

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Marinna Gomes

**Produção do ScFVantibap1 em *Nicotiana Benthamiana* e avaliação *in silico*
contra metaloproteinases de Viperídeos**

Juiz de Fora

2024

Marinna Gomes

**Produção do ScFVantibap1 em *Nicotiana Benthamiana* e avaliação *in silico*
contra metaloproteinases de Viperídeos**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: ou Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientador: Prof Dr. Octávio Luiz Franco

Juiz de fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes, Marinna .

Produção do ScFVantibap1 em Nicotiana Benthamiana e avaliação in silico contra metaloproteinases de Viperídeos / Marinna Gomes. -- 2024.

89 p. : il.

Orientador: Marcelo Oliveira Santos

Coorientador: Octávio Luiz Franco

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. anti-venenos. 2. Bothrops. 3. molecular pharming. 4. scfv. I. Oliveira Santos , Marcelo , orient. II. Franco , Octávio Luiz , coorient. III. Título.

Marinna Gomes

Produção do scFvantiBAP1 em *Nicotiana benthamiana* e avaliação *in silico* contra metaloproteinases de viperídeos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 20 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª. Dr^ª. Sara Malaguti Andrade Soares
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª. Dr^ª. Letícia Stephan Tavares
Centro Universitário UniAcademia

Prof. Dr. Vinícius Carius de Souza

Instituto Butantã

Juiz de Fora, 09/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo de Oliveira Santos, Professor(a)**, em 21/11/2023, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **SARA MALAGUTI ANDRADE SOARES, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **VINICIUS CARIUS DE SOUZA, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Stephan Tavares, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 24/11/2023, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1567022** e o código CRC **9EB3080B**.

AGRADECIMENTOS

O final do meu doutorado foi um pouco atípico, diferente do que eu imaginava. Mas creio que aconteceu exatamente da forma que deveria acontecer e tudo conspirou para que ocorresse da melhor forma possível.

Hoje como profissional, fora do meio acadêmico, só tenho a agradecer os anos de universidade, as pessoas que cruzaram o meu caminho e a influência de tudo isso na minha atual carreira.

Em especial, agradeço aos meus pais que sonharam comigo todos os meus sonhos e não mediram esforços para que fossem realizados. Muito obrigada pelos momentos de renúncias e pelo apoio, mesmo sem entender direito ou concordar com as minhas decisões.

As minhas amadas irmãs que desde muito cedo tiveram de lidar com a minha ausência, e se fizeram presente em todos os momentos, muitas vezes me motivando, mesmo que elas não tivessem noção disso, sempre foram o meu Norte.

Ao meu amor, que esteve presente em um dos momentos mais desafiadores do meu doutorado, por todo amor e suporte. Por se dedicar aos meus sonhos, por dividir a vida comigo no momento mais turbulento, de forma paciente, acolhedora e amorosa. Agradeço também por todas as viagens pra Taguatinga no horário de pico! rs

Ao meu orientador, Marcelo, obrigada por todos os anos de ensinamentos, amizade, comprometimento e boas risadas. Agradeço por ter aceitado as minhas decisões e por entender as minhas escolhas, e por toda ajuda que tornou o processo mais fácil e leve. Sempre levarei comigo os princípios que me transmitiu, o seu entusiasmo pela ciência mesmo frente as adversidades e sua forma gentil de levar a vida. Nesses 10 anos certamente você se fez presente de forma a ser bem mais além que meu orientador.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, obrigada por todos os momentos de parceria, boas risadas e cafés na copa. Que vocês continuem com este espírito acolhedor e colaborativo, e sempre achem motivos para salgadinhos e bolos no café da manhã.

Aos amigos Matheus e Leonardo, agradeço todos os anos de experimentos, amizade, ajuda com os trabalhos e momentos de descontração. Que vocês brilhem por onde passarem e realizem seus sonhos.

As minhas amigas de vida, obrigada pelos anos de amizade, por dividirem as angústias e apoiarem os meus sonhos. Em especial, a Dra. Priscila por todo incentivo, suporte e por ter sido uma inspiração de dedicação e realização de sonhos.

Ao meu coorientador, Octávio, obrigada por ter me recebido em seu laboratório e permitido que me desafiasse na carreira acadêmica, conhecendo um pouco do mundo fantástico da bioinformática. Agradeço também ao Allan, pela ajuda, ensinamentos e paciência nos experimentos. Aos colegas de Brasília, apesar de breve, a minha experiência foi muito produtiva, obrigada.

RESUMO

As plantas transgênicas podem ser utilizadas como sistema de produção de proteínas recombinantes com diferentes aplicabilidades, incluindo o campo terapêutico (molecular pharming). Diversas moléculas podem ser expressas em plantas com o intuito de serem empregadas no tratamento e diagnóstico de doenças; na imunização ativa, por meio da produção de epítopos vacinais e na imunização passiva, utilizada na produção dos chamados “soros” ou anti-venenos, que tem como produto base anticorpos monoclonais ou seus derivados, como os fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv). Neste trabalho, avaliou-se a produção do scFvBaP1 em plantas transgênicas, por meio da caracterização de linhagens previamente obtidas; determinou-se condições de armazenamento e a estabilidade da proteína recombinante em diferentes condições físico-químicas; além de predizer o potencial polivalente do scFvBaP1 frente a metaloproteinases presentes nos venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Palavras-chave: anti-venenos, *Bothrops*, molecular pharming, scFv.

ABSTRACT

Transgenic plants can be used as a system for producing recombinant proteins with different applicability, including the therapeutic field (molecular pharming). Several molecules can be expressed in plants with the aim of being used in the treatment and diagnosis of diseases; in active immunization, through the production of vaccine epitopes and also in passive immunization, used in the production of so-called “sera” or anti-venoms, whose base product is monoclonal antibodies or their derivatives, such as single-chain variable fragments (scFv). In this work, the production of scFvBaP1 in transgenic plants was evaluated, through the characterization of previously obtained lines; storage conditions and also the stability of the recombinant protein were determined in different physicochemical conditions; in addition to predicting the polyvalent potential of scFvBaP1 against metalloproteinases present in the venoms of snakes of the genera *Bothrops* and *Crotalus*.

Keywords: *anti-venoms, Bothrops, molecular pharming, scFv*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Comparação das taxas de emissão de fluorescência entre plantas transgênicas em relação ao controle 30
- Figura 2** A – Peso médio das plantas por linhagem; B - Altura média das plantas por linhagem; C - Quantidade média de folhas presentes em cada plantas por linhagem; D - Diâmetro médio das folhas presentes em cada planta por linhagem. Os boxes-plots demonstram apenas estatísticas descritivas 32
- Figura 3** Análise da correlação entre concentração de proteínas totais ($\mu\text{g/g}$) de peso fresco das folhas e o rendimento de produção de proteínas recombinantes. Correlação de Pearson, 95% de intervalo de confiança. O eixo X apresenta a concentração de proteínas totais, enquanto o eixo Y apresenta os rendimentos de proteínas recombinantes 33

CAPÍTULO II

- Figura 1** Visualização esquemática do fragmento scFvBaP1. Disposição das cadeias do fragmento scFvBaP1 unidas por *Linker* e acopladas aos acessórios anteriormente descritos 49
- Figura 2** Comportamento do fragmento scFvBaP1 frente a diferentes condições ambientais 52
- Figura 3** Comportamento do fragmento scFvBaP1 frente a agentes oxidantes e glicolizantes 53
- Figura 4** Estabilidade do fragmento scFvBaP1 ao longo de 15 dias 54

CAPÍTULO III

- Figura 1** Porcentagens de notificação de acidentes ofídicos por gênero de serpentes – ano 2019 64
- Figura 2** Alinhamento de sequências das metaloproteinases alvo. Alinhamento realizado com o Software Clustal Ω. As sequências apresentam-se conservadas demonstrando similaridade entre os alvos selecionados. As caixas em vermelho indicam conservação do sítio de atividade das metaloproteinases (H142EXXHXXGXXH152). A caixa em azul indica a conservação de um aminoácido Lisina, o qual participa do processo de neutralização das enzimas por meio da ancoragem dos anticorpos 75
- Figura 3** Representação do melhor modelo obtido a partir da sequência do scFvBaP1.A - Representação do fragmento scFvBaP1. Em verde as cadeias VH e VL; unidas pelo peptídeo linker, em laranja; em vermelho as regiões de CDR; em azul a cauda de Histidina. B – Representação do fragmento scFvBaP1 diferenciando as duas cadeias (VH e VL). Demonstração em posição original e rotação em 180°. As imagens foram geradas no programa PyMol 76
- Figura 4** Análise de docking molecular entre o scFvBaP1 e as SVMPs alvo. Em azul a representação do fragmento scFvBaP1; em verde as metaproteinases (SVMPs) – alvo; a visualização em zoom corresponde aos locais de interação (pontes de hidrogênio) entre o complexo protéico. Em A-scFvBaP1 associado a SVMP de *B. asper*, em B- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. atrox*; em C- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. jararaca*; em D- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. leucurus*; em E- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. moojeni*; em F- scFvBaP1 associado a SVMP de *C. adamanteus*; em G- scFvBaP1 associado a SVMP de *C. atrox* 79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Genes alvos na análise de PCR em tempo real e seus respectivos primers	25
Tabela 2	Condições escolhidas para qPCR após padronização do teste de eficiência	26
Tabela 3	Condições luminosas para cultivo de plantas transgênicas	27
Tabela 4	Dosagem de proteínas purificadas nas diferentes linhagens por grama de peso fresco de folhas	29
Tabela 5	Valores de expressão relativa e valor de p	30
Tabela 6	Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas	31
Tabela 7.	Concentração de proteínas purificadas a partir das linhagens transgênicas cultivadas em diferentes condições de luminosidade ($\mu\text{g/g}$) de peso fresco das folhas	34

CAPÍTULO II

Tabela 1	Regiões de CDR presentes no fragmento scFvBaP1	50
Tabela 2	Análise dos parâmetros físico-químicos do fragmento scFvBaP1	50
Tabela 3	Análise da alergenicidade do fragmento scFvBaP1 <i>in silico</i>	51

CAPÍTULO III

Tabela 1	Ocorrência de acidentes botrópicos por região do Brasil – ano 2019	64
Tabela 2	Toxinas escolhidas como alvo terapêutico – gênero <i>Bothrops</i>	73
Tabela 3	Regiões de complementaridade ao antígeno (CDRs) que possuem interação com as SVMPS-alvo	80

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 DESENVOLVIMENTO	17
CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS E INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO scFvBaP1	18
1. PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO PRODUTORAS DE BIOFÁRMACOS	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. METODOLOGIA	23
3. 1 Caracterização das linhagens transgênicas	23
3.1.1 Quantificação de proteínas recombinantes	23
3. 1. 2 PCR em tempo real (qRT – PCR)	23
3. 1. 3 Citometria de Fluxo	25
3.2 Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas	25
3. 3 Otimização da produção do fragmento scFvBaP1	26
. 3. 1 Variação de tipos e qualidade de luzes	26
2.4 Análises estatísticas	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Caracterização das linhagens transgênicas	28
4. 1. 1 Quantificação de proteínas recombinantes	28
4. 1. 2 PCR em tempo real (q RT – PCR)	28
4. 1. 3 Avaliação da quantidade de DNA]	29
4.2 Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas	30
4. 3 Otimização da produção do fragmento scFvBaP1	32
4. 3. 1 Variação de tipos e qualidade de luzes	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DO FRAGMENTO scFvBap1 E PADRONIZAÇÃO DAS SUAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	43
1. O FRAGMENTO scFvBaP1	43
2 OBJETIVOS	45

2.1 OBJETIVO GERAL	45
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. METODOLOGIA	46
3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos do fragmento ScFvBaP1 <i>in silico</i>	46
3.2 Predição de alergenicidade <i>in silico</i>	46
3.3 Avaliação da estabilidade do fragmento scFvBaP1 em diferentes condições ambientais	47
4. RESULTADOS	48
4. 1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos do fragmento ScFvBaP1 <i>in silico</i>	49
4.2 Predição de alergenicidade <i>in silico</i>	50
4.3 Avaliação da estabilidade do fragmento scFvBaP1 em diferentes condições ambientais	50
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO III – PREDIÇÃO, <i>IN SILICO</i>, DA POLIVALÊNCIA DO FRAGMENTO ScFvBaP1 E SEUS PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO	61
1. Epidemiologia de <i>Bothrops sp.</i>	61
2. OBJETIVOS	67
2.1 OBJETIVO GERAL	67
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3. METODOLOGIA	68
3.1 Busca por metaloproteinases alvo.....	68
3.2 Modelagem computacional do fragmento scFvBaP1 e proteínas alvo	68
3.3 <i>Docking Molecular</i>	69
4. RESULTADOS	70
4.1 Busca por metaloproteinases alvo.....	70
4.2 Modelagem computacional do fragmento scFvBaP1 e proteínas alvo	72
4.3 <i>Docking Molecular</i>	73
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CONCLUSÕES GERAIS	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas transgênicas podem ser utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, e quando estas são utilizadas para fins terapêuticos, estamos diante de uma tecnologia conhecida como *Molecular Pharming* (plant molecular pharming) (Guiller et al., 2020). Uma vez utilizadas como sistema de produção, as plantas oferecem características relevantes, principalmente no que diz respeito a aspectos econômicos, pois consistem em um sistema menos custoso, que não requer infraestruturas elaboradas, são passíveis de escalonamento e capazes de produzir moléculas seguras (Margolin et al., 2020).

Em relação aos demais sistemas de expressão, as plantas ainda se destacam por permitirem a produção de moléculas estáveis, de alto peso molecular, livre de contaminantes e seguras para uso terapêutico. Além disso, o sistema apresenta alta biomassa, o que resulta em altos rendimentos. Quando uma planta transgênica é transformada, todos seus componentes – folhas, frutos, sementes - são capazes de expressar a proteína recombinante, o que contribui para suas altas taxas de produtividade (Owczarek et al., 2019). De acordo com Yan et al., (2016) as proteínas recombinantes purificadas podem chegar a corresponder a até 46,1 % do total de proteínas presentes nas plantas, o que configura um importante parâmetro no que diz respeito a rendimentos.

Diversas moléculas de uso terapêutico vêm sendo expressas em plantas transgênicas, como anticorpos, citocinas, hormônios, dentre outras. Tais moléculas são empregadas nos mais variados campos terapêuticos, sendo utilizadas para o tratamento de doenças, diagnóstico de infecções e também como potenciais vacinas, incluindo candidatas para COVID – 19, o que demonstra como as plantas podem ser úteis em situações emergenciais, uma vez que também foram utilizadas na pandemia ocasionada pelo Ebola (Dhama et al., 2020).

Uma outra vertente da aplicabilidade de moléculas expressas em plantas transgênicas, é a produção de anticorpos para imunização passiva de pacientes que se envolvem em acidentes com animais peçonhentos, sendo tais imunizantes popularmente conhecidos como soros. Neste contexto, no trabalho de Gomes e colaboradores (2019) foi expresso, em *Nicotiana benthamiana* um fragmento de

anticorpo monoclonal, do tipo scFv (single chain variable fragment), com propriedades antiofídicas. O fragmento expresso, scFvBaP1, é capaz de reconhecer e neutralizar a atividade biológica da BaP1, uma metaloproteinase abundantemente encontrada no veneno de *Bothrops asper* (Castro et al., 2014). Quando expresso em *N. benthamiana*, o fragmento scFvBaP1 se demonstrou funcional, sendo capaz de reconhecer e neutralizar metaloproteinases presentes nos venenos de *B. asper*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*, ressaltando também uma possível polivalência.

No referido trabalho foram obtidas três linhagens de plantas transgênicas capazes de expressar o fragmento recombinante de forma funcional, porém para os testes de atividade *in vitro* e para os testes de produtividade das plantas, foi utilizado uma mistura de anticorpos produzidas nas linhagens, não sendo possível assim, avaliar qual delas apresentava a melhor taxa de produção e os anticorpos com melhores afinidades ao antígeno. Desta forma, tornou-se necessário que tais parâmetros fossem investigados. Uma vez que foram encontradas diferenças de produtividade e de funcionalidade dos anticorpos, pode-se escolher com qual linhagem se trabalhar, visando efetividade e altos rendimentos, a partir do escalonamento da produção em biorreatores.

Neste trabalho, foi realizada a caracterização das linhagens transgênicas supramencionadas, onde foram avaliados parâmetros gerais, principalmente no que diz respeito a biomassa e rendimento de proteínas totais e recombinantes. Além disso, realizou-se caracterização *in silico* do anticorpo recombinante e padronização das condições de armazenamento da molécula. Ademais, foi avaliado o potencial de polivalência do fragmento, com o intuito de ampliar a sua efetividade frente a outras serpentes do gênero *Bothrops*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimização da produção do fragmento scFvBaP1 em linhagens transgênicas de *Nicotiana benthamiana* e avaliação do seu potencial polivalente de neutralização de metaloproteinases de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as três linhagens transgênicas de *N. benthamiana* no que tange a biomassa e rendimentos de proteínas recombinantes, bem como potencializar a sua produção por meio de lâmpadas de LED;
- Avaliar, *in silico*, a molécula de anticorpo recombinante levando em consideração seu potencial alergênico e características pertinentes as suas condições de armazenamento;
- Predizer, *in silico*, o potencial polivalente do fragmento scFv frente a demais metaloproteinases do gênero *Bothrops*, além de elucidar o seu mecanismo de atividade.

3 DESENVOLVIMENTO

Como forma de cumprir os objetivos propostos e ilustrar os resultados de forma didática, este trabalho foi subdividido em 3 capítulos, tomando como norte os objetivos específicos supracitados.

Desta forma, segue a divisão dos capítulos:

- 1. CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS E INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO scFvBaP1;**
- 2. CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO FRAGMENTO scFvBap1 E PADRONIZAÇÃO DAS SUAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO;**
- 3. PREDIÇÃO, *IN SILICO*, DA POLIVALÊNCIA DO FRAGMENTO ScFvBaP1 E SEUS PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO**

CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS E INFLUÊNCIA DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO DO FRAGMENTO scFvBaP1

1. PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO PRODUTORAS DE BIOFÁRMACOS

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante fez-se possível a produção de uma gama de moléculas proteicas a serem utilizadas como forma de terapia. Tais moléculas são conhecidas como Biofármacos e podem ser produzidas em diferentes hospedeiros biológicos, tais como bactérias, leveduras, células de mamíferos, células de insetos e em plantas transgênicas (Kesik-Brodacka, 2018).

Nas últimas décadas as plantas vêm sendo consideradas como um sistema seguro, economicamente rentável e escalonável, recebendo destaque no campo da produção de proteínas recombinantes. Quando comparadas aos demais sistemas apresentam vantagens principalmente no que diz respeito aos custos de produção; a expressão de moléculas estáveis; a realização de modificações pós-traducionais, importante na conformação de moléculas complexas, como anticorpos; baixo risco de contaminação com patógenos e metabólitos secundários; além da sua alta produção de biomassa, que apresenta em altos rendimentos e na possibilidade de produção em larga escala (Shanmugaraj et al., 2020).

Devido a tais vantagens e à possibilidade de se produzir proteínas recombinantes de forma transiente, ou seja, sem a integração efetiva do *transgene* ao genoma, as plantas são soluções ideais para a produção de moléculas de resposta rápida, como as produzidas para serem utilizadas em situações pandêmicas. Como exemplo disso, podemos citar anticorpos monoclonais produzidos em *Nicotiana benthamiana* para o tratamento e diagnóstico da COVID-19 (Capell Et Al., 2020; Rosales-Mendoza Et Al., 2020; Shanmugaraj et al., 2020b); para o tratamento das complicações ocasionadas pelo Ebola (Davey et al., 2016); de arboviroses como Zika (Diamos Et al., 2019) e Chikungunya (Hurtado et al., 2020) e outras doenças negligenciadas, como a AIDS (Teh et al., 2014).

A vertente de utilização de plantas transgênicas para a produção de proteínas recombinantes é chamada de *Molecular Farming*, sendo aqui, ao contrário dos interesses agrícolas, as plantas utilizadas apenas como reatores vegetais ou

biofábricas. As moléculas produzidas são recuperadas a partir de métodos cromatográficos e as plantas, que serviram apenas como hospedeiros, podem ser até mesmo descartadas (Buyel, 2019).

A *Molecular Farming* consiste em um sistema de produção altamente versátil e adaptável, uma vez que podem ser utilizados métodos diferentes de transgenia, como a transformação transiente ou estável; podem ser utilizadas diferentes espécies, desde espécies modelo como o tabaco como até mesmo espécies voltadas para alimentação, como arroz, soja e cenoura. Possibilita ainda diferentes variações do sistema, tais como os baseados em culturas de células e sua produção em larga escala, com o auxílio de biorreatores industriais (Fischer; Buyel, 2020).

Quando analisamos os custos da produção de proteínas recombinantes em plantas, Dirisala et al., (2017) elencam que eles podem corresponder a cerca de 2 a 10%, quando comparado ao método de fermentação de microrganismos e a 0,1% dos custos da produção utilizando cultura de células de mamíferos. Além disso, como exemplo de redução de custos é citado a produção de Butirilcolinesterase em *N. benthamiana* é 20x menor, do que o isolamento da enzima diretamente do plasma sanguíneo. Da mesma forma, em sistemas vegetais, a produção de Celulase é 30% mais barata quando comparada a produção em sistemas fúngicos.

Devido a plasticidade dos custos de produção e da efetividade do sistema, a *Molecular Farming* vem ganhando destaque, uma vez que consegue competir de forma igualitária com outros sistemas industriais anteriormente utilizados. E por conta disso as plantas, atualmente, já participam da produção de enzimas com aplicação industrial, insumos laboratoriais e proteínas biofarmacêuticas, que são aquelas utilizadas com fins terapêuticos ou para produção de vacinas e métodos diagnósticos (Schillberg et al., 2019).

Para que sejam obtidas proteínas estáveis, seguras e funcionais é necessário que a sua produção esteja adaptada as boas práticas de manufatura (*good manufacturing practice – GMP*), principalmente quando estas terão finalidade terapêutica. Para isso é importante que as plantas sejam cultivadas em um ambiente livre de contaminantes, como microrganismos e metabólitos; que permita o controle das condições de cultivo como temperatura, luminosidade, pH; que possibilite a purificação do produto e que também não possua custos elevados (Shillberg; Finnern, 2021).

Neste contexto, podemos destacar a utilização de células vegetais em biorreatores, as quais se encaixam adequadamente nas GMPs, principalmente no que diz respeito ao controle das condições de cultura, que podem inclusive ser alvo de metodologias que visam aumentar a produção das proteínas, a partir de por exemplo, da adição de suplementos ao meio de cultura.

Uma outra vantagem atrelada ao uso de biorreatores vegetais é a possibilidade de produção em larga escala. Quando produzidas nesse sistema, as proteínas apresentam as devidas modificações pós-traducionais, o que torna o sistema ideal para se obter proteínas complexas, como os anticorpos. O custo final do produto é bem inferior quando comparado a outros sistemas; não necessita da incorporação de nenhum produto de origem animal, o que contempla uma grande parte da sociedade que não faz uso de tais produtos e seus derivados; dentre outros benefícios (Corbin et al., 2020). Essas e outras características se demonstraram fundamentais para que a empresa *Protalix Biotherapeutics* conseguisse a aprovação da *Food Drug Administration (FDA)*, para a produção e comercialização do primeiro biofármaco produzido em células vegetais, mais precisamente em células de cenoura (Tekoah et al., 2015).

Além disso, com o auxílio dos biorreatores é possível aumentar de forma exponencial a biomassa celular, o que resulta em altos rendimentos de proteínas recombinantes. Para a produção rápida de um teste de detecção do SARS-CoV-2, foram utilizadas células de alface em biorreator e com 7 dias de cultivo, foram obtidos 9,8 kg de biomassa, resultando na purificação de 100mg de antígeno viral por quilo de peso fresco. O que demonstra que além de possibilitar rendimentos em escala industrial, estes podem ser adequados a situações emergenciais (Mcdonald; Holtz, 2020).

A plataforma em questão, demonstra-se flexível, escalonável, de baixo custo e sustentável, além de produzir moléculas eficientes e que estão aptas a concorrer em questões de mercado. Porém, antes que uma planta seja submetida ao processo de escalonamento são necessárias diversas etapas de padronização e caracterização tanto das plantas hospedeiras como das proteínas produzidas. Nesse contexto, é de suma importância conhecer os processos fisiológicos da planta como sua produção de biomassa; crescimento frente a nutrientes diversos; além da produção de proteínas e seus rendimentos (produção/peso fresco) (Buyel; Twyman; Fischer, 2017; Ganeshan; Kim; Vujanovic, 2021).

Diante do bom desempenho das plantas como produtoras de proteínas recombinantes, bem como o seu potencial para obtenção de produtos em escalas comerciais e a sua capacidade de produzir proteínas complexas e funcionais, o sistema de biorreatores foi utilizado para a expressão do fragmento de anticorpo scFvBaP1 (Gomes et al., 2019). O referido anticorpo apresenta afinidade por metaloproteinases de serpentes (SVMPs) tendo sido previamente expresso em microrganismos (Castro et al., 2014), além de ter tido a sua eficácia avaliada frente a modelos *in vitro* e *in vivo*.

O scFvBaP1 mostrou-se efetivo, sendo, portanto, uma molécula com potencial para ser produzida em larga escala, uma vez que se demonstrou eficiente quando produzida em dois sistemas de expressão de fármacos, com aspectos diferentes. Neste sentido, o objetivo do trabalho ilustrado neste capítulo foi caracterizar as linhagens de plantas transgênicas previamente obtidas (Gomes et al., 2019), no que diz respeito a seus caracteres morfológicos e sua produção de proteínas recombinantes. A caracterização das linhagens é de suma importância, uma vez que através disso, pode-se otimizar a produção e minimizar os seus custos. Além disso, como forma de potencializar os rendimentos de proteínas recombinantes também foi realizada uma avaliação da influência de lâmpadas de led, em diferentes comprimentos de onda.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os principais parâmetros de produtividade e morfologia, das três linhagens transgênicas de *N. benthamiana* expressando o fragmento scFvBaP1

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de proteínas recombinantes das linhagens transgênicas;
- Determinar as características morfológicas e o potencial de biomassa de cada linhagem;
- Otimizar a produção do fragmento scFvBaP1 por meio da utilização de lâmpadas de LED.

3. METODOLOGIA

3. 1 Caracterização das linhagens transgênicas

3.1.1 Quantificação de proteínas recombinantes

A fim de se caracterizar as linhagens de plantas transgênicas previamente obtidas (Gomes et al., 2019) em relação as taxas de produção do fragmento recombinante scFv BaP1, foi realizada uma extração de proteínas totais, pelo método de fragmentação de tecidos em Nitrogênio Líquido.

Foram utilizadas aproximadamente 1g de folhas jovens obtidas a partir de cada uma das linhagens (P2, P3 e P4) com quatro semanas de idade. As plantas, cultivadas *in vitro* (meio MS basal), foram acondicionadas em sala de crescimento, com condições de cultivo controladas, com temperatura aprox. 26° C, fotoperíodo 16h/8 em lâmpada de LED, com espectro de luminosidade em aproximadamente 420 nm (azul) e intensidade de fótons igual a 124, 6 μ Mols. O extrato total de proteínas foi utilizado para purificação do fragmento scFv, por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel HisTrap HP (5ml). A purificação foi realizada de acordo com as orientações do fabricante, utilizando para eluição tampão (NaCl e NaHPO₄) acrescido de 1M de imidazol.

A concentração de proteínas purificadas foi determinada utilizando o método de dosagem direta em comprimento de onda 280nm em Nanodrop 2000.

3. 1. 2 PCR em tempo real (qRT – PCR)

Para se determinar possíveis diferenças nas taxas de expressão gênica do fragmento scFvBaP1 nas linhagens avaliadas (P2, P3 e P4), foi realizada uma reação em cadeia da polimerase PCR do tipo quantitativa, utilizando Mix SybrGreen em termociclador Applied Biosystems 7300 Real - Time PCR System ®.

Os fragmentos foliares obtidos a partir de plantas (P2, P3 e P4), com quatro semanas de idade foram conservados em freezer -80°C e, a partir delas, realizou-se a extração de RNA total, em triplicatas, com o auxílio do kit de extração RNAeasy Plant Mini Kit QIAGEN®, conforme as especificações do fabricante. Após a extração, as concentrações e purezas do RNA extraído foram analisadas em Nanodrop 1000.

Tais amostras foram utilizadas para síntese de cDNA, a qual foi utilizada com o kit de síntese de cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, invitrogen), conforme as orientações do fabricante. Foi realizado teste de eficiência para cada gene com o *pool* de amostras das plantas P2, P3 e P4, com o intuito de padronizar as reações de qPCR quanto à quantidade de cDNA input e à concentração de *primers*. Para as reações foi utilizado SYBR-GREEN Master Mix®, além dos *primers* F' e R', específicos para o fragmento *scFvBaP1* e *primers* para 18S, β -actina e Tubulina demonstrados abaixo (Tabela 1), como controle endógeno, com as seguintes condições:

Tabela 1: Genes alvos na análise de PCR em tempo real e seus respectivos primers

Gene	Primers
18S	F'- GCAAGACCGAAACTCAAAGG R'- TGTTTCATATGTCAAGGGCTGG
β-actina	F' - TCCTGATGGGCAAGTGATTAC R' - TTGTATGTGGTCTCGTGGATTC
<i>scFvBaP1</i>	F' - GTGGAGGTGGCAGTGATATT R' - GCAACTGAGACTGACGCTAT
TUBULINA	F'- CAAGATGCTACTGCAGACGAG R'- CTGGAAGTTGTGGTTTTTGGC

Fonte: Elaborado pelo autor

Foram escolhidas as condições de qPCR com base nos valores de eficiência mais próximos de 1 e curva de dissociação sem amplificações inespecíficas. As condições escolhidas estão na tabela 2.

Tabela 2. Condições escolhidas para qPCR após padronização do teste de eficiência

Gene	primer (mM)	cDNA (ng)	Eficiência
18s	100	100	0,966
β-actina	100	400	0,995
<i>scFvBaP1</i>	200	50	0,900
Tubulina	200	100	0,915

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a padronização a partir do teste de eficiência, foram realizadas reações de qPCR em triplicata para cada uma das amostras, seguindo as condições estabelecidas anteriormente. As análises de diferença de expressão foram realizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando os três controles endógenos (18S, β -actina e Tubulina) no REST® 2009 V2.0.13.

3. 1. 3 Citometria de Fluxo

Para se estimar variações na quantidade de DNA foi realizada a quantificação da emissão de fluorescência do tamanho do genoma das linhagens transgênicas utilizando a citometria de fluxo. Para tanto, foram preparadas suspensões nucleares a partir de folhas jovens picadas por lâmina de aço descartável, em tampão de isolamento (LOUREIRO et al., 2007). A suspensão obtida foi filtrada em membrana de Nylon com malha de 30 μ m com o intuito de remover fragmentos celulares e tecidos remanescentes, sendo posteriormente adicionado 25 μ l (1mg mL^{-1}) de iodeto de propídio para corar o DNA e 5 μ l (1mg mL^{-1}) de RNase .

As amostras permaneceram por 30 minutos em ambiente escuro, sem incidência de luz e posteriormente foram analisadas em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, EUA). Foram analisadas 1000 células de cada linhagem, em três repetições, sendo a emissão de fluorescência quantificada em filtro de 580 nm. Como padrão interno das análises foi utilizada uma quantidade de DNA conhecida de *Pisum sativum* ($2C = 9.09\text{pg}$). Como controle negativo das análises foram utilizadas plantas controle de *N. benthamiana*, sem nenhum tipo de transgene. Os dados gerados foram analisados pelo programa CytExpert 2.0.1.

3.2 Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas

Com o intuito de se determinar a linhagem transgênica com as melhores características morfológicas, em relação ao seu crescimento e biomassa, foram utilizadas plantas transgênicas das linhagens estudadas (P2, P3 e P4) com quatro semanas de idade, cultivadas em meio MS basal, e nas condições ambientais anteriormente descritas. As plantas foram pesadas separadamente em balança de precisão e medidas com o auxílio de um paquímetro digital do tipo mtX® Matrix Tools for eXistence – 150 mm). Os parâmetros avaliados foram tabelados e submetidos a

análise estatística. Além disso também se avaliou o rendimento de proteínas totais extraídas em cada amostra.

3. 3 Otimização da produção do fragmento scFvBaP1

3. 1 Variação de tipos e qualidade de luzes

A fim de otimizar a produção do fragmento scFvBaP1 foi avaliado o comportamento das linhagens transgênicas, no que tange aos rendimentos de produção de proteínas, frente a diferentes combinações de comprimentos (λ) de onda dispostos em lâmpadas de LED, de acordo com a Tabela 3. Para tanto foram utilizadas plantas transgênicas de todas as linhagens, cultivadas em temperatura de aproximadamente 26° C e em diferentes condições luminosas, conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3: Condições luminosas para cultivo de plantas transgênicas

	Lâmpadas	λ	Densidade de Fótons ($\mu\text{m.m}^2.\text{s}$)
Tratamento 1	6.500k Branca	420 nm	127,8
Tratamento 2	Branca/Vermelho curto	420 – 660 nm	98,4

Fonte: Elaborado pelo autor

As plantas foram mantidas em tais condições ao longo de quatro semanas. A partir de cada linhagem foi obtido 1g de folha fresca, sendo tais amostras utilizadas para extração de proteínas totais e para purificação de proteínas recombinantes em coluna de afinidade, conforme descrito anteriormente.

2.4 Análises estatísticas

Para análise dos dados foi utilizado o teste de one-way ANOVA e para avaliar as diferenças entre as médias foram utilizados testes de Tukey com $P < 0,05$ para ser

considerado significativo. os dados apresentados correspondem às média aritmética $\pm$ desvio padrão. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das linhagens transgênicas

4.1.1 Quantificação de proteínas recombinantes

A partir da dosagem das proteínas recombinantes purificadas, foram obtidos os seguintes rendimentos (Tabela 4):

Tabela 4 – Dosagem de proteínas purificadas nas diferentes linhagens por grama de peso fresco de folhas.

Linhagem	Proteína total	Proteína purificada
P2	3,400*	205.00*
P3	4,490	364.12
P4	3,900	320.00

* Planta 2 apresenta menor produção, estatisticamente significativas (Tukey $p = 0,05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor

Quando comparadas as linhagens apresentam taxas de expressão diferentes. A planta 3 apresenta a maior produtividade, expressando 364 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco. Apesar desta diferença quando comparada com a planta 4, estas apresentam taxas de produção similares, não apresentando diferenças significativas de acordo com a análise do Teste de Tukey, com intervalo de confiabilidade a 95%. Por outro lado, a planta 2 possui os menores rendimentos, sendo eles diferentes dos encontrados nas demais linhagens.

4.1.2 PCR em tempo real (q RT – PCR)

Uma vez que as linhagens transgênicas apresentaram taxas diferentes de produção de proteínas recombinantes, tornou-se necessário avaliar a expressão gênica do fragmento *scFvBaP1* a fim de se determinar se haveria um padrão entre essas duas variáveis. A análise de qPCR permitiu observar que as linhagens transgênicas não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quando comparadas as taxas de expressão gênica (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de expressão relativa e valor de *p*

	P2	P3	P4
P2		1,509	0,697
P3	0,257		0,462
P4	0,768	0,435	

Diagonal superior direita expressão relativa coluna/ linha; diagonal inferior esquerda valor de *p*.

Fonte: Elaborado pelo autor

4. 1. 3 Avaliação da quantidade de DNA]

As linhagens transgênicas foram analisadas isoladamente e comparadas à amostra controle, sendo uma planta *N. benthamiana* do tipo selvagem (c – WT). A partir da análise estatística dos dados observou-se que, apesar dessa variação não houve diferença significativa entre as plantas transgênicas e o controle (Figura 1).

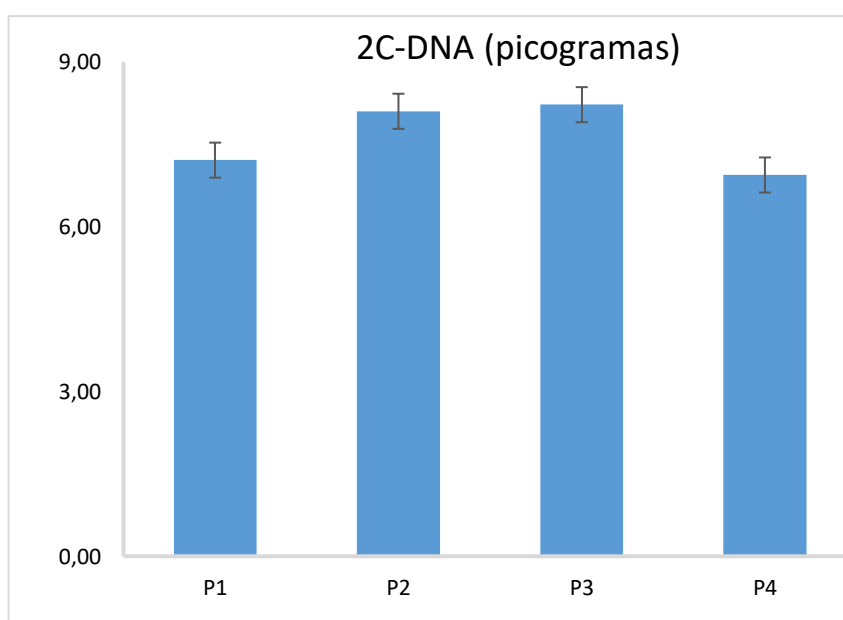


Figura 1 – Comparação das taxas de emissão de fluorescência entre plantas transgênicas em relação ao controle

4.2 Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas

A partir da avaliação dos caracteres morfológicos das diferentes linhagens de plantas transgênicas pode-se observar que estas apresentam grande variabilidade, dificultando uma padronização de taxas de crescimento e biomassa. Como demonstrado na Tabela 4, os seguintes parâmetros foram analisados: (i) peso da planta (mg); (ii) altura (cm); (iii) quantidade de folhas; (iv) diâmetro das folhas (cm). A partir da análise dos dados foi possível se observar que, apesar de encontrarmos diferenças morfológicas visíveis nas plantas e métricas, como plotado na tabela 6, estas não são estatisticamente significativas. Sendo assim, a partir de tais dados não foi possível se determinar a melhor planta em termos de biomassa.

Tabela 6: Avaliação dos caracteres morfológicos das linhagens transgênicas

	Peso (mg)	altura (mm)	Largura da folha (mm)	Peso da folha (mm)
P1	330 ± 12	44 ± 1	9.5 ± 2	6.5 ± 0.3
P2	180 ± 20	55 ± 2	10.8 ± 4	7.9 ± 0.4
P3	370 ± 20	45.7 ± 0.5	9.3 ± 2	6.3 ± 0.2
P4	240 ± 15	40.9 ± 0.1	10.3 ± 3	6.3 ± 0.3

Figura 2 - A – peso médio das plantas por linhagem; B - altura média das plantas por linhagem; C - quantidade média de folhas presentes em cada plantas por linhagem; D - diâmetro médio das folhas presentes em cada planta por linhagem. Os boxes-plots demonstram apenas estatísticas descritivas.

Os dados encontrados demonstraram que as plantas apresentaram grande variação fenotípica, quando comparadas, dentro de uma mesma linhagem. Como demonstrado na Figura 2, os parâmetros analisados apresentam alta heterogeneidade em cada uma das réplicas biológicas analisadas, o que pode ter influído na validação das análises.

Além disso também foram avaliadas as concentrações de proteínas totais extraídas de cada linhagem e o rendimento de produção de proteínas recombinantes, sendo este calculado pela concentração de proteínas purificadas ($\mu\text{g/g}$) em cada grama de folha obtida, considerando o peso médio de cada linhagem analisada. Como pode ser observado na tabela 4, a planta 2 apresentou uma menor concentração de proteínas totais além dos menores rendimentos de produção do fragmento recombinante. Os rendimentos das plantas 3 e 4, assim como os parâmetros morfológicos, não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Também, foi realizada uma análise de correlação entre as variáveis analisadas. Conforme demonstra a Figura 3, a produção de proteínas recombinantes está intimamente relacionada à concentração de proteínas totais presentes nas folhas das referidas plantas.

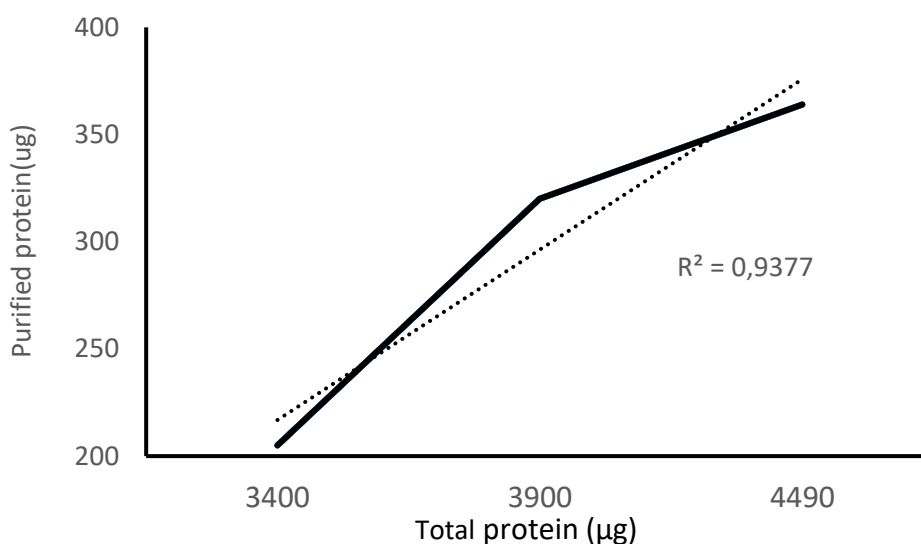


Figura 3: Análise da correlação entre concentração de proteínas totais ($\mu\text{g/g}$) de peso fresco das folhas e o rendimento de produção de proteínas recombinantes. Correlação de Pearson, 95% de intervalo de confiança. O eixo X apresenta a concentração de proteínas totais, enquanto o eixo Y apresenta os rendimentos de proteínas recombinantes.

Fonte: Elaborado pelo autor

4. 3 Otimização da produção do fragmento scFvBaP1

4. 3. 1 Variação de tipos e qualidade de luzes

Como forma de se otimizar as condições de cultivo das linhagens transgênicas, com a finalidade de potencializar a expressão de proteínas recombinantes, avaliou – se as concentrações de proteínas recombinantes obtidas em cada um dos tratamentos utilizados. Ao analisar as taxas de produção da planta 2 (P2), foi possível observar que estas apresentaram variações conforme a condição luminosa a qual as plantas foram submetidas. As plantas obtiveram uma melhor taxa de produção quando cultivadas apenas sob as lâmpadas Grow lux, com emissão luminosa adicional de vermelho longo (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração de proteínas purificadas a partir das linhagens transgênicas cultivadas em diferentes condições de luminosidade ($\mu\text{g/g}$) de peso fresco das folhas

	Luz Branca (6.500K)		Grow Lux	
	TSP	scFVBAP1	TSP	scFVBAP1
P2	3380.67 $\pm$ 142	362.67 $\pm$ 61	4140.67 $\pm$ 133	455.33 $\pm$ 85*
P3	4720.33 $\pm$ 161	500.67 $\pm$ 2	5860.33 $\pm$ 142	897.7 $\pm$ 46*
P4	3180.67 $\pm$ 112	264.67 $\pm$ 11	4790.33 $\pm$ 98	814.66 $\pm$ 41*

Teste de Tukey 5%. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas em relação à proteína extraída de plantas cultivadas sob luz branca. TSP corresponde a proteínas totais solúveis

Fonte: Elaborado pelo autor

Quando se analisa o comportamento da linhagem 3 (P3) diante da variação de luminosidade, pode-se observar que a melhor estratégia de cultivo foi a combinação de luzes branca e vermelha (Grow lux), a qual possui emissão dos espectros azul e vermelho. Nessa condição foram encontradas as maiores taxas de expressão do fragmento scFvBaP1, destacando-se estatisticamente daquelas encontradas nos demais tratamentos. De forma similar à planta 3, a planta 4 também demonstrou taxas de produção mais favoráveis quando cultivada sob a condição luminosa constituída

por lâmpadas brancas e vermelhas. Sendo tais taxas superiores às demais e significativamente diferentes.

Cada uma das linhagens de plantas transgênicas apresentou um comportamento diferente nas condições luminosas. Porém, a combinação de lâmpadas de LED brancas e vermelhas conseguiu aumentar de forma significativa a produção de duas, das três linhagens avaliadas, o que torna evidente a sua efetividade como forma de potencializar a expressão do fragmento recombinante.

5. DISCUSSÃO

A utilização das plantas transgênicas para a produção de moléculas de uso terapêutico vem se destacando cada vez mais, principalmente devido às suas vantagens significativas em relação a outros sistemas de expressão, como a alta biomassa, altas concentrações de proteínas produzidas, possibilidade de produção em larga escala, entre outros. Além disso, a produção de proteínas em sistemas vegetais tem sido utilizada como alternativa para a redução do uso de produtos derivados de animais (Shillberg; Finnern, 2021). Também é importante destacar a aplicabilidade de tal sistema em emergências, como no caso da pandemia da COVID-19, onde as plantas foram utilizadas para produção de moléculas para tratamento, diagnóstico e também para candidatas a vacinas (Capell Et Al., 2020; Rosales-Mendoza et al., 2020).

Uma das principais vantagens que as plantas oferecem no campo da produção de biofármacos é a possibilidade de escalonamento, com o auxílio de biorreatores, onde são produzidas moléculas em altas concentrações, livres de contaminantes, com um custo rentável e um processo de produção bio sustentável (Buyel, 2019). Porém, antes de se alcançar um patamar de produção em larga escala, faz-se necessário compreender todos os aspectos relacionados a produtividade das plantas utilizadas para obtenção das moléculas de interesse.

Em um estudo anterior (Gomes et al., 2019), foram obtidas três linhagens de plantas transgênicas expressando um fragmento scFv de anticorpo monoclonal, o scFvBaP1, com propriedades antiofídicas. Porém, para realização dos devidos testes biológicos foi utilizado um pool de anticorpos, contendo amostras de todas as linhagens obtidas.

A fim de se caracterizar tais linhagens e de se elencar as que apresentavam as melhores taxas de produtividade, inicialmente foi realizada uma comparação da taxa de produção de proteínas purificadas por meio da cromatografia de afinidade. Por meio das análises de tais taxas, foi possível se observar que a linhagem 2 (P2) apresenta uma taxa inferior de produção (339 µg/ml), em relação as demais plantas. Essa é uma condição não bem detectada, pois pode haver inserção do transgene em posição que pode afetar a produção das proteínas. No entanto, quando analisamos

as taxas de expressão gênica do fragmento scFvBaP1 por qPCR, não é possível se visualizar diferenças significativas entre as três linhagens.

Entre as linhagens 3 (P3) e linhagem 4 (P4), tanto as taxas de produção de proteínas recombinantes como as taxas de expressão gênica demonstram que não há diferenças de produtividade entre as plantas, demonstrando uma possível correlação entre as variáveis analisadas, uma vez que se trata de parâmetros dependentes. Em contrapartida, como anteriormente mencionado, a planta 2 possui uma divergência nessa relação, uma vez que apresenta menores taxas de expressão de proteínas recombinantes.

Uma possível causa para tal diferença está na degradação das proteínas recombinantes por meio de enzimas proteolíticas presentes nas folhas do tabaco. De acordo com Mandal et al., (2016), o tabaco possui uma série de enzimas proteolíticas (sublisinas, serino carboxipeptidases, papaínas, dentre outras), que atuam nas vias de processamento de proteínas, após sua tradução, atuando sobre elas ao longo do trajeto que fazem entre o retículo endoplasmático rugoso até alcançarem o espaço periplasmático, onde atingem certa estabilidade. O referido artigo ainda cita achados similares aos encontrados neste trabalho, nos quais também foram destacadas perdas na produtividade de proteínas recombinantes por meio de proteólise, no entanto, em tais trabalhos foram expressos anticorpos inteiros (Magy Et Al., 2014; (Muyneck Et Al., 2009).

As plantas transgênicas e controle não demonstraram diferenças entre si indicando que não houve alteração na quantidade de DNA genômico entre elas. Dessa forma, as três linhagens de plantas transgênicas possuem a inserção de apenas uma cópia do transgene, porém serão necessários mais testes para poder confirmar tais suposições. Além disso, descarta-se a hipótese de que a quantidade de cópias possa estar relacionada com os baixos rendimentos da planta 2, visto que o nível de expressão do transgene não variou entre elas. A avaliação do nível de mRNA do gene scFv-ant-BAP1 mRNA nas diferentes linhagens (P2, P3 e P4) não foi significativamente diferente entre elas, visto que o transgene está sob controle do promotor CaMV35s, um promotor constitutivo e conforme observado por Betts e colaboradores (2019) que plantas transgênicas de milho e soja apresentar um pequeno e não significativo efeito na expressão e produção de proteínas recombinantes.

Ainda no contexto da caracterização das linhagens transgênicas, foram avaliados parâmetros morfológicos das plantas, além de seus respectivos rendimentos de proteínas recombinantes. Quando analisados, os critérios morfológicos considerados relevantes para esta pesquisa, não demonstram diferenças significativas entre as linhagens analisadas. No entanto, pode ser observado que as plantas apresentam uma grande variabilidade fenotípica, dentro da mesma linhagem. Apesar das réplicas biológicas serem clones provenientes de um mesmo explante, elas apresentaram alta heterogeneidade nas suas características, não permitindo se diferenciar a melhor linhagem em termos de produção de biomassa.

Quando analisamos os rendimentos de produção das linhagens, em isolado, observa-se que a planta 2 apresenta os menores rendimentos. Neste panorama, ainda foi verificada a correlação entre concentrações de proteínas totais presentes nas plantas e seu respectivo rendimento de proteínas recombinantes. A forte correlação linear ($R = 0,937$) entre os dados demonstra que quanto mais proteínas totais forem obtidas a partir das plantas, maior será a concentração de proteínas recombinantes isoladas. Esses resultados tornam evidentes que a produção de biomassa é um ponto extremamente importante no que diz respeito a produção de proteínas recombinantes. Sendo assim, investindo em otimização desse quesito será possível otimizar também os rendimentos de produção do scFvBaP1, além de outras proteínas a serem produzidas em plantas transgênicas. De acordo com Fujiuchi et al., (2016), utilizar um sistema capaz de produzir grandes quantidades de biomassa é de suma importância para garantir que os custos envolvidos no processo de síntese de biofármaco sejam minimizados.

Como forma de otimizar as taxas de expressão de proteínas nas diferentes linhagens foram utilizadas diferentes combinações de lâmpadas de LED, emitindo espectros de luminosidade em diferentes comprimentos de onda (420 ~ 740nm). Essa otimização baseou-se nos achados de Ochoa-Fernandez et al., (2016), os quais demonstram que determinados comprimentos de onda são capazes de regular positivamente a expressão de genes em plantas, uma vez que podem ser ativados fatores de transcrição favoráveis ao processo.

Cada uma das linhagens apresentou comportamentos diferentes quando submetidas aos diferentes tratamentos luminosos. No tratamento 2, no qual as plantas foram submetidas ao cultivo em lâmpadas de LED branca associadas à vermelhas (Grow lux) foi possível observar uma otimização na produção da proteína

recombinante, uma vez que as plantas 3 e 4, apresentaram um aumento significativo nas suas taxas de produção. No trabalho de Jin et al., (2021) foram encontrados dados similares, porém em uma outra espécie de planta modelo (*Lectuca sativa*). Nesta espécie a combinação de comprimentos de onda azul e vermelho longo foi capaz de aumentar a sua produção de biomassa. Os aumentos das taxas de produção das proteínas também poderiam ser explicados por esse fator, porém até o momento não foram obtidos dados de ganhos de biomassa entre as linhagens.

Por outro lado, um aumento na produção de proteínas solúveis deve ser considerado um fator importante na produção de proteínas, o que consequentemente reduz o número de etapas durante o processo de purificação de proteínas recombinantes. Uma vez que a produção de proteína solúvel pode ser afetada pela fonte de luz, conforme demonstrado por Zhang et al., (2021) que mostraram o efeito positivo da luz azul/luz vermelha (4:1) produzindo maior quantidade de proteína em comparação com outras fontes de luz. No presente trabalho observamos que as proteínas recombinantes totais apresentaram forte correlação com a recuperação proteica total (Figura 3). Com o objetivo de testar a fonte de luz na produção de proteína recombinante, submetemos as linhagens transgênicas (P2, P3 e P4) sob diferentes qualidades de luz durante o crescimento. Foi observado que a luz branca e vermelho distante (W/FR) (GrowLux) afetou positivamente a recuperação da proteína recombinante scFvantiBAP1 (Tabela 6). Aproximadamente 50% a mais de recuperação de proteínas sob luz led azul/vermelho pode representar uma vantagem para o crescimento das plantas, em geral, levando a uma maior produção de proteínas, principalmente solúveis, devido aos seus benefícios no crescimento das plantas e consequentemente afetando a recuperação de proteínas recombinantes.

6. CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados foi possível se observar que não existem diferenças significativas em relação aos parâmetros morfológicos analisados nas linhagens transgênicas, sendo assim o padrão de biomassa das linhagens também não apresenta variações significativas.

Porém, quando avaliamos a produção de proteínas recombinantes observa-se que a planta 2 apresenta rendimentos desfavoráveis em relação as demais, sendo tal fato correlacionado a ação de interferentes, uma vez que as três linhagens apresentam apenas uma cópia do transgene recombinante.

Além disso, foi possível se demonstrar a eficiência das lâmpadas de LED na potencialização das taxas de produção de proteínas solúveis totais e consequentemente no rendimento de proteínas recombinantes recuperadas. O que demonstra que tal tratamento pode ser um fator auxiliar ao sistema de produção de proteínas em plantas transgênicas, podendo inclusive, ser incluído no rol das GMPs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUYEL, J. F. **Plant Molecular Farming – Integration and Exploitation of Side Streams to Achieve Sustainable Biomanufacturing.** *Frontiers in Plant Science*, 2019.

BUYEL, J. J.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. **Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing.** *Biotechnology Advances*, v. 35, 4, p. 458-46, 2021.

CAPELL, T., et al. **Potential applications of plant biotechnology Against SARS-CoV-2.** *Trends Plant Sci.* v.25, p.635–643, 2020.

CORBIN, J. M. et al. **Techno-economic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures,** 2020.

DAVEY, R. T. et al. **A randomized, controlled trial of ZMapp for ebola virus infection.** *N. Engl. J. Med.* v.375, p.1448–1456, 2016.

DHAMA, K. et al. **Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2020.

DIAMOS, A. G. et al. **High level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system.** *Front. Bioeng. Biotechnol.* v. 7:472, 2019.

DIRISALA, V. R. et al. **Recombinant pharmaceutical protein production in plants: unraveling the therapeutic potential of molecular pharming.** *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 40, 2017.

FISCHER, R.; BUYEL, J. F. **Molecular farming – The slope of enlightenment.** *Biotechnology Advances*, v. 40, 2020.

FUJIKI, Y. et al. **Quantification of green fluorescence protein by in vivo imaging, PCR and flow cytometry: comparison of transgenic strains and relevance for fetal cell microchimerism.** *Cytometry A*. v. 2, p. 11–118, 2008.

FUJIUCHI, N. et al. **Removal of bacterial suspension water occupying the intercellular space of detached leaves after agroinfiltration improves the yield**

of recombinant hemagglutinin in a *Nicotiana benthamiana* transient gene expression system. *Biotechnol. Bioeng.* v.113, p.901–906, 2016.

GANESHAN, S.; KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. **Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives.** *Bioresour. Bioprocess.* v.8, 63, 2021.

GOMES, M. et al. **Expression of an scFv antibody fragment in *Nicotiana benthamiana* and in vitro assessment of its neutralizing potential against the snake venom metalloproteinase BaP1 from *Bothrops asper*.** *Toxicon*, v. 160, p. 38-46, 2019.

GUILLER, J. T. et al. **Plant-made HIV vaccines and potential candidates.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 61:209–216, 2020.

HURTADO, J. et al. **In vitro and in vivo efficacy of anti-chikungunya virus monoclonal antibodies produced in wild-type and glycoengineered *Nicotiana benthamiana* plants.** *Plant Biotechnol. J.* 18, 266–273, 2020.

KESIK-BRODACKA, M. **Progress in biopharmaceutical development.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 65, 3, 2018.

MANDAL, M. K. et al. **Tackling unwanted proteolysis in plant production hosts used for molecular farming.** *Frontiers in Plant Science*, v.7, 267, 2016.

MARGOLIN, E. et al. **Production and immunogenicity of soluble plant-produced HIV-1 subtype C envelope gp140 immunogens.** *Front Plant Sci*, v.10:1378, 2019.

McDONALD, K. A; HOLTZ, R. B. **From Farm to Finger Prick—A Perspective on How Plants Can Help in the Fight Against COVID-19.** *Front. Bioeng. Biotechnol*, v. 8, 2020.

MUYNCK, B. et al. **Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells.** *Transgenic Research*, v.18, p.467–482, 2009.

OCHOA-FERNANDEZ, R. et al. **Optogenetics in Plants: Red/Far-Red Light Control of Gene Expression.** Arash Kianianmomeni (ed.), *Optogenetics:*

- Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1408, DOI 10.1007/978-1-4939-3512-3_9, © Springer Science+Business Media New York 2016
- OWCZAREK, B. et al. **A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals.** BioMed Research International, 2019.
- ROSALES-MENDOZA, S. et al. **What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19?** Vaccines, v. 8, 2020.
- SCHILLBERG, S. et al. **Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins.** Front. Plant Sci. v.10, 720, 2019.
- SHILLBERG, S.; FINNERN, R. **Plant molecular farming for the production of valuable proteins – Critical evaluation of achievements and future challenges.** Journal of plant physiology, 2021.
- SHANMUGARAJ, B. et al. **Monoclonal antibodies b38 and H4 produced in Nicotiana benthamiana neutralize SARS-CoV-2 in vitro.** Frontiers in Plant Science, v. 11, 2020.
- SHANMUGARAJ, B. et al. **Emergence of novel coronavirus 2019-nCoV: need for rapid vaccine and biologics development,** Pathogens, v. 148, 2020b.
- SOBOLESKI, M. R.; OAKS, J.; HALFORD, W. P. **Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells.** The FASEB Journal express article 10.1096/fj.04-3180fje. Published online January 7, 2005.
- SOUZA, G. T. et al. **Easy In Vitro Synthesis of Optimised Functioning Reporter mRNA from Common eGFP Plasmid.** Molecular Biotechnology (2018) 60:762–771.
- TEH, A. Y. et al. **Characterization of VRC01, a potent and broadly neutralizing anti-HIV mAb, produced in transiently and stably transformed tobacco.** Plant Biotechnol. J. v.12, p.300–311, 2014.
- TEKOA, Y. et al **Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the protalix experience.** *Plant Biotechnology Journal*, v.13(8), p.1199–1208, 2015.

TAN, N. et al. **“The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals,”** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 6, p. 962, 2016.

CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO FRAGMENTO scFvBaP1 E PADRONIZAÇÃO DAS SUAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1. O FRAGMENTO scFvBaP1

Os venenos produzidos por serpentes são complexas misturas de proteínas, lipídeos, carboidratos e compostos inorgânicos. Dentre as muitas proteínas presentes em sua composição, podemos citar as serino proteinases, fosfolipases A2, enzimas proteolíticas, hialuronidades, lectinas e metaloproteinases (Menaldo Et Al., 2015).

As metaloproteinases (*Snake Venom Metalloproteinases - SVMPs*) são enzimas zinco-dependentes com potencial hemorrágico. O processo de hemorragia é desencadeado pela hidrólise da membrana basal dos vasos sanguíneos, reduzindo sua estabilidade mecânica, levando assim à ruptura da matriz extracelular, o que leva ao extravasamento do plasma e infiltração leucocitária, resultando em uma resposta inflamatória. Tais enzimas também podem ser consideradas “fatores de difusão”, devido a sua atividade proteolítica que é capaz de facilitar a difusão de outras toxinas na circulação (Souza, 2016; De Toni et al., 2015).

As SVMPs podem ser classificadas em quatro classes, dependendo da composição dos seus domínios: (1) PI- inclui enzimas que possuem apenas o domínio metaloproteinase; (2) PII- possuem metaloproteinases e um domínio de desintegrinas; (3) PIII- possuem ambos os domínios e um domínio de cisteínas (high-cysteine); (4) PIV- enzimas que compreendem todos os domínios anteriores e são ligadas, por pontes de dissulfureto, a uma subunidade de lectina tipo C (Watanabe et al., 2003).

A BaP1 é uma metaloproteinase isolada do veneno de *Bothrops asper*. Possui 202 aminoácidos, resultando em uma conformação de cadeia simples, e peso molecular igual a 22.7 kDa. Em comparação com outras metaloproteinases hemorrágicas, a BaP1 apresenta atividade relativamente baixa, porém ela se destaca por ser um constituinte abundante do veneno de *B. asper*, chegando a corresponder a 10% do peso fresco total. Além da atividade hemorrágica, apresenta também propriedades miotóxicas, dermonecróticas e pró- inflamatórias, sendo que estas são mediadas pela ativação do sistema do complemento (Frasky, 2000; Rucavado; Nuñez;

Gutiérrez, 1998; Watanabe, 2003; Alape-Girón Et Al., 2009; Rucavado; Nuñez; Gutiérrez, 1998).

No trabalho de Fernandes et al., (2010) foram isolados, a partir de clones de hibridomas, anticorpos monoclonais (MAbs). Tais anticorpos foram produzidos como resposta imunológica de camundongos sensibilizados com uma toxina Bap1, sendo os MAbs capazes de reconhecer e neutralizar seus efeitos.

Posteriormente, Castro et al., (2014) obtiveram um fragmento variável de cadeia simples (ScFv), a partir do Mab que apresentava as melhores propriedades, e os expressaram de forma recombinante (ScFvBaP1) em *E. coli*. Tal molécula recombinante apresenta as cadeias leve (VL) e pesada (VH) unidas por um peptídeo flexível, que funciona como linker. Quando expresso de forma heteróloga, o fragmento foi capaz de reconhecer a toxina BaP1, e também de neutralizar as suas propriedades fibrinolítica, hemorrágica, miotóxica e pró-inflamatória. Além disso, demonstrou efeito similar contra a toxina BnP1 de *B. neuwiedi*, demonstrando assim, que o fragmento possui eficiência e tem potencial para ser utilizado na terapia contra acidentes ofídicos (Castro Et al., 2014).

Na mesma vertente, Gomes et al., (2019) expressaram o mesmo fragmento recombinante, porém utilizando um sistema de expressão diferente, as plantas transgênicas. Da mesma forma, quando expresso em plantas, o fragmento demonstrou a sua eficácia frente as toxinas BaP1, BnP1 e pela Atroxlysina, metaloproteinase presente no veneno de *B. atrox*, uma serpente com grande relevância médica na região norte do país. Neste trabalho, além de ter sido demonstrada uma ampliação na polivalência do fragmento, foi evidente o potencial das plantas transgênicas para produção em larga escala do fragmento (Gomes et al., 2019).

A partir da produção do fragmento ScFvBaP1 em plantas, devido aos diferentes modos de processamento pós-traducional possíveis, sua funcionalidade e outras características foram avaliadas, tais como a capacidade de neutralizar toxinas presentes em venenos diversos. Para tal, é importante conhecê-la enquanto molécula, determinando suas propriedades físico-químicas, buscando desta forma, otimizar a sua produção e posterior aplicação terapêutica.

Dentro deste contexto, nesse capítulo foram avaliadas *in silico* as principais características físico-químicas da molécula e sua relação com a sua meia-vida, estabilidade e armazenamento; além das suas principais características imunológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, *in silico*, a molécula scFvBaP1 no que diz respeito a sua estrutura e potencial alergênico, além de padronizar as condições ideais de armazenamento.

2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o fragmento scFvBaP1, *in silico*;
- Conhecer os principais aspectos físico-químico da molécula;
- Predizer, *in silico*, seu potencial de alergenicidade;
- Avaliar o seu comportamento frente a diferentes condições de armazenamento.

3. METODOLOGIA

3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos do fragmento ScFvBaP1 *in silico*

Como forma de avaliar a composição do fragmento e suas principais características físico-químicas, foi utilizada a ferramenta *ProtParam Tools* do *Software on line Expasy* (<https://web.expasy.org/protparam/>). A sequência utilizada como *input* (Quadro 1) no software foi a mesma utilizada para expressão do fragmento, contendo todas as estruturas presentes no desenho da molécula.

Quadro 1: Sequência proteica do fragmento scFvBaP1 utilizado para análises

N'TTMANKLFLVCATFALCFLLTNAVKLQESGPVLKPGASVNLSCKASGYTFTNFDINWVKQRPG QGPEWIGWINPRDGSTKYNEKFKGKATLTVDPSSTAYMEIHSLTSEDSAVYFCVRWDLVYWGQG TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRANQSITNNLQWYQQKSHGSP RLLIKYSSQSVSGIPSRFSGSGSDTDFSLINSVETEDFGMYFCQQSNSWPFTFGSGTKLEIKRHHHH HH C'

3.2 Predição de alergenicidade *in silico*

A fim de se investigar o potencial alergênico da molécula, a sequência correspondente ao fragmento ScFvBaP1 e suas demais estruturas foi submetida a análise do *Software on line* AlgPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>). Além da predição de alergenicidade também foi realizado um mapeamento de epítomos reconhecidos por IgE.

3.3 Avaliação da estabilidade do fragmento scFvBaP1 em diferentes condições ambientais

Visando se determinar a estabilidade do fragmento recombinante, foi realizada uma análise do seu comportamento em diferentes condições ambientais. Para tanto, foram utilizadas amostras de proteínas purificadas por cromatografia de afinidade, a partir de folhas de plantas com 4 semanas de idade. A amostra inicial de proteínas foi dosada pelo método direto UV, em Nanodrop 2000 e foi padronizada para uso a concentração de 220 µg/ml (dosagem inicia - momento 0).

Os seguintes parâmetros físico-químicos foram analisados sob as seguintes variações:

1. pH: 3, 4, 7, 9 e 10;
2. Temperatura: 4°, 20°, 37°, 50° e 60°;
3. Agitação: 0, 100 rpm e 200 rpm;
4. Luminosidade: ausência de luz, luz ambiente e luz clara;
5. Glicosilação: sendo utilizado solução de glicose nas concentrações 2,5 M; 1M, 25M e 0,5M;
6. Estresse oxidativo: utilizando solução de peróxido de oxigênio (H₂O₂) nas concentrações 0,2%, 0,5% e 1%.

Ressalta-se que todos os parâmetros escolhidos para tal análise apresentam correlação com a veiculação e armazenamento de medicamentos biológicos.

Para avaliar o comportamento das proteínas frente a tais condições, amostras purificadas foram dispostas em placas de 96 poços ou em tubos Eppendorf de 1,5ml, em triplicatas. As variações de temperatura foram realizadas em geladeira, freezer, estufa e banho aquecido, respectivamente.

As amostras submetidas as condições testadas foram quantificadas, conforme mencionado anteriormente, após 24h e 48h. A partir desta triagem, as condições que apresentaram os melhores resultados foram repetidas para validação da estabilidade do fragmento a longo prazo. Para tanto, as amostras foram mantidas nas devidas condições ao longo de 15 dias, sendo dosadas periodicamente.

4. RESULTADOS

O fragmento scFvBaP1 foi clonado em um vetor recombinante, PK7WGD2, específico para expressão de proteínas em sistemas vegetais. Para melhor expressão do fragmento, foi adicionado a sua porção N' terminal um peptídeo sinal S2 com o objetivo de direcioná-lo ao espaço periplasmático das células vegetais. Além disso, à sua porção C' terminal foi adicionada uma cauda de aminoácidos histidina, para fins de purificação em coluna de afinidade por Níquel (Figura 1). O fragmento scFvBaP1 apresenta uma cadeia pesada (VH) e uma cadeia leve (VL), contendo cada uma, seis regiões de complementariedade a antígenos (CDRs), conforme a tabela 1. As referidas cadeias são unidas por um peptídeo Linker, que além de uni-lás também confere flexibilidade à molécula, conforme esquematizado na Figura 1.

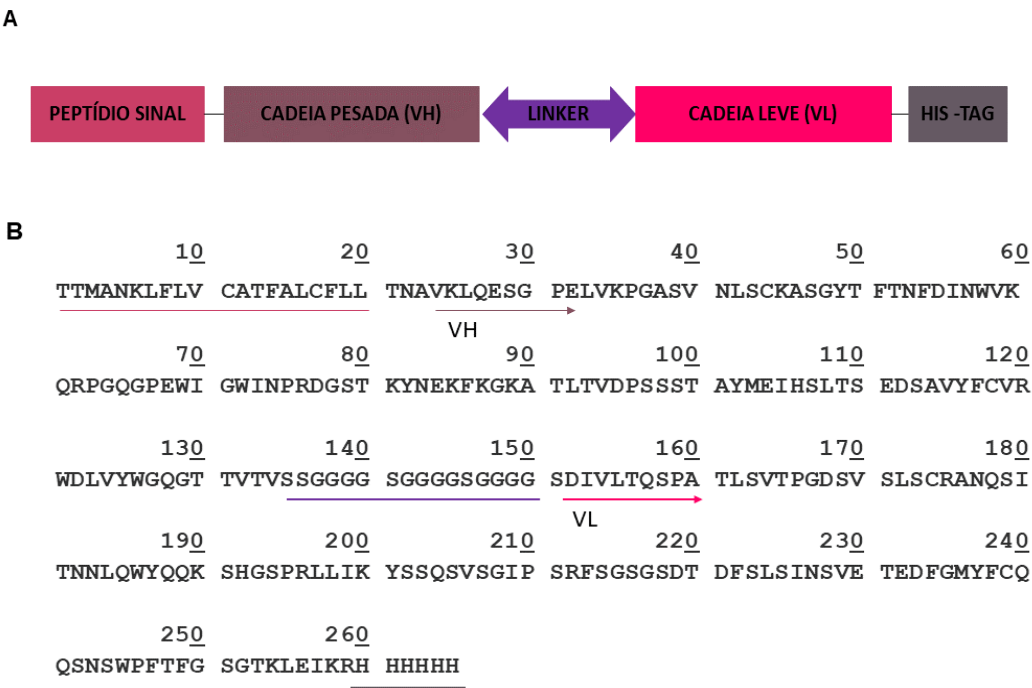


Figura 1: Visualização esquemática do fragmento scFvBaP1. Disposição das cadeias do fragmento scFvBaP1 unidas por *Linker* e acopladas aos acessórios anteriormente descritos.
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 1: Regiões de CDR presentes no fragmento scFvBaP1

CDRs	Sequência
CDR 1 – VH	25-GYTFTNFDIN-34
CDR 2 – VH	49-WINPRDGS-56
CDR 3 – VH	98-WDLVY-102
CDR 1 – VL	152-RANQSITNN-160
CDR 2 - VL	178-YSSQ-181
CDR 3 - VL	218-QSNSWPFTF-226

Fonte: Elaborado pelo autor

4. 1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos do fragmento ScFvBaP1 *in silico*

A estrutura proteica em questão, quando analisada no software ProtParam, apresenta 265 aminoácidos, totalizando 28,5 KDa (peso molecular). De acordo com os índices avaliados pelo software a proteína se demonstra instável, porém apresenta um tempo de meia – vida de 7,2h horas em organismos vivos, o que contribui com a sua atuação e efetividade como possível biofármaco. Além disso, pelo índice de GRAVY a proteína tem comportamento hidrofílico, ideal para sua veiculação. Os demais pontos obtidos através da análise estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2: análise dos parâmetros físico-químicos do fragmento scFvBaP1

PARÂMETROS ANALISADOS	
Número de resíduos	265
Peso molecular	28, 5 kDa
Ponto isoelétrico (pI)	7,62
Fórmula molecular	C1264H1924N346O396S9
Estimativa de meia – vida	7,2 horas
Índice de instabilidade	- 43,55 Instável
Índice alifático	64,32
GRAVY	-0.336 Hidrofílica

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Predição de alergenicidade *in silico*

As predições do potencial alergênico do fragmento scFvBaP1, bem como a busca por epítomos reconhecidos por anticorpos IgE, foram realizadas pelo software AlgPred. De acordo com as análises, o mapeamento de epítomos não detectou nenhuma região considerada antigênica, sendo assim a proteína não apresenta nenhuma região potencialmente reconhecida por imunoglobulinas IgE. De acordo com o índice MAST; método SVM, baseado na composição de aminoácidos; e o alinhamento por BLAST com outras sequências proteicas, o fragmento scFvBaP1 não apresenta potencial alergênico. Porém, conforme o índice SVM baseado em análises dipeptídicas a proteína apresenta alergenicidade. Todas as análises e seus respectivos resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Análise da alergenicidade do fragmento scFvBaP1 *in silico*

Análise	Score	Threshold ¹	Resultado
Mapeamento de epítomos	-	-	Não detectado
MASP	-	-	Não alergênica
SVM- aminoácidos	- 0,546	- 0,4	Não alergênica
SVM - dipeptídeos	- 0,185	-0,2	Alergênica
BLAST	-	-	Não detectado

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 Avaliação da estabilidade do fragmento scFvBaP1 em diferentes condições ambientais

Buscando a melhor compreensão o comportamento do fragmento scFvBaP1 frente a diferentes condições ambientais, físicas e químicas, foram realizados testes para avaliar de estabilidade. Quando armazenado em soluções com diferentes pHs, o fragmento foi sensível a tais variações. Em soluções com pH 3 e 4 o fragmento foi totalmente degradado após 24h, não sendo mais possível realizar a sua detecção nas

¹ São consideradas alergênicas, aquelas moléculas que apresentarem valores maiores que o Threshold

amostras. De forma similar, em solução com pH 9 o anticorpo também apresentou diminuição significativa na sua dosagem. Em pH 7 e 10, as concentrações permaneceram constantes não diferindo significativamente da concentração inicial do experimento.

Ao analisarmos as variações de temperatura testadas, apenas na temperatura de 4°C o anticorpo se mostrou estável, sem apresentar diminuições nas quantificações. Nas demais temperaturas houve queda na concentração de proteínas, sendo estas diferentes significativamente da concentração inicial, de acordo com o mostrado na Figura 2.

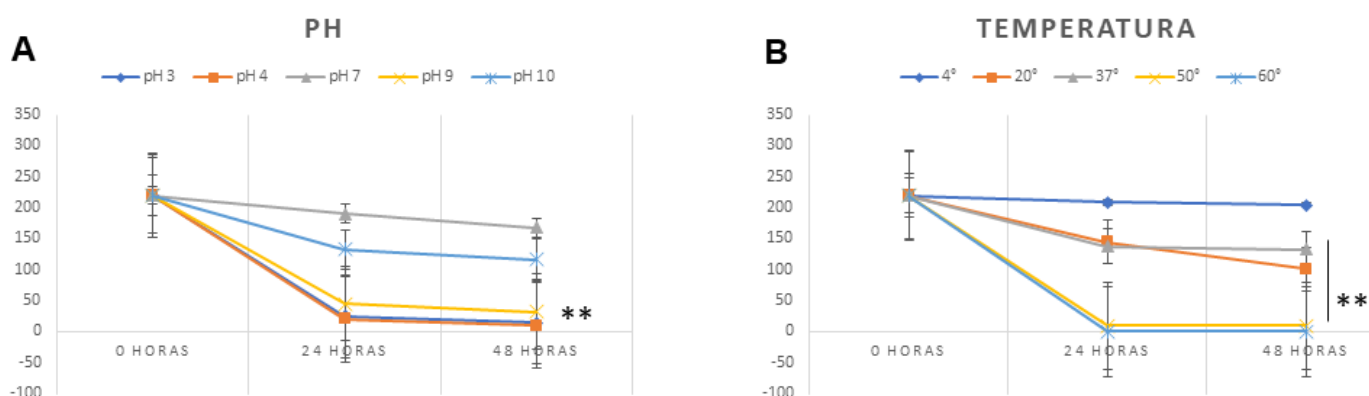


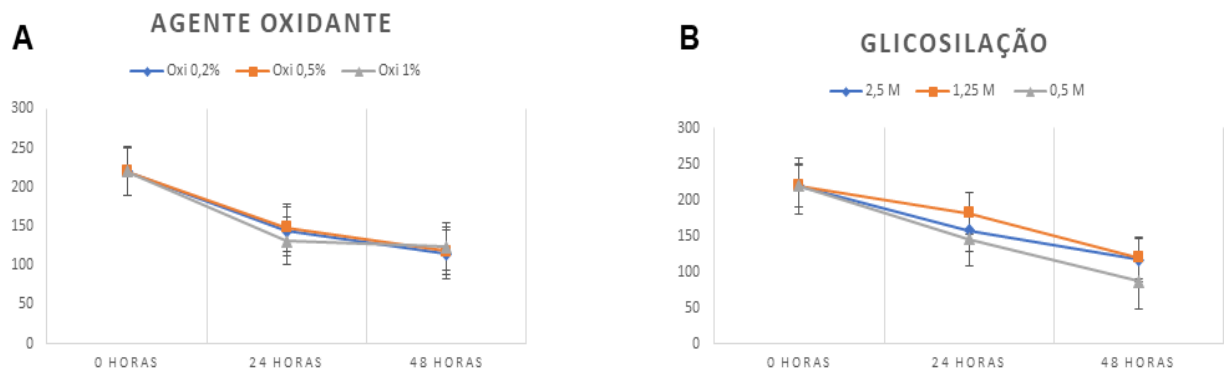
Figura 2: Comportamento do fragmento scFvBaP1 frente a diferentes condições ambientais.

Os asteriscos (*) indicam diferentes estatísticas pelo Teste de Tukey com 5% de confiabilidade

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise da influência da Oxidação e da Glicosilação (relacionada a condições de armazenamento), na estabilidade do fragmento identificou que na presença do agente oxidante utilizado, mesmo em diferentes concentrações, o anticorpo não demonstrou perdas de concentração significativas, sendo tal condição considerada irrelevante. Da mesma forma, as variadas concentrações de glicose adicionadas ao meio de armazenamento do anticorpo não degradaram e não causaram perdas de concentração significativas. Dessa forma, fica demonstrando que o fragmento não sofre alterações frente a tais condições. As variações observadas no experimento podem ser observadas na Figura 3.

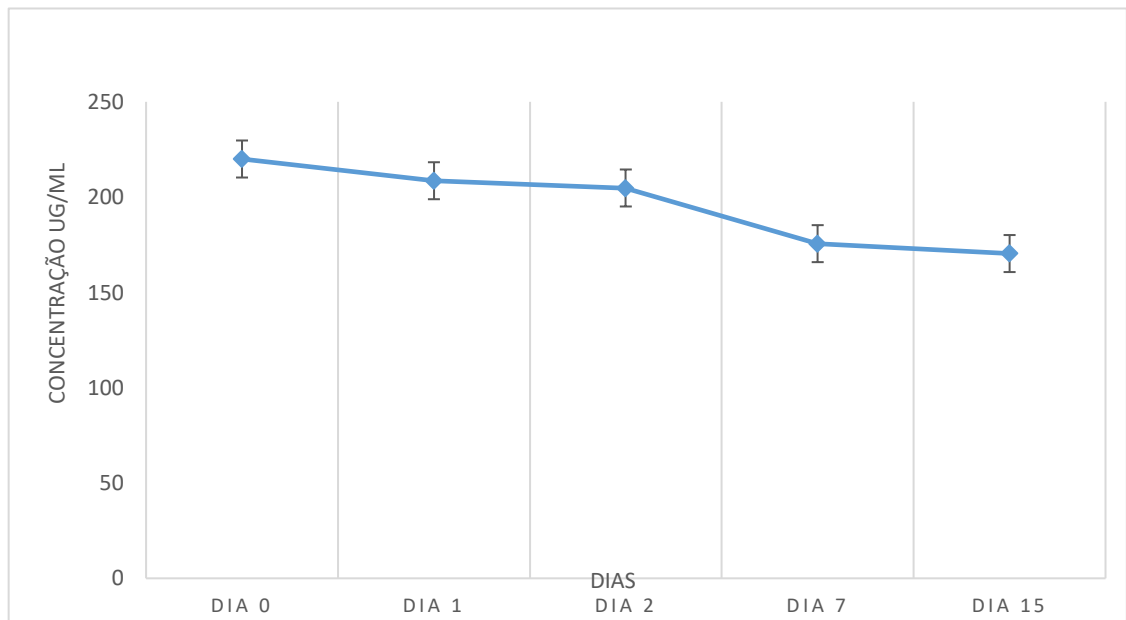
Figura 3: Comportamento do fragmento scFvBaP1 frente a agentes oxidantes e glicosilantes.



Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados obtidos o fragmento foi mantido nas melhores condições encontradas, dentre as que apresentaram diferenças relevantes nas concentrações dos anticorpos após 48h de experimento, sendo elas: pH = 7, temperatura = 4° C, ausência de agitação e ausência de luminosidade, de maneira a validar a estabilidade do anticorpo.

Uma vez determinadas as condições experimentais os anticorpos foram nelas mantidos durante 15 dias, sendo dosadas as suas concentrações periodicamente. A partir dessa análise foi possível se demonstrar que, nas condições utilizadas no experimento, o fragmento scFvBaP1 se demonstra estável durante 15 dias (Figura 4). Após esse período o fragmento já demonstra perdas significativas em relação a concentração inicial de estudo.

Figura 4: Estabilidade do fragmento scFvBaP1 ao longo de 15 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Conhecer os parâmetros físico-químicos presentes em uma proteína é de suma importância, principalmente quando esta é expressa com finalidade terapêutica. Neste contexto, softwares vêm sendo utilizados para realização de tais caracterizações além de predições de informações como estabilidade, alergenicidade etc.

Quando submetido a análises do software ProtParam, o fragmento scFvBaP1 associado aos acessórios inseridos no seu cassete de expressão, totalizam 265 aminoácidos com peso molecular de 28,5 kDa, mas apesar de ser uma proteína complexa, ainda apresenta um tamanho relativamente pequeno quando comparados a anticorpos completos, o que favorece a sua difusão e dispersão através dos tecidos, de suma importância nos casos de envenenamento ofídico.

De acordo com o índice de instabilidade (II) obtido (43, 55), o fragmento scFvBaP1 se mostrou instável, uma vez que a análise considera que apenas as proteínas com $II < 40$ apresentam estabilidade. Complementar a esse parâmetro, o índice alifático (AI) também apresentou informações acerca da estabilidade da proteína analisada. O valor encontrado a partir das análises pode ser considerado um AI alto, o que indica que o fragmento em questão apresenta estabilidade em variações de temperatura (Kaur et al., 2020).

Em relação ao comportamento da proteína em soluções aquosa, o índice de GRAVY indica se determinada proteína apresenta caráter hidrofílico ou hidrofóbico, sendo que índices negativos sugerem hidrofiliabilidade. O fragmento scFvBaP1 apresenta índice de GRAVY igual a -0,336, demonstrando sua propriedade hidrofílica, ideal para sua utilização terapêutica, da mesma forma que outros fragmentos do tipo scFv, como o expresso no trabalho de Komijani et al., (2021).

Ao analisarmos, *in silico*, o potencial alergênico do fragmento scFvBaP1, não foram detectados epítomos de IgE, bem como não foram encontradas regiões de similaridade com proteína antigênicas, pela análise de BLAST. De acordo com Sharma et al., (2020) o AlgPred 2.0 consiste em uma ferramenta eficaz para a realização de análises preliminares da alergenicidade de moléculas, principalmente se tais moléculas estiverem destinadas a fins terapêuticos. Quando analisamos os índices de alergenicidade, MASP e SVM, não foram encontradas regiões

potencialmente alergênicas, baseando-se na composição dos aminoácidos presentes na molécula. Porém, ao ser avaliado pelo método SVM–dipeptídeo, o fragmento apresentou regiões com potencial alergênico. O artigo anteriormente mencionado ressalta, nesse contexto, que o software utilizado para análises pode apresentar algumas limitações no que diz respeito a revisão das sequências depositadas, duplicidade dos dados, dentre outros (Sharma et al., 2020). Porém, por se tratar de uma molécula a ser utilizada como biofármaco, tal condição deverá ser reavaliada antes do ensaio *in vivo*.

A fim de se verificar a estabilidade do fragmento scFvBaP1, foi realizado um teste de estabilidade baseado no que versa Nowak et al., (2017). No referido teste foram analisadas as variações das concentrações de proteínas recombinantes, ao longo dos dias, submetidas a diversas condições ambientais. Avaliar o comportamento do fragmento frente a tais perturbações é de grande importância para se determinar os parâmetros ótimos de acondicionamento, nos quais a molécula se mantém íntegra e com a sua devida atividade biológica. Quando analisamos o comportamento do fragmento scFvBaP1 em variações de temperatura, este corrobora o que consta no trabalho supracitado em relação a sua sensibilidade e degradação quando submetidos a altas temperaturas. E quando apresenta estabilidade em temperatura de 4°C, que é a temperatura ideal para armazenamento de moléculas em geladeira. Porém, quando analisado em 37° C o fragmento demonstra uma perda significativa de concentração, o que pode ser desvantajoso por ser tratar de uma temperatura fisiológica. Semelhante ao resultado encontrado, o trabalho de Lee et al., (2015) observou perdas de concentração na temperatura em questão, porém quando analisada a atividade do scFv testado, não houve prejuízos significativos, ou seja, não houve perda de estabilidade. O mesmo trabalho também aponta, que as degradações podem ser provenientes da formação de agregados proteicos, da quebra de ligações covalentes ou pela formação de ligações indesejadas, como pontes dissulfeto (Lee et al., 2015).

Outro fator analisado no estudo foi o armazenamento do scFvBaP1 em diferentes condições de pH. O pH além de estar relacionado com o armazenamento da molécula também influi significativamente no seu processo de purificação. Em baixos valores de pH (3 e 4) foi observada uma perda total da concentração de proteínas nas devidas amostras, o que pode ser explicado pela capacidade desses valores promoverem degradação de anticorpos específicos, como prolina e ácido

aspárgico, levando a formação de agregados proteicos, além de causar uma precipitação da molécula (Nowak et al., 2017). Em pH 7 o scFvBaP1 se demonstrou estável, não apresentando degradações significativas. Achados similares também foram encontrados no trabalho desenvolvido por Manikwar et al., (2019), o qual demonstra a estabilidade de fragmentos scFvs bi-específicos na faixa de pH entre 6 e 7. Em relação aos pHs mais altos, o pH 10 foi capaz de manter a estabilidade do fragmento, porém o pH 9 promoveu degradação. Como tais achados não se mostraram coerentes, torna-se necessário à sua reavaliação.

O stress oxidativo também é apontado como fator influenciador na produção e armazenamento de anticorpos recombinantes, devido a ação degradativa que pode ser desencadeada por radicais livres que são capazes de degradar aminoácidos. Folzer et al., (2015) demonstrou que tais radicais são capazes de desestabilizar resíduos de metionina e triptofano, e caso tais degradações não sejam suficientes para gerar perdas na concentração dos anticorpos, elas podem alterar a afinidade dos mesmos caso os resíduos em questão estejam localizados em regiões de CDR. Halley et al., (2020) também chama atenção para tais aspectos, trazendo que o stress oxidativo é capaz de causar alterações estruturais nos aminoácidos, podendo influenciar na sua atividade, estabilidade, farmacocinética e imunogenicidade. Quando submetido a tais condições, o fragmento scFvBaP1 não demonstrou alterações no que diz respeito a sua estabilidade, mantendo-se estável em todas as concentrações utilizadas do agente oxidante. Porém, devido a possibilidade de prejuízos mais específicos, como na sua atividade, será necessário novos testes para avaliar se os agentes oxidantes interferem na atividade do scFvBaP1.

De forma similar, o fragmento scFvBaP1 não se mostrou sensível a influência da adição de açúcares na amostra. A glicosilação também vem sendo apontada como uma força de degradação de anticorpos, formação de agregados e modificação estrutural da porção N'-terminal de resíduos de lisina (Nowak et al., 2017). Apesar de não terem sido observadas degradações, também será necessário avaliar a influência de tal parâmetro na atividade da molécula.

Após a análise da estabilidade do fragmento scFvBaP1 frente as condições supracitadas, elencadas as melhores condições e estas foram testadas no que diz respeito a estabilidade a longo prazo da molécula, que está relacionada diretamente com o seu armazenamento. Quando armazenado em temperatura de 4°C, em solução com pH 7, sem agitação e protegido da luz (escuro) o fragmento demonstrou-se

estável, em relação a sua concentração, por 15 dias. A partir deste período a concentração do fragmento começou a decair, diferenciando de forma significativa da concentração inicial das amostras.

6. CONCLUSÕES

Neste capítulo foi possível se conhecer um pouco mais o fragmento scFvBaP2, principalmente no que diz respeito aos seus aspectos físico-químicos, sendo estes intimamente relacionados a funcionalidade da molécula. Além disso, foram ilustradas importantes regiões da molécula tais como as regiões de interação com o antígeno, os chamados CDRs.

Os padrões de alergenicidade do fragmento foram analisados, sendo considerado não alergênico e, portanto, apresenta potencial para ser administrados a modelos animais, sem que haja efeitos adversos. É importante ressaltar, que serão necessários testes de avaliação *in vivo* visando demonstrar tais dados de forma prática a fim de que se confirme se tratar de uma molécula de administração segura.

Outro fator importante aqui demonstrado foi a avaliação do comportamento do fragmento scFv frente a diferentes condições ambientais, as quais poderão ser futuramente exploradas com o fito de se armazenar e veicular o fragmento na forma de um fármaco propriamente dito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAPE-GIRÓN, A. et al. **Studies on the venom proteome of Bothrops asper: Perspectives and applications.** Toxicon, v. 54, n. 7, p. 938–948, 2009.

CASTRO, J. M. A. et al. **A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A P-I hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops asper snake venom.** Toxicon, v. 87, p. 81–91, 2014.

DE TONI, L. G. B. et al. **Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from Bothrops atrox snake venom.** International Immunopharmacology, v. 28, n. 1, p. 199–207, 2015

FARSKY, S. H. P. et al. **Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system.** Role in leucocyte recruitment. Mediators of inflammation, v. 9, n. 5, p. 213–221, 2000.

FERNANDES, I. et al. **Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom.** Toxicon, v. 56, n. 6, p. 1059–1065, 2010.

FOLZER, E. et al. **Selective oxidation of methionine and tryptophan residues in a therapeutic igg1 molecule.** J Pharm Sci. 2015;104(9):2824-31.

GOMES, M. et al. **Expression of an scFv antibody fragment in Nicotiana benthamiana and in vitro assessment of its neutralizing potential against the snake venom metalloproteinase BaP1 from Bothrops asper.** Toxicon, v. 160, p. 38-46, 2019.

KAUR, A. et al. **Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from Arabidopsis thaliana and Oryza sativa using in-silico approaches.** Plos One, 15 (9), 2020.

KOMIJANI, S. et al. **Characterization of a novel mCH3 conjugated anti-PcrV scFv molecule.** Nature reports, 11:7154, 2021.

MENALDO, D. L. et al. **Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A 2 from Bothrops atrox snake venom.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 21, n. 28, p. 1–14, 2015.

NOWAK, C. et al **Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide.** MABS, 7 (8), 2017.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. **Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake Bothrops asper.** International Journal of Experimental Pathology, v. 79, n. 4, p. 245–254, 1998.

SERNO, T. et al. **Inhibition of agitation-induced aggregation of an IgG-antibody by hydroxypropyl-betacyclodextrin.** J Pharm Sci. 2010;99(3):1193-1206.

SOUZA, R. A. et al. **Unraveling the distinctive features of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using molecular simulations.** Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 30, n. 1, p. 69–83, 2016.

WATANABE, L. et al. **Amino acid sequence and crystal structure of BaP1 , a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities.** Protein Science, v. 12, n. 10, p. 2273–2281, 2003.

CAPÍTULO III – PREDIÇÃO, *IN SILICO*, DA POLIVALÊNCIA DO FRAGMENTO ScFvBaP1 E SEUS PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO

1. Epidemiologia de *Bothrops* sp.

Os acidentes ofídicos foram inseridos no rol das doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo tais doenças aquelas que acometem, em sua maioria, populações pobres e residentes de áreas rurais. O referido agravo foi incluído na Lista de Notificação de Compulsória (LNC) do Brasil, publicada na Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010 (ratificada na Portaria Nº 104, de 25 de janeiro de 2011). Tal inclusão se fez importante devido ao alto número de notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O SINAN consiste em um sistema informatizado de notificações de agravos de doenças incluídas na LNC, e tem por objetivo coletar, transmitir e disseminar dados gerados rotineiramente pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica das três esferas de governo, a fim de se dar suporte para o processo de investigação e para subsidiar a análise das informações de vigilância epidemiológica das doenças anteriormente citadas.

No cenário dos acidentes ofídicos, por meio das análises realizadas pelo SINAN, a vigilância epidemiológica consegue mensurar o quantitativo de soros a ser distribuído aos estados, determinar pontos estratégicos de vigilância, estruturar as unidades de atendimentos aos acidentados, elaborar estratégias de controle dos animais, dentre outros (Manual SINAN, 2019).

No Brasil, no ano de 2019, foram notificados ao sistema cerca de 30 mil casos de acidentes envolvendo serpentes. Destes, 20.897 foram ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* (~ 70%), 2.610 por *Crotalus*, 620 por *Lachesis*, 326 por *Micrurus* e os demais atribuídos a serpentes não peçonhentas (SINAN, 2019) (Figura 1).

NOTIFICAÇÕES DE ACIDENTES OFÍDICOS - 2019

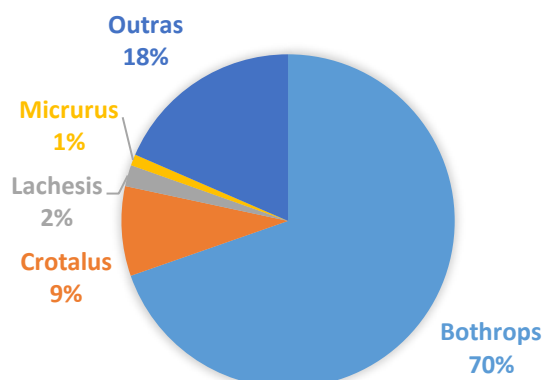


Figura 1: Porcentagens de notificação de acidentes ofídicos por gênero de serpentes - ano 2019.

Fonte: SINAN, 2019. Elaborado pelo autor

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam ampla distribuição ao longo do território nacional, sendo representadas por mais de 30 espécies encontradas em áreas rurais e de floresta, e nas periferias das grandes cidades. Apresentam grandes variações morfológicas e ecológicas de acordo com a localidade onde se encontram. Em relação aos seus hábitos podem ser arborícolas, semi-arborícolas ou terrestres; além disso, apresentam alimentação generalista, variando de acordo com as condições presentes (FERREIRA e FERREIRA, et al., 2020). Acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* são relatados em todas as regiões do país. Quando analisamos as notificações disponíveis no SINAN, é possível se observar que a região mais acometida com acidentes ofídicos é a Norte, seguida da Nordeste, Sudeste, Centro-oeste e Sul conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Ocorrência de acidentes botrópicos por região do Brasil – ano 2019

Região	Ano	Notificações	Óbitos
Sudeste	2019	4.201 (20%)	14 (15%)
Sul	2019	1.493 (7%)	5 (5%)
Centro – oeste	2019	2.169 (10%)	9 (10%)
Nordeste	2019	4.569 (22%)	24 (25%)

Norte	2019	8.465 (41%)	43 (45%)
Total		20.897	95

Fonte: SINAN, 2019². Elaborado pelo autor

Em razão da variedade de espécies e ampla distribuição geográfica, observa-se que tais serpentes apresentam variações significativas na composição e atividade dos venenos, o que pode afetar diretamente nas manifestações clínicas, no tratamento do envenenamento e na produção de soros. Diversos fatores podem ser associados a essa diversidade, dentre eles podemos destacar as características filogenéticas da espécie, sazonalidade, dieta, sexo, distribuição geográfica e estágio ontogenético das serpentes. Desta forma observa-se que os venenos de serpentes podem variar entre as espécies de um mesmo gênero, ou ainda, entre indivíduos de uma mesma espécie (Sousa, 2014).

De modo geral, o envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado, dentre outras manifestações clínicas, por grave dano tecidual no local de lesão. A ação do veneno pode desencadear uma série de efeitos como necrose muscular, hemorragia, edema, dermonecrose, formação de bolhas, desequilíbrio homeostático, grave inflamação, dentre outros (Gutiérrez; Rucavado, 2000). Na maioria dos casos, os danos ocorrem apenas no local da picada, porém em casos de envenenamento grave, as manifestações podem ocorrer de forma sistêmica. A hemorragia é o efeito mais relevante observado como consequência de envenenamentos ofídicos, não se limitando apenas ao local da picada, mas podendo se difundir para órgãos distantes, como o coração, rins, pulmão e cérebro (Asega et al., 2014). Em alguns casos, os locais das picadas, podem sofrer ação das bactérias residentes na microbiota bucal dos animais, levando a formação de abscessos e outras complicações devido à infecção secundária. Além disso, o processo inflamatório desencadeia uma resposta mediada pela ativação do sistema complemento e produção de citocinas, o que pode acentuar o dano tecidual local (Silva; Vilela; Possa, 2016).

A soroterapia é principal alternativa utilizada no tratamento contra o envenenamento por picadas de cobras, sendo baseada na administração de anticorpos purificados, produzidos em animais hipersensibilizados com o veneno da

² No ano de 2019 foi realizada a última atualização dos dados presentes na plataforma SINAN

serpente, comumente se utilizam equinos, mas também podem ser utilizados caprinos e ovinos. Os soros consistem em imunoglobulinas, ou fragmentos das mesmas (Fab) extraídos do plasma do animal, e isolados por cromatografia (Organização Mundial De Saúde, 2012). No Brasil, o soro antiofídico é produzido a partir de uma imunização realizada por uma mistura do veneno de apenas cinco serpentes. Desta forma, não é possível se neutralizar a atividade de todos os venenos disponíveis e por conta disso, sugere-se que mais venenos sejam incorporados nessa mistura, com o objetivo de ampliar o espectro de imunização (Machado, 2010).

Neste contexto, algumas moléculas vêm sendo analisadas como candidatas a serem utilizadas na terapêutica dos acidentes ofídicos. Podemos ressaltar, como avanço biotecnológico, o emprego de fragmentos de anticorpos recombinantes, mais precisamente a porção scFv (*single chain variable fragment*). No trabalho de Roncolato et al., (2013) foram expressos fragmentos do tipo scFv específicos para neutralizar componentes do veneno de *B. jararacussu*, porém ele se mostrou eficaz quando testando contra dos venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, demonstrando a sua potencialidade para abarcar várias serpentes dentro do gênero *Bothrops*. De forma similar, Silva et al., (2018) demonstraram a capacidade de um fragmento do tipo scFv em neutralizar os efeitos provenientes do veneno de *B. jaracussu* e de *Crotalus durissus terrificus*, que pertence a mesma família que *Bothrops*, porém em um gênero distinto que engloba as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis. O referido artigo destaca ainda a importância de se obter moléculas polivalentes, com o intuito de potencializar as terapias utilizadas.

Castro et al., (2014) obtiveram um fragmento variável de cadeia simples (ScFv) recombinante, a partir de anticorpo monoclonal recombinante (Mab) proveniente de camundongos sensibilizados com uma metaloproteinase oriunda do veneno de *B. asper*, a BaP1 (SVMP-I). Tal molécula recombinante apresenta as cadeias leve (VL) e pesada (VH) unidas por um peptídeo flexível, que funciona como linker. Quando expresso de forma heteróloga em *E. coli*, o fragmento foi capaz de reconhecer a toxina BaP1, e também de neutralizar as suas propriedades fibrinolítica, hemorrágica, miotóxica e pró-inflamatória. Além disso, demonstrou efeito similar contra a toxina BnP1 de *B. neuwiedi*, demonstrando assim, que o fragmento possui eficiência e tem potencial para ser utilizado na terapia contra acidentes ofídicos.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Gomes et al., (2019) expressaram o mesmo fragmento recombinante, porém utilizando como sistema de expressão as

plantas transgênicas. Da mesma forma, quando expresso em plantas, o fragmento demonstrou a sua eficácia frente as toxinas BaP1, BnP1 e pela Atroxlysina, metaloproteinase presente no veneno de *B. atrox*, uma serpente com grande relevância médica na região norte do país. Sendo este trabalho, demonstrada uma ampliação na polivalência do fragmento expresso, demonstrando o seu potencial terapêutico.

Foi demonstrado por Sousa, (2014) que os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* apresentam uma alta conservação filogenética, no que diz respeito a sua constituição proteica, sendo também observada tal conservação dentro do grupo das metaloproteinases (SVMPs). Além disso, o trabalho ainda avalia o potencial de reatividade de um anticorpo monoclonal frente a diferentes metaloproteinases de *Bothrops*, demonstrando a sua polivalência. Para tanto foi utilizado o MAJar-3, proveniente de clones de hibridomas, e que reconhece um epítipo conformacional localizado no domínio tipo desintegrina de uma SVMP de classe P-III do veneno de *B. jararaca*. O potencial do MAJar-3 já havia também sido demonstrado por Tanjoni et al., (2003), onde o monoclonal mostrou-se capaz de neutralizar a propriedade hemorrágica de serpentes do gênero *Bothrops*, além de conseguir reconhecer epítipos presentes em toxinas de *Crotalus* e *Lachesis*. Este achado evidencia a conservação filogenética das metaloproteinases presentes nos venenos de serpentes, além de demonstrar que as moléculas utilizadas como anti-venenos possuem potencial para serem exploradas no que diz respeito a sua polivalência.

Em relação ao desenvolvimento de moléculas na terapêutica de acidentes com animais peçonhentos, antes da produção e validação das moléculas, o uso de ferramentas bioinformáticas vêm contribuindo de forma significativa. Análises *in silico*, como o Docking Molecular podem prever as interações antígeno-anticorpos; a afinidade de ligação desse complexo pode ser avaliada através da Dinâmica Molecular; além de poderem ser visualizados a conformação das moléculas, seu comportamento frente a diferentes condições ambientais, sua estabilidade, dentre outros aspectos (Fernandes et al., 2021).

Compreender as interações proteína-proteína (PPI) é de suma importância quando se trata de processos biológicos, sendo tais interações intimamente relacionadas ao processo de desenvolvimento e análise de fármacos. Muitas técnicas experimentais podem ser utilizadas para determinar a estrutura, o funcionamento e as interações realizadas por proteínas, tais como espectometrias, cristalografia e

microscopia eletrônica, porém, podem apresentar algumas defasagens principalmente no que diz respeito ao tempo e custo de realização dos testes, o que abre portas para que os mesmos sejam realizados em consonância com testes *in silico* (métodos computacionais), a fim de se acelerar o processo (Ding; Khiara, 2019).

No campo das interações proteína-proteína (PPI), as interações antígeno anticorpo são altamente específicas e por conta disso, sua compreensão torna-se um alvo da imunologia, uma vez que estas podem ser vislumbradas como mecanismos terapêuticos para diversas comorbidades (Kulkarni-Kale et al., 2014). O desenvolvimento de terapias a base de anticorpos deve estar intimamente relacionado com a elucidação das formas de interação envolvidas no complexo antígeno-anticorpo, e para tanto, o emprego de ferramentas computacionais tem se mostrado promissor, uma vez que fornecem resultados sólidos e mais rápidos quando comparados aos métodos experimentais convencionais (Krawczyk; Dunbar; Deane, 2017).

Métodos de bioinformática estrutural, tais como a modelagem por homologia, *Docking molecular* do tipo proteína-proteína vêm sendo utilizados no design racional de anticorpos. As interações antígeno-anticorpo podem ser bem estabelecidas com o emprego das análises de *Docking molecular*, uma vez que tal metodologia consegue prever um complexo biológico baseado em ligações proteicas, com grande proximidade com as interações que ocorrem nos sistemas biológicos, demonstrando a sua funcionalidade para predição de afinidades entre anticorpos e moléculas antigênicas (Norman et al., 2020).

Diante da ampla distribuição de serpentes do gênero *Bothrops* no Brasil; da alta incidência de envenenamentos atribuídos a tal gênero e da necessidade de implementação de terapias auxiliares aos anti-venenos já existentes, torna-se promissora a busca por moléculas a serem utilizadas no tratamento de pacientes que se envolveram em acidentes ofídicos e que apresentem uma ampla abrangência, conseguindo abarcar as diversas serpentes compreendidas no gênero *Bothrops*. Neste panorama, devido a eficiência do fragmento scFvBaP1 frente as metaloproteinases presentes nos venenos de *B. asper*, *B. atrox* e *B. neuwiedi* (Gomes et al., 2019) neste capítulo foi avaliado a sua capacidade de reconhecer metaloproteinases, *in silico*, de venenos de outras serpentes do gênero, com o fim de propor a ampliação da sua polivalência.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por técnicas *in silico* o potencial polivalente de neutralização do fragmento scFvBaP1 frente a metaloproteinases presentes em venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar metaloproteinases a serem utilizadas como alvo;
- Avaliar as possíveis interações entre o fragmento scFv-BaP1 e os alvos por *docking* molecular;
- Descobrir as regiões específicas de interação antígeno-anticorpo;
- Propor o mecanismo de ação do fragmento scFvBaP1.

3. METODOLOGIA

3.1 Busca por metaloproteínas alvo

Para se avaliar o potencial do fragmento scFvBaP1 em reconhecer outras metaloproteínas, foi realizada uma busca por proteínas que apresentam similaridade com a toxina BaP1, de *Bothrops asper*. A busca foi realizada por meio da ferramenta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como critério de inclusão no estudo foram consideradas aquelas proteínas que apresentavam 60% ou mais de identidade (% ID) com a toxina BaP1; que se encaixavam na classificação de metaloproteínas e que pertenciam a serpentes do gênero *Bothrops*. Além disso, a partir das proteínas encontradas também se realizou uma análise de BLAST contra o banco de dados de proteínas (do inglês *Protein Data Bank* PDB; <https://www.rcsb.org/>) com o objetivo de encontrar *templates* para modelagem molecular. As sequências das proteínas selecionadas para estudo foram submetidas a um alinhamento múltiplo com auxílio do software Clustal Ω (Sievers et al., 2011; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.2 Modelagem computacional do fragmento scFvBaP1 e proteínas alvo

A modelagem molecular das estruturas foi realizada utilizando-se o programa MODELLER na versão 9.19 (Carter; Sweet, 2003), seguindo o método da modelagem por homologia. A busca dos moldes estruturais foi realizada por meio do servidor HHPred (Soding; Bierget; Lupas, 2005). Para a modelagem do fragmento scFvBaP1 foi utilizado como molde um scFv derivado do anticorpo Ixekizumab (PDB ID: 6NOU; DURBIN et al., 2019), possuindo as cadeias VH e VL unidas com o mesmo peptídeo linker. No geral foram gerados 2000 modelos, dos quais foram escolhidos 100 modelos de acordo com o DOPE score (*Discrete Optimized Protein Structure*). O melhor modelo, de 100, foi selecionado por meio da sua avaliação no QMEAN (Benkert; Biasini; Schwede, 2011). O melhor modelo também foi analisado pelo

PROSA II (Wiederstein; Sippl, 2007), tendo sua qualidade estereoquímica verificada pelo PROCHECK (Laskowski et al., 1993) e QMEAN (Benkert; Biasini; Schwede, 2011). As estruturas geradas foram observadas pelo programa *Pymol Molecular Graphics System* na versão 1.6 (Schrodinger, LLC).

3.3 Docking Molecular

As interações entre o fragmento scFvBaP1 e as proteínas alvo (antígenos) foram avaliadas por meio de *docking molecular*. As análises foram realizadas utilizando o software ZDOCK na versão 3.0.2 (Pierce et al., 2014). Foram realizadas ligações do tipo proteína-proteína, sendo as proteínas alvo consideradas como receptores e o fragmento scFvBaP1, ligante. Os resíduos do ligante foram determinados como flexíveis para melhor cobertura do antígeno. As dez estruturas finais foram avaliadas com o auxílio do PyMOL v 1.6 (Schrodinger, LLC).

4. RESULTADOS

4.1 Busca por metaloproteínas alvo

A partir da busca comparativa realizada através da ferramenta BLAST, foram identificadas nove toxinas alvo que se enquadraram nos critérios de busca estipulados previamente para o estudo (Tabela 2). Além dos critérios, ainda foi inserido na determinação dos alvos a região de ocorrência da serpente a ser analisada, como forma de tentar abranger todas as regiões do país. Foram inseridas na análise outras Metaloproteínas com similaridade à BaP1, porém fora do gênero *Bothrops*. Apesar de não se enquadrarem em todos os critérios definidos, tais enzimas estão presentes no veneno de serpentes que também possuem relevância médica, devido a também estarem relacionadas com parte significativa de acidentes ofídicos.

Tabela 2: Toxinas escolhidas como alvo terapêutico – gênero *Bothrops*

Espécie	Cobertura %	Identidade %	Regiões de ocorrência
<i>B. leucurus</i>	99	79	Norte, Sudeste
<i>B. moojeni</i>	99	81	Centro–Oeste, Sudeste
<i>B. jararacussu</i>	99	81	Centro–Oeste, Sudeste
<i>B. insularis</i>	99	82	Sudeste
<i>B. pauloensis</i>	96	70	Centro–Oeste
<i>B. pirajái</i>	97	69	Nordeste (+ MG)
<i>B. jararaca</i>	99	65	Centro–Oeste, Sudeste
<i>B. neuwiedi</i> ³	99	81	Sudeste, Sul
<i>B. atrox</i> ⁴	99	82	Norte

³ Reconhecida previamente pelo scFvBaP1

⁴ Reconhecida previamente pelo scFvBaP1

Figura 2: Alinhamento de sequências das metaloproteínas alvo. Alinhamento realizado com o Software Clustal Ω. As sequências apresentam-se conservadas demonstrando similaridade entre os alvos selecionados. As caixas em vermelho indicam conservação do sítio de atividade das metaloproteínas (H₁₄₂EXXHXXGXXH₁₅₂). A caixa em azul indica a conservação de um aminoácido Lisina, o qual participa do processo de neutralização das enzimas por meio da ancoragem dos anticorpos.

4.2 Modelagem computacional do fragmento scFvBaP1 e proteínas alvo

A partir dos 2000 modelos obtidos foram pré-selecionados 100 modelos, a partir dos seus valores de DOPE score, com o intuito de refinamento das análises. Posteriormente, tais modelos foram submetidos a análises de qualidade tendo sido escolhido aquele que apresentava os melhores resultados. O modelo escolhido apresentou resolução similar a uma estrutura resolvida por NMR (z-score -4, 94); além de apresentar 88,5% dos seus resíduos de aminoácidos em regiões mais favoráveis, 8% em regiões adicionalmente permitidas, 1% em regiões generosamente aliadas e apenas 2,5% em regiões proibidas no Ramachandran Plot. Por meio de tal análise são considerados bons modelos aqueles que apresentem mais que 90% dos seus resíduos em regiões permitidas e favoráveis. Pela análise de Qmean, o z-score obtido foi |-1,05|, sendo também considerado um valor ótimo para bons modelos uma vez que software considera como tal, modelos que apresentem valores entre -2 e 2 (modular). Os modelos obtidos podem ser visualizados na figura 3. Conforme o desenho do cassete do fragmento em questão, o modelo foi obtido demonstra na sua porção N' terminal a cadeia pesada (VH), um peptídeo linker flexível compostos por aminoácidos Glicina e Serina e a cadeia leve (VL), seguida da cauda de Histidina na porção C' terminal. Além de tais estruturas também são indicadas as regiões de complementariedade ao antígeno (CDR).

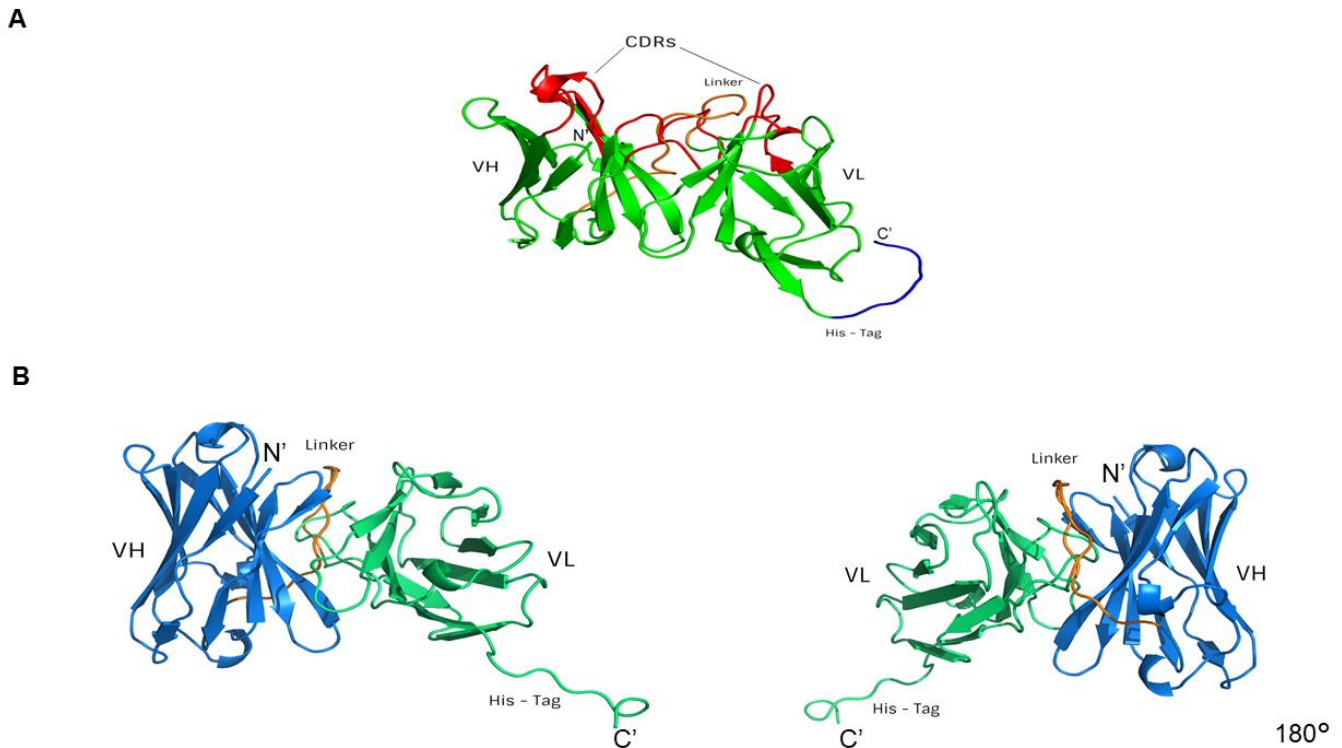
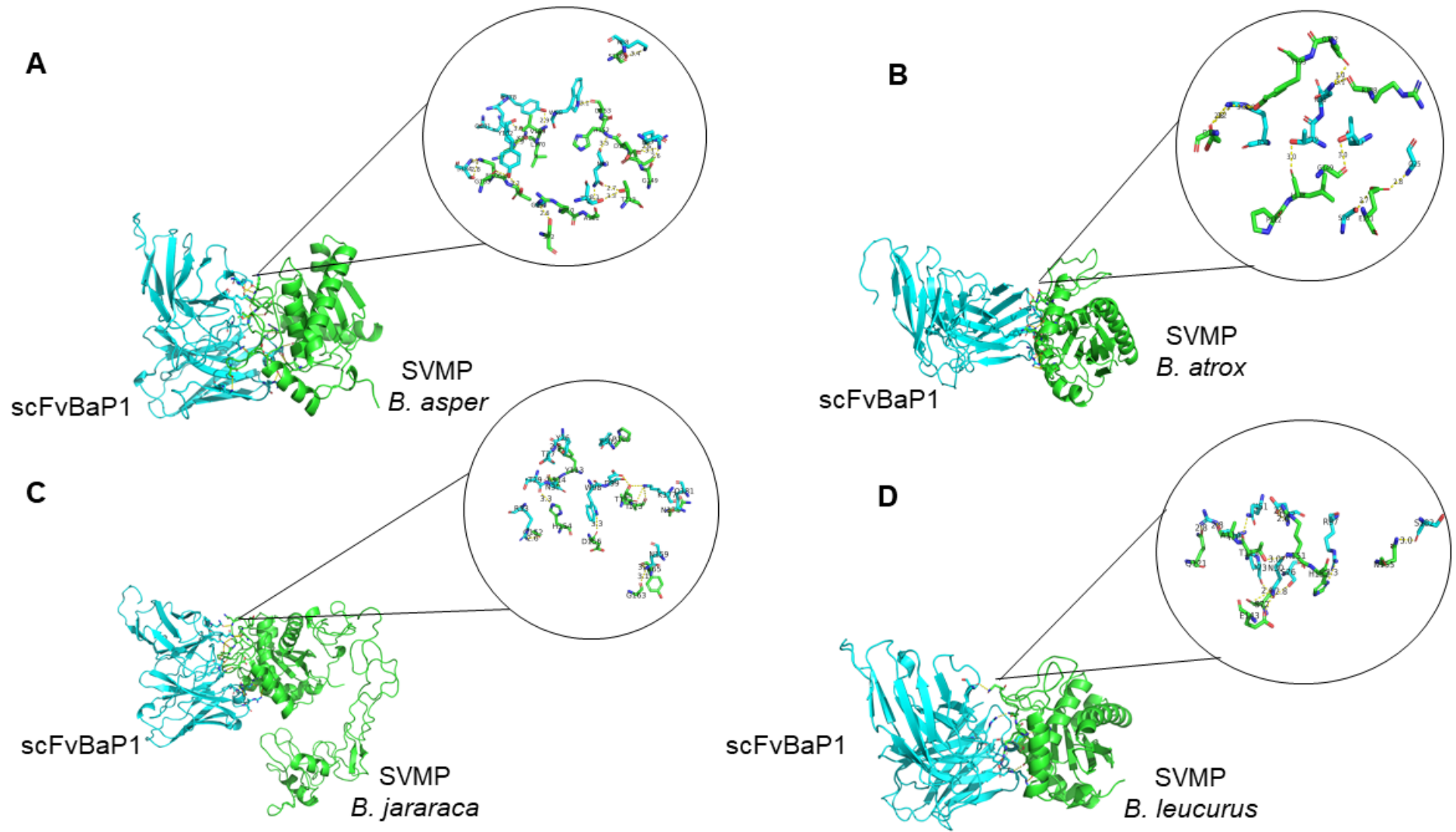


Figura 3: Representação do melhor modelo obtido a partir da sequência do scFvBaP1.A - Representação do fragmento scFvBaP1. Em verde as cadeias VH e VL; unidas pelo peptídeo linker, em laranja; em vermelho as regiões de CDR; em azul a cauda de Histidina. B – Representação do fragmento scFvBaP1 diferenciando as duas cadeias (VH e VL). Demonstração em posição original e rotação em 180°.

As imagens foram geradas no programa PyMol.

4.3 Docking Molecular

Quando analisamos os *dockings* moleculares, realizados com o intuito de investigar a afinidade do scFvBaP1 com as metaloproteinases escolhidas como alvos, é possível se observar que o fragmento é capaz de reconhecer todos os alvos analisados, como demonstra a Figura 4.



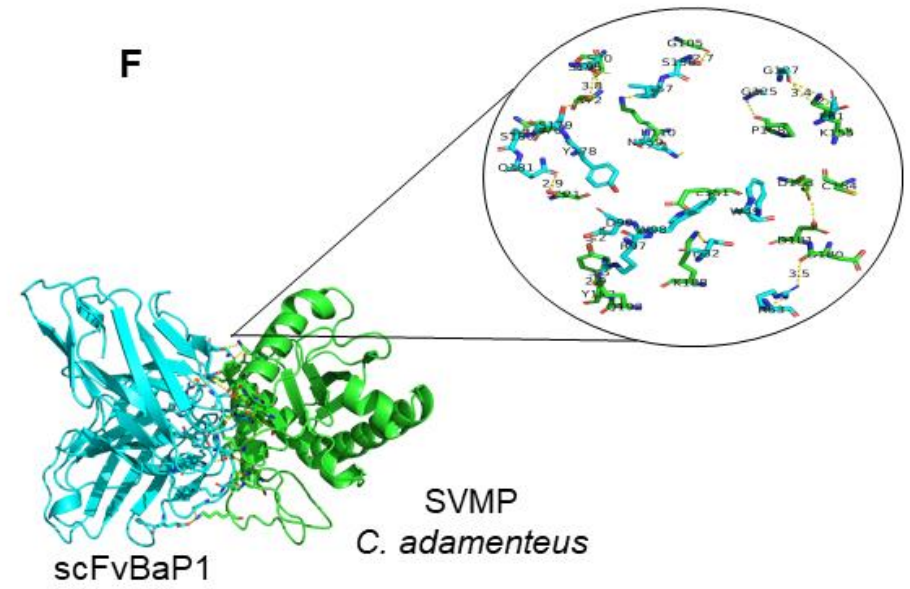
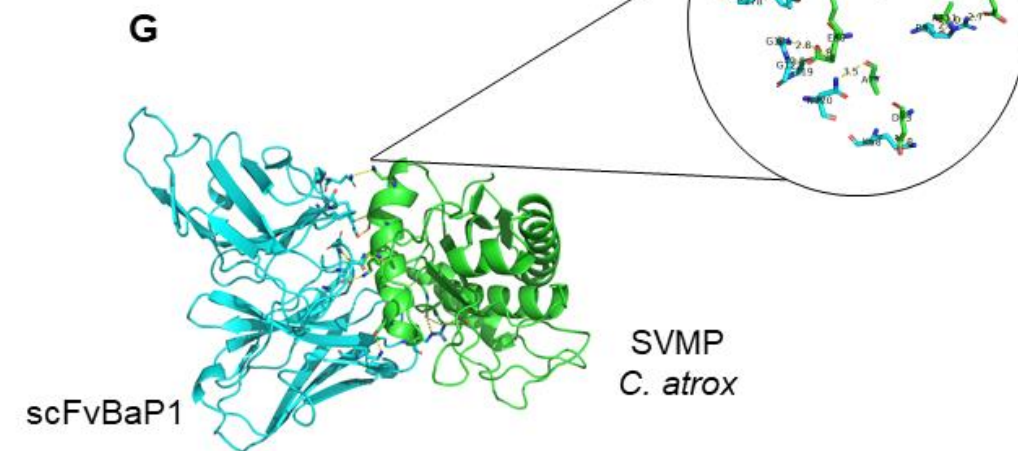
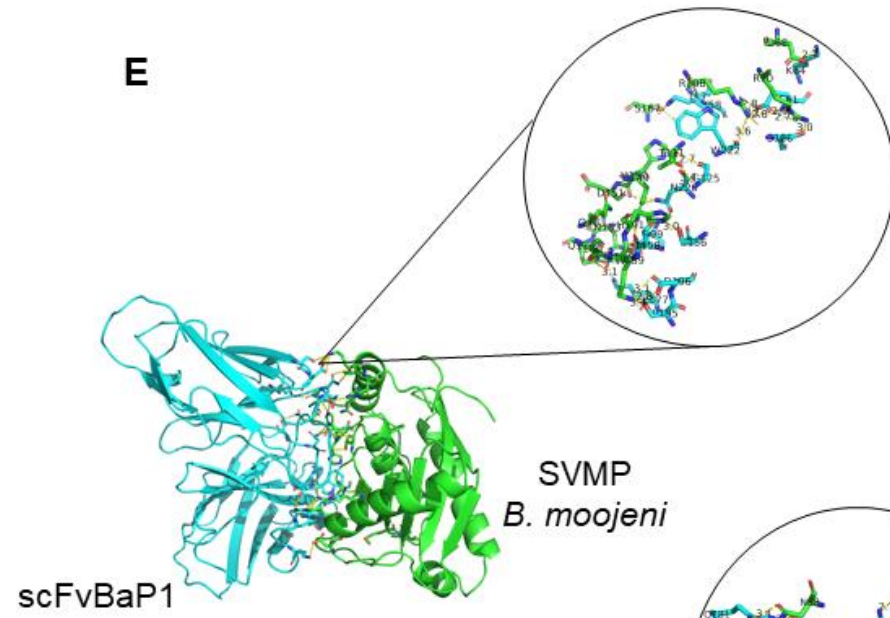


Figura 4: Análise de docking molecular entre o scFvBaP1 e as SVMPs alvo. Em azul a representação do fragmento scFvBaP1; em verde as metaproteínases (SVMPs) – alvo; a visualização em zoom corresponde aos locais de interação (pontes de hidrogênio) entre o complexo protéico. Em A- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. asper*, em B- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. atrox*; em C- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. jararaca*; em D- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. leucurus*; em E- scFvBaP1 associado a SVMP de *B. moojeni*; em F- scFvBaP1 associado a SVMP de *C. adamanteus*; em G- scFvBaP1 associado a SVMP de *C. atrox*.

É possível se observar que houve interação do anticorpo com os referidos antígenos, por meio da formação de ligações de hidrogênio entre aminoácidos presentes entre as duas cadeias. Para tanto, foram consideradas pontes de hidrogênio formadas entre aminoácidos distantes em até 3,6 Å.

A maioria das ligações observadas se deram entre regiões de complementariedade aos antígenos (CDRs), presentes nos anticorpos associadas ao sítio de atividade das metaloproteinases e regiões circunvizinhas. O sítio de atividade das metaloproteinases de *B. asper*, *B. atrox*, *B. leucurus* e *B. moojeni* demonstrou interação com o fragmento scFvBaP1 sugerindo que a sua neutralização possa estar relacionada a um impedindo físico neste local, impedindo a ligação dos íons de zinco, cofatores das enzimas em questão. Apesar dessa ligação ter sido observada nos alvos supracitados, o reconhecimento de tais regiões foram realizados por CDRs diferentes, nas SVMPs de *B. asper* e *B. atrox* quem participa da inibição é o primeiro CDR presente na cadeia pesada do anticorpo (VH), enquanto na SVMP de *B. leucurus* tal interação é feita pelo terceiro CDR da mesma cadeia, sendo que em *B. moojeni*, o responsável pela inibição é o primeiro CDR da cadeia leve (VL).

Já nas demais SVMPs não foram observadas interações diretas com os seus respectivos sítios de atividade, sugerindo que a inibição da atividade de tais enzimas pode estar relacionado com outros mecanismos de ação. As interações provenientes das análises, bem como as regiões de CDRs envolvidas no reconhecimento de cada SVMP está descrita na tabela 3.

Em relação a quantidade de CDRs interagindo em cada alvo, foram observadas variações. Em *B. asper* e *B. atrox*, apesar da atividade biológica do fragmento scFvBaP1 ter sido comprovada *in vitro* (Gomes et al., 2019), observa-se uma menor participação em relação ao número de CDRs, no entanto há uma ligação direta com o sítio de atividade das metaloproteinases. Além disso, quando olhamos de forma

mais minuciosa, avaliando as interações aminoácido-aminoácido, em tais complexos são observadas uma maior formação de pontes de hidrogênio, em relação as demais, o que pode sugerir que a interação entre as proteínas seja mais forte. A validação de tais interações, no entanto, deverão ser confirmadas a partir da relação de tais dados com os resultados obtidos nas dinâmicas moleculares.

SVMP	CDR 1 - VH	CDR 2- VH	CDR 3- VH	CDR 1- VL	CDR 2- VL	CDR 3- VL	Sítio de atividade	Regiões adjacentes
<i>B. asper</i>	X		X		X		X	
<i>B. atrox</i>	X	X					X	
<i>B. jararaca</i>		X	X	X	X			X
<i>B. leucurus</i>	X	X	X		X		X	
<i>B. moojeni</i>		X		X	X		X	X
<i>C. adaman</i>		X	X	X	X			X
<i>C. atrox</i>	X	X			X	X		X

Tabela 3: Regiões de complementaridade ao antígeno (CDRs) que possuem interação com as SVMPs-alvo. Em vermelho os CDRs que interagem com os sítios de atividade das respectivas SVMPs.

Fonte: Elaborado pelo autor

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a soroterapia é a única forma de tratamento disponível para pacientes que se envolvem em acidentes ofídicos. Tal terapia apesar de apresentar grande eficácia e de estar presente no mercado há décadas, apresenta limitações tais como: o desencadeamento de reações adversas, como a anafilaxia e a doença do soro; altos custos de produção; dentre outras (Laustsen, 2016). Grande parte dos soros antiofídicos disponíveis consiste em imunoglobulinas inteiras do tipo IgG ou fragmentos do tipo Fab, ambos provenientes de animais sensibilizados, entretanto, cerca de 70% das imunoglobulinas utilizadas não são específicas para as toxinas de serpentes, sendo oriundas de infecções anteriores à sensibilização do animal. (Szteiter et al., 2021).

Diante deste cenário, a busca por estratégias alternativas para o desenvolvimento de novos anti-venenos se torna de grande validade. Para tanto, podem ser utilizadas uma gama de moléculas tais como inibidores naturais e sintéticos; peptídeos; fagos bacterianos; e anticorpos poli e monoclonais, além de seus fragmentos recombinantes. Essas moléculas vêm se demonstrando altamente eficazes, além de minimizarem os efeitos colaterais e apresentarem menor custo de produção (Ainsworth Et Al., 2018; Lauridsen Et Al., 2017; Tan Et Al., 2025). Neste trabalho, o potencial de polivalência de um fragmento de anticorpo, scFvBaP1 (Castro et al., 2014) contra metaloproteinases de *Bothrops sp.* foi avaliado por meio de técnicas de docking molecular. O fragmento utilizado foi previamente avaliado *in vitro* contra venenos de algumas serpentes do gênero onde demonstrou atividade contra o veneno de *B. asper*, *B. atrox* e *B. neuwiedi* (Gomes etAl., 2019).

As metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs) são enzimas zinco-dependentes, abundantes em venenos de serpentes das famílias *Viperidae* e *Crotalinae* e pouco abundantes nas famílias *Elapidae* e *Colubridae*. Tais enzimas são classificadas em quatro classes, de acordo com os domínios presentes em sua composição. A classe I (SVMP-I), consiste na classe mais simples, sendo constituída por um peptídeo sinal e apenas um domínio metaloproteinase (Olaoba et al., 2020).

Neste trabalho foi demonstrada a capacidade de reconhecimento do fragmento scFvBaP1, *in silico*, frente a metaproteinases (SVMPs) componentes dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. O reconhecimento de SVMPs de espécies

contidas em gêneros diferentes pode estar associado ao fato de tais moléculas apresentarem alta conservação filogenética, como demonstra o estudo de Souza, (2014). Neste contexto, além da conservação filogenética observada nos alvos, também podemos atribuir tais achados à propriedade polivalente do fragmento, corroborando os achados de Silva et al., (2018), que também demonstra o reconhecimento de SVMPs de *C. terrificus*, por meio de um scFv específico para *B. jararacussu*.

No trabalho de Souza et al., (2020) foi avaliado o potencial de polivalência de um fragmento scFv proveniente de anticorpos monoclonais obtidos a partir da sensibilização de galináceos com SVMPs de *B. pauloensis*. De forma similar aos nossos resultados, o scFv em questão reconheceu SVMPs componentes dos venenos de *B. leucurus* e *B. moojeni*, além de uma espécie compreendida no gênero *Crotalus*. Apesar de ter uma origem diversa do fragmento scFvBaP1, tais resultados são importantes para substantiar a proposta de polivalência deste anticorpo.

As interações observadas entre o complexo antígeno-anticorpo foram interações eletrostáticas entre os resíduos, por meio da formação de pontes de hidrogênio. De acordo com Dasikan; Maiti e Ayappa (2020), as pontes de hidrogênio são ligações cruciais na determinação da estabilidade das interações proteína-proteína. Nos complexos obtidos por meio da interação scFvBaP1 e SVMPs das serpentes *B. asper* e *B. atrox*, foram observadas uma maior quantidade de pontes de hidrogênio em relação aos demais complexos. Essa variação observada nas interações proteína-proteína pode estar atrelada a afinidade do anticorpo aos diferentes antígenos, o que pode refletir na sua eficácia de neutralização dos efeitos provenientes da ação das SVMPs avaliadas. Tal fato é demonstrado no trabalho de Boorla et al., (2020) no qual a quantidade de ligações de hidrogênio, bem como a média das distâncias entre os aminoácidos que interagem, foram utilizadas como parâmetro de validação da afinidade de anticorpos do tipo scFv capazes de reconhecer uma subunidade protéica do SARS-CoV-2

As interações antígeno-anticorpo são primariamente realizadas por aminoácidos presentes nas regiões de complementaridade ao antígeno (CDRs), que são regiões cruciais para a capacidade de reconhecimento dos anticorpos. Os CDRs presentes no fragmento scFvBaP1 participam ativamente da formação de ligações com diferentes regiões das SVMPs, sendo capazes de se ligar simultaneamente em diferentes pontos das toxinas, formando *loopings* capazes de englobar diferentes

partes da molécula-alvo. Quando esse comportamento de ligações diversas é observado em scFvs, de acordo com Ali et al., (2021), isto pode indicar que o mecanismo de ação do anticorpo está atrelado ao reconhecimento de epítomos conformacionais.

Além das regiões de CDR também foi encontrada a interação de aminoácidos Glicina com diferentes regiões dos antígenos. O fragmento scFvBaP1 possui um peptídeo flexível rico em Glicinas e Serinas, que tem como finalidade a união das cadeias VH e VL, porém de forma convencional tal região não foi alocada para interagir com antígenos de forma proposital. Em uma análise de docking anteriormente realizada por Castro et al., (2014) a influência da inserção do *linker* no fragmento scFvBaP1 não pode ser demonstrada, uma vez que tal estrutura foi desconsiderada para as análises. Porém, torna-se de suma importância demonstrar essa influência uma vez que, quando realizadas as análises biológicas, o *linker* está presente na molécula. A participação do *linker* no reconhecimento de regiões antigênicas, provavelmente ocorre de forma acidental e deverá ser verificada para avaliar se esta tem a capacidade de influir negativamente na ligação de outros aminoácidos, presentes nas regiões de CDR, por exemplo. No entanto, como ressalta Qu et al., (2021) tais interações podem ser consideradas normais devido à alta flexibilidade atribuída aos resíduos de glicina.

De acordo com Castro et al., (2014), a partir de análises de *docking* molecular, a atividade biológica do fragmento scFvBaP1 pode estar relacionada com o reconhecimento específico do sítio catalítico das metaloproteinases, ou com uma neutralização por impedimento estérico, por meio da ligação a epítomos localizados em regiões circunvizinhas. O sítio catalítico das metaloproteinases corresponde a uma sequência consenso altamente conservada (H₁₄₂EXXHXXGXXH₁₅₂), a qual forma uma fenda onde insere-se um íon de zinco (Zn), atuando como cofator (Yee et al., 2017).

Nos complexos formados pelo scFvBaP1 associado as metaloproteinases de *B. asper*, *B. atrox*, *B. leucurus* e *B. moojeni*, as regiões de CDR do anticorpo interagiram diretamente com o sítio de atividade das SVMs, mais especificamente com o resíduo Histidina₁₅₂ (H₁₅₀ em *B. moojeni*) o qual possui grande relevância na atividade catalítica da enzima, por auxiliar na ancoragem dos íons de zinco. Tais associações corroboram o mecanismo proposto por Castro et al., (2014), reforçando a eficácia no fragmento na neutralização dos efeitos degradantes das SVMs. Além

disso, Xie et al., (2020) destacam a importância de se obter moléculas cujo direcionado está atrelado ao sítio de atividade das SVMs. O autor elenca uma série de moléculas, tais como fármacos sintéticos, derivados de metabólitos secundários de plantas, peptídeos e agentes quelantes que vêm sendo testados como antivenenos pela sua propriedade de inibir a ancoragem do zinco ao sítio catalítico das SVMs.

No entanto, quando associado às SVMs de *B. jararaca*, *C. adamanteus* e *C. atrox* as regiões de CDR do fragmento scFvBaP1 se associaram a aminoácidos fora do sítio de atividade de tais enzimas. Tal forma de associação também havia sido prevista por Castro et al., (2014) como anteriormente citado. Um mecanismo similar foi encontrado no trabalho de Karim-Silva et al., (2020), no qual demonstrou-se que, quando um fragmento scFv se liga a diversos pontos de determinado antígeno, ocorre um impedimento de que essas proteínas se associem a outras, fazendo com que elas sejam impedidas de desempenhar a sua atividade.

No que diz respeito às SVMs os seus principais efeitos no contexto do envenenamento ofídico são a hemorragia, a dermo e a mionecrose. A hemorragia é consequência da degradação das proteínas que constituem a membrana basal dos vasos sanguíneos, enquanto a dermo e a mionecrose são atreladas à clivagem de proteínas como colágeno, fibrina, fibrinogênio etc (GUTIÉRREZ et al., 2016). Para que essas proteínas sejam degradadas é necessário que as SVMs se associem a elas, no entanto como o scFvBaP1 se liga em vários pontos das SVMs, isso pode impedir que elas interajam com outras proteínas, sendo então, uma forma de neutralização da sua atividade.

6. CONCLUSÕES

Neste capítulo foi possível se avaliar a interação do fragmento scFvBaP1 com metaloproteinases presente nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. É importante ressaltar que no experimento foram inseridas metaloproteinases além das quais foram utilizadas para avaliação da atividade do fragmento *in vitro* e *in vivo*, demonstrando assim que ele apresenta potencial para abranger de forma ampla, o gênero *Bothrops*, e abrindo portas para que sua atividade também seja experimentalmente testada com um número maior de serpentes.

Além disso, foi demonstrado a partir do *Docking molecular* que o fragmento neutraliza a atividade das metaloproteinases, basicamente, por meio de dois mecanismos de ação: ligação direta ao sítio de atividade da enzima impedindo a interação com o cofator e ligação em regiões circunvizinhas, associando-se a molécula enzimática e impedindo que ela se ligue a outros componentes, como por exemplo o colágeno, a fibrina que são alvos de degradação delas.

Tais achados abrem portas para que o fragmento possa ter a sua ação explorada, uma vez que, conhecendo seu mecanismo de atividade a sua utilização pode ser mais bem direcionada. Além disso, poderão ser feitas melhorias a nível molecular para que as interações antígeno-anticorpo possam ser acentuadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEGA, A. F. et al. **Toxicon Interaction of Bothrops jararaca venom metalloproteinases with protein inhibitors**. Toxicon, v. 80, p. 1–8, 2014.

AINSWORTH, S. et al. **The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms**. Commun. Biol. 1:34, 2018.

BOORLA, V. S.; CHOWDHURY, R.; MARANAS, C. D. **De novo design of high-affinity antibody variable regions (scFv) 1 against the SARS-CoV-2 spike protein**. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.034868>, 2021.

BRASIL, Manual de Operação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2019. Disponível em:

https://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Aplicativos/relatorios/Manual%20de%20Operacao%20SINAN%20Relatorios%20-%20versao_4.8.pdf.4.

CASTRO, J. M. A. et al. **A neutralizing recombinant single chain antibody, scFv, against BaP1, A P-I hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops asper snake venom**. Toxicon, v. 87, p. 81–91, 2014.

DING, Z.; KIHARA, D. **Computational identification of protein-protein interactions in model plant proteomes**. Scientific reports. v. 9, 2019.

FERNANDES, C. F. C. et al. **Engineering of single-domain antibodies for next-generation snakebite antivenoms**. International Journal of Biological Macromolecules. v.185, p. 240–250, 2021.

FERREIRA, A. A. F.; et al. **Increase in the risk of snakebites incidence due to changes in humidity levels: A time series study in four municipalities of the state of Rondônia**. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine Vol. 53, 2020.

GOMES, M. et al. **Expression of an scFv antibody fragment in *Nicotiana benthamiana* and in vitro assessment of its neutralizing potential against the snake venom metalloproteinase BaP1 from *Bothrops asper***. *Toxicon*, v. 160, p. 38-46, 2019.

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

GUTIÉRREZ, J. M. et al. **A Comprehensive View of the Structural and Functional Alterations of Extracellular Matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel Perspectives on the Pathophysiology of Envenoming**. *Toxins*, 8, 304, 2020.

KARIM-SILVA, K. et al. **Loxoscelism: Advances and Challenges in the Design of Antibody Fragments with Therapeutic Potential**. *Toxins*, 12, 156, 2020.

KRAWCZYK, K., DUNBAR, J., DEANE, C. M. **Computational tools for aiding rational antibody design**. *Methods Mol Biol*. v.1529, p.399–416, 2017.

KULKARNI-KALE, U. et al. **Antigen–Antibody Interaction Database (AgAbDb): A Compendium of Antigen–Antibody Interactions**. *Immunoinformatics, Methods in Molecular Biology*, vol. 1184, 2014.

LAUSTSEN, A.H. Snakebites: **Costing recombinant antivenoms**. *Nature*, 538, 41, 2016.

LAURIDSEN, L.P. et al. **Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca***. *J. Proteom.* 2017, 150, 98–108. [CrossRef]

MACHADO, T. *Filogenia Molecular de Serpentes do gênero *Bothrops* do tipo neuwiedii*. Dissertação. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MENALDO, D. L. et al. **Purification procedure for the isolation of a P-I metalloprotease and an acidic phospholipase A 2 from *Bothrops atrox* snake venom.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 21, n. 28, p. 1–14, 2015.

MODELLER: generation and refinement of homology-based protein structure models. In Methods in Enzymology, C.W. Carter and R.M. Sweet, eds. Academic Press, San Diego, 374, 463-493, 2003.

NORMAN, R. A. et al. **Computational approaches to therapeutic antibody design: established methods and emerging trends.** Briefings in Bioinformatics, V. 21, p 1549–1567, 2020.

PIERCE, B. G. et al. **ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers.** Bioinformatics 30(12): 1771-3, 2014.

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

QU, L. et al. **Analysis of Binding Modes of Antigen–Antibody Complexes by Molecular Mechanics Calculation.** J. Chem. Inf. Model., v. 61, p. 2396–2406, 2021.

RONCOLATO, E. C. et al. **Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops sp.* venoms.** Journal of Immunotoxicology, v. 2, p. 160-168, 2013.

Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins D Molecular Systems Biology 7 Article number: 539 doi:10.1038/msb.2011.75

SILVA, P. R. G. V. DE F.; VILELA, R. V. R.; POSSA, A. P. **Infecções secundárias**

em acidentes ofídicos: uma avaliação bibliográfica ISSN. Estudos vida e saúde, v. 43, n. 1, p. 17–26, 2016.

SILVA, L. C. et al., **Discovery of human scFvs that cross-neutralize the toxic effects of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms.** Acta Tropica. V.17 7, p. 66-73, 2018.

SINAN – SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, Ministério da Saúde. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>.

SOUSA, L. F. Estudo de venenos de serpentes do complexo Bothrops, uma comparação da filogenia e da reatividade com antivenenos. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

SZTEITER, S. S. et al. **Examination of the Efficacy and Cross-Reactivity of a Novel Polyclonal Antibody Targeting the Disintegrin Domain in SVMs to Neutralize Snake Venom.** Toxins, v. 13, 254, 2021.

TAN, C., et al. **Antivenom cross-neutralization of the venoms of *Hydrophis schistosus* and *Hydrophis curtus*, two common sea snakes in Malaysian waters.** Toxins 7, 572–581, 2015.

TANJONI, I. et al. **Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies.** Toxicon, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.

XIE et al. **Neutralizing effects of small molecule inhibitors and 3 metal chelators on coagulopathic Viperinae snake 4 venom toxins.** Biomedicines, bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.129643>, 2020.

YEE, K. T. et al. **Snake Venom Metalloproteinases and Their Peptide Inhibitors from Myanmar Russell's Viper Venom.** Toxins v. 9, 15, 2017.

CONCLUSÕES GERAIS

De forma geral, neste trabalho foram realizados experimentos preliminares, porém de suma importância. Com a caracterização das linhagens transgênicas foi possível avaliar qual delas apresentou maior potencial para ser utilizada como fonte de escalonamento do fragmento scFvBaP1, a partir por exemplo, da obtenção de suspensões celulares em biorreatores. Além disso, foi possível se predizer também a quantidade de cópias do gene de interesse inserida no processo de transgenia e correlacionar tal evento à produção de proteínas.

A produtividade de cada uma das plantas foi verificada, tornando possível um trabalho de forma mais direcionada utilizando apenas aquela linhagem mais rentável. Ademais, foi ainda demonstrado uma forma de potencialização de tais taxas, por meio da utilização de lâmpadas de led, que consiste numa forma barata e de fácil utilização e que muito tem a contribuir aos rendimentos de proteínas recombinantes expressas em plantas transgênicas.

Um outro ponto importante no que tange a compreensão do fragmento scFvBaP1, foi a caracterização da molécula de anticorpo em si. Compreender seus aspectos físico-químicos é fundamental quando se pensa na administração desta molécula em modelos animais e futuramente na sua veiculação como fármaco. Também foi analisada a questão da alergenicidade *in silico*, uma vez que, uma molécula não alergênica por si só já traz consigo um grande potencial, podendo ser veiculada de forma segura e sem efeitos colaterais.

Salienta-se ainda, neste trabalho, que o fragmento scFvBaP1 apresentou, *in silico*, polivalência uma vez que fora testado frente a diversas metaloproteinases de serpentes do gênero *Bothrops* e também no gênero *Crotalus*. Tal achado apresenta grande relevância quando se leva em consideração que a maioria dos acidentes ofídicos são ocasionados por serpentes desses gêneros e que a maioria dos pacientes não sabem identificar de forma correta qual a serpente que ocasionou a picada. Nesses casos é administrado um soro genérico, porém menos efetivo.

Ressalto a importância do estudo do mecanismo de ação do fragmento, onde foi possível visualizar como acontece de fato a interação antígeno-anticorpo. O que

pode facilitar a utilização do fragmento, frente a outras aplicabilidades, uma vez que este poderá ser sítio-direcionado.

Como forma complementar a este estudo torna-se necessário à validação dos dados obtidos *in silico*, em modelos *in vivo*. Visando corroborar os dados encontrados até o presente momento e contribuir de forma mais efetiva para que o fragmento possa ser utilizado, futuramente, como um medicamento biológico.