidade de interagir com o cálcio, essencial para sua atividade catalítica (LOMONTE et al., 2003). As PLA₂s que possuem um resíduo de Asp na posição 49 ainda podem ter caráter básico, com pontos isoelétricos

entre 7 e 10 (DAMICO et al., 2005; CALGAROTTO et al., 2008; VINDAS et al., 2018), ou ácido com ponto isoelétrico entre 4 e 6 (FULTON et al., 2002; MODESTO et al., 2006; SOBRINHO et al., 2018) todas com atividade fosfolipásica.

A atividade das svPLA₂s acarreta diversos efeitos pró-inflamatórios determinados principalmente pelas características funcionais de cada svPLA₂ e os receptores com os quais interagem. A maioria dos venenos de viperídeos induz dano local ao tecido. Isso ocorre, pois as PLA₂s em geral possuem como um de seus substratos o ácido araquidônico (AA), componente das membranas celulares (ZAMBELLI et al., 2017). Quando o AA é clivado, ele serve de substrato para enzimas que irão desencadear a biossíntese de mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, óxido nítrico, bradicinina, histamina e citocinas. Esses componentes, em conjunto, induzem um aumento da permeabilidade vascular e a formação do exsudato (Figura 6), o qual contém fragmentos de proteínas, quimiocinas e moléculas associadas ao dano que podem potencializar a inflamação e contribuir para o dano tecidual (TEIXEIRA et al., 2009). Além disso, a resposta inflamatória exacerbada, pode levar a hemorragia e dor intensa (ZAMBELLI et al., 2017).

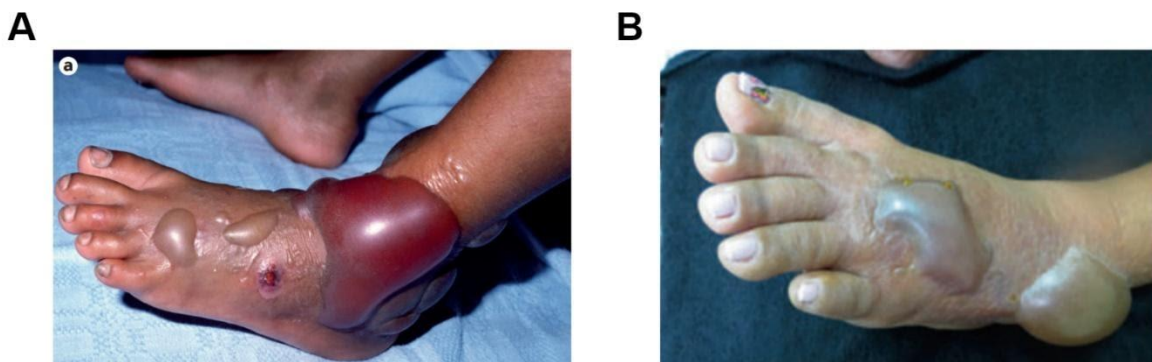


Figura 6. **(A)** Inchaço e bolha provocado após uma mordida no dorso do pé por *Bothrops jararaca* no Brasil. Fonte: Gutiérrez et al., (2017). **(B)** Manifestação local resultante de mordida por *Bothrops sp.* Fonte: Oliveira et al., (2016).

Outro efeito das PLA₂s é a mionecrose. Quando as PLA₂s miotóxicas se ligam e clivam a membrana plasmática das fibras musculares, há influxo de cálcio para o citosol, acarretando hipercontração do miofilamento, disfunção mitocondrial e outros eventos degenerativos, o que leva ao dano irreversível das células musculares (DIXON E

HARRIS, 1996). Já as Lys49PLA₂, exibem atividade mionecrótica sem provocar a hidrólise dos fosfolípidos (GUTIÉRREZ et al., 2009). Essas PLA₂ causam danos ao sarcolema através de interações hidrofóbicas (GUTIÉRREZ E OWNBY, 2003; CHIOATO et al., 2007).

Por fim, outro efeito distinto das PLA₂ é a neurotoxicidade. Alguns venenos de viperídeos podem conter neurotoxinas que induzem a paralisia flácida motora descendente, podendo causar dispnéia, insuficiência respiratória e tetraplegia flácida. Dois principais grupos de neurotoxinas são encontrados no veneno de serpentes, as α -neurotoxinas e as β -neurotoxinas (GUTIÉRREZ et al., 2017). As β -neurotoxinas são majoritariamente PLA₂s neurotóxicas que induzem a hidrólise de fosfolípidos na membrana plasmática no nervo terminal pré-sináptico das junções neuromusculares (ROSSETO E MONTECUCCO, 2008). O rompimento da membrana leva a uma série de processos fisiológicos, que por sua vez levam a destruição dos terminais nervosos (HARRIS et al., 2000).

2.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico do envenenamento ofídico geralmente é realizado através do padrão dos sintomas e de anamnese. Frequentemente, os pacientes têm ciência de quando foram mordidos, e devido a isso, quando chegam à clínica um histórico inicial é realizado para definir-se a natureza e a gravidade do envenenamento. Perguntas, como qual foi o local da mordida, quando ocorreu a mordida, o que ele estava fazendo enquanto ele foi mordido, qual era a aparência da cobra que o mordeu e como ele está se sentindo, são realizadas. As respostas permitem que o tratamento adequado e urgente possa ser realizado. Se a serpente morta for levada a clínica ou uma foto estiver disponível, um especialista pode identificar a espécie. Caso o contrário, o diagnóstico é realizado através da descrição dos indivíduos e evolução dos sintomas, aliados a testes bioquímicos e exames de imagem (GUTIÉRREZ et al., 2017).

A soroterapia é o tratamento mais empregado no Brasil para a remediação de envenenamentos, isto porque o soro ou o antiveneno é o único antídoto eficaz para o tratamento dos efeitos sistêmicos do envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2017). Além

disso, a soroterapia pode ser direcionada às espécies causadoras da mordida, o que não ocorre em outras terapias. No Brasil, os soros antiofídicos são produzidos pelo Instituto Butantan (São Paulo), pela Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais), pelo Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) e pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (Paraná) e consistem em imunoglobulinas concentradas de equinos que foram hiperimunizados com um ou mais venenos. Os soros produzidos por esses fabricantes são o antibotrópico (SAB), anticrotálico (SAC), antibotrópico-crotálico (SABC), antibotrópico-laquélico (SABL) e antielapídico (SAE) (INSTITUTO VITAL BRAZIL; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS; INSTITUTO BUTANTAN; CENTRO DE PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLÓGICOS). No mundo, a maioria dos fabricantes de antiveneno digerem a IgG extraída do plasma dos animais com pepsina e papaína, a fim de remover a porção Fc e produzir fragmentos Fab e F (ab')₂, reduzindo as reações adversas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Contudo, reações ainda podem ser observadas, dentre as manifestações leves provocadas estão o rubor cutâneo, urticária, náuseas, vômito e crise asmátiforme. Já dentre as manifestações graves estão as arritmias cardíacas, hipotensão arterial, choque anafilático e quadro obstrutivo das vias respiratórias, embora estas últimas sejam menos frequentes. Reações tardias, como a doença do soro, também podem ocorrer. Nesse caso, os sintomas de urticária local ou generalizada, febre e artralgia aparecem de 1 a 15 dias após a administração do antiveneno (LOVRECEK E TOMIC, 2011; THEAKSTON et al., 2003).

Algumas desvantagens dos antivenenos são o seu alto custo de produção (MORAIS E MASSALDI, 2006) e a má distribuição em áreas onde é altamente necessário (HABIB E WARREL, 2013). Por não serem drogas lucrativas, o número de empresas farmacêuticas que produzem antivenenos está diminuindo. Em 2010, a empresa francesa Sanofi, que produzia o soro Fav-Afrique, frente as 10 espécies de serpentes mais venenosas da África, encerrou a produção de antivenenos (ARNOLD, 2016). Ademais, os anticorpos do soro também contêm baixa especificidade em relação aos componentes biologicamente ativos do veneno. Como os animais são imunizados com o veneno bruto das serpentes, parte da resposta imune é direcionada para proteínas não tóxicas e pouco antigênicas (KNUDSEN E LAUSTEN, 2018). Em vista disso, o uso de anticorpos monoclonais (mAbs), que são altamente específicos e puros, tem sido discutido para

neutralização de proteínas tóxicas do veneno de animais peçonhentos e futura substituição do uso de soros heterólogos (CHOW E CASADEVALL, 2012).

2.6 Uso de biossensores para estudo, diagnóstico e tratamento do ofidismo

Nos últimos anos, surgiu um interesse na produção de misturas de anticorpos monoclonais, pois, devido à complexidade dos venenos de serpentes, é improvável que um único anticorpo seja capaz de neutralizar os efeitos do veneno total (LAUSTSEN et al., 2017). Além disso, os mAbs são ferramentas essenciais para a investigação de diversos mecanismos imunológicos (NELSON et al., 2000) e podem auxiliar na elucidação de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia dos envenenamentos (ALVARENGA et al., 2021). Dessa forma, diversos grupos têm desenvolvido anticorpos monoclonais e recombinantes frente as mais diversas toxinas do veneno de serpentes na tentativa de neutralização e estudo dessas proteínas. No contexto das PLA₂s encontradas em venenos ofídicos, Lomonte e Kahan, (1988) produziram 7 anticorpos monoclonais murinos, dos quais 2, mAb3 e mAb4, foram capazes de neutralizar a atividade das PLA₂s miotóxicas I e II encontradas no veneno de *Bothrops asper* (Lomonte et al., 1992). Em seguida, Chang et al., (1991) produziram três anticorpos monoclonais frente PLA₂s presentes no veneno de *Naja naja atra*, dos quais 2, 1E531 e 5F92 foram capazes de inibir a atividade enzimática da proteína. Choumet et al., (1992) produziram anticorpos monoclonais frente a subunidade fosfolipásica da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e observaram uma reatividade cruzada com a agkistrotoxina, uma PLA₂ neurotóxica do veneno de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. Lafaye et al., (1997) também desenvolveram anticorpos monoclonais recombinantes frente a crotoxina no formato de fragmento variável de cadeia única (scFv), através da técnica de phage display. Já Gowda & Middlebrook (1994), produziram 4 anticorpos monoclonais frente a fosfolipase básica, VRV-PL-VIIIa, presente no veneno de *Vipera russelli*, os quais foram capazes de neutralizar a atividade enzimática das PLA₂s. Kanashiro et al., (2002) desenvolveram anticorpos monoclonais frente as fosfolipases miotóxicas, BaPLA₂I e BaPLA₂III, do veneno de *Bothrops atrox*, os quais foram incapazes de neutralizar a atividade edematogênica dessa enzima, mas foram capazes de bloquear a mionecrose induzida por elas em um ensaio de

neutralização *in vivo*. Tamarozzi et al., (2006) também utilizaram a técnica de phage display para produção de scFvs humanos frente as toxinas BthTX-I e BhTX-II (svPLA₂) da serpente *Bothrops jararacussu* e obtiveram fragmentos que inibiram a atividade fosfolipásica e a miotoxicidade dessas svPLA₂. Esse estudo foi continuado e, posteriormente, Roncolato et al., (2013) demonstraram que estes scFvs reconheceram as svPLA₂ contidas nos venenos de *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni* e parcialmente inibiam a atividade fosfolipásica *in vitro*.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a relevância epidemiológica de acidentes causados pelas serpentes do gênero *Bothrops sp.* e a representatividade molecular e toxicológica das svPLA₂s em seus venenos, se faz de grande importância o desenvolvimento de biomoléculas anti-svPLA₂ para estudo e neutralização dos seus efeitos. Nesse contexto, os anticorpos monoclonais são uma boa opção, visto que são altamente específicos e possuem alto grau de pureza. No entanto, até o momento, no Brasil, não existem grupos que tenham produzido anticorpos monoclonais com especificidade para as svPLA₂s presentes nos venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. alternatus* que apresentem altos níveis de proteção dos efeitos deletérios induzidos por tais toxinas.

Além disso, com a técnica de humanização de anticorpos, a qual visa o transplante das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) presentes nas regiões hipervariáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo não-humano à uma região de *framework* de um anticorpo humano, há a possibilidade de se utilizar os mAbs como tratamento, diminuindo ou eliminando as reações adversas que ocorrem com a utilização de soros ou mesmo mAbs, heterólogos. Os anticorpos humanizados são vistos como uma solução viável, pois sua construção e expressão pode ser realizada tanto em sistemas procariotos como eucariotos, possibilitando a síntese e expressão de grandes quantidades de anticorpos, diminuindo-se potencialmente o custo de produção e aumentando-se o rendimento.

Ademais, a utilização de anticorpos monoespecíficos ou misturas de mAbs pode auxiliar no desenvolvimento de imunoterapias mais específicas, as quais permitem a utilização de uma menor quantidade de antivenenos. Por fim, os mAbs podem auxiliar na elucidação de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia dos envenenamentos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é a produção e caracterização de um anticorpo monoclonal anti-svPLA₂s da espécie *Bothrops jararaca* e avaliação de seu potencial neutralizante, bem como sua utilização para o estudo das atividades biológicas destas Fosfolipases.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Produção e caracterização de um anticorpo monoclonal frente Fosfolipases A₂ do veneno de serpentes *Bothrops jararaca*.

4.2 Objetivos Específicos:

- Purificação das Fosfolipases A₂ do veneno de *Bothrops jararaca*;
- Imunização de camundongos com as svPLA₂s;
- Produção e caracterização de anticorpos policlonais frente svPLA₂s;
- Produção, seleção e expansão de hibridomas capazes de secretar anticorpos monoclonais frente svPLA₂s;
- Caracterização dos anticorpos monoclonais quanto a especificidade frente a ao veneno botrópico, pelo emprego das técnicas imunoquímicas, como ELISA e *Western Blotting*;
- Avaliação da capacidade dos anticorpos monoclonais em inibir diferentes efeitos deletérios provocados pelas fosfolipases e pelo veneno total de *B. jararaca*.

5 METODOLOGIA

5.1 Venenos e soros

O veneno de *Bothrops jararaca*, assim como o soro antiofídico foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI – Piraquara, PR, Brasil).

5.2 Isolamento da PLA₂ por cromatografia de troca iônica

Para isolar a PLA₂ do veneno de *Bothrops jararaca* foi utilizada a técnica de cromatografia de troca iônica consoante Andrião-Escarso et al., (2000) com modificações. Brevemente, 15 mg do veneno de *Bothrops jararaca* foi re-suspenso em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ - AMBIC) 50 mM (pH 8,0), homogeneizado e centrifugado a 1000 xg durante 5 minutos. O veneno foi fracionado em uma coluna contendo a resina Sephadex CM50 (Sigma-Aldrich). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão AMBIC 50 mM. Por fim, a amostra foi eluída sob gradiente de 50 mM a 500 mM de AMBIC, sob fluxo de 1mL/min. As frações foram coletadas e foi realizada uma leitura no espectrofotômetro a 280 nm. Para identificar se houve isolamento da fração de interesse foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE e testes de atividade de PLA₂.

5.3 Eletroforese SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia

Para identificar a PLA₂ nas frações obtidas por cromatografia, foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE. As frações 1, 2 e 3 (1 µg) obtidas por cromatografia de troca catiônica foram resolvidas em gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras e não redutoras (presença ou ausência do β-mercaptoetanol, respectivamente). Subsequentemente, o gel foi corado e as bandas evidenciadas por nitrato de prata (AgNO₃) ou Coomassie Blue.

5.4 Teste de atividade de PLA₂

Para definir quais frações apresentavam atividade fosfolipásica, um teste de atividade de PLA₂ em placas ágar-gema de ovo foi realizado, de acordo com os

protocolos descritos por Gutiérrez et al. (1987), alterando-se os eritrócitos ovinos por eritrócitos humanos. Brevemente, 0,2g de agarose foram dissolvidas em 25 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (pH 8,1) e aquecidos até 100°C. Uma vez que a temperatura atingiu 50°C, foram adicionados 0,3 mL de eritrócitos humanos, 0,3 mL de gema de ovo e 0,055 g de CaCl₂. A mistura foi colocada em Placas de Petri para polimerizar. Em seguida, foram realizados furos de 3 mm de diâmetro que foram preenchidos com: as frações 1, 2 e 3 (2,5 µg) obtidas por cromatografia nos dias 22, 24, 26 e 11, PBS (controle negativo) e veneno de *Bothrops jararaca* (2,5 µg) (controle positivo). As placas foram incubadas à 37°C durante 20 horas. Após o tempo de incubação, o diâmetro dos halos formados foi mensurado com auxílio de uma régua.

5.5 Produção do anticorpo monoclonal pela tecnologia de hibridoma

Para produzir os anticorpos monoclonais frente as PLA₂s do veneno de *Bothrops jararaca* foi empregada a tecnologia de hibridoma, segundo o protocolo descrito por Becker-Finco et al., (2012), com modificações, utilizando a linhagem de mieloma P3-X63-Ag8 (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). O projeto foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR) e obteve aprovação para realização em 17/03/2020 (certificado n° 1342).

5.5.1 Cultivo de células de mieloma de camundongo (P3-X63-Ag8)

A linhagem de células P3-X63-Ag8, derivada de plasmacitoma de camundongo BALB-c, foi descongelada e cultivada em DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) (Sigma) e 1% de penicilina-streptomicina (v/v) (Gibco) durante 1 semana. As células foram mantidas em estufa a 37°C e gás carbônico (CO₂) a 5%.

5.5.2 Cronograma de Imunização

Os camundongos foram imunizados com veneno de *B. jararaca* e com as frações contendo fosfolipases A₂ de acordo com o cronograma (Tabela 3). Foram realizadas 4 doses, sendo a primeira com veneno bruto de *B. jararaca* aplicada via subcutânea e as

outras 3 doses com as frações obtidas através da cromatografia por via intraperitoneal e subcutânea. Por fim, um *booster* foi realizado com a fração que contém PLA₂, por via endovenosa.

TABELA 3: CRONOGRAMA DE IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS.

Cronograma de Imunização				
ETAPA	DATA	ADJUVANTE	ANTÍGENO	VIA
Dose 1	13/08/2021	Completo de Freund	Veneno <i>Bothrops jararaca</i> (3µg)	Subcutânea
Dose 2	13/09/2021	Incompleto de Freund	F1 (5µg)	Subcutânea
Sangria 1	20/09/2021	-	-	Retro-orbital
Dose 3	28/09/2021	Incompleto de Freund	F1 (5µg)	Intraperitoneal
Sangria 2	05/10/2021	-	-	Retro-orbital
Dose 4	15/10/2021	Incompleto de Freund	F1 (5µg)	Intraperitoneal (C1) Subcutânea (C2)
Sangria 3	22/10/2021	-	-	Retro-orbital
Booster	02/11/2021	-	F1 (2µg)	Endovenosa

FONTE: O autor (2021).

5.5.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para avaliação do título dos anticorpos dos camundongos

Para avaliar o título dos anticorpos dos camundongos imunizados com o antígeno de interesse, um ELISA indireto foi realizado. A fração 1 e o veneno de *B. jararaca* (0,15µg) foram imobilizados em placas de poliestireno de 96 poços, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, após sucessivas lavagens, a placa foi saturada com caseína 2%, em PBS, por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi novamente lavada e incubada com o soro dos

camundongos imunes, nas diluições 1:100, 1:500, 1:5000, 1:10000, 1:20000 e 1:40000 por 1 hora a 37°C. Como controle negativo foi utilizado soro de camundongo não imune na diluição 1:100 e como controle positivo foi utilizado soro de um camundongo previamente imunizado com veneno de *B.jararaca* e F1 na diluição 1:100. Após as lavagens, anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (HRP) foi adicionado à placa, na diluição 1:4000, e incubado durante 1 hora, a 37°C. A revelação foi realizada através da adição de ortofenilenodiamino (OPD) e H₂O₂ e foi interrompida com ácido sulfúrico (1:20). As leituras de absorbância serão feitas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

5.5.4 Verificação da reatividade do soro frente os componentes da fração 1 por Western Blot

Para avaliar a reatividade dos anticorpos frente os componentes da fração foi realizado um Western Blot. Para isso, a fração 1 (100µg) foi resolvida em um gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras e transferida para uma membrana de nitrocelulose durante 2 horas à 100V. Após, a membrana foi saturada (caseína 5%/tween 0,2%) durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada com PBS-T 0,05%, cortada em tiras e incubada durante 1 hora à 37°C com soro do camundongo 2 na diluição 1:5000, soro antibotrópico na diluição 1:5000, como controle positivo, e com soro de camundongo não imune na diluição 1:5000, como controle negativo. Após sucessivas lavagens com PBS-T 0,05%, a membrana incubada com soro do camundongo 2 e a membrana incubada com o soro de camundongo não imune foram incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (HRP) na diluição 1:4000 e a membrana incubada com soro antibotrópico foi incubada com anti-IgG de cavalo conjugado com a enzima peroxidase (HRP) na diluição de 1:30.000 durante 1 hora à 37°C. Após 2 lavagens com PBS-T 0,05% e 3 lavagens com PBS, o ensaio foi revelado através da adição de DAB/cloronaftol.

5.5.5 Fusão dos esplenócitos e células P3-X63-Ag8

Uma vez que o cronograma de imunização foi concluído e foi confirmado um título alto de anticorpos no soro dos camundongos (absorbância (492 nm) superiores a 1.0 na

diluição 1:100), o camundongo com valor absoluto mais alto de absorvância, foi selecionado, eutanasiado e teve seu baço removido. Os esplenócitos foram individualizados e fundidos a 1×10^7 células de mieloma modificadas (P3-X63-Ag8) com a utilização do agente polietilenoglicol (PEG) (Sigma). As células foram distribuídas em 5 placas de 96 poços e foram cultivadas em DMEM, (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v), penicilina-estreptomicina 100 U/mL/100 µg/MI (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), 2% de Hipoxantina, Aminopterina e Timidina, (HAT Media Supplement (50x) Hibri-Max (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em estufa a 37°C e gás carbônico (CO₂) a 5%.

5.5.6 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por ELISA

Para avaliar a reatividade dos clones frente a PLA₂, um ELISA indireto foi realizado, no 14º dia após a fusão nas mesmas condições descritas em 5.5.3, com algumas modificações. A fração 1 e o veneno de *B. jararaca* (0,25µg) foram imobilizados em placas de poliestireno em um volume final de 50µl por poço, *overnight* a 4°C. A placa foi incubada com 50µl do sobrenadante dos hibridomas e o com 50µl de anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (HRP) na diluição de 1:4.000. Como controle negativo foi utilizado sobrenadante das células P3-X63-Ag8 mortas. Os poços que, após a fusão, apresentavam anticorpos específicos para os antígenos de interesse foram nomeados de clones. 16 clones foram expandidos para uma placa de 24 poços para cultura de células e testados novamente por ELISA nas mesmas condições citadas acima. Após a confirmação da reatividade, os hibridomas reativos ao antígeno foram clonados através de diluição limitante. Os poços em que os hibridomas foram individualizados para a obtenção dos anticorpos monoclonais foram nomeados de subclones.

5.5.7 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por Western Blot

Para avaliar a reatividade dos anticorpos produzidos pelos clones frente os componentes presentes na fração 1 um Western Blot foi realizado nas mesmas condições

descritas em 5.5.4, com modificações. A membrana foi incubada com 1 mL dos sobrenadantes dos clones diluídos em 1 mL de PBS-T 0,05% durante 1 hora à 37°C. Como controle positivo foi utilizado soro do camundongo 2 na diluição de 1:5.000 e como controle negativo foi utilizado soro de camundongo não imune na diluição de 1.5.000.

5.5.8 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos subclones por ELISA

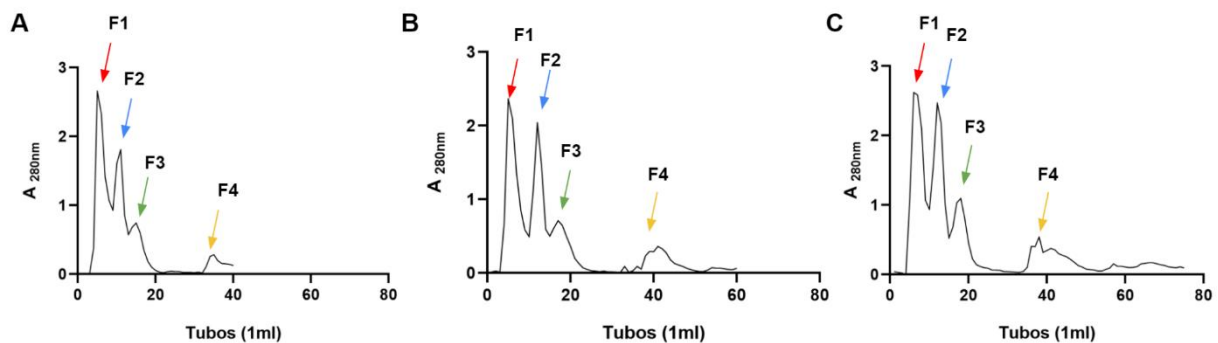
Para avaliar a reatividade dos hibridomas clonados por diluição limitante, um ELISA indireto foi realizado 14 dias após a clonagem nas mesmas condições descritas em 5.5.3 com algumas modificações. Primeiramente, com auxílio de um microscópio invertido, as placas de clonagem foram observadas para identificar em quais poços havia uma ou mais colônias de células. Nos poços onde havia colônias, foi coletado 100ul de sobrenadante para o teste. O veneno de *B. jararaca* (0,25µg) foi imobilizado em uma placa de poliestireno de 96 poços, *overnight* a 4°C. A placa incubada com 100µl do sobrenadante dos subclones. Como controle negativo, foi utilizado sobrenadante de uma célula irrelevante e como controle positivo, soro policlonal do camundongo 2 na diluição de 1:2.000. Os subclones que possuíam apenas uma colônia no poço e apresentaram uma absorbância maior que 0,5 foram expandidos para uma garrafa de cultivo celular T25.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Separação da PLA₂ do veneno de *Bothrops jararaca*

Com o objetivo de separar a PLA₂ do veneno de *Bothrops jararaca*, uma cromatografia de troca catiônica foi realizada conforme Andrião-Escarso et al., (2000). Ao todo, foram 6 cromatografias efetuadas nos dias 22/02/2021 (Figura 7A), 24/02/2021 (Figura 7B), 26/02/2021 (Figura 7C), 09/03/2021 (Figura 7D), 10/03/2021 (Figura 7E) e 11/03/2021 (Figura 7F).

Nas figuras 7A, 7B, 7C e 7F observou-se um mesmo perfil de separação com a presença de 4 picos proteicos, enquanto nas cromatografias realizadas nos dias 09 e 10 observou-se um perfil de separação diferente, com 3 picos proteicos. Devido a isso, para a realização das caracterizações por SDS-PAGE e teste de atividade fosfolipásica foram escolhidas as frações obtidas pelas cromatografias executadas nos dias 22, 24, 26 e 11, as quais apresentaram o mesmo padrão de separação. Para isso, com base nos picos proteicos obtidos nas cromatografias, foram determinadas 4 frações, chamadas de fração 1 (F1), fração 2 (F2), fração 3 (F3) e fração 4 (F4). Essas frações foram todas dialisadas frente PBS 1X e dosadas segundo o método de Bradford (BRADFORD.,1976), posteriormente aliqotadas e armazenadas a -20°C.



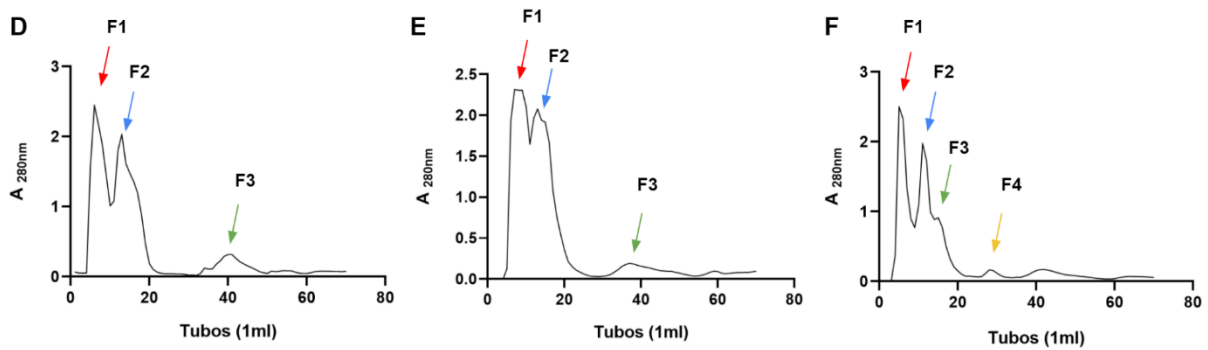


FIGURA 7. Comparação dos perfis cromatográficos do veneno bruto de *B.jararaca*. Em uma coluna Sephadex CM50, 15 mg do veneno de *B.jararaca* foram submetidos à cromatografias de troca iônica realizados nos dias 22/02/2021 (A), 24/02/2021 (B), 26/02/2021 (C), 09/03/2021 (D), 10/03/2021 (E) e 11/03/2021 (F). As eluições foram realizadas utilizando 50mM de tampão de bicarbonato de amônio (AMBIC), coletando 1 mL por tubo em um fluxo de 6 mL/hora. FONTE: O autor (2021).

A cromatografia de troca iônica é uma das técnicas mais utilizadas para separação de proteínas (BOLLAG, 1994), e por isso foi escolhida para isolamento das fosfolipases. No entanto, na literatura, a separação por troca iônica é empregada de forma combinada para a separação de componentes de venenos. O estudo de Cedro et al., (2018) visou isolar a PLA₂ do veneno de *B. jararaca*, mas para isso, utilizou a cromatografia de troca iônica após a realização de uma separação por exclusão molecular. Em vista disso, não foi possível sugerir em qual pico protéico estariam as PLA₂s. Ademais, na cromatografia de troca catiônica, as proteínas de caráter básico são eluídas primeiro (LOUGH E WAINER, 2006) contudo, como são encontradas fosfolipases A₂ com caráter básico e ácido (DAMICO et al., 2005; CALGAROTTO et al., 2008; VINDAS et al., 2018; (FULY et al., 2002; MODESTO et al., 2006; SOBRINHO et al., 2018), não foi possível utilizar desse critério para estimar em qual pico a proteína se encontrava. Por esses motivos, tornou-se necessária uma caracterização das frações obtidas para determinar a fração em que estaria a PLA₂.

6.2 SDS-PAGE das frações obtidas por cromatografia

Para avaliar o isolamento dos componentes do veneno, as frações obtidas por cromatografia foram resolvidas sob condições redutoras e não-redutoras em SDS-PAGE. Em condições redutoras foi possível observar bandas entre 6 e 15 kDa que sugerem a presença das PLA₂s nas frações 1, 2 e 3 nas cromatografias realizadas nos dias 26 (Figura 8B), 22 (Figura 9A), 24 (Figura 9B) e 11 (Figura 9C), quando coradas por Nitrato de Prata (AgNO₃). Já quando coradas por Coomassie Blue (Figura 8A), a banda que sugere a presença da PLA₂ só foi observada na Fração 1. Tal fato pode ser explicado pela diferença de sensibilidade dos métodos, dado que o Coomassie Blue é um método de coloração menos sensível em relação ao Nitrato de Prata (SIMPSON, 2007). No entanto, uma vantagem da coloração por Coomassie é possibilitar uma melhor quantificação da abundância relativa de cada proteína, devido a sua reduzida gama de linearidade (FREITAS., 2009), ou seja, o intervalo de concentrações no qual o método bioanalítico tem capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração de analito presente na amostra, com precisão e exatidão aceitáveis (SHAH et al., 2000). Dessa forma, outra vantagem da coloração é garantir a existência de quantidade suficiente de proteína para a sua subsequente identificação. Portanto, o aparecimento da banda na coloração por Coomassie em condições não redutoras sugere uma maior presença de PLA₂ na Fração 1 obtida por cromatografia.

Já em condições não redutoras não foram observadas bandas entre 6-15 kDa, mas entre 19-26 kDa. Isso já era esperado, visto que em sua maioria as PLA₂s são encontradas em sua forma dimerizada em condições não redutoras (SHIOMI et al., 1998; MATSUI et al., 2019). Além das bandas que sugerem a presença das PLA₂s também é possível observar outras bandas na altura de 64 kDa, que sugerem a presença das metaloproteinases e entre 28 e 35 kDa que por fim indicaria a presença das serino-proteinases (ZELANIS et al., 2010).

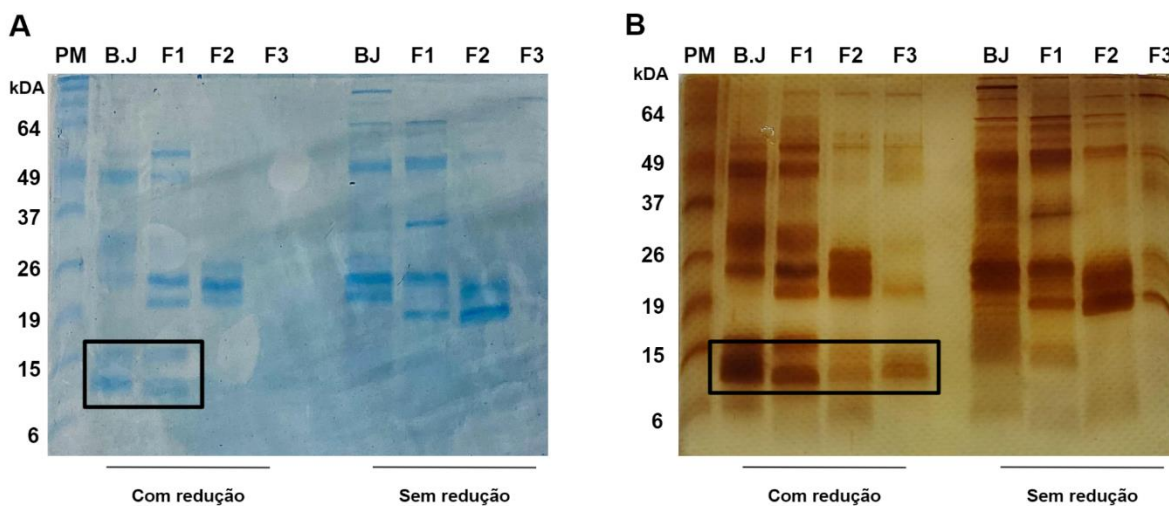


FIGURA 8. Perfil eletroforético das frações do veneno de *Bothrops jararaca* obtidas no dia 26/02/21. O veneno de *B. jararaca* (1 μ g) as frações 1 e 2 do veneno de *B. jararaca* (1 μ g) e a fração 3 (0,5 μ g) obtidas por cromatografia de troca iônica foram fracionadas por SDS-PAGE (gel de acrilamida 15%) sob condições redutoras e não redutoras e corados com Coomassie Blue (A) e por Nitrato de Prata (B). Os retângulos indicam as bandas de proteína que sugerem a presença das Fosfolipases. PM: Padrão molecular; B.J: Veneno total de *B. jararaca*; F1: Fração 1; F2: Fração 2; F3: Fração 3. FONTE: O autor (2021).

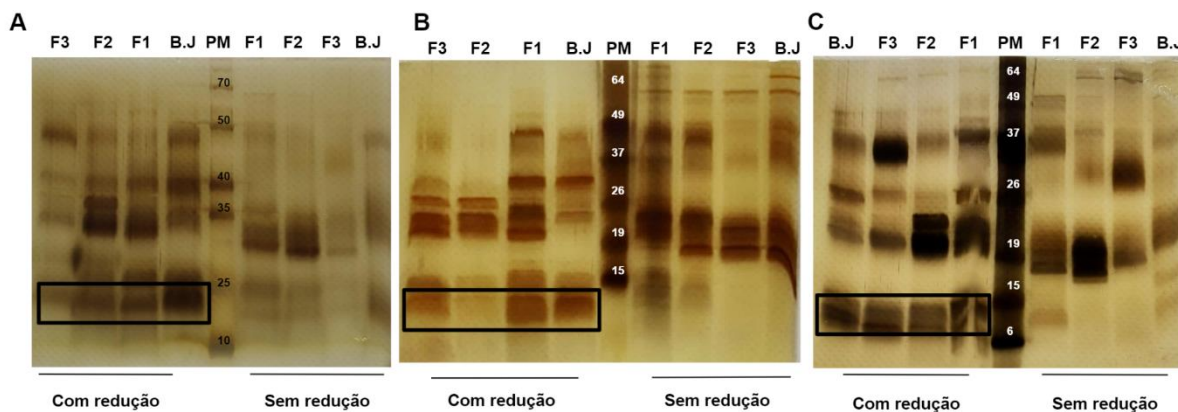


FIGURA 9. Perfil eletroforético das frações do veneno de *Bothrops jararaca*. O veneno de *B. jararaca* (1 μ g) as frações 1 e 2 do veneno de *B. jararaca* (1 μ g) e a fração 3 (0,5 μ g) obtidas por cromatografia de troca iônica nos dias 22/02/2021 (A), 24/02/2021 (B) e 11/03/2021 (C) foram fracionadas por SDS-PAGE (gel de acrilamida 15%) sob condições redutoras e não redutoras e corados por Nitrato de Prata. Os retângulos indicam as bandas de proteína que sugerem a presença das Fosfolipases. PM: Padrão molecular; B.J: Veneno total de *B. jararaca*; F1: Fração 1; F2: Fração 2; F3: Fração 3. FONTE: O autor (2021).

De maneira geral, isso demonstra que a eficiência da cromatografia de troca catiônica para a separação dos componentes do veneno foi baixa e mais etapas

cromatográficas consecutivas seriam necessárias para o isolamento das PLA₂s, como já é observado na literatura. Cedro et al., (2018) utilizaram três métodos cromatográficos para obtenção da PLA₂ purificada de *Bothrops jararaca*: cromatografia de exclusão molecular, seguida de duas cromatografias de troca iônica com diferentes colunas. Já Borja-Oliveira et al., (2006) utilizaram de dois métodos cromatográficos para o isolamento de uma PLA₂ neurotóxica do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*: cromatografia de exclusão molecular seguida de HPLC de fase reversa.

6.3 Teste de atividade fosfolipásica das frações obtidas por cromatografia

Para confirmar se as bandas observadas por SDS-PAGE correspondiam às PLA₂s, um teste de atividade fosfolipásica foi realizado em placas de agarose com eritrócitos humanos. Esse teste utiliza gema de ovo como fonte de lecitina, um fosfolipídio que pode ser degradado pelas PLA₂s. As fosfolipases A₂ presentes no veneno de *B. jararaca* são capazes de degradar a lecitina presente no meio, acidificando-o. Essa redução do pH provoca a lise das hemácias presentes no gel de agarose, levando a formação de um halo. A atividade fosfolipásica é proporcional ao tamanho do halo translúcido formado (HABERMANN E HARDT, 1972). Logo, ela foi mensurada a partir da medição do tamanho do halo formado pelas frações do veneno testadas. Como controle positivo, utilizou-se veneno bruto de *B. jararaca* e como controle negativo, tampão PBS. Foi possível observar que as frações 1 obtidas pelas cromatografias realizadas nos dias 24, 26 e 11 apresentaram uma maior atividade fosfolipásica em relação às frações 2 e 3 (Figura 10A), visto que o tamanho do halo formado por elas (entre 1,4 e 1,5 cm) foi similar ao tamanho do halo formado pelo veneno total de *Bothrops jararaca* (entre 1,3 e 1,5 cm) (Figura 10B). Esse resultado corroborou com o observado por SDS-PAGE, no qual a coloração por Coomassie evidenciou apenas a banda que sugere a presença da fosfolipase na fração 1, indicando uma maior presença de PLA₂ nessa fração. Dessa forma, a partir desses resultados, escolhemos utilizar a fração 1 como imunógeno para a produção do anticorpo monoclonal.

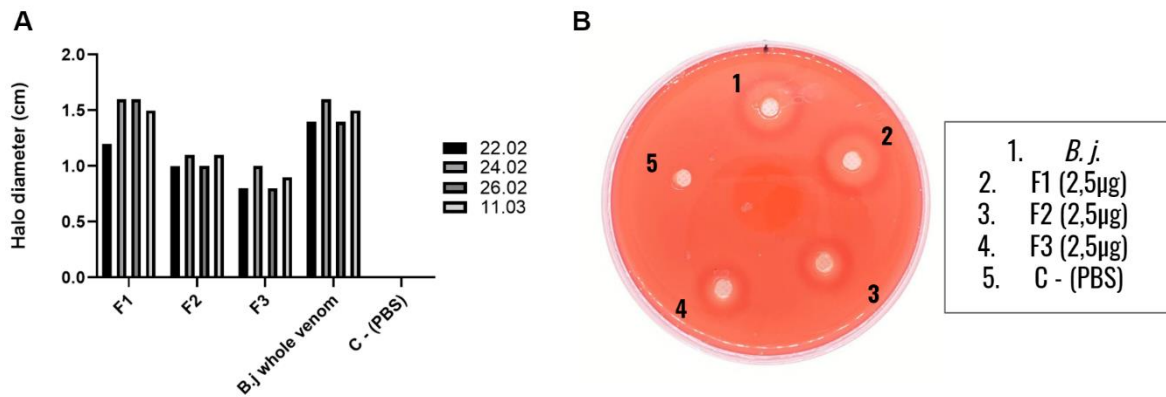


FIGURA 10. **(A)** Atividade de fosfolipase induzida pelo veneno de *B. jararaca*. O ensaio foi realizado em placas de agarose diluídas em PBS (pH 8,1). As frações 1, 2 e 3 do veneno de *B.jararaca* (2,5µg) obtidas por cromatografia de troca iônica nos dias 22/02/2021, 24/02/2021, 26/02/2021 e 11/03/2021 foram aplicadas na placa de agarose e incubadas por 20 horas no 37 ° C. O veneno de *B.jararaca* (2,5µg) foi usado como controle positivo e PBS como controle negativo. **(B)** Placa de atividade obtida com as frações do dia 11.03. A atividade da PLA2 está relacionada ao tamanho do halo translúcido (em cm) formado por cada amostra. C - (PBS): controle negativo; B.j: Veneno total de *B. jararaca*; F1: fração 1; F2: fração 2; F3: fração 3. FONTE: O autor (2021).

6. 4 Imunização dos camundongos e verificação da reatividade dos soros frente o veneno total de *B. jararaca* e frente a fração 1 por ELISA

Terminado o esquema de imunização, como descrito na metodologia, os soros dos camundongos (C1 e C2) foram testados frente ao veneno total de *B. jararaca* e F1 por ELISA. Como controle negativo, soro de camundongo não imune foi utilizado e como controle positivo, o soro de um camundongo previamente imunizado com os mesmos antígenos.

A reação se mostrou positiva até a última diluição testada (1:40.000) para o soro de ambos os camundongos e para ambos os antígenos (Figura 11A). Além disso, nota-se que quando o soro foi diluído 100 vezes, a absorbância obtida foi em torno de 1,2, já quando o soro foi diluído 10.000 vezes, a queda de reatividade foi de aproximadamente 25%, o que sugere que uma alta afinidade entre os anticorpos presentes no soro e os antígenos.

As Figuras 11B e 11C apresentam os resultados de titulação dos anticorpos após terceira e quarta doses, respectivamente. Em ambas as figuras é possível perceber a manutenção da reatividade dos anticorpos frente aos imunógenos. No entanto, pode-se observar na figura 11C, que a reatividade do soro do C2 frente a F1 foi maior em relação ao C1, nas maiores diluições, sugerindo que a aplicação via subcutânea é mais eficiente para a produção de anticorpos. Tal fato, corrobora com o que foi observado por Hendriksen & Leenaars (1998), os quais observaram diferenças mínimas no título de anticorpos entre as duas vias tanto em coelhos, como em camundongos. Os autores observaram que a via subcutânea foi mais eficaz para a produção de anticorpos e sugeriram que essa diferença pode ocorrer pois executar a injeção intraperitoneal corretamente é complexo e monitorar o local da injeção pode ser dificultoso. Esse resultado demonstra que o perfil da resposta imune depende da via de administração e essa deve ser considerada durante o cronograma de imunização.

Em seguida, após a verificação do título de anticorpos de ambos os camundongos, o C2 foi selecionado pelo valor absoluto mais alto de absorbância e foi realizada uma dose de reforço nesse animal via endovenosa para a realização da fusão dos esplenócitos e das células de mieloma.

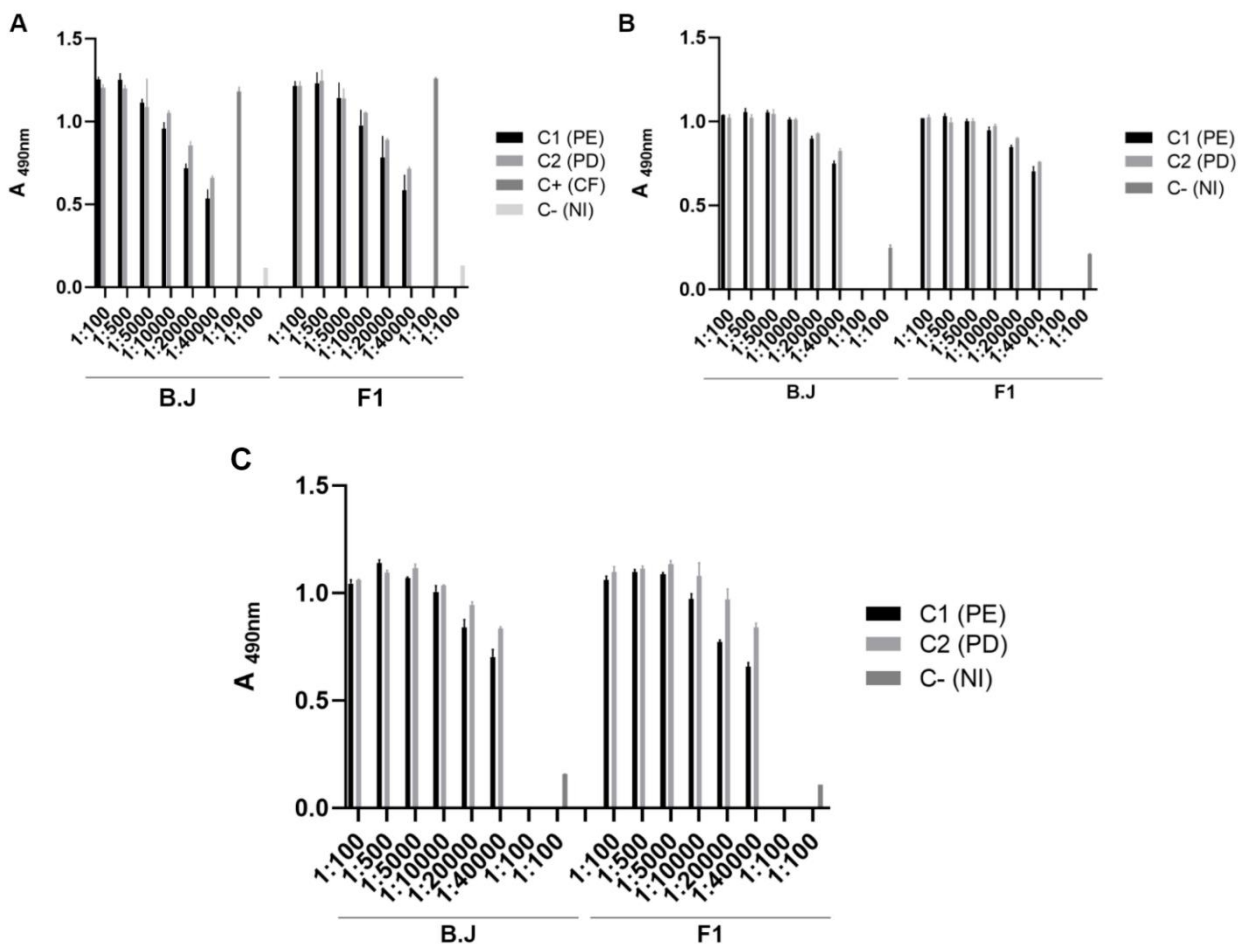


FIGURA 11. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos camundongos frente o veneno total de *B. jararaca* e frente a fração 1 do veneno de *B. jararaca* por ensaio ELISA na primeira (A), segunda (B) e terceira sangria (C). O veneno total de *B.jararaca* (0,15 µg) e a fração 1 (0,15 µg) do veneno de *B. jararaca* obtida por cromatografia de troca iônica foram imobilizados em uma placa e incubados com soro de camundongo previamente imunizado frente o veneno de *B.jararaca* e F1 nas diluições 1: 100, 1: 500, 1: 5.000, 1: 10.000; 1: 20.000 e 1: 40.000. O soro de camundongo não imune foi utilizado como controle negativo. B.j: Veneno total de *B. jararaca*; F1: fração 1; C1 (PE): camundongo 1, C2 (PD): camundongo 2; C- (NI): controle negativo, C+: controle positivo. FONTE: O autor (2021).

6.5 Verificação da reatividade do soro frente os componentes da fração 1 por Western Blot

Posteriormente, um Western Blot foi realizado para verificação da reatividade dos anticorpos presentes no soro frente os componentes contidos na fração 1. Para isso, a F1 obtida por cromatografia de troca iônica foi resolvida por SDS-PAGE em condições redutoras e transferida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com o soro do camundongo 2, soro antibiótico (controle positivo) e soro de camundongo não imune (controle negativo). Em relação às frações reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro, observam-se bandas na altura de 64 kDa e 45-47 kDa, 28-35 kDa e 15 kDa (Figura 12) que sugerem a presença de metaloproteinases, serino-proteinases e fosfolipases (indicada pelo retângulo preto), respectivamente (ZELANIS et al., 2010). Isso demonstra, mais uma vez, que a eficiência da separação da PLA₂ somente por cromatografia de troca catiônica não é suficiente e que são necessárias mais etapas cromatográficas para o isolamento da PLA₂, a fim de que somente ela seja injetada no camundongo. Visto que, dessa forma, a resposta imune do camundongo seria direcionada para a produção de anticorpos para a proteína de interesse.

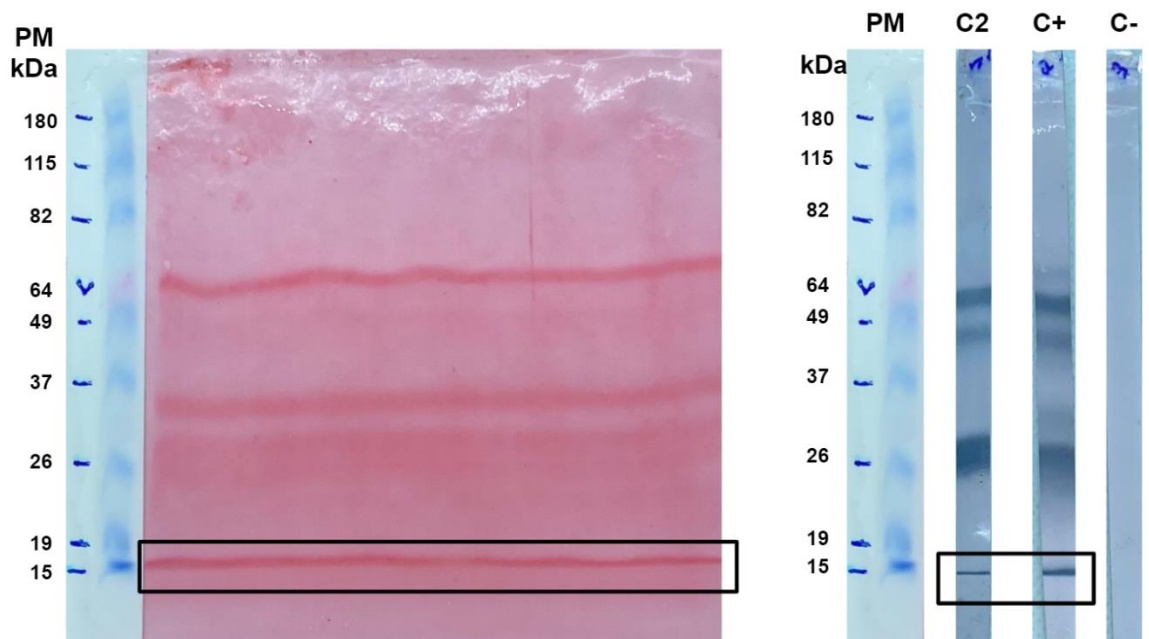


FIGURA 12. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos camundongos frente componentes da fração 1. A fração 1 (100µg) obtida por cromatografia de troca iônica foi fracionada por SDS-PAGE (gel de acrilamida

15%) em condições redutoras e transferida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi corada por Ponceau (Figura 12A) bloqueada com caseína 5%/tween 0,2% e incubada com soro de camundongo previamente imunizado frente o veneno de *B.jararaca* e F1 (C2), soro antibotrópico (C +) e soro de camundongo não imune (C-) na diluição 1: 5000 e anti-mouse IgG (1: 4000). O ensaio foi revelado por DAB / cloronaftol (Figura 12B). PM: peso molecular. FONTE: O autor (2021).

6.6 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por ELISA

Após 14 dias da realização da fusão dos esplenócitos do camundongo 2 com as células de mieloma, foi realizado o primeiro *screening* por ELISA para avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas frente o veneno total de *Bothrops jararaca* e F1. Observou-se que dos 448 sobrenadantes de hibridomas testados, 420 apresentaram absorvância no mínimo 3 vezes maior do que o controle negativo (0,051) tanto em relação ao veneno total de *B.jararaca* quanto para F1, representando uma eficiência de 93,75% (Figura 13). Dos 420 hibridomas reativos frente o veneno total e a F1, 32 apresentaram absorvância maior que 0,5 (Figura 14). De maneira geral, a eficiência da fusão foi alta, visto que Belo et al., (2021), visando a produção de um anticorpo monoclonal a partir de um *pool* de venenos botrópicos, obtiveram apenas 47 hibridomas reativos, porém com absorvâncias entre 1,0 e 3,1. Apesar dos autores terem observado uma alta reatividade, isso provavelmente ocorreu pois o *pool* de venenos utilizado é mais imunogênico (ANDERSON; GUTIÉRREZ; OWNBY, 1993) em relação a apenas o veneno de *B.jararaca* e da fração 1 utilizados para a produção do anticorpo monoclonal .

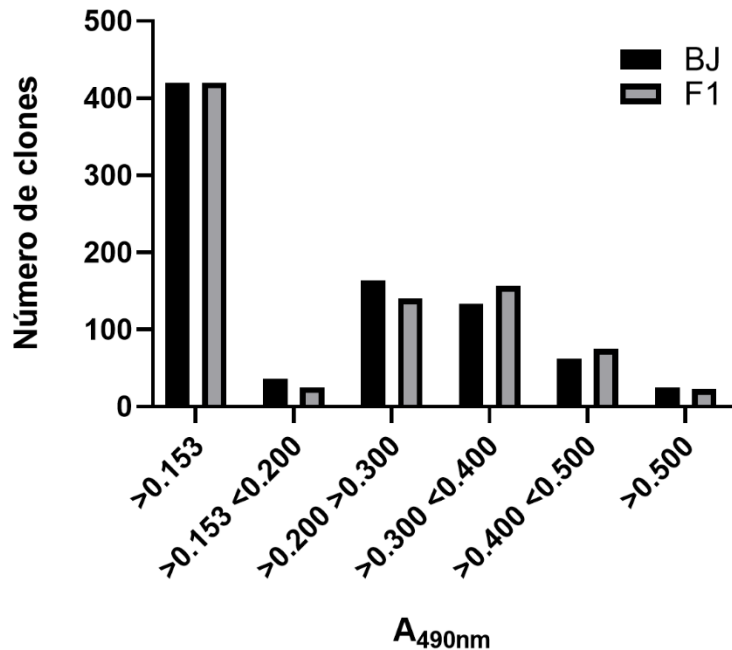


FIGURA 13. Número de clones reativos frente o veneno total de *B. jararaca* e a fração do 1 veneno de *B. jararaca* por ensaio de ELISA. Os resultados correspondem à absorbância obtida no teste de ELISA. Hibridomas secretores de anticorpos: 420 poços maiores que 0,153 para BJ e F1, 36 poços para BJ e 25 poços para F1 entre 0,153 e 0,200, 164 poços para BJ e 140 poços para F1 entre 0,200 e 0,300, 133 poços para BJ e 157 poços para F1 entre 0,300 e 0,400, 62 poços para BJ e 75 poços para F1 entre 0,400 e 0,500 e 35 poços para BJ e 23 poços para F1 maior que 0,500. FONTE: O autor (2021).

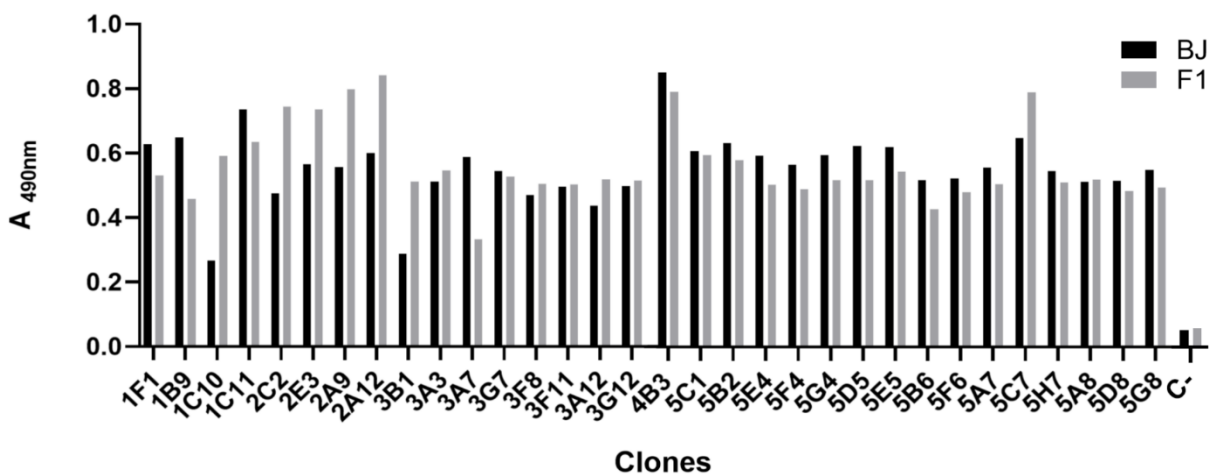


FIGURA 14. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos clones frente o veneno total de *B. jararaca* e a fração do 1 veneno de *B. jararaca* por ensaio de ELISA. O veneno total de *B. jararaca* (0,25 µg) e a Fração 1 (0,25 µg) do veneno de *B. jararaca* obtidos por cromatografia de troca iônica foram imobilizados em uma placa e incubados com o sobrenadante dos hibridomas e anti-mouse IgG (1:4.000). O sobrenadante de células mortas foi utilizado como controle negativo. B.j: Veneno total de *B. jararaca*; F1: fração 1; C- (controle negativo). FONTE: O autor (2021).

Os clones 2C2, 2E3, 2A9, 2A12 e 5C7 apresentaram uma absorvância maior em relação a fração 1, sugerindo que essas células produzem anticorpos frente componentes que provavelmente foram enriquecidos durante a cromatografia de troca catiônica.

6.7 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por Western Blot

Posteriormente, um Western Blot para avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas pelos componentes da fração 1 foi realizado. Essa etapa foi importante para orientar a escolha dos clones a serem subclonados. Como controle positivo, foi utilizado o soro do camundongo imunizado com veneno de *B. jararaca* e F1 e como controle negativo, soro de camundongo não imune. Observou-se que os sobrenadantes dos clones 1C11 e 3A7 reconhecem bandas na altura de aproximadamente 49 kDa e 64 kDa, que podem se tratar de serinoproteinases (Figura 15 - retângulo vermelho) e metaloproteinases (Figura 15 - retângulo azul), respectivamente. Ademais, notou-se que os clones 2A9 e 3A7 reconhecem bandas na altura de 15 kDa que sugere uma reatividade com as fosfolipases (Figura 15 - retângulo preto). A baixa reatividade obtida no ensaio pode ser atribuída a necessidade de diluição dos anticorpos, uma vez que nessa etapa havia um pequeno volume de sobrenadante celular.

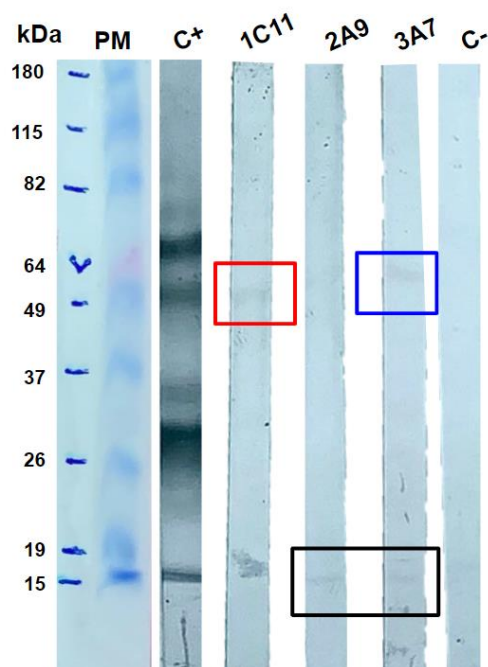


FIGURA 15. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos clones frente os componentes da fração 1. A fração 1 (100 μ g) obtida por cromatografia de troca iônica foi fracionada por SDS-PAGE (gel de acrilamida 15%) em condições redutoras e transferida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com caseína 5%/ tween 0,2% e incubada com soro de camundongo previamente imunizado frente o veneno de *B.jararaca* e F1 (C+), sobrenadante dos clones 1C11, 2A9 e 3A7 e soro de camundongo não imune (C-) e anti-mouse IgG (1: 4000). O ensaio foi revelado por DAB / cloronaftol. PM: peso molecular. Os retângulos pretos na altura de 15 kDa indicam as bandas que sugerem a presença das fosfolipases. o retângulo vermelho na altura de 49 kDa indica a banda que sugere a presença das serinoproteinases e o retângulo azul na altura de 64 kDa indica a banda que sugere a presença das metaloproteinases. FONTE: O autor (2021).

Com base nas absorbâncias obtidas no teste de ELISA e no resultado do ensaio de Western Blot foram selecionados 12 hibridomas (Tabela 4), com absorbâncias compreendidas entre 0,2 e 0,9 para serem clonados através da metodologia de diluição limitante.

TABELA 4: HIBRIDOMAS SELECIONADOS PELO TESTE DE ELISA.

Hibridomas selecionados	Absorbância (490nm)	
	BJ	F1
1B9	0,649	0,458
1C10	0,267	0,592
1C11	0,736	0,635
1F1	0,627	0,530
2A9	0,556	0,798
2A12	0,600	0,841
3A7	0,589	0,332
4B3	0,837	0,778
5C1	0,597	0,585
5C7	0,637	0,776
5E5	0,610	0,534
5G4	0,584	0,508

FONTE: O autor (2021).

6.8 Avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos subclones por ELISA

Após a clonagem por diluição limitante, foi realizado um ELISA para avaliação da reatividade dos anticorpos produzidos pelos subclones frente o veneno total de *B.jararaca*. Foi observado que dos 118 subclones testados, 47 subclones apresentaram uma absorbância três vezes maior em relação ao controle negativo (Figura 15), representando uma eficiência de aproximadamente 40% na clonagem. Tal fato pode ter ocorrido pois o método de diluição limitante, apesar do baixo custo, é laboroso e apresenta um baixo rendimento (HANACK; MESSERSCHMIDT; LISTEK, 2016). Esse baixo rendimento ocorre, visto que essa técnica faz suposições sobre a distribuição de células individuais e não leva em consideração erros de pipetagem e a vantagem de crescimento conferida pela presença de múltiplas células. Assim, as células que produzem anticorpos específicos podem ser perdidas durante o processo (BROWNE; AL-RUBEAI, 2007). Dentre os hibridomas clonados, os clones 2A12, 5C7, 1C11, 2A9, 1B9, 1C10, 1F1 e 3A7 apresentaram 1, 11, 9, 3, 5, 6, 4, e 8 subclones reativos,

respectivamente, enquanto os clones 4B3, 5C1, 5E5 e 5G4 não apresentaram nenhum subclone positivo.

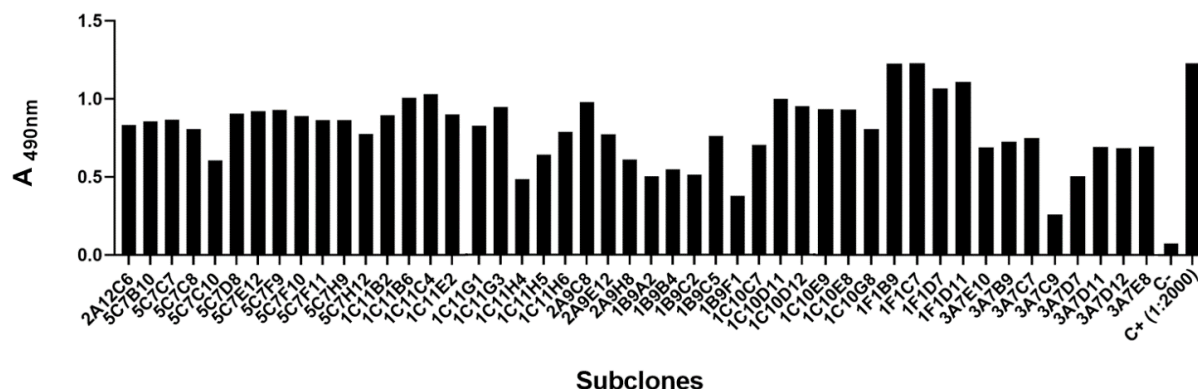


FIGURA 16. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos subclones frente o veneno total de *B. jararaca*. O veneno total de *B. jararaca* (0,25 μ g) foi imobilizado em uma placa e incubado com sobrenadante dos subclones e anti-mouse IgG. O sobrenadante de um hibridoma irrelevante foi utilizado como controle negativo e o soro do camundongo 2 foi utilizado como controle positivo. FONTE: O autor (2021).

Como um número grande de clones reativos foram obtidos, para dar continuidade às caracterizações alguns foram selecionados tomando como base a reatividade por ELISA e a confirmação de que se tratava de monoclonais, através da análise por microscópio, em que foram marcados apenas os poços que continham uma colônia por poço. Dessa forma, foram selecionados 16 subclones (Tabela 5), com absorvâncias compreendidas entre 0,6 e 1,3 para serem expandidos para garrafas de cultivo e subsequentemente caracterizados por testes imunológicos e de neutralização.

TABELA 5: HIBRIDOMAS SELECIONADOS PELO TESTE DE ELISA E ANÁLISE MICROSCÓPICA.

Subclones selecionados	Absorbância (490nm)
3A7B9	0,726
1F1D7	1,068
1F1C7	1,229
1C10D11	0,996
1C10C7	0,703
1C10E8	0,932
1C11H6	0,787
1C11C4	1,029
1C11B6	1,007
2A9C8	0,975
2A9H8	0,608
5C7C7	0,865
5C7F9	0,929
3A7E8	0,696
1B9C5	0,760
2A9E12	0,770

FONTE: O autor (2021).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Devido a pandemia de COVID-19, houve um atraso no cronograma e não foi possível atingir todos os objetivos estabelecidos. Contudo, apesar desse fato, foi possível verificar que a cromatografia de troca catiônica foi insuficiente para a separação da PLA₂ do veneno total de *Bothrops jararaca*, evidenciada por SDS-PAGE, e Western Blot. Portanto, são necessárias mais etapas cromatográficas para o isolamento completo da proteína.

Já o programa de imunização, demonstrou-se eficiente para a produção de anticorpos policlonais frente aos componentes do veneno total de *Bothrops jararaca*. Além disso, através da técnica de hibridoma, foi possível a obtenção de 16 hibridomas funcionais e secretores de anticorpos específicos para componentes presentes no veneno de *Bothrops jararaca*.

Porém, ainda se fazem necessárias etapas de amplificação, purificação e caracterização funcional dos anticorpos monoclonais produzidos, a fim de se verificar o potencial de emprego dos mesmos no estudo e na neutralização dos efeitos deletérios das toxinas presentes no veneno total de *Bothrops jararaca*, incluindo as fosfolipases. A partir destes resultados, esse trabalho poderá contribuir para a produção de novos antivenenos e para o estudo dos mecanismos das toxinas presentes no veneno.

REFERÊNCIAS

- ALOULOU, A.; ALI, Y. B.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y.; GELB, M. H. Phospholipases: An Overview. In: G. Sandoval (Org.); **Lipases and Phospholipases**. v. 861, p.63–85, 2012. Totowa, NJ: Humana Press.
- ALVARENGA, L. M. et al. A new insight into the cellular mechanisms of envenomation: Elucidating the role of extracellular vesicles in *Loxoscelism*. **Toxicology Letters**, v. 350, p. 202–212, out. 2021.
- ANDERSON, S. G.; GUTIÉRREZ, JOSÉM.; OWNBY, C. L. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 8, p. 1051–1059, ago. 1993.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755–763, ago. 2000.
- ARNOLD, C. Synthetic biology tackles global antivenom shortage. **Nature**, v. 532, n. 7599, p. 292–292, abr. 2016.
- BLANCO, B.; MELO, M. Ofidismo. In: **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. [s.l.] FEPMVZ Editora, 2014. p. 9–14.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BECKER-FINCO, A.; COSTA, A. O.; SILVA, S. K.; et al. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology**, v. 140, n. 3, p. 396–405, 2013.
- BOLLAG, D. M. Ion-Exchange Chromatography. In: DUNN, B. M.; PENNINGTON, M. W. (Eds.). **Peptide Analysis Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1994. v. 36p. 11–22.
- BORJA-OLIVEIRA, C. R. et al. Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA2, neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 103–121, 2007.
- BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 425–432, set. 2007.
- CALGAROTTO, Andrana K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTXI isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 51, n. 8, p.1509-1519, jun. 2008. Elsevier BV.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739–758, dez. 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Comstock Pub. Associates, 2004.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2009.

CEDRO, R. C. A. et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 33, 23 nov. 2018.

CHANG, L. S. et al. A convenient method to differentiate the monoclonal antibodies with differing immunochemical properties. **Biochemistry International**, v. 23, n. 6, p. 1063–1069, abr. 1991.

CHIOATO, L.; ARAGAO, E. A.; FERREIRA, T. L.; DE MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1768, p. 1247–1257, 2007

CHOUMET, V. et al. Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. **Molecular Immunology**, v. 29, n. 7–8, p. 871–882, jul. 1992.

CHOW, S.-K.; CASADEVALL, A. Monoclonal Antibodies and Toxins—A Perspective on Function and Isotype. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 430–454, 11 jun. 2012.

CPPI - CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/CPPI-Centro-de-Producao-e-Pesquisa-de-Imunobiologicos>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

DAMICO, Daniela C.s. et al. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from Lachesis muta muta (Surucucu) venom. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1726, n. 1, p.75-86, out. 2005. Elsevier BV.

DANIEL-DE-CASTRO. **Índia vai fornecer o tratamento para HIV a todos que precisam** **UNAIDS Brasil**, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://unaid.org.br/2017/05/india-tratamento-para-hiv-todos/>>. Acesso em: 20 jul. 2021

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 12 out. 2011.

DENNIS, E. A. Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 7, p. 1245–1247, jul. 2015.

DIXON, R. W.; HARRIS, J. B. Myotoxic Activity of the Toxic Phospholipase, Notexin, from the Venom of the Australian Tiger Snake: **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 55, n. 12, p. 1230–1237, dez. 1996.

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

FARIAS, I. B. DE et al. Functional and proteomic comparison of Bothrops jararaca venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. **Journal of Proteomics**, v. 174, p. 36–46, mar. 2018.

FILKIN, S. YU.; LIPKIN, A. V.; FEDOROV, A. N. Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. S1, p. 177–195, jan. 2020.

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

FREITAS, A. Detecção e quantificação das proteínas. Disponível em: <<http://web.tecnico.ulisboa.pt/ana.freitas/bioinformatics.ath.cx/bioinformatics.ath.cx/index5cee.html?id=118>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

FULY, André L et al. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from Lachesis muta (Bush master) snake venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.961-972, jul. 2000. Elsevier BV.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Fazenda Experimental São Judas Tadeu e Produção de Soros**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/fazenda-experimental-sao-judas-tadeu/>>. Acesso em: 20 jul. 2021

GOMES, N M B; PUORTO, G. Atlas anatômico de bothrops jararaca wied, 1924 (serpentes: viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, Rio de Janeiro, v. 55, n. supl.1, p. 69-100, 1994.

GOWDA, T. V.; MIDDLEBROOK, J. L. Monoclonal antibodies to VRV-PL-VIIIa, a basic multitoxic phospholipase A2 from Vipera russelli venom. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 955–964, ago. 1994.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. In: Kini R. M. (Ed.). **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Chichester: Wiley & Sons. p. 321-52, 1997.

GUTIÉRREZ, José María; OWNBY, Charlotte L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.915-931, dez. 2003. Elsevier BV.

GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, nov. 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 14 set. 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 6 jun. 2006.

HABERMANN, E.; HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 163–173, nov. 1972.

HABIB, A. G. et al. Envenoming after carpet viper (*Echis ocellatus*) bite during pregnancy: timely use of effective antivenom improves maternal and foetal outcomes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 9, p. 1172–1175, set. 2008.

HABIB, A. G.; WARRELL, D. A. Antivenom therapy of carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming: Effectiveness and strategies for delivery in West Africa. **Toxicon**, v. 69, p. 82–89, jul. 2013.

HANACK, K.; MESSERSCHMIDT, K.; LISTEK, M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. In: BÖLDICKE, T. (Ed.). . **Protein Targeting Compounds**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 917p. 11–22.

HARRIS, J. B. et al. The Neurotoxicity of the Venom Phospholipases A2, Notexin and Taipoxin. **Experimental Neurology**, v. 161, n. 2, p. 517–526, fev. 2000.

INSTITUTO BUTANTAN. **Soros**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/soros>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

INSTITUTO VITAL BRAZIL. Disponível em: <<http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/etapas-producao.html>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

INOUE, Keizo; ARAI, Hiroyuki; AOKI, Junken. Phospholipase A1 Structures, Physiological and Patho-physiological Roles in Mammals. **Lipases And Phospholipases In Drug Development**, [s.l.], p.23-39, 7 jan. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

KANASHIRO, M. M. et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 7, p. 1179–1186, out. 2002.

Klima Naturali™ : Cobra-Jararaca (*Bothrops jararaca*). **Klima Naturali™**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.klimanaturali.org/2011/05/cobra-jararaca-bothrops-jararaca.html>>. Acesso em: 22 jul. 2021

KÖHLER, G. A. et al. Phospholipase A2 and Phospholipase B activities in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1391–1399, nov. 2006.

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

KNUDSEN, C.; LAUSTSEN, A. Recent Advances in Next Generation Snakebite Antivenoms. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 42, 15 abr. 2018.

LAFAYE, P.; CHOUMET, V.; DEMANGEL, C.; BON, C.; MAZIÉ, J.-C. Biologically active human anti-crotoxin scFv isolated from a semi-synthetic phage library. **Immunotechnology**, v. 3, n. 2, p. 117–125, 1997

LAUSTSEN, A. H. et al. Recombinant snakebite antivenoms: A cost-competitive solution to a neglected tropical disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005361, 3 fev. 2017.

LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Influence of Route of Injection on Efficacy and Side Effects of Immunisation. **ALTEX**, v. 15, n. 5, p. 87, 1998.

LOMONTE, B.; KAHAN, L. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to Bothrops asper (terciopelo) myotoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 675–689, jan. 1988.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. Neutralization of myotoxic phospholipases A2 from the venom of the snake Bothrops asper by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 239–245, 1992.

LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; MORENO, Edgardo. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A2 Homologues from Viperidae Snake Venoms: **Biomimetic Activities and Potential Applications**. *Current Pharmaceutical Design*, [s, l], v. 16, n. 28, p.3224-3230, jul. 2010.

LOUGH, W.J. e WAINER, I.W. High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. Blackie Academic and Professional, 1995.

LOVRECEK, D.; TOMIĆ, S. A century of antivenom. **Collegium Antropologicum**, v. 35, n. 1, p. 249–258, 2011.

MARIUTTI, R. B.; CHAVES-MOREIRA, D.; VUITIKA, L.; et al. Bacterial and Arachnid Sphingomyelinases D: Comparison of Biophysical and Pathological Activities: BACTERIAL AND ARACHNID SPHINGOMYELINASES D. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 8, p. 2053–2063, 2017

MATSUI, T. et al. SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2330, dez. 2019.

MENALDO, D. L. et al. Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A2 from Bothrops atrox snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 28, dez. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN NET. **Acidentes por animais peçonhentos: notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 3 jul. 2021.

MODESTO, Jeanne Claine de Albuquerque et al. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from Bothrops erythromelas venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.377-384, jul. 2006. Elsevier BV.

MORAES, R. Variações em caracteres morfológicos e ecológicos em populações de Bothrops jararaca (serpentes: Viperidae) no Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Ecologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 3. 2008.

MORAIS, V.; MASSALDI, H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, 2006.

MURAKAMI, M. et al. Recent progress in phospholipase A2 research: From cells to animals to humans. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 2, p. 152–192, abr. 2011.

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopectidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, jan. 2017.

NELSON, P. N. Demystified ...: Monoclonal antibodies. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 3, p. 111–117, 1 jun. 2000.

OLAOPA, O. T. et al. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. **Toxicon: X**, v. 7, p. 100052, set. 2020.

OLIVEIRA, S. S. et al. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Eds.). **Clinical Toxinology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p. 1–22.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411–445, mar. 1999.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.; MINOZZO, J. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 123-137, 2006.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337–360, 24 dez. 2008.

RONCOLATO, E. C.; PUCCA, M. B.; FUNAYAMA, J. C.; et al. Human antibody fragments specific for Bothrops jararacussu venom reduce the toxicity of other Bothrops sp. venoms. **Journal of Immunotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 160–168, 2013.

ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C. Presynaptic Neurotoxins with Enzymatic Activities. In: SÜDHOF, T. C.; STARKE, K. (Eds.). **Pharmacology of Neurotransmitter Release**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 184p. 129–170.

SAZIMA, I.; MANZANI, P. As cobras que vivem numa reserva florestal urbana. In: **Ecologia e Preservação de uma Floresta Tropical Urbana**. [s.l.] Ed Unicamp, 1995. p. 78–82.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246–1259, nov. 2006.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, jun. 2005.

SHAH, V. P. et al. [No title found]. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1551–1557, 2000.

SHIOMI, K. AZUO et al. Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 4, p. 589–599, maio 1998.

SIMPSON, R. J. Staining Proteins in Gels with Silver Nitrate. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2007, n. 7, p. pdb.prot4727, jul. 2007.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1–2, p. 1–19, out. 2000.

SMITH, J. B.; SILVER, M. J.; WEBSTER, G. R. Phospholipase A1 of human blood platelets (Short Communication). **Biochemical Journal**, v. 131, n. 3, p. 615–618, 1 mar. 1973.

SESA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

SOARES, Andreimar; FONTES, Marcos; GIGLIO, Jose. Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms: Structure- Function Relationship. **Current Organic Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 17, p.1677-1690, 1 nov. 2004. Bentham Science Publishers Ltd..

SOBRINHO, Juliana C. et al. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A 2 from Bothrops brazili snake venom. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 107, p.1014-1022, fev. 2018. Elsevier BV.

SOUSA, L. F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2442, 12 set. 2013.

STRANSKY, S. et al. In vitro assessment of cytotoxic activities of Lachesis muta muta snake venom. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006427, 16 abr. 2018.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of Bothrops jararacussu venom. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 9, p. 1450–1457, 2006.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 18 set. 2017.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 988–997, dez. 2009.

THE LANCET. Snake bite—the neglected tropical disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9999, p. 1110, set. 2015.

THEAKSTON, R.; WARRELL, D.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541-557, 2003.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, jan. 1997.

VINDAS, Julio et al. A novel pentameric phospholipase A 2 myotoxin (PophPLA 2) from the venom of the pit viper Porthidium ophryomegas. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 118, p.1-8, out. 2018. Elsevier BV.

WARD, R. J. et al. Refolding and Purification of Bothropstoxin-I, a Lys49–Phospholipase A2 Homologue, Expressed as Inclusion Bodies in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 134–140, fev. 2001.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Snakebite envenoming. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

XIAO, H. et al. Snake Venom PLA₂, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

ZAMBELLI, V.; PICOLO, G.; FERNANDES, C.; FONTES, M.; CURY, Y. Secreted Phospholipases A2 from Animal Venoms in Pain and Analgesia. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 406, 2017

ZELANIS, A. et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 7 maio 2010.