



RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 11/12/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

MARCELA ROMANAZZI

**DESCOBERTA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS
NEUTRALIZANTES DE SERINOPROTEASES A PARTIR DA TÉCNICA DE
PHAGE DISPLAY PARA PRODUÇÃO DE SORO ANTIBOTRÓPICO DE
NOVA GERAÇÃO**

**Araraquara
2026**

MARCELA ROMANAZZI

**DESCOBERTA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS
NEUTRALIZANTES DE SERINOPROTEASES A PARTIR DA TÉCNICA DE
PHAGE DISPLAY PARA PRODUÇÃO DE SORO ANTIBOTRÓPICO DE
NOVA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a) Manuela Berto Pucca
Coorientador(a): Prof. Dr. Felipe Augusto Cerni

**Araraquara
2026**

R758d

Romanazzi, Marcela

Descoberta de anticorpos monoclonais humanos neutralizantes de serinoproteases a partir da técnica de Phage Display para produção de soro antibotrópico de nova geração / Marcela Romanazzi. --

Araraquara, 2026

166 p. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara

Orientadora: Manuela Berto Pucca

Coorientador: Felipe Augusto Cerni

1. Anticorpos monoclonais. 2. Bacteriófagos. 3. Antivenenos. 4.

~~Tratamento. I. Título.~~

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Descoberta de anticorpos monoclonais humanos neutralizantes de serinoproteases a partir da técnica de Phage Display para produção de soro antibotrópico de nova geração**

AUTORA: MARCELA ROMANAZZI FERNANDES

ORIENTADORA: MANUELA BERTO PUCCA

COORDENADOR: FELIPE AUGUSTO CERNI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MANUELA BERTO PUCCA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Prof. Dr. JOSÉ RAFAEL DE ALMEIDA (Participação Virtual)
Instituto Butantan

Profa. Dra. ISADORA SOUSA DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Centro Universitário Estácio de Ribeirão Preto

Araraquara, 11 de junho de 2026.

*A minha mãe,
Cora Romanazzi Tôrres,
pelo apoio constante e por sempre estar presente.*

*Aos meus irmãos,
Izabel Romanazzi Fernandes & Lucas Romanazzi Menescal
companheiros de vida, histórias e sonhos.*

*A grandíssima orientadora,
Manuela Berto Pucca,
que seu conhecimento e dedicação ecoem muito além deste trabalho.*

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Manuela Berto Pucca, expresso minha mais profunda e sincera gratidão por ter conduzido esta trajetória com excelência, generosidade e humanidade. Obrigada por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que tudo parecia difícil, pela confiança depositada no meu trabalho, pelos ensinamentos científicos e pessoais e pela dedicação incansável à minha formação. Sua paixão pela ciência, sua força e sua competência foram inspiração diária ao longo desta caminhada. Muito do que sou hoje como pesquisadora foi construído através dos seus ensinamentos, exemplos e apoio constante.

Ao meu coorientador, Dr. Felipe Augusto Cerni, agradeço imensamente por toda contribuição, disponibilidade e incentivo ao longo deste trabalho. Obrigada pelas discussões científicas, pelas orientações, pelo suporte e por toda ajuda durante esta jornada. Sua participação foi fundamental para meu crescimento acadêmico e profissional.

À equipe do ITox-Lab, deixo meu mais sincero agradecimento pela convivência, apoio, colaboração e por todos os momentos compartilhados ao longo desta trajetória. A rotina da pesquisa científica é feita de desafios constantes, e ter pessoas incríveis ao lado tornou esse caminho mais leve, enriquecedor e especial. Em especial, agradeço a Geovanna Maria Malachias Pires, Isabela Caroline dos Santos e Me. Eloise Trostdorf Monteiro Filardi, pela amizade, parceria, ajuda diária e por toda troca de conhecimento e experiências.

Aos meus queridos amigos e parceiros de pesquisa, Dr. Henrique Ranieri Covali-Pontes e Me. Joeliton S. Cavalcante, agradeço imensamente pelo auxílio nas etapas de genômica e proteômica, fundamentais para complementar a caracterização molecular desenvolvida nesta dissertação. Agradeço pela disponibilidade, pela paciência, pelas discussões científicas e pela generosidade em compartilhar conhecimento.

Ao CEVAP, agradeço pela importante colaboração através da doação das peçonhas utilizados neste estudo, contribuição essencial para a realização desta pesquisa.

À Dra. Suely Vilela, expresse meu profundo agradecimento pela generosa contribuição com a proteína utilizada neste trabalho, Moojase. Sua colaboração foi indispensável para o desenvolvimento dos experimentos e teve papel fundamental na concretização desta pesquisa.

Ao meu supervisor de estágio BEPE no exterior, Dr. Sakthivel Vaiyapuri, agradeço profundamente pela oportunidade, acolhimento e confiança durante este período tão importante da minha formação científica. Obrigada pelos ensinamentos, pela orientação e por proporcionar uma experiência que ampliou não apenas meus conhecimentos acadêmicos, mas também minha visão sobre a ciência e sobre mim mesma como pesquisadora. À equipe do laboratório, especialmente Dr. José Rafael de Almeida, Dr. Bruno Mendes, Dra. Richa Sharma e Me. Jomanah Alqallaf, agradeço pela receptividade, colaboração e apoio durante minha estadia. Levo comigo aprendizados, experiências e memórias que marcarão minha trajetória para sempre.

À Dra. Isadora Sousa de Oliveira, meu agradecimento pela generosidade em compartilhar conhecimentos, pelos protocolos, pelas discussões científicas e pelos conselhos que foram essenciais ao longo desta trajetória. Sua ajuda tornou os caminhos da pesquisa mais leves, mais inteligentes e, muitas vezes, possíveis.

Ao meu companheiro, Lucas Fécchio, por caminhar ao meu lado durante toda esta trajetória, compartilhando não apenas os momentos felizes, mas também o cansaço, as incertezas e a intensidade que acompanharam este trabalho. Obrigada por cada gesto de cuidado, por me levar e buscar inúmeras vezes no laboratório, por me acompanhar até na busca pelos ovos utilizados nos experimentos e por estar presente em cada etapa, mesmo quando isso significava reorganizar seus próprios dias para tornar os meus possíveis. Seu carinho, sua paciência, seu apoio constante e sua confiança em mim fizeram com que este caminho fosse mais leve e possível de ser percorrido. Ao nosso Antônio, meu pequeno companheiro de quatro patas, que chegou para preencher nossos dias de amor, alegria e bagunça, oferecendo, entre longas horas

de trabalho, as pausas mais afetuosas e necessárias. Vocês foram meu lar, meu aconchego e uma parte essencial da força que me permitiu chegar até aqui.

À minha mãe, nenhuma palavra será suficiente para expressar minha gratidão. Obrigada por ser minha base, meu abrigo e minha maior fonte de força. Obrigada por cada esforço silencioso, por cada renúncia, pelo amor incondicional e por nunca permitir que eu desistisse dos meus sonhos, mesmo nos momentos mais difíceis. Tudo o que conquistei até aqui carrega profundamente sua dedicação, sua coragem e seu amor. Esta conquista é tão sua quanto minha.

Aos meus irmãos e à minha família, agradeço por todo amor, apoio, compreensão e incentivo ao longo desta caminhada. Obrigada por celebrarem minhas conquistas, compreenderem minhas ausências e permanecerem ao meu lado em todos os momentos. Ter vocês comigo tornou esta jornada possível e infinitamente mais significativa.

À minha avó, in memoriam, dedico um agradecimento especial e cheio de saudade. Mesmo não estando mais fisicamente presente, seu amor, cuidado e lembranças permaneceram comigo em cada etapa desta caminhada. Levo comigo tudo o que você representou na minha vida, e espero que, de alguma forma, esta conquista também possa te alcançar. Sua memória seguirá para sempre viva no meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/01801-1 e 2025/11949-9.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte desta trajetória. Cada apoio, ensinamento, incentivo e gesto de carinho teve importância imensurável para que este sonho se tornasse realidade.

“A girl should be two things: who and what she wants.”

— Coco Channel

“It is not the critic who counts; not the man who points out how the strong man stumbles,
or where the doer of deeds could have done them better. The credit belongs to the man
who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood...”

— Theodore Roosevelt

Resumo

Os envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* estão frequentemente associados a alterações hemostáticas, inflamação, dano tecidual e distúrbios da coagulação. Entre os componentes dessas peçonhas, as serinoproteases (SVSPs) exercem papel relevante na modulação da hemostasia, sendo capazes de atuar sobre fibrinogênio, fatores da coagulação, plaquetas e vias relacionadas à formação do coágulo. Nesse contexto, a Moojase, uma SVSP semelhante à trombina isolada do veneno de *Bothrops moojeni*, representa um alvo importante para o estudo de toxinas pró-coagulantes e para o desenvolvimento de moléculas recombinantes com potencial neutralizante.

Neste trabalho, foram selecionados e caracterizados fragmentos recombinantes de anticorpos humanos do tipo scFv contra a Moojase, com o objetivo de obter moléculas capazes de reconhecer essa toxina e modular atividades funcionais associadas à hemostasia. Para isso, foi empregada a tecnologia de *phage display* utilizando a biblioteca Griffin I, com biopanning em solução contra Moojase biotinilada e captura por esferas magnéticas conjugadas à estreptavidina. Após rodadas sucessivas de seleção, triagem por interferometria de biocamada e avaliação individual dos clones, os scFvs ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 foram priorizados, expressos em formato solúvel em *Escherichia coli*, purificados e avaliados quanto à capacidade de ligação, modulação enzimática, interferência em parâmetros de coagulação e reconhecimento cruzado frente a diferentes peçonhas e toxinas.

A Moojase isolada apresentou perfil compatível com SVSPs já descritas, com banda única próxima de 30 kDa, e a modelagem estrutural indicou conservação da arquitetura típica dessa classe enzimática. Nos ensaios funcionais, ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 modularam a atividade de SVSP em curvas fluorogênicas, sugerindo interferência na dinâmica catalítica da Moojase e de componentes relacionados em algumas peçonhas. Nos ensaios hemostáticos, a Moojase e o veneno bruto de *B. moojeni* apresentaram efeito pró-coagulante, principalmente sobre parâmetros associados às vias intrínseca e/ou comum da coagulação, enquanto os scFvs não alteraram a coagulação por si só. ITX_MJ001-25 apresentou maior efeito em sangue total, enquanto ITX_MJ003-25 demonstrou resposta mais evidente em plasma, especialmente em ensaios de aPTT frente à Moojase. A análise de reconhecimento cruzado sugeriu possível interação com componentes de peçonhas botrópicas e, preliminarmente, com *Daboia russelii*.

Assim, este estudo produziu, de forma pioneira no grupo, scFvs humanos contra a Moojase. Os clones ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 demonstraram capacidade de reconhecimento do alvo e potencial de modulação de atividades funcionais associadas à hemostasia, representando ferramentas promissoras para a investigação de SVSPs de peçonhas

de serpentes e para o desenvolvimento de estratégias recombinantes voltadas à neutralização direcionada de toxinas pró-coagulantes.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*; Moojase; scFv; Anticorpos Recombinantes; Neutralização; Coagulação; SVSP.

Abstract

Envenomings by snakes of the genus *Bothrops* are frequently associated with hemostatic changes, inflammation, tissue damage, and coagulation disorders. Among the components of these venoms, serine proteases play an important role in hemostasis modulation, acting on fibrinogen, coagulation factors, platelets, and pathways related to clot formation. In this context, Moojase, a thrombin-like serine protease isolated from *Bothrops moojeni* venom, represents an important target for the study of procoagulant toxins and for the development of recombinant molecules with neutralizing potential.

In this study, recombinant human antibody fragments of the scFv type against Moojase were selected and characterized, aiming to obtain molecules capable of recognizing this toxin and modulating functional activities associated with hemostasis. For this purpose, phage display technology was employed using the Griffin I library, with solution-phase biopanning against biotinylated Moojase and capture by streptavidin-conjugated magnetic beads. After successive selection rounds, biolayer interferometry screening, and individual clone evaluation, the scFvs ITX_MJ001-25 and ITX_MJ003-25 were prioritized, expressed in soluble format in *Escherichia coli*, purified, and evaluated for binding capacity, enzymatic modulation, interference with coagulation parameters, and cross-recognition against different venoms and toxins.

Isolated Moojase showed a profile compatible with previously described serine proteases, with a single band close to 30 kDa, and structural modeling indicated conservation of the typical architecture of this enzymatic class. In functional assays, ITX_MJ001-25 and ITX_MJ003-25 modulated serine protease activity in chromogenic curves, suggesting interference with the catalytic dynamics of Moojase and related components in some crude venoms. In hemostatic assays, Moojase and *B. moojeni* crude venom showed a procoagulant effect, mainly on parameters associated with the intrinsic and/or common coagulation pathways, whereas the scFvs did not alter coagulation by themselves. ITX_MJ001-25 showed a greater effect in whole blood, while ITX_MJ003-25 showed a more evident response in plasma, especially in aPTT assays against Moojase. Cross-recognition analysis suggested possible interaction with components of bothropic venoms and, preliminarily, with *Daboia russelii*.

Thus, this study produced, for the first time in the group, human scFvs against Moojase. The clones ITX_MJ001-25 and ITX_MJ003-25 showed target recognition capacity and potential to modulate functional activities associated with hemostasis, representing promising

tools for the investigation of snake venom serine proteases and for the development of recombinant strategies aimed at the targeted neutralization of procoagulant toxins.

Keywords: *Bothrops moojeni*; Moojase; scFv; recombinant antibodies; neutralization; coagulation; serine proteases.

Lista de Figuras

Figura 1. Espectro de atividades biológicas das serinoproteases e dos substratos e fármacos derivados de serinoproteases presentes em peçonhas botrópicos.	23
Figura 2. Estruturas preditas por AlphaFold de serinoproteases.....	26
Figura 3. Composição generalizada do veneno de serpentes <i>Bothrops</i> spp.	27
Figura 4. Resumo esquemático da metodologia empregada para seleção, caracterização e avaliação funcional de scFvs anti-Moojase.	44
Figura 5. Distribuição das espécies de serpentes utilizadas no projeto.....	46
Figura 6. Extração de peçonha de serpentes.....	47
Figura 7. Ilustração esquemática do processo de quantificação de proteínas das peçonhas Botrópicas.....	48
Figura 8. Processo de validação da biotilização da Moojase.....	51
Figura 9. Processo seleção de fagos anticorpos (biopanning).....	53
Figura 10. Análise da afinidade dos fagos anticorpos selecionados em sistema de Interferometria de Biocamadas por Octet® R2.....	55
Figura 11. Interferometria de Biocamada (BLI) em sensor de estreptavidina e sistema de Octet® R2.....	56
Figura 12. Processo de infecção e produção de fragmentos de anticorpos (scFv) a partir dos fagos anticorpos amplificados e selecionados através de BLI.....	58
Figura 13. Processo de diálise.....	60
Figura 14. Ensaio de tromboelastrometria rotacional (ROTEM).....	62
Figura 15. Curva padrão para quantificação proteica de peçonhas botrópicas pelo método de BCA.....	69
Figura 16. Perfil eletroforético do veneno bruto de <i>Bothrops moojeni</i> e da toxina Moojase.. ..	70
Figura 17. Modelagem tridimensional da Moojase e da batroxobina.	71
Figura 18. Validação estereoquímica dos modelos estruturais por gráfico de Ramachandran.....	72
Figura 19. Sobreposição estrutural entre Moojase e batroxobina e análise de regiões funcionais conservadas.....	73
Figura 20. ELISA de biotilização da Moojase..	74
Figura 21. Padronização do Loading de Moojase utilizando Interferometria de Biocamada (BLI).....	76

Figura 22. Análise de interferometria de biocamada (BLI) para o segundo e terceiro turnos de fago-anticorpos selecionados para a Moojase.....	77
Figura 23. Análise de interferometria de biocamada (BLI) para os grupos de fago-anticorpos (pools) selecionados para a Moojase	79
Figura 24. Análise de interferometria de biocamada (BLI) dos fago-anticorpos monoclonais selecionados para a Moojase..	80
Figura 25. Avaliação do processo de purificação dos scFvs por eletroforese.	82
Figura 26. Avaliação do processo de purificação dos scFvs por eletroforese.	83
Figura 27. Curva padrão para quantificação proteica do rendimento de produção dos clones ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 pelo método de BCA.	84
Figura 28. Análise de interferometria de biocamada (BLI) dos scFvs monoclonais selecionados para a Moojase.....	85
Figura 29. Avaliação da atividade de serinoproteases de peçonhas do gênero Bothrops e da toxina isolada Moojase frente a diferentes tratamentos.	87
Figura 30. Heatmap do percentual de inibição (%) da atividade serinoproteásica da Moojase e de diferentes peçonhas após incubação com PMSF, soro antibotrópico e scFvs humanos.....	92
Figura 31. Avaliação da atividade de metaloproteases de peçonhas do gênero Bothrops frente a diferentes tratamentos.	93
Figura 32. Heatmap do percentual de inibição da atividade metaloproteásica de diferentes peçonhas após incubação com PMSF, soro antibotrópico e scFvs humanos.	98
Figura 33. Efeito do veneno de B. moojeni sobre o tempo de coagulação sanguínea em ensaio de EXTEM.).....	100
Figura 34. Avaliação do Tempo de Coagulação (CT) por ROTEM sob influência de veneno, toxina e potenciais inibidores.....	101
Figura 35. Efeito neutralizante dos tratamentos sobre o tempo de coagulação (CT) na proporção 1:10.	102
Figura 36. Avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) sob Influência de Veneno, Toxina e Inibidores.....	103
Figura 37. Avaliação do Tempo de Protrombina (PT) frente ao veneno de B. moojeni e tratamentos.....	104
Figura 38. Avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) na proporção 1:4.....	105
Figura 39. Sensogramas de associação obtidos por interferometria de biocamada para avaliação do cross-reconhecimento dos scFvs frente a diferentes peçonhas e toxinas..	107

Figura 40. Sensogramas de associação obtidos por interferometria de biocamada para avaliação do cross-reconhecimento dos scFvs frente a diferentes peçonhas e toxinas. ..	108
Figura 41. Perfil eletroforético dos componentes recuperados após imunocaptura de peçonhas por beads conjugadas aos scFvs ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25.....	112
Figura 42. Avaliação macroscópica imediata da membrana corioalantóica após exposição aos tratamentos no ensaio HET-CAM modificado.....	115
Figura 43. Representação esquemática do plasmídeo recombinante contendo o inserto scFv.....	116
Figura 44. Sequência nucleotídica da região codificante do scFv obtida a partir do sequenciamento do plasmídeo recombinante realizado pelo serviço Plasmidsaurus)....	117
Figura 45. Racional da nomenclatura proposta para Snakeserinumab.....	118
Figura 46. Síntese visual dos ensaios funcionais e exploratórios realizados com os scFvs humanos ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 contra a Moojase.....	134

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição das peçonhas de serpentes <i>Bothrops</i> spp. do Brasil.....	26
Tabela 2. Serinoproteases de peçonhas botrópicas.....	28
Tabela 3. Concentração de proteínas estimada a partir do método de BCA.....	69
Tabela 4. Média da absorbância e do título estimado de fagos por round de seleção.....	78
Tabela 5. Resultado de dosagem de proteínas a partir de BCA para os clones purificados ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25.....	84
Tabela 6. Percentual de inibição da atividade serinoproteásica da Moojase e de diferentes peçonhas após incubação com PMSF, soro antibotrópico e os scFvs ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25.....	89
Tabela 7. Percentual de inibição da atividade metaloproteásica de diferentes peçonhas após incubação com Marimaastat, soro antibotrópico e os scFvs ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25.....	96
Tabela 8. Parâmetros cinéticos aparentes e resposta de ligação de diferentes clones de scFv frente à Moojase.....	108
Tabela 9. Respostas de associação em BLI antes e após subtração da interação inespecífica com o sensor controle.....	109
Tabela 10. Quantificação proteica estimada dos eluatos recuperados após imunocaptura de componentes de peçonhas por beads conjugadas aos scFvs ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25.....	111
Tabela 11. Composição proteica média ou estimada dos venenos e toxinas avaliados por BLI.....	123

Lista de Abreviações

BLI — interferometria de biocamada (biolayer interferometry)

HET-CAM — teste em ovo embrionado de galinha na membrana corioalantoide (Hen's Eggs Test on the chorioallantoic membrane)

K_D — constante de dissociação (dissociation constant)

OD₆₀₀ — densidade óptica a 600 nm

PBS — solução salina tamponada com fosfato (phosphate-buffered saline)

PBST — solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 (phosphate-buffered saline with Tween 20)

rpm — rotações por minuto

scFv — fragmento variável de cadeia única (single-chain variable fragment)

SVMP — metaloprotease de veneno de serpente (snake venom metalloprotease)

SVSP — serinoprotease de veneno de serpente (serine protease from snake venom)

TYGA — meio triptona-extrato de levedura-glicose-ágar (tryptone-yeast extract-glucose agar);

× **g** — força centrífuga relativa

Sumário

1. Introdução.....	20
1.1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos no mundo e no Brasil	20
1.2. A peçonha botrópica.....	21
1.3. Serinoproteases	22
1.3.1. A arquitetura molecular e o mecanismo catalítico das serinoproteases	23
1.3.2. Serinoproteases de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	26
1.4. O proteoma de <i>Bothrops moojeni</i>	31
1.4.1. A Moojase	33
1.5. Soro antiofídico	34
1.6. A tecnologia de phage display	36
1.6.1. Phage display no desenvolvimento de soro antiofídico	38
1.7. Phage display e a aplicabilidade em toxinas animais e serinoproteases.....	38
2. Objetivos	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
2.3. Fluxograma de atividades	43
3. Materiais e métodos.....	45
3.1. Obtenção das peçonhas do gênero <i>Bothrops</i>	45
3.2. Obtenção da serinoprotease Moojase	47
3.3. Dosagem de proteínas	47
3.4. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE 12%)	48
3.5. Análise estrutural <i>in silico</i> da Moojase e Batroxobina	48
3.6. Biblioteca de phage display Griffin I	49
3.7. Biotinização da serinoprotease Moojase	50
3.8. Seleção de fagos anticorpos	51
3.9. Amplificação dos fagos anticorpos em <i>E. coli</i> TG1-TR	53
3.10. Precipitação de fagos anticorpos	54
3.11. Interferometria de biocamada (BLI) – Rounds de seleção por phage display	55
3.12. Titulação de bacteriófagos – Enriquecimento dos ciclos de seleção.....	56
3.13. Busca de clones específicos - monoclonais	57
3.14. Infecção de <i>E. coli</i> HB2151 e expressão dos scFvs específicos.....	57
3.15. Purificação dos scFv	58
3.16. Diálise, concentração, recuperação e afinidade dos scFvs	59

3.17. Ensaio enzimático de serinoproteases.....	61
3.18. Ensaio enzimático de metaloproteases	61
3.19. Ensaio de Tromboelastometria (ROTEM)	62
3.20. Ensaio de coagulação plasmática (CEVERON-T100).....	62
3.21. Interferometria de Biocamada – Análise de reconhecimento cruzado de peçonhas	63
3.22. Imobilização dos scFvs em beads magnéticas e ensaio de imunocaptura	64
3.23. Teste da membrana corioalantoica de ovo embrionado de galinha (HET-CAM)	65
3.24. Sequenciamento genético	66
3.25. Determinação das regiões determinantes de complementaridade	67
4. Resultados	68
4.1. Dosagem de proteínas	68
4.2. Perfil eletroforético <i>Bothrops moojeni</i> e Moojase.....	69
4.3. Análise estrutural <i>in silico</i> da Moojase e Batroxobina	70
4.4. Biotinização da Moojase e validação por ELISA	73
4.4. Seleção de fago-anticorpos específicos para Moojase por phage display (<i>Biopanning</i> em Solução).....	74
4.5. Carregamento de antígeno em biossensores por interferometria de biocamada (BLI)	75
4.6. Avaliação dos ciclos de seleção por interferometria de biocamada (BLI)	76
4.7. Titulação de fagos anticorpos	77
4.8. Estratégia de seleção de fago-anticorpos monoclonais por interferometria de biocamada (BLI).....	78
4.9. Expressão e purificação dos scFvs	81
4.10. Seleção dos eluídos, diálise, análise eletroforética e rendimento do processo de purificação dos scFvs	82
4.11. Análise de afinidade cinética por BLI e estabilidade dos scFvs.....	84
4.12. Validação funcional	86
4.12.1. Inibição da atividade enzimática de serinoproteases	86
4.12.2. Avaliação da neutralização cruzada: Atividade sobre metaloproteases	92
4.12.3. Avaliação dinâmica da coagulação por tromboelastometria (ROTEM)	99
4.12.4. Ensaio de coagulação automatizados (Ceveron T100): PT e aPTT	102
4.13. Análise do potencial de reconhecimento cruzado através de Interferometria de Biocamada	106
4.14. Imunocaptura em beads magnéticas (<i>Pull-down assay</i>)	110
4.15. Avaliação da membrana corioalantônica (HET-CAM - <i>Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane</i>).....	114

4.16. Sequenciamento genético dos scFvs específicos para Moojase.....	115
5. <i>Discussão</i>	118
6. <i>Conclusão</i>	133
8. <i>Fomento à Pesquisa</i>	135

1. Introdução

1.1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos no mundo e no Brasil

Entre os mais de 100.000 animais peçonhentos descritos no mundo, as serpentes são consideradas as mais importantes para a saúde pública, devido à alta capacidade de resultar em envenenamento humano e sequelas. Estima-se que, aproximadamente 5,4 milhões de pessoas sejam picadas por serpentes anualmente, com cerca de 2,7 milhões de envenenamentos que resultam em 81-138 mil mortes e mais de 400 mil sequelas permanentes (Gutiérrez et al., 2017).

De fato, envenenamentos ofídicos constituem um grande problema para a saúde pública, afetando, em sua grande maioria, regiões rurais tropicais pobres e densamente povoadas (D'Amélio et al., 2021; Gamulin et al., 2023). No Brasil, refletindo a gravidade desse cenário no período recente, o Ministério da Saúde registrou 31.735 acidentes de 127 mortes em 2024. Dando continuidade a esse panorama crítico, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/DATASUS), foram notificados em 2025 um total de 26.970 acidentes ofídicos, sendo que 19.848 foram acidentes ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*, ou seja, aproximadamente 73% (dados disponibilizados em 02/2026). Assim, tanto no Brasil, como nas Américas Central e do Sul, a maioria dos acidentes ofídicos são provocados por serpentes do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas (Pidde-Queiroz et al., 2010).

Contudo, embora o índice de mortalidade seja um indicador alarmante, a letalidade representa apenas uma fração do real impacto do ofidismo, tornando imperativo deslocar o debate também para a alta taxa de morbidade dessas ocorrências (Gutiérrez et al., 2017). Os envenenamentos por diferentes gêneros de serpentes frequentemente resultam em sequelas anatômicas e funcionais graves (Waiddyanatha et al., 2019). Além da severa destruição tecidual local por necrose, perda crônica de mobilidade e risco de amputações de membros, marcantes nos acidentes botrópicos e laquéuticos, o panorama de morbidade do ofidismo também engloba complicações sistêmicas duradouras ou permanentes, como a insuficiência renal crônica, distúrbios de coagulação prolongados ou recorrentes e déficits neurológicos ou oftálmicos secundários (Fernández et al., 2025; Pucca et al., 2020b; Waiddyanatha et al., 2019).

O grande desafio clínico reside no fato de que os antivenenos atuais não são plenamente capazes de mitigar ou reverter esses danos locais e degenerativos uma vez que o processo fisiopatológico é desencadeado pelas toxinas, limitando-se principalmente a neutralizar os efeitos sistêmicos na circulação sanguínea (Gutiérrez et al., 2006, 2017). Essa realidade compromete severamente a qualidade de vida a longo prazo dos sobreviventes, em sua maioria trabalhadores rurais em idade produtiva, evidenciando que a melhoria do tratamento, seja por

meio do desenvolvimento de terapias adjuvantes (capazes de barrar localmente a ação imediata das toxinas) ou da descentralização e rapidez do socorro, é o caminho fundamental para conter incapacidades permanentes (Carvalho et al., 2023; Kasturiratne et al., 2021).

1.2. A peçonha botrópica

A composição proteica da peçonha de muitas espécies do complexo *Bothrops* já é conhecida por avaliação direta das peçonhas através de técnicas de purificação (Alape-Girón et al., 2008, 2009; Calvete et al., 2009a; Cidade et al., 2006; Fox et al., 2006; Gutiérrez et al., 2008; Rodrigues et al., 2012; Tashima et al., 2008) ou indiretamente por técnicas ômicas (Cardoso, 2009; Cidade et al., 2006; Durban et al., 2011; Kashima et al., 2004; Neiva et al., 2009). A partir desses estudos, tornou-se evidente que as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* são constituídas predominantemente por um conjunto relativamente restrito de famílias proteicas. Entre elas, destacam-se as enzimas (especialmente as metaloproteases, serinoproteases e as fosfolipases A₂), que representam os componentes mais abundantes e os mais consistentemente associados às manifestações clínicas do envenenamento (Romanazzi et al., 2025; Santos et al., 2025).

As serinoproteases (SVSPs, do inglês *snake venom serinoproteases*) presentes nas peçonhas botrópicas incluem enzimas com atividade trombina-símile ou trombina-*like*, capazes de clivar fibrinogênio e contribuir para as alterações de coagulação observadas em muitos pacientes (Serrano e Maroun, 2005). Entretanto, essas enzimas não são idênticas à trombina, elas mimetizam parcialmente sua função, gerando fibrina instável e favorecendo o consumo de fatores de coagulação. Adicionalmente, as SVSPs atuam principalmente em pró-enzimas da cascata de coagulação, causando atividades pró-coagulantes, fibrinolíticas e/ou fibrinogenolíticas (Matsui et al., 2000; Serrano e Maroun, 2005), resultando na interrupção da hemostase e hipotensão (Serrano e Maroun, 2005).

As fosfolipases A₂ (PLA₂), por sua vez, estão principalmente associadas aos efeitos locais, incluindo dor, edema, inflamação e miotoxicidade observada em acidentes envolvendo diversas espécies de *Bothrops*. Essas enzimas atuam via hidrólise de fosfolípidos de membrana e indução de respostas inflamatórias que contribuem para a destruição tecidual (Harris et al., 2013).

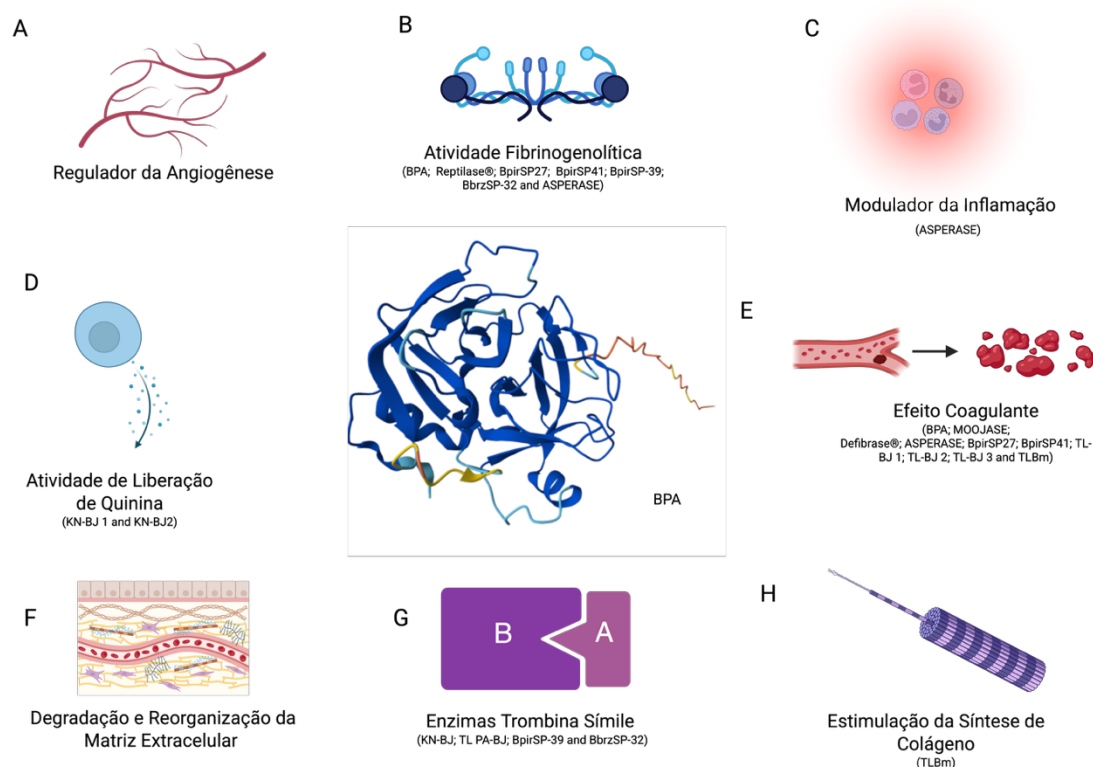
Já as metaloproteases (SVMPs, do inglês *snake venom metaloprotease*) são enzimas multifuncionais envolvidas nos sintomas locais e sistêmicos vistos nos envenenamentos, como a indução de hemorragia local, reação inflamatória, ativação de fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária (Moura-da-Silva et al., 2007).

No entanto, a variabilidade na composição das peçonhas botrópicas é ampla e multifatorial, podendo ser associada a diversos determinantes biológicos e ecológicos. Estudos indicam que essa diversidade está relacionada à filogenia das espécies (Tu, 2018, 1998), bem como à idade e ao tamanho corporal dos indivíduos (Guércio et al., 2006; Saldarriaga et al., 2003). Além disso, variações atribuídas ao sexo (Menezes et al., 2006), à distribuição geográfica das populações (Alape-Girón et al., 2008; Gibbs e Mackessy, 2009; Menezes et al., 2006) e à dieta das serpentes (Barlow et al., 2009; Daltry et al., 1996; Gibbs e Mackessy, 2009) também desempenham papel importante na determinação do perfil proteico final do veneno.

1.3. Serinoproteases

As glândulas de veneno de serpentes sintetizam uma ampla variedade de SVSPs, consideradas uma das enzimas mais bem caracterizadas na modulação do sistema hemostático. Essas proteases são tipicamente eréricas, glicosiladas e de natureza ácida, podendo apresentar capacidade ou incapacidade de atuar sobre diferentes substratos macromoleculares da coagulação (Figura 1). Entre seus alvos estão componentes da cascata de coagulação, elementos dos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina, além de plaquetas, o que contribui para o desequilíbrio do sistema hemostático da presa. Algumas SVSPs apresentam ainda outras atividades biológicas, incluindo efeitos moduladores sobre o sistema complemento, o que amplia o espectro funcional dessas enzimas (Tu 1998; 2018). Assim, as SVSPs são caracterizadas como uma classe de toxina com papel importante no quadro de envenenamento.

Figura 1. Espectro de atividades biológicas das serinoproteases e dos substratos e fármacos derivados de serinoproteases presentes em peçonhas botrópicas.



No centro da figura, está representada uma SVSP por meio da estrutura tridimensional predita por AlphaFold da BPA, isolada de *Bothrops jararaca*. **(A)** As SVSPs participam da liberação e modificação de fatores de crescimento durante a angiogênese, como observado para quimotripsina, tripsina, elastase e plasmina. **(B)** A atividade fibrinogenolítica está relacionada à degradação e clivagem do fibrinogênio humano, principalmente das cadeias α e β , bem como à formação de fibrina, como descrito para BPA, BpirSP27, BpirSP41, BpirSP-39, BpirSP-32 e Asperase, além da Reptilase®, fármaco derivado de uma enzima semelhante à trombina isolada do veneno de *Bothrops atrox*. **(C)** Algumas SVSPs podem reduzir a produção de mediadores inflamatórios e a migração celular, como a Asperase. **(D)** Outras apresentam atividade liberadora de cininas, como KN-BJ 1 e KN-BJ 2. **(E)** Também são descritos efeitos antitrombóticos e degradação de coágulos, como observado para BPA, Moojase, Asperase, BpirSP27, BpirSP41, TL-BJ 1, TL-BJ 2, TL-BJ 3 e TLBm, além da Defibrase®, fármaco derivado de SVSPs. **(F)** Essas enzimas podem atuar na degradação e reorganização da matriz extracelular, como quimotripsina, tripsina, elastase e plasmina. **(G)** Algumas serinoproteases apresentam atividade semelhante à trombina, como KN-BJ, PA-BJ, BpirSP-39 e BpirSP-32. **(H)** Por fim, também foi descrita a capacidade de estimular a síntese de colágeno, como observado para TLBm. Fonte: (Romanazzi et al., 2025).

Por outro lado, as SVSPs possuem grande potencial terapêutico, uma vez que podem causar depleção do fibrinogênio plasmático, debilitando o desenvolvimento de trombos *in vivo* sem a formação de coágulos de fibrina. Além disso, essas SVSPs geralmente não são suscetíveis a inibidores endógenos e exibem alta estabilidade enzimática devido ao seu alto grau de glicosilação, podendo ser facilmente purificadas de peçonhas por uma variedade de métodos cromatográficos (Carone et al., 2018; Serrano e Maroun, 2005).

1.3.1. A arquitetura molecular e o mecanismo catalítico das serinoproteases

A organização estrutural tridimensional das SVSPs pertencentes ao clã da quimiotripsina é notavelmente conservada e caracteriza-se pela presença de dois domínios

globulares de dimensões semelhantes, cujo enovelamento é predominantemente composto por folhas β antiparalelas organizadas em barris β . A elevada similaridade estrutural entre esses domínios sustenta a hipótese de que essa arquitetura tenha emergido a partir de um evento ancestral de duplicação gênica, seguido por processos de divergência evolutiva que preservaram os determinantes catalíticos essenciais (Neurath, 1984; Perona e Craik, 1995). Esses domínios frequentemente apresentam motivos estruturais do tipo “chave grega”, os quais contribuem significativamente para a estabilidade conformacional da proteína e para a manutenção da integridade do sítio ativo (Richardson, 1981).

A disposição espacial desses domínios resulta na formação de uma fenda catalítica profunda na interface interdomínio, na qual se localiza o sítio ativo da enzima. Essa organização estrutural estabelece um microambiente altamente especializado, no qual os resíduos catalíticos são posicionados com elevada precisão geométrica, favorecendo a orientação adequada do substrato e minimizando interferências do solvente (Hedstrom, 2002; Perona e Craik, 1995). Tal arranjo contribui diretamente para o aumento da eficiência catalítica, ao restringir o acesso de moléculas de água não produtivas e promover interações específicas enzima-substrato.

O centro funcional dessas enzimas é constituído por uma tríade catalítica altamente conservada, composta pelos resíduos Serina-195 (Ser195), Histidina-57 (His57) e Ácido Aspártico-102 (Asp102), de acordo com a numeração clássica da quimiotripsina. Apesar de estarem distantes na sequência primária, esses resíduos são aproximados no espaço tridimensional pelo enovelamento proteico, formando uma rede cooperativa de ligações de hidrogênio essencial para a atividade catalítica (Blow et al., 1969; Hedstrom, 2002). O mecanismo catalítico dessas proteases ocorre em duas etapas principais, acilação e desacilação, e envolve um sistema altamente coordenado de transferência de prótons e redistribuição eletrônica (Wolfenden, 2001).

Na etapa de acilação, o Asp102 exerce um papel fundamental na estabilização e orientação da His57, aumentando sua capacidade de atuar como base geral. A His57, por sua vez, promove a desprotonação do grupo hidroxila da Ser195, gerando um nucleófilo alcóxido altamente reativo, capaz de atacar o carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato. Esse ataque resulta na formação de um intermediário tetraédrico de alta energia, cuja subsequente reorganização leva à clivagem da ligação peptídica, com liberação do fragmento C-terminal e formação de um intermediário acil-enzima covalente (Blow et al., 1969; Hedstrom, 2002). Na etapa subsequente de desacilação, uma molécula de água, ativada pela His57, atua como nucleófilo e promove a hidrólise do intermediário acil-enzima, resultando na formação de um segundo intermediário tetraédrico. A resolução desse intermediário leva à regeneração da

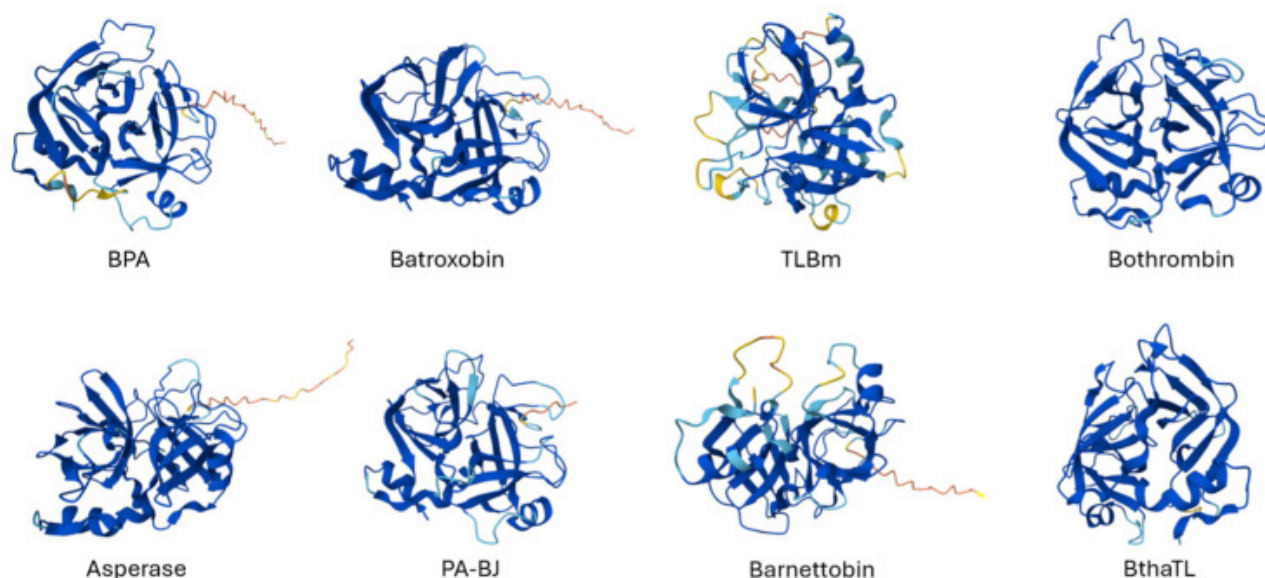
enzima livre e à liberação do fragmento N-terminal do substrato (Hedstrom, 2002; Wolfenden, 2001).

A elevada eficiência catalítica dessas enzimas está intimamente relacionada à sua capacidade de estabilizar o estado de transição, reduzindo significativamente a energia livre de ativação ($\Delta G^\ddagger$) da reação (Wolfenden, 2001). Essa estabilização ocorre em uma subestrutura altamente conservada denominada buraco do oxiânion, onde o oxigênio carbonílico do substrato, que adquire carga parcial negativa durante a formação dos intermediários tetraédricos, é estabilizado por ligações de hidrogênio provenientes dos grupos amida da cadeia principal da enzima, tipicamente dos resíduos Gly193 e Ser195 (Hedstrom, 2002; Richardson, 1981). Esse mecanismo de estabilização eletrostática é fundamental para a viabilidade cinética e termodinâmica da reação.

Adicionalmente, a especificidade de substrato dessas proteases é determinada principalmente pelas características estruturais e eletrostáticas do bolsão S1, localizado nas proximidades da tríade catalítica. Embora o arcabouço estrutural e o mecanismo catalítico sejam altamente conservados ao longo da família, variações na profundidade, geometria e composição química desse bolsão conferem seletividade diferencial entre as enzimas. Na quimiotripsina, o bolsão S1 é profundo e hidrofóbico, favorecendo a ligação de resíduos aromáticos; na tripsina, a presença de um resíduo de ácido aspártico no fundo do bolsão confere especificidade por resíduos carregados positivamente; enquanto na elastase, o bolsão apresenta restrições estéricas que limitam a ligação a resíduos pequenos e alifáticos (Hedstrom, 2002; Perona e Craik, 1995).

Esse conjunto de características evidencia um exemplo paradigmático de conservação estrutural (Figura 2) associada à diversificação funcional, no qual a manutenção de um arcabouço catalítico altamente eficiente é acompanhada por modificações localizadas responsáveis pela adaptação funcional ao longo da evolução (Neurath, 1984; Rawlings et al., 2016).

Figura 2. Estruturas preditas por AlphaFold de serinoproteases.



Estruturas tridimensionais de serinoproteases de diferentes espécies de *Bothrops* preditas pelo AlphaFold. As seqüências de Asperase e Barnettobina permanecem incompletas, enquanto as demais serinoproteases apresentadas foram completamente sequenciadas. Fonte: (Romanazzi et al., 2025).

1.3.2. Serinoproteases de serpentes do gênero *Bothrops*

SVSPs são glicoproteínas monoméricas com 228-239 resíduos e massa molecular de 25-70 kDa, possuindo uma variedade de sítios de N ou O-glicosilação que constituem de 10 a 30% do veneno de serpentes da família Viperidae (Tabela 1; Figura 3) (D'Amélio et al., 2021; Mamede et al., 2020; Megale et al., 2018; Oliveira et al., 2022a).

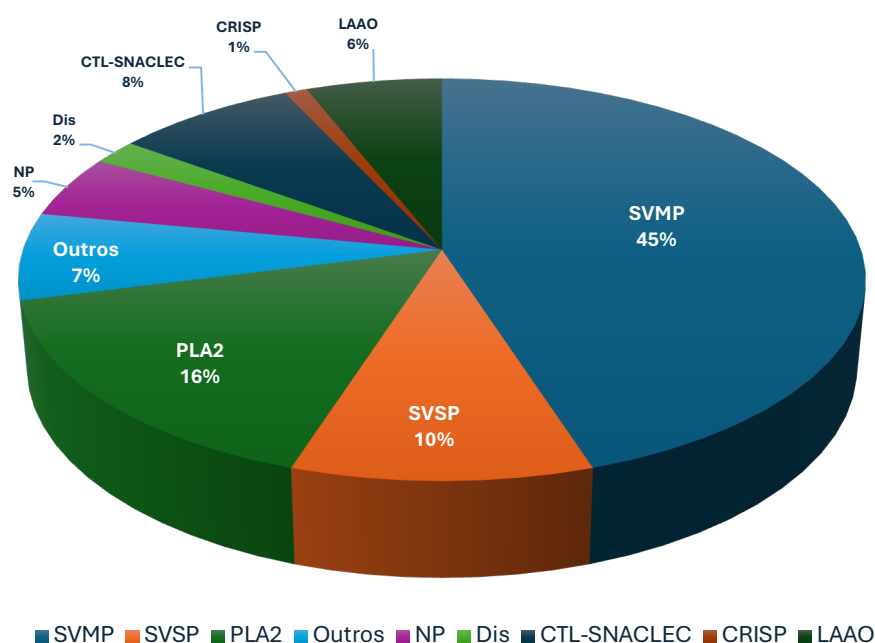
Tabela 1. Composição das peçonhas de serpentes *Bothrops* spp. do Brasil.

Serpente	Componentes do veneno (%)								
	SVMP	SVSP	PL	CLEC	LAAO	Dis	VEGF	Pep	Other
<i>B. alternatus</i>	52.2	5.8	4.4	14.8	14.9	0	0	0	8
<i>B. atrox</i>	46-54	8.1-14	4.8-7.5	10-13	8-14.2	0	0	0	6.2-10.7
<i>B. brazili</i>	27.7	14.2	33.1	0.5	6.4	0	0	0	6.4
<i>B. cotiara</i>	51-73	13-14.4	0-3.1	0-5	4-19.6	0-1.7	0-1.7	0	3.6-8.6
<i>B. eritromelas</i>	32-60	4-10	10-15	8-21.6	0	4-10	4-9.8	9-14.5	0
<i>B. fonsecai</i>	42.5	4.1	30.1	9.8	1.9	5.1	3.9	0	2.4
<i>B. insularis</i>	30	12.5	10	31.3	1.3	0	1.3	11.3	2.6

<i>B. jararaca</i>	10-43	11.7-29	4- 20.4	4-24.4	7.2-10.7	0-7.6	1.8	0-22.6	3.9-8.7
<i>B. jararacussu</i>	26.2	12.3	27.4	9.7	15	0	0	0	9.4
<i>B. leucurus</i>	12,92	14,46	33,66	-	9,18	-	-	-	29,78
<i>B. moojeni</i>	36	14-20	11-17	2-3	4-5.2	0	1-5.6	2	8-9.8
<i>B. newiedi</i>	49.9	8.8	9.8	8.6	16.7	0	0,4	0	5.8
<i>B. pauloensis</i>	38.1	10.5	32	0.6	2.8	1.3	0	12.4	2.4
<i>B. pirajai</i>	20.7	7.1	40.2	9.2	5.2	1.4	1.4	5.6	7

Fonte: Adaptado de (Dias et al., 2022; Mamede et al., 2020).

Figura 3. Composição generalizada do veneno de serpentes *Bothrops* spp.



Fonte: Adaptado de (Serrano e Maroun 2005; Paes Leme et al. 2008; Carone et al. 2018).

Uma grande variedade de SVSPs já foi descrita não apenas em serpentes do gênero *Bothrops*, amplamente distribuídas no Brasil, mas também em diversas outras espécies ao redor do mundo. Com base em levantamentos realizados em bancos de dados, estima-se que o número de proteases classificadas como SVSPs derivadas desse gênero alcance aproximadamente 42 moléculas, refletindo a amplitude estrutural e funcional dessas enzimas (Tabela 2).

Tabela 2. Serinoproteases de peçonhas botrópicas.

Serinoprotease	Serpente	Onde é encontrada	Tamanho	Peso molecular	Identificador UniProt/Referência
BPA	<i>Bothrops jararaca</i>	Brasil (SP, RJ, BA, RS, SC, MG, GO, MT, ES, PR)	258 aa	~28,38	Q9PTU8
HS112			255 aa	~28,05	Q5W960
HS114			259 aa	~28,49	Q5W959
SVSP like- HS120			253 aa	28.4 KDa	(Galizio et al., 2018; Saguchi et al., 2005)
Botrombina			232 aa	~25,52	P81661
PA-BJ			237 aa	~26,07	P81824
TL-BJ1			19 aa*	nr	P81882
TL-BJ2			19 aa*	nr	P81883
TL-BJ3			19 aa*	nr	P81884
KN-BJ1			19 aa*	38 KDa	(Serrano et al., 1998)
KN-BJ2			19 aa*	39 KDa	(Serrano et al., 1998)
Bhalternina	<i>Bothrops alternatus</i>	Argentina,	260 aa	~28,6	P0CG03
Balterina		Uruguai,	nr	nr	(Vilca Quispe, 2013)
BthatL		Brasil (RS, SP, RJ, MS, GO, MG, PR, SC)	233 aa	~25,63	Q61WF1
Barnettobina	<i>Bothrops barnetti</i>	Peru	249 aa	39 KDa	K4LLQ2
BpirSP41	<i>Bothrops pirajai</i>	Brasil (BA)	50 aa* (~364)	40.6 KDa	P0DL27
BpirSP-39			~445	49 KDa	(Zaqueo et al., 2014)
BpirSP27			50 aa* (~245)	27.1 KDa	P0DL2

Asperase	<i>Bothrops asper</i>	Mexico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panama, Belize, Colombia, Equador, Venezuela	259 aa	27.6 KDa	Q072L6
TLBm	<i>Bothrops marajoensis</i>	Brasil (AP, PA)	285 aa	33,3 KDa	P0DJE9
Batroxobina	<i>Bothrops atrox</i>	Brasil (RR, AM, Ap, AC, PA, MA, RO, TO, MT)	255 aa	28.1 KDa	P04971
Ba III-4			293 aa	34 KDa	(Ponce-Soto et al., 2007)
Thrombocytin			~327	36 KDa	(Vidal et al., 2024)
Leuurobina	<i>Bothrops leucurus</i>	Brasil (BA, CE, RN, PB, PE, AL, SE, ES, MG)	231 aa	30.4 KDa	P0DJ86
Leucurobin			~318 aa	35 KDa	(Vidal et al., 2024)
BJ-48	<i>Bothrops jararacussu</i>	Brasil (MS, BA, ES, MG, RJ, SP, PR, SC, RS)	22 aa* (~436)	48 KDa	P0DJF0
DV			10 aa*	nr	(Amorim et al., 2018c)
BjussusSP-1			232 aa	~25,52	Q2PQJ3
FC-Bj			nr	nr	(Vidal et al., 2024)

Jararacussin-I			~254	28 KDa	(Vidal et al., 2024)
BJV-VIIIcp			~254	28 KDa	(Vidal et al., 2024)
Moojase	<i>Bothrops moojeni</i>	Brasil (TO, MT, MS, GO, DF, MA, PI, BA, MG, SP, PR)	188 aa	30,2 KDa	(Amorim et al., 2018c)
BMII32			~290	32 KDa	(Amorim et al., 2018c)
BMII35			~318	35 KDa	(Amorim et al., 2018c)
BmooSP			~327	36 KDa	(Amorim et al., 2018c)
MSP 1			~309	34	(Vidal et al., 2024)
TI-Bp	<i>Bothrops pauloensis</i>	Paraguai, Bolivia, Brasil (MT, MS, GO, DF, MG, SP, PR)	nr	nr	(Vilca Quispe, 2013)
rBpSP-I			15 aa*	nr	P0DJF1
rBpSP-II			~409	45 KDa	(Carneiro, 2018)
rBamSP_1	<i>Bothrops ammodytoides</i>	Argentina	~245	27.8 KDa	(Clement et al., 2019)
SVSP	<i>Bothrops fonsecai</i>	Brasil (MG, RJ, SP)	15 aa*	nr	P0DMH6
BITS01A	<i>Bothrops insularis</i>	Brasil (SP)	257 aa	~28,27	Q8QG86
Pictobin	<i>Bothrops pictus</i>	Peru	250 aa	~27,5	U5YCR8
TLBro			183 aa	20.2 KDa	(Vilca Quispe, 2013)
SVSP	<i>Bothrops cotiara</i>	Argentina, Brasil (SP, PR, SC, RS)	15 aa*	nr	P0DMH5
TLBbz			321 aa	35.1 KDa	(Vilca Quispe, 2013)

BbrzSP32	<i>Bothrops brazili</i>	Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Colombia, Peru, Equador, Bolívia, Brasil (PR, AM, RO, MT)	~290	32 KDa	(Zaqueo et al., 2016)
TL-Ban	<i>Bothrops andianus</i>	Peur, Bolívia	269 aa	25.8 KDa	(Valeriano-Zapana et al., 2012)

(*) fragmento do comprimento (aa) das proteases de serina em relação a resíduos não terminais; (~) valores estimados (1 aa equivalente a 110 Da); (nr) não reportado; valores não encontrados em bancos de dados. Fonte: Adaptado de (Romanazzi et al., 2025).

1.4. O proteoma de *Bothrops moojeni*

O proteoma do veneno de *Bothrops moojeni*, serpente amplamente distribuída no território brasileiro e de elevada relevância médica, constitui uma mistura altamente complexa de proteínas e peptídeos bioativos, cuja composição reflete um sistema molecular refinado para a subjugação da presa e a rápida disrupção fisiológica do organismo envenenado (Zelani e Keiji Tashima, 2014). Análises proteômicas baseadas em espectrometria de massas demonstram que esse repertório é organizado em famílias toxicológicas estrutural e funcionalmente distintas, sendo predominantemente composto por SVMPs de veneno de serpente, que correspondem a aproximadamente 36,5% a 39,8% da composição total (Tasoulis e Isbister, 2017b). Essas enzimas desempenham papel central na fisiopatologia do envenenamento, sendo diretamente responsáveis pelos efeitos hemorrágicos sistêmicos e pelo extenso dano tecidual local, por meio da degradação de componentes da matriz extracelular e da desestabilização da integridade vascular (Gutiérrez et al., 2017).

A segunda classe mais abundante do veneno é constituída pelas SVSPs, representando cerca de 14,7% a 19,8% do proteoma total, seguidas pelas PLA₂ (11,5% a 17,1%), L-aminoácido oxidases (LAAOs; 4,2% a 5,2%) e lectinas tipo C (2,4% a 3,1%) (Tasoulis e Isbister, 2017c). No entanto, é importante destacar que esses valores representam estimativas

globais por classe toxicológica, não sendo possível, na maioria dos estudos, atribuir proporções fixas e invariáveis a isoformas individuais (Calvete, 2017; Zelanis e Keiji Tashima, 2014). Isso se deve à elevada plasticidade fenotípica do veneno, cuja composição é modulada por fatores ontogenéticos, variações sexuais, dieta, distribuição geográfica e condições ambientais (Calvete, 2017). Dessa forma, a fração correspondente às SVSPs deve ser compreendida como um consórcio dinâmico de múltiplas isoformas, frequentemente glicosiladas, que coexistem em diferentes níveis de abundância relativa, incluindo tanto componentes majoritários quanto variantes minoritárias com funções especializadas (Kini, 2005; Zelanis e Keiji Tashima, 2014).

Apesar dessa variabilidade intrínseca, abordagens bioquímicas e proteômicas têm permitido o isolamento e a caracterização detalhada de diversas SVSPs do veneno de *B. moojeni*, evidenciando um elevado grau de especialização funcional dessas enzimas, particularmente no contexto da hemostasia (Kini, 2005). Entre os componentes mais estudados, destaca-se a batroxobina, uma SVSP do tipo trombina-like amplamente caracterizada e com aplicação clínica e biotecnológica (comercialmente conhecida como Defibrase®) (Markland, 1998; Matsui et al., 2000). Diferentemente da trombina humana, a batroxobina apresenta especificidade restrita pela cadeia A α do fibrinogênio, promovendo a liberação exclusiva do fibrinopeptídeo A e induzindo a formação de coágulos estruturalmente anômalos (Matsui et al., 2000). Esse processo resulta em consumo acelerado de fibrinogênio e desenvolvimento de hipofibrinogenemia, um dos principais determinantes da coagulopatia associada ao envenenamento botrópico (Gutiérrez et al., 2017; Kini, 2005).

Em contraste com essa especificidade mais restrita, outras SVSPs isoladas desse veneno apresentam perfis catalíticos mais amplos. A Moojase, por exemplo, é uma glicoproteína ácida com massa molecular aproximada de 30 kDa que exibe atividade fibrinogenolítica sobre múltiplas cadeias do fibrinogênio, incluindo A α e B β , além de participar da modulação da função plaquetária (Fox e Serrano, 2009; Kini, 2006). De maneira semelhante, a BmooSP constitui uma SVSP com elevada atividade procoagulante e fibrinogenolítica *in vitro*, que, no contexto sistêmico do envenenamento, contribui para o consumo acelerado de fatores de coagulação, exacerbando o quadro de incoagulabilidade sanguínea (Kini, 2006). Adicionalmente, outras enzimas, como as Moojeni Serine Proteinases (MSP1 e MSP2), demonstram atividade relevante sobre a hemostasia primária, atuando na modulação da agregação plaquetária (Fox e Serrano, 2009; Kini, 2006).

Dessa forma, a fração correspondente às SVSPs no veneno de *B. moojeni* não deve ser interpretada como dominada por uma única estrutura molecular, mas sim como um conjunto funcionalmente integrado de isoformas estruturalmente relacionadas e bioquimicamente diversas (Zelanis e Keiji Tashima, 2014). Essas enzimas atuam de maneira sinérgica e

complementar, promovendo simultaneamente ativação, consumo e desregulação dos componentes da cascata de coagulação e da função plaquetária (Fox e Serrano, 2009; Gutiérrez et al., 2017; Kini, 2006). Esse arranjo multifuncional evidencia uma estratégia evolutiva altamente eficiente, na qual a conservação do arcabouço estrutural das SVSPs é explorada para gerar diversidade funcional, maximizando o impacto fisiopatológico do envenenamento sobre o sistema hemostático da presa (Zelani e Keiji Tashima, 2014).

1.4.1. A Moojase

O estudo sistemático do veneno de *Bothrops moojeni* tem revelado uma complexidade proteômica notável, na qual eventos de duplicação gênica e diversificação funcional permitiram que uma mesma matriz estrutural ancestral originasse toxinas com alvos altamente específicos (Calvete, 2017; Zelani e Keiji Tashima, 2014). Dentro da expressiva fração das SVSPs de veneno de serpente (SVSPs), a batroxobina figurou por décadas como o principal objeto de estudo, sendo notória por sua elevada especificidade em clivar a ligação Arg16–Gly17 da cadeia A α do fibrinogênio humano (Kini, 2006; Matsui et al., 2000).

No entanto, investigações bioquímicas e cromatográficas mais aprofundadas sobre este veneno culminaram no isolamento de uma nova e relevante hidrólase, a Moojase (Amorim et al., 2018c). No estudo original, a enzima foi obtida a partir de 200 mg de peçonha bruta de *B. moojeni* com rendimento de recuperação correspondente a aproximadamente 0,9% (1,8 mg), evidenciando tratar-se de um componente minoritário, porém funcionalmente relevante dentro da matriz venômica. Caracterizada como uma glicoproteína monomérica de caráter ácido, com ponto isoelétrico (pI) variando entre 5,80 e 6,88, a Moojase apresenta massa molecular aproximada de 30,3 kDa em sua forma nativa (Amorim et al., 2018c). Grande parte dessa massa e de sua estabilidade físico-química decorre de modificações pós-traducionais, especialmente a N-glicosilação, a qual contribui significativamente para a estabilidade estrutural, resistência a variações de pH e temperatura, e modulação da interação com inibidores e componentes do sistema imune da presa (Amorim et al., 2018c; Calvete, 2017).

O que posiciona a Moojase como uma enzima de destaque na toxinologia é seu comportamento catalítico marcadamente pleiotrópico, em contraste com a elevada seletividade observada na batroxobina. A Moojase atua como uma enzima do tipo trombina, exibindo atividade procoagulante dose-dependente *in vitro* (Amorim et al., 2018c; Kini, 2006). Entretanto, seu espectro catalítico é significativamente mais amplo. Embora o ataque inicial seja direcionado à cadeia A α do fibrinogênio, a exposição prolongada evidencia sua capacidade de clivar também a cadeia B β , além de promover a degradação de coágulos previamente formados (Amorim et al., 2018c; Matsui et al., 2000).

Adicionalmente, a enzima apresenta atividade relevante na hemostasia primária, atuando como indutora da agregação plaquetária (Amorim et al., 2018c), o que amplia seu impacto fisiopatológico no envenenamento (Kini, 2006; Markland, 1998). Ensaio de especificidade de substrato indicam que SVSPs podem apresentar afinidade não apenas por substratos semelhantes aos da trombina, mas também por alvos associados a outras SVSPs plasmáticas, incluindo calicreína e fatores da coagulação, refletindo um grau elevado de versatilidade funcional (Kini, 2006).

A dependência do resíduo de serina no sítio ativo dessas enzimas é evidenciada pela inibição completa da atividade catalítica na presença de inibidores clássicos, como o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), enquanto a manutenção da estrutura tridimensional depende da integridade das pontes dissulfeto, sensíveis a agentes redutores como o ditioneitol (DTT) (Amorim et al., 2018c; Kini, 2006). Em contrapartida, a resistência a agentes quelantes como o EDTA confirma que, diferentemente das SVMs, a atividade catalítica das SVSPs é independente de íons metálicos (Kini, 2006; Markland, 1998).

A elevada similaridade entre a Moojase e a batroxobina, tanto em sequência primária quanto na organização estrutural geral, levanta questões relevantes acerca dos determinantes moleculares da especificidade enzimática. Evidências indicam que a seletividade de substrato em SVSPs não é determinada diretamente pela tríade catalítica (Ser-His-Asp), mas sim por elementos estruturais periféricos, como o bolsão S1 e regiões de alças superficiais hipervariáveis (Hedstrom, 2002; Perona e Craik, 1995). Alterações sutis nessas regiões podem modificar profundamente o reconhecimento de substratos, permitindo a acomodação de diferentes cadeias do fibrinogênio e a interação com múltiplos alvos biológicos.

Apesar dos avanços na caracterização bioquímica dessas enzimas, a compreensão estrutural detalhada da Moojase ainda é limitada pela ausência de estruturas tridimensionais experimentais de alta resolução disponíveis em bancos de dados estruturais. Nesse contexto, abordagens de modelagem estrutural *in silico* e predição baseada em aprendizado profundo têm se tornado ferramentas fundamentais para investigar as relações entre estrutura e função em toxinas de veneno (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). A reconstrução tridimensional dessas isoformas permite explorar os determinantes moleculares responsáveis pela diversificação funcional, oferecendo novas perspectivas sobre a evolução e especialização das SVSPs de veneno de serpente.

1.5. Soro antiofídico

O tratamento específico para envenenamentos por serpentes é realizado por meio da administração intravenosa de soro antiofídico, também denominado antiveneno (Wood, 2023).

Esses preparados consistem em anticorpos heterólogos capazes de reconhecer e neutralizar as principais toxinas presentes no veneno das serpentes (Clement et al., 2019). Os antivenenos atualmente disponíveis no mundo podem ser formulados a partir de imunoglobulinas inteiras da classe G (IgGs) obtidas de animais ou de fragmentos gerados por digestão enzimática destas IgGs (frequentemente Fab ou F(ab')₂). Trata-se de uma tecnologia de produção desenvolvida há mais de um século e que, embora seja regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) no Brasil, ainda permanece baseada em processos clássicos de imunização animal e obtenção de anticorpos policlonais heterólogos, com desafios relacionados à padronização, variabilidade entre lotes e complexidade de composição (Gamulin et al., 2023).

No Brasil, o soro antibotrópico (SAB) é produzido pelo Instituto Butantan a partir do plasma de equinos imunizados com uma mistura de veneno das seguintes espécies: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%), *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%) e *Bothrops jararacussu* (12,5%) (Sousa et al., 2018). Embora os antivenenos sejam distribuídos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, o acesso oportuno ao tratamento ainda representa um desafio em diversas regiões do país, especialmente em áreas rurais, remotas e de maior vulnerabilidade assistencial. Nesse contexto, uma limitação importante da soroterapia está relacionada à distribuição dos antivenenos no território nacional, uma vez que os acidentes ofídicos apresentam ocorrência geográfica heterogênea e exigem alocação estratégica dos soros de acordo com a frequência regional dos casos, as espécies envolvidas e a manutenção de condições adequadas de armazenamento e transporte, incluindo a cadeia refrigerada (Arias-Esquivel et al., 2024; Farias et al., 2025)..

Além disso, variações nos sistemas imunológicos dos animais, nas misturas de peçonhas utilizadas e em fatores ambientais como clima e dieta resultam em diferenças entre os lotes produzidos. Essas variações dificultam a padronização e, consequentemente, o processo de aprovação regulatória pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Curiosamente, os antivenenos distribuídos e utilizados há mais de um século nunca foram submetidos a ensaios clínicos controlados, o que levanta questionamentos sobre sua real eficácia. Além disso, por serem produtos derivados de animais, apresentam riscos adicionais à saúde humana. Entre esses riscos estão reações de hipersensibilidade imediata, como anafilaxia, e reações tardias, como doença do soro, sendo o choque anafilático uma condição potencialmente fatal (Laustsen et al., 2018). Outro risco pouco discutido é a possibilidade de produtos derivados de soro equino transmitirem infecções ou doenças animais aos humanos (Pucca e Camphora, 2024). Apesar de avanços nos processos de purificação, muitos métodos de produção ainda não incluem etapas de inativação viral, o que pode permitir a transmissão parenteral de agentes zoonóticos. Casos recentes de doenças zoonóticas ilustram a

complexidade da interação entre humanos e reservatórios animais, reforçando a necessidade de rigor sanitário em todas as etapas da cadeia produtiva (Burnouf et al., 2004). No cenário do século 21, marcado por conquistas científicas, biotecnológicas e farmacêuticas sem precedentes, e diante das lições claras trazidas pela pandemia de COVID-19, surge a indagação sobre a razão pela qual ainda endossamos a prática antiquada de utilizar soro equino como opção terapêutica (Pucca e Camphora, 2024).

Em artigo publicado na Nature Biotechnology sobre antivenenos, destaca-se a limitação dos medicamentos atualmente disponíveis, especialmente porque casos de envenenamento podem demandar grandes volumes de antiveneno, ao mesmo tempo em que esses produtos apresentam baixa proporção de anticorpos neutralizantes. Somam-se a isso fatores como a escassez de antivenenos em diversas regiões e a ausência de especificidade adequada para todas as espécies envolvidas nos acidentes, o que reduz ainda mais sua efetividade clínica. Nesse contexto, versões sintéticas e tecnologicamente avançadas, incluindo abordagens baseadas em inteligência artificial, tornam-se essenciais para o desenvolvimento de antivenenos mais eficazes e compatíveis com as necessidades contemporâneas da toxicologia (ANTIVENOM SLITHERS BACK TO LIFE, 2024).

1.6. A tecnologia de phage display

Em 1980, George P. Smith descreveu pela primeira vez a construção de uma junção peptídica entre um peptídeo de interesse e uma proteína estrutural localizada no revestimento externo de fagos filamentosos. Essa estratégia tornou possível a exposição controlada de peptídeos recombinantes na superfície do fago, o que representou um avanço conceitual significativo, pois demonstrou que vírus bacterianos poderiam servir como plataformas para apresentação de ligantes em formato biologicamente funcional. Em 1985, Smith e colaboradores introduziram formalmente o termo “exibição em fagos” (do inglês *phage display*), que passou a designar a tecnologia baseada na fusão de genes que codificam proteínas ou peptídeos heterólogos aos genes virais responsáveis pelas proteínas do capsídeo (Arap, 2005; Azzazy e Highsmith, 2002; Jaroszewicz et al., 2022; Zuo et al., 2024).

Essa tecnologia foi significativamente aprimorada por Parmley e Smith em 1988, quando os autores realocaram o sítio de clonagem das sequências externas de DNA para a região do gene responsável pela codificação da proteína pIII. Essa modificação permitiu a produção de uma proteína de revestimento III plenamente funcional, mesmo após a inserção de peptídeos heterólogos. No mesmo ano, partículas completas de fagos foram empregadas pela primeira vez para induzir uma resposta imune contra peptídeos exibidos em sua superfície, o que demonstrou o potencial da plataforma como ferramenta tanto para apresentação de

antígenos quanto para seleção biológica. Na década de 1990, Sir Greg Winter e colaboradores avançaram ainda mais no campo ao demonstrarem a possibilidade de exibir fragmentos de anticorpos humanos em fagos filamentosos (McCafferty et al., 1990). Esse avanço consolidou a tecnologia de exibição em fagos como uma estratégia essencial para a seleção e evolução dirigida de anticorpos, estabelecendo as bases para o desenvolvimento de terapias biológicas modernas (Jaroszewicz et al., 2022).

Desde então, a exibição em fagos tornou-se uma ferramenta molecular poderosa para a seleção de fragmentos de anticorpos com propriedades de ligação específicas, revolucionando a engenharia de anticorpos, a determinação de antígenos, o desenvolvimento de vacinas e as aplicações de triagem de medicamentos (Jaroszewicz et al., 2022; Zuo et al., 2024).

A tecnologia de phage display é capaz de produzir grandes números de peptídeos e proteínas, em diversidade de até 10^{10} e isolar moléculas com alta especificidade, sendo capaz de proporcionar um vasto conjunto de anticorpos os quais podem ser selecionados a partir de polipeptídeos de elevada afinidade e especificidade para um antígeno alvo (Asar et al., 2024; Azzazy e Highsmith, 2002). A partir disso, anticorpos de alta afinidade já foram derivados de camundongos, galinhas, e coelhos, além da produção de bibliotecas de tais anticorpos derivados de ovelhas, vacas e primata (Azzazy e Highsmith, 2002).

A tecnologia de exibição em fagos funciona de modo em que o DNA de interesse (peptídeos, proteínas ou fragmentos) é clonado a partir da sua inserção em um local no genoma do bacteriófago filamentoso, provocando a fusão dos genomas de modo que uma das proteínas de revestimento (pIII, pVI ou pVIII) seja codificada (Azzazy e Highsmith, 2002; Hoogenboom et al., 1998). Após a expressão, a fusão da proteína de revestimento é incorporada em novas partículas de fagos que são montadas na bactéria, resultando na apresentação da proteína de interesse na superfície do fago. Os fagos que apresentam o ligante relevante são retidos por afinidade, podendo ser recuperados da superfície, reinfectados em bactérias e cultivados, enquanto os fagos não aderentes são eliminados (Hoogenboom et al., 1998).

A versatilidade dessa tecnologia a tornou inestimável em inúmeras aplicações além de apresentar inúmeras vantagens, como, o isolamento de anticorpos para antígenos próprios, não imunogênicos ou tóxicos, a possibilidade de seleção de diferentes anticorpos para os inúmeros antígenos existentes, o isolamento de anticorpos de alta afinidade em bibliotecas de grande porte e o curto período de tempo necessário para a geração dos anticorpo de especificidade (Asar et al., 2024; Azzazy e Highsmith, 2002).

Laureada com o Prêmio Nobel em 2018, a técnica de phage display aplicada a bibliotecas de fago-anticorpos totalmente humanos consolidou-se como uma alternativa robusta à tecnologia tradicional baseada em hibridomas produtores de anticorpos murinos (Köhler;

Milstein, 1975). O êxito dessa abordagem decorre da possibilidade de construir bibliotecas com altíssima diversidade molecular, o que permite o isolamento e a identificação rápida de ligantes proteicos com elevada especificidade para uma ampla gama de alvos macromoleculares. Além de possibilitar o estudo de interações proteína-ligante e dos sítios de ligação de anticorpos, a técnica pode ser empregada para aprimorar ou modificar a afinidade de proteínas por seus respectivos ligantes (Azzazy e Highsmith, 2002; Hamzeh-Mivehroud et al., 2013).

1.6.1. Phage display no desenvolvimento de soro antiofídico

Em 2019, a OMS estabeleceu um programa, que se encontra, hoje, em estado de expansão, para reduzir o número de mortes e incapacidades relacionadas a acidentes ofídicos até 2030, incluindo como principais aspectos os esforços preventivos, melhores tratamentos e melhor acesso a cuidados médicos (Seifert et al., 2022).

Neste contexto, a busca por antivenenos de próxima geração tem se tornado cada vez mais importante em quase todas as áreas da medicina moderna. Dentre as diferentes abordagens de descoberta de anticorpos existentes, no campo da toxinologia e desenvolvimento de soro antiofídico, a técnica de phage display se destaca (Ledsgaard et al., 2018b).

Para antivenenos a grande vantagem é que os anticorpos monoclonais e humanos possuem imunogenicidade muito baixa e são fáceis de projetar usando abordagens padrão, permitindo o desenho de terapias de envenenamento mais otimizadas, seguras e eficazes uma vez que tais anticorpos recombinantes seriam completamente compatíveis com o sistema imunológico humano (Laustsen et al., 2018; Song et al., 2024).

A técnica de phage display vem sendo empregada na toxinologia para obtenção de fragmentos de anticorpos com especificidades para diferentes toxinas, sendo pela primeira vez empregada na pesquisa de soro antiofídico por Meng et al. (1995), para descoberta de fragmentos de anticorpos contra crototoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Desde tal descoberta, a tecnologia phage display tem sido base para a descoberta de anticorpos neutralizantes para diferentes toxinas-alvo de espécies animais, como serpentes (Roncolato et al., 2013; Tamarozzi et al., 2006), escorpiões (Pucca et al., 2012, 2014), aranhas (Føns et al., 2020) e abelhas (Pessenda et al., 2016), utilizando bibliotecas contendo anticorpos humanos e de camelídeos . (Ahmadi et al., 2025)

1.7. Phage display e a aplicabilidade em toxinas animais e serinoproteases

O desenvolvimento de novas tecnologias ampliou as possibilidades para a geração de antivenenos fundamentalmente inovadores, especialmente a partir do avanço no conhecimento sobre a estrutura de anticorpos e DNA, da tecnologia de hibridomas, da reação em cadeia da polimerase (PCR), da expressão recombinante de anticorpos e da tecnologia de *phage display*

(Pucca et al., 2019). Entre essas abordagens, o *phage display* tem se destacado como uma ferramenta relevante para a descoberta de anticorpos monoclonais e fragmentos recombinantes contra toxinas de diferentes animais peçonhentos, incluindo serpentes, aranhas, escorpiões e abelhas.

A primeira aplicação dessa tecnologia no contexto de toxinas animais foi descrita por Meng et al. (1995), que construíram uma biblioteca combinatória de anticorpos murinos a partir de células B esplênicas de camundongos imunizados contra a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Esse estudo resultou na seleção de um fragmento variável de cadeia única murino (scFv) com alta afinidade pela crotoxina. Além disso, um dos scFvs derivados dessa biblioteca neutralizou parcialmente, em camundongos, a letalidade induzida pela toxina Mojave, um homólogo da crotoxina (Roncolato et al., 2015).

Com o objetivo de contextualizar o uso atual dessa tecnologia, foi realizada uma busca na plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o termo “Phage Display Animal Toxins”, que resultou em 309 publicações. Esses trabalhos envolveram toxinas de diferentes origens animais, incluindo peçonhas de serpentes, aranhas, escorpiões e abelhas. Entre os estudos mais recentes, Benard-Valle et al. (2024) descreveram a descoberta de nanocorpos com neutralização cruzada contra toxinas de peçonhas de cobras-corais, demonstrando que misturas oligoclonais desses nanocorpos foram capazes de neutralizar a letalidade induzida por duas peçonhas de serpentes corais norte-americanas em camundongos (Benard-Valle et al., 2024).

Outros estudos recentes também demonstram a versatilidade do *phage display* aplicado a toxinas animais. Li et al. (2024) construíram uma biblioteca de fagos T7 a partir da glândula de veneno de *Naja atra* para a triagem de ligantes do receptor Toll-like 4 (TLR4), identificando um novo peptídeo com ligação específica a esse receptor (Li et al., 2024). Rivera-de-Torre et al. (2024) aplicaram a tecnologia à seleção de scFvs contra esfingomielinases tóxicas de peçonhas de *Loxosceles* sp. e *Hemiscorpius* sp., demonstrando que os fragmentos obtidos foram capazes de reconhecer SMases de *H. lepturus* e *L. rufescens* e neutralizar, in vitro, a atividade de SMase do veneno total de *H. lepturus*. (Rivera-de-Torre et al., 2024). e forma semelhante, Sørensen et al. (2024) utilizaram *phage display* para a descoberta de anticorpos monoclonais humanos contra miotoxina II de *Bothrops asper*, evidenciando a importância de avaliar cuidadosamente os efeitos funcionais desses anticorpos, uma vez que determinadas interações podem aumentar a toxicidade da toxina por mecanismos dependentes de anticorpos. Em outro estudo, o mesmo grupo selecionou anticorpos contra ecarfolina S de *Echis carinatus sochureki* e miotoxina II de *B. asper*, demonstrando capacidade de reduzir efeitos citotóxicos de PLA₂ de peçonhas de serpentes de diferentes gêneros (Sørensen et al., 2024).

No contexto de neurotoxinas, Rimbault et al. (2023a) selecionaram fago-anticorpos contra a α -cobratoxina de *Naja kaouthia*, obtendo moléculas com afinidade de ligação e potência de neutralização funcional semelhantes às observadas para scFvs selecionados contra a toxina nativa (Rimbault et al., 2023a). Ledsgaard et al. (2023), por sua vez, produziram anticorpos monoclonais humanos por *phage display* contra toxinas do veneno de *Naja kaouthia*, obtendo moléculas com elevada capacidade de neutralização in vitro e in vivo contra α -neurotoxinas de cadeia longa. Esses anticorpos foram capazes de prevenir a letalidade induzida pelo veneno de *N. kaouthia* e prolongar a sobrevivência de camundongos desafiados com peçonhas de *Dendroaspis polylepis* ou *Ophiophagus Hannah* (Ledsgaard et al., 2023).

Apesar do número crescente de estudos envolvendo *phage display* e toxinas animais, o cenário é diferente quando a busca é direcionada especificamente para SVSPs. Ao utilizar o termo “Phage Display Serine Proteases” na plataforma NCBI, foram encontrados 314 resultados. No entanto, a maioria desses estudos esteve relacionada a SVSPs humanas, murinas, virais, infecciosas, tumorais ou associadas a processos fisiopatológicos não relacionados a envenenamentos. Porém, ao analisarmos estudos realizados em animais de demais origens, pudemos constatar 6 estudos, os quais envolvem a utilização do *phage display* para caracterização das especificidades de clivagem das SVSPs granzima G e gar DDN1 de *Lepisosteus oculatus* (Valentini et al., 2024), especificidade de clivagem da SVSP granzima I de bagre (Thorpe et al., 2016), descrição de um novo método para maturação in vitro de *Chiloscyllium plagiosum* HTRA1 (Zielonka et al., 2014), identificação de inibidores de proteases específicas das enzimas digestivas de *Aedes aegypti* e larvas de *Aedes aegypti* (Soares et al., 2013), especificidade de clivagem da quimase de mastócitos de *Maca fascicularis* comparando-a a quimase humana e de cão (Thorpe et al., 2012) e, por último, estudos das interações peptídicas da glutathione transferase de mamíferos como parte de via de sinalização para estresse oxidativo e apoptose em modelo *Caenorhabditis elegans* (Rimbault et al., 2023b).

Dessa forma, mesmo com a restrição dos parâmetros de busca, não foram encontrados indícios de estudos publicados utilizando *phage display* para a produção de anticorpos ou fragmentos recombinantes dirigidos a SVSPs de peçonhas de serpentes. Esse ponto evidencia a lacuna existente na literatura e reforça o caráter inovador da estratégia adotada neste trabalho, que teve como alvo a Moojase, uma SVSP trombina-like do veneno de *Bothrops moojeni*.

Para complementar essa análise, foi realizada a busca pelo termo “Serine Protease Antivenom”, que resultou em 150 publicações. De modo geral, os trabalhos encontrados envolveram a purificação de SVSPs de peçonhas de serpentes para processos de imunização ou a avaliação da participação dessas enzimas no envenenamento, mas não utilizaram a tecnologia de *phage display*. Entre os estudos mais relevantes, Kuniyoshi et al. (2019) demonstraram que

o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan não apresenta cobertura completa contra SVSPs do veneno de *Bothrops jararaca*. Nesse estudo, quatro SVSPs presentes no veneno de *B. jararaca* — KN-BJ2, HS112, BjSP e BPA — não tiveram sua atividade totalmente inibida pelo antiveneno comercial. A partir disso, os autores avaliaram a produção de anticorpos contra um pool de SVSPs não bloqueadas, demonstrando que os soros obtidos em modelos murinos apresentaram resposta específica e potencial neutralizante *in vitro* superior ao do antiveneno convencional em determinadas condições (Kuniyoshi et al., 2019).

Outro estudo relevante foi conduzido por Alomran et al. (2022), que expressaram três SVSPs recombinantes em células HEK293F: ancrod, de *Calloselasma rhodostoma*; batroxobina, de *Bothrops atrox*; e RVV-V, de *Daboia russelii*. Essas toxinas foram utilizadas para imunização murina, resultando em antivenenos experimentais com reatividade cruzada promissora. Os perfis de ligação indicaram respostas fortes e consistentes contra ancrod, RVV-V e contra a mistura de toxinas recombinantes, enquanto a resposta à batroxobina recombinante foi consideravelmente menor (Alomran et al., 2022).

Mais recentemente, Saladini et al. (2024) exploraram o potencial inibitório de cinco peptídeos sintéticos homólogos a regiões CDR3 de um anticorpo monoclonal murino direcionado a uma SVSP de *Bothrops atrox*. O estudo demonstrou que quatro desses peptídeos foram capazes de inibir SVSPs presentes nas peçonhas de *B. jararaca* e *B. atrox*, além de uma SVSP purificada. Quando comparados ao antiveneno do Instituto Butantan, os peptídeos apresentaram desempenho superior ou equivalente na inibição da hidrólise de substratos específicos, indicando que regiões derivadas de anticorpos podem atuar como moléculas inibitórias contra SVSPs de peçonhas (Saladini et al., 2024).

Silva et al. (2021) também demonstraram a relevância das SVSPs como alvos terapêuticos ao avaliar inibidores seletivos de SVSPs, como pepC e pepB, em associação ao antiveneno botrópico. Os autores observaram que, *in vitro*, a combinação desses inibidores com o antiveneno melhorou a neutralização da ativação da coagulação e reduziu a depleção de fibrinogênio humano. Além disso, em modelo *in vivo*, a associação de pepC ou pepB ao soro antiveneno melhorou a neutralização da hemorragia local. O estudo destacou, contudo, que a semelhança entre a tríade catalítica das SVMPS e das SVSPs humanas torna essencial o desenvolvimento de inibidores seletivos para enzimas do Veneno (Silva et al., 2021).

De modo semelhante, Kuniyoshi et al. (2012) já havia demonstrado que o soro antibotrópico apresenta fraca neutralização da atividade de SVSPs presentes no veneno de *Bothrops jararaca*, apesar de neutralizar de forma mais eficiente a atividade de SVMPS. Esses achados, posteriormente reforçados por outros estudos, indicam que as SVSPs representam uma classe toxínica relevante, mas ainda insuficientemente explorada no contexto

da melhoria de antivenenos botrópicos.(Kuniyoshi et al., 2012). Ainda, as mesmas constatações a respeito do bloqueio das SVSPs pelo antiveneno do Instituto Butantan foram feitas por outros autores (Saladini et al., 2024).

Neste contexto, o presente estudo se posiciona estrategicamente para selecionar, produzir e testar fragmentos de anticorpos humanos para reconhecer e neutralizar a SVSP Moojase, uma toxina relevante do veneno de *Bothrops moojeni* associada a importantes alterações hemostáticas no envenenamento. Por meio da tecnologia de phage display, aliada a análises imunológicas e biofísicas, este trabalho busca identificar fragmentos de anticorpos com alta afinidade e especificidade, contribuindo para o avanço do desenvolvimento de um futuro antiveneno recombinante mais seguro e potencialmente mais eficaz no tratamento do envenenamento ofídico pelo gênero *Bothrops*.

6. Conclusão

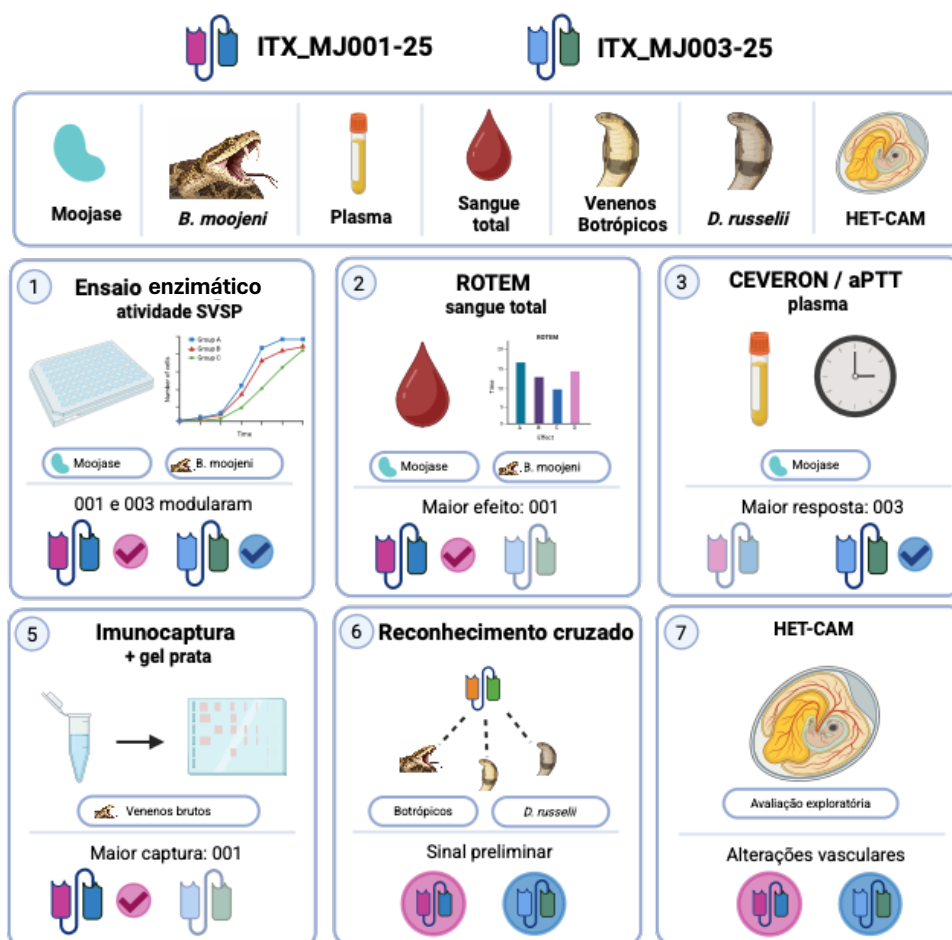
Em conjunto, os resultados demonstraram que os clones ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 constituem ferramentas recombinantes promissoras para o reconhecimento e a modulação funcional da Moojase, uma SVSP trombina-like do veneno de *Bothrops moojeni*. A estratégia de seleção por *phage display* permitiu a obtenção de fragmentos recombinantes de anticorpos humanos do tipo scFv capazes de reconhecer essa toxina e interferir em atividades associadas à sua ação proteolítica e pró-coagulante, ampliando as possibilidades de aplicação de anticorpos monoclonais humanos no estudo de toxinas hemostaticamente relevantes.

Os clones selecionados apresentaram perfis funcionais distintos e complementares. ITX_MJ001-25 destacou-se nos ensaios em sangue total, especialmente em maior razão molar, enquanto ITX_MJ003-25 apresentou efeito mais evidente em plasma, com destaque para a

modulação do aPTT frente à Moojase. Além disso, os ensaios enzimáticos evidenciaram modulação da atividade de SVSP da Moojase e de componentes relacionados presentes em alguns venenos brutos, enquanto os ensaios hemostáticos demonstraram que os scFvs isolados não alteraram a coagulação por si só. Esses achados indicam que os clones não são funcionalmente redundantes e podem atuar por mecanismos distintos.

Dessa forma, este trabalho estabeleceu uma base experimental para o desenvolvimento de anticorpos humanos recombinantes voltados à modulação de SVSPs botrópicas. Os resultados obtidos, sintetizados na Figura 46, indicam que ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 representam candidatos iniciais para estratégias futuras de neutralização recombinante, individualmente ou em combinação com anticorpos e inibidores direcionados a outras famílias tóxicas, contribuindo para o avanço de abordagens racionais aplicadas à toxinologia e ao desenvolvimento de antivenenos de nova geração.

Figura 46. Síntese visual dos ensaios funcionais e exploratórios realizados com os scFvs humanos ITX_MJ001-25 e ITX_MJ003-25 contra a Moojase.



A figura resume os principais ensaios empregados para caracterização funcional dos scFvs selecionados contra a Moojase, incluindo ensaio fluorogênico de atividade serinoproteásica, ROTEM em sangue total, CEVERON/aPTT em plasma, imunocaptura em solução seguida de gel corado por prata, análise exploratória de cross-reconhecimento e ensaio HET-CAM. O clone ITX_MJ001-25 apresentou maior destaque em sangue total, especialmente no ROTEM, e

maior perfil de captura na imunocaptura, enquanto o clone ITX_MJ003-25 demonstrou resposta mais evidente em plasma, principalmente no ensaio de aPTT frente à Moojase. Em conjunto, os resultados indicam o potencial dos clones como ferramentas recombinantes para o estudo e a modulação de SVSPs trombina-like de peçonhas de serpentes. Criado com Biorender.com.

8. Fomento à Pesquisa

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/01801-1 e 2025/11949-9.

Referências

- ABRAMSON, Josh et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, [S. l.], v. 630, n. 8016, p. 493–500, 2024. DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07487-w>. Acesso em: 14 abr. 2026.
- AHMADI, Shirin et al. Nanobody-based recombinant antivenom for cobra, mamba and rinkhals bites. **Nature**, [S. l.], v. 647, n. 8090, p. 716–725, 2025. DOI: 10.1038/s41586-025-09661-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-025-09661-0>. Acesso em: 4 jun. 2026.
- AHMADI, Shirin; PUCCA, Manuela B.; JÜRGENSEN, Jonas A.; JANKE, Rahel; LEDSGAARD, Line; SCHOOF, Erwin M.; SØRENSEN, Christoffer V.; ÇALIŞKAN, Figen; LAUSTSEN, Andreas H. An in vitro methodology for discovering broadly-neutralizing monoclonal antibodies. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 10765, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-67654-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-67654-7>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- AL QARAGHULI, Mohammed M.; KUBIAK-OSSOWSKA, Karina; FERRO, Valerie A.; MULHERAN, Paul A. Antibody-protein binding and conformational changes: identifying allosteric signalling pathways to engineer a better effector response. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 13696, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70680-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-70680-0>. Acesso em: 20 maio. 2026.
- ALAPE-GIRÓN, Alberto; FLORES-DÍAZ, Marietta; SANZ, Libia; MADRIGAL, Marvin; ESCOLANO, José; SASA, Mahmood; CALVETE, Juan J. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 54, n. 7, p. 938–948, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.06.011.
- ALAPE-GIRÓN, Alberto; SANZ, Libia; ESCOLANO, José; FLORES-DÍAZ, Marietta; MADRIGAL, Marvin; SASA, Mahmood; CALVETE, Juan J. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008. DOI: 10.1021/pr800332p.
- ALOMRAN, Nessrin et al. Exploring the Utility of Recombinant Snake Venom Serine Protease Toxins as Immunogens for Generating Experimental Snakebite Antivenoms. **Toxins**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 443, 2022. DOI: 10.3390/toxins14070443. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9319908/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- ALSOLAISS, Jaffer; ALOMRAN, Nessrin; HAWKINS, Laura; CASEWELL, Nicholas R. Commercial Antivenoms Exert Broad Paraspecific Immunological Binding and In Vitro Inhibition of Medically Important *Bothrops* Pit Viper Venoms. **Toxins**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1, 2022. DOI: 10.3390/toxins15010001.
- ALVARENGA, Larissa M.; ZAHID, Muhammad; DI TOMMASO, Anne; JUSTE, Matthieu O.; AUBREY, Nicolas; BILLIALD, Philippe; MUZARD, Julien. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 2541–2567, 2014. DOI: 10.3390/toxins6082541.

AMORIM, Fernanda G.; MENALDO, Danilo L.; CARONE, Sante E. I.; SILVA, Thiago A.; SARTIM, Marco A.; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loic; SAMPAIO, Suely V. New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from Bothrops moojeni Snake Venom. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 500, 2018. a. DOI: 10.3390/toxins10120500. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316876/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

AMORIM, Fernanda G.; MENALDO, Danilo L.; CARONE, Sante E. I.; SILVA, Thiago A.; SARTIM, Marco A.; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loic; SAMPAIO, Suely V. New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from Bothrops moojeni Snake Venom. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 500, 2018. b. DOI: 10.3390/toxins10120500. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316876/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

AMORIM, Fernanda G.; MENALDO, Danilo L.; CARONE, Sante E. I.; SILVA, Thiago A.; SARTIM, Marco A.; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loic; SAMPAIO, Suely V. New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from Bothrops moojeni Snake Venom. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 500, 2018. c. DOI: 10.3390/toxins10120500.

Antivenom slithers back to life. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 537–538, 2024. DOI: 10.1038/s41587-024-02221-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-024-02221-3>. Acesso em: 18 fev. 2026.

ARAP, Marco Antonio. Phage display technology: applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 28, p. 1–9, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100001>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/Mt4nbDzq99JdN9jpJfVrwKH/>. Acesso em: 9 abr. 2025.

ARIAS-ESQUIVEL, Ana Margarita; MOSCOSO, Edwin; UMAÑA, Deibid; ARGUEDAS, Mauricio; SOLANO, Daniela; DURÁN, Gina; GÓMEZ, Aarón; GUTIÉRREZ, José María; LEÓN, Guillermo. Stress levels, hematological condition, and productivity of plasma-producing horses used for snake antivenom manufacture: A comparison of two industrial bleeding methods. **Toxicon: X**, [S. l.], v. 24, p. 100212, 2024. DOI: 10.1016/j.toxcx.2024.100212. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171024000298>. Acesso em: 18 fev. 2026.

ASAR, Mallika; NEWTON-NORTHUP, Jessica; SOENDERGAARD, Mette. Improving Pharmacokinetics of Peptides Using Phage Display. **Viruses**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 570, 2024. DOI: 10.3390/v16040570.

AZZAZY, Hassan M. E.; HIGHSMITH, W. Edward. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 425–445, 2002. DOI: 10.1016/s0009-9120(02)00343-0.

BAKHSINEJAD, Babak; KJAER, Andreas. On the origin of non-specific binders isolated in the selection of phage display peptide libraries. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 16, p. 1571679, 2025. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1571679. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12174986/>. Acesso em: 12 set. 2025.

BARLOW, Axel; POOK, Catharine E.; HARRISON, Robert A.; WÜSTER, Wolfgang. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings. Biological Sciences**, [S. l.], v. 276, n. 1666, p. 2443–2449, 2009. DOI: 10.1098/rspb.2009.0048.

BENARD-VALLE, Melisa et al. In vivo neutralization of coral snake venoms with an oligoclonal nanobody mixture in a murine challenge model. **Nature Communications**, [S. l.], v. 15, p. 4310, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-48539-z. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11109316/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J. J.; HARTLEY, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**, [S. l.], v. 221, n. 5178, p. 337–340, 1969. DOI: 10.1038/221337a0.

BURNOUF, Thierry; GRIFFITHS, Elwyn; PADILLA, Ana; SEDDIK, Salwa; STEPHANO, Marco Antonio; GUTIÉRREZ, José-María. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 115–128, 2004. DOI: 10.1016/j.biologicals.2004.07.001.

BUTLER, John E. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. **Methods**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 4–23, 2000. DOI: 10.1006/meth.2000.1031. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202300910314>. Acesso em: 20 maio. 2026.

CALVETE, Juan J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colubriensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 227–240, 2009. a. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.005.

CALVETE, Juan J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **The Biochemical Journal**, [S. l.], v. 474, n. 5, p. 611–634, 2017. DOI: 10.1042/BCJ20160577.

CALVETE, Juan J.; RODRÍGUEZ, Yania; QUESADA-BERNAT, Sarai; PLA, Davinia. Toxin-resolved antivenomics-guided assessment of the immunorecognition landscape of antivenoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 148, p. 107–122, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010118301582>. Acesso em: 27 maio. 2026.

CALVETE, Juan J.; SANZ, Libia; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009. b. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.029. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2009.03.029>. Acesso em: 27 maio. 2026.

CARDOSO, Edgar António Delgado. **Moléculas de adesão celular: papel do microambiente tumoral na carcinogénese**. 2009. masterThesis - [S. l.], 2009. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/34214>. Acesso em: 20 jun. 2025.

CARNEIRO, Anna Cecília Vieira. **Expressão de uma serinoprotease de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais**. 2018. Bacharel em Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

CARONE, Sante E. I. et al. BjsP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 357, p. 50–61, 2018. DOI: 10.1016/j.taap.2018.08.018.

CARVALHO, Érica S. et al. Prospecting Local Treatments Used in Conjunction with Antivenom Administration Following Envenomation Caused by Animals: A Systematic Review. *Toxins*, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 313, 2023. DOI: 10.3390/toxins15050313. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/15/5/313>. Acesso em: 17 jun. 2026.

CASEWELL, Nicholas R. et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S. l.], v. 111, n. 25, p. 9205–9210, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1405484111. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1405484111>. Acesso em: 17 jun. 2026.

CAVECCI-MENDONÇA, Bruna et al. Preliminary Insights of Brazilian Snake Venom Metalloproteomics. *Toxins*, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 648, 2023. DOI: 10.3390/toxins15110648. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/15/11/648>. Acesso em: 17 jun. 2026.

CHAMES, Patrick; BATY, Daniel. Phage Display and Selections on Biotinylated Antigens. Em: KONTERMANN, Roland; DÜBEL, Stefan (org.). *Antibody Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 151–164. DOI: 10.1007/978-3-642-01144-3_11. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-01144-3_11. Acesso em: 20 maio. 2026.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991. DOI: 10.1016/0041-0101(91)90116-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010191901169>. Acesso em: 27 maio. 2026.

CIDADE, Daniela A. P.; SIMÃO, Tatiana A.; DÁVILA, Alberto M. R.; WAGNER, Glauber; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Inácio de L. M.; HO, Paulo Lee; BON, Cassian; ZINGALI, Russolina B.; ALBANO, Rodolpho M. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 437–461, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.07.008.

CLEMENT, Herlinda; CORRALES-GARCÍA, Ligia Luz; BOLAÑOS, Damaris; CORZO, Gerardo; VILLEGAS, Elba. Immunogenic Properties of Recombinant Enzymes from Bothrops Ammodytoides Towards the Generation of Neutralizing Antibodies against Its Own Venom. *Toxins*, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 702, 2019. DOI: 10.3390/toxins11120702.

COLOMBINI, Mônica et al. Phenotypic dichotomy in Crotalus durissus ruruima venom and potential consequences for clinical management of snakebite envenomations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, [S. l.], v. 19, n. 8, p. e0013296, 2025. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013296. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0013296>. Acesso em: 17 jun. 2026.

CROWTHER, John R. *The ELISA Guidebook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 516 DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-254-4>. Acesso em: 20 maio. 2026.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. *Nature*, [S. l.], v. 379, n. 6565, p. 537–540, 1996. DOI: 10.1038/379537a0.

D'AMÉLIO, Fernanda; VIGERELLI, Hugo; DE BRANDÃO PRIETO DA SILVA, Álvaro Rossan; KERKIS, Irina. Bothrops moojeni venom and its components – an overview. *Journal of Venom Research*, [S. l.], v. 11, p. 26–33, 2021.

DANTAS-BARBOSA, Carmela; DE MACEDO BRIGIDO, Marcelo; MARANHÃO, Andrea Queiroz. Antibody phage display libraries: contributions to oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 5420–5440, 2012. DOI: 10.3390/ijms13055420.

DE OLIVEIRA, Isadora Sousa; ALANO-DA-SILVA, Nicolay Malachize; FERREIRA, Isabela Gobbo; CERNI, Felipe Augusto; SACHETT, Jacqueline de Almeida Gonçalves; MONTEIRO, Wuelton Marcelo; PUCCA, Manuela Berto; ARANTES, Eliane Candiani. Understanding the complexity of Tityus serrulatus venom: A focus on high molecular weight components. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 30, p. e20230046, 2024. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0046.

DEMICO, Poliana J. et al. Comparative Analysis of the Enzymatic, Coagulant, and Neuromuscular Activities of Two Variants of Crotalus durissus ruruima Venom and Antivenom Efficacy. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 54, 2025. DOI: 10.3390/ph18010054. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/18/1/54>. Acesso em: 17 jun. 2026.

DIAS, Êuder Reis et al. Bothrops leucurus snake venom protein profile, isolation and biological characterization of its major toxin PLA2s-like. **Toxicon**, [S. l.], v. 213, p. 27–42, 2022. DOI: 10.1016/j.toxicon.2022.04.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010122000964>. Acesso em: 16 jun. 2026.

DUBROW, Alyssa; ZUNIGA, Bryan; TOPO, Elias; CHO, Jae-Hyun. Suppressing Nonspecific Binding in Biolayer Interferometry Experiments for Weak Ligand–Analyte Interactions. **ACS Omega**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 9206–9211, 2022. DOI: 10.1021/acsomega.1c05659. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c05659>. Acesso em: 20 maio. 2026.

DURBAN, Jordi et al. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. **BMC genomics**, [S. l.], v. 12, p. 259, 2011. DOI: 10.1186/1471-2164-12-259.

ELIA, Giuliano. Protein Biotinylation. **Current Protocols in Protein Science**, [S. l.], v. 60, n. 1, 2010. DOI: 10.1002/0471140864.ps0306s60. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0306s60>. Acesso em: 27 maio. 2026.

FARIAS, Altair Seabra De et al. Decentralization of snakebite antivenom treatment to indigenous community health centers in the Brazilian Amazon: From demand to the first treatment (the SAVING Program). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. e0013011, 2025. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0013011>. Acesso em: 18 fev. 2026.

FERNÁNDEZ, Eduardo M. G. et al. Physical and Sensory Long-Term Disabilities from Bothrops Snakebite Envenomings in Manaus, Western Brazilian Amazon. **Toxins**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 22, 2025. DOI: 10.3390/toxins17010022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/17/1/22>. Acesso em: 17 jun. 2026.

FERNÁNDEZ-QUINTERO, Monica L.; HOERSCHINGER, Valentin J.; LAMP, Leonida M.; BUJOTZEK, Alexander; GEORGES, Guy; LIEDL, Klaus R. V_H-V_L interdomain dynamics observed by computer simulations and NMR. **Proteins: Structure, Function, and**

Bioinformatics, [S. l.], v. 88, n. 7, p. 830–839, 2020. DOI: 10.1002/prot.25872. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.25872>. Acesso em: 20 maio. 2026.

FØNS, Sofie; LEDSGAARD, Line; NIKOLAEV, Maxim V.; VASSILEVSKI, Alexander A.; SØRENSEN, Christoffer V.; CHEVALIER, Manon K.; FIEBIG, Michael; LAUSTSEN, Andreas H. Discovery of a Recombinant Human Monoclonal Immunoglobulin G Antibody Against α -Latrotoxin From the Mediterranean Black Widow Spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 587825, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.587825. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.587825/full>. Acesso em: 4 jun. 2026.

FOX, Jay W.; MA, Li; NELSON, Kristina; SHERMAN, Nicholas E.; SERRANO, Solange M. T. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 700–714, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.01.022.

FOX, Jay W.; SERRANO, Solange M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 200–209, 2009. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.015.

GALIZIO, Nathália da Costa; SERINO-SILVA, Caroline; STUGINSKI, Daniel Rodrigues; ABREU, Patrícia Antônia Estima; SANT'ANNA, Sávio Stefanini; GREGO, Kathleen Fernandes; TASHIMA, Alexandre Keiji; TANAKA-AZEVEDO, Anita Mitico; MORAIS-ZANI, Karen De. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 186, p. 56–70, 2018. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.07.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187439191830277X>. Acesso em: 14 maio. 2024.

GAMULIN, Erika; MATELJAK LUKAČEVIĆ, Sanja; HALASSY, Beata; KURTOVIĆ, Tihana. Snake Antivenoms-Toward Better Understanding of the Administration Route. **Toxins**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 398, 2023. DOI: 10.3390/toxins15060398.

GAY, Carolina; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J.; PLA, Davinia. Snake Venomics and Antivenomics of *Bothrops diporus*, a Medically Important Pitviper in Northeastern Argentina. **Toxins**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 9, 2015. DOI: 10.3390/toxins8010009.

GIBBS, H. Lisle; MACKESSY, Stephen P. Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. **Toxicon**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 672–679, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.034. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101010900083X>. Acesso em: 19 jan. 2026.

GRANT, Oliver C.; MONTGOMERY, David; ITO, Keigo; WOODS, Robert J. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield: implications for immune recognition. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, [S. l.], p. 2020.04.07.030445, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.07.030445.

GUADARRAMA-MARTÍNEZ, Alid; NERI-CASTRO, Edgar; BOYER, Leslie; ALAGÓN, Alejandro. Variability in antivenom neutralization of Mexican viperid snake venoms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. e0012152, 2024. DOI:

10.1371/journal.pntd.0012152. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0012152>. Acesso em: 31 maio. 2026.

GUÉRCIO, Rafael AP; SHEVCHENKO, Anna; SHEVCHENKO, Andrej; LÓPEZ-LOZANO, Jorge L.; PABA, Jaime; SOUSA, Marcelo V.; RICART, Carlos AO. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11, 2006. DOI: 10.1186/1477-5956-4-11. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-5956-4-11>. Acesso em: 19 jan. 2026.

GUIMARAES KOCH, Sofia S. et al. International nonproprietary names for monoclonal antibodies: an evolving nomenclature system. **mAbs**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 2075078, 2022. DOI: 10.1080/19420862.2022.2075078. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420862.2022.2075078>. Acesso em: 7 jun. 2026.

GUTIÉRREZ, J. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, [S. l.], v. 82, n. 9–10, p. 841–850, 2000. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01163-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908400011639>. Acesso em: 20 maio. 2026.

GUTIÉRREZ, José. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7, 2014. DOI: 10.1186/1678-9199-20-7. Disponível em: <http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/1678-9199-20-7>. Acesso em: 20 maio. 2026.

GUTIÉRREZ, José María; CALVETE, Juan J.; HABIB, Abdulrazaq G.; HARRISON, Robert A.; WILLIAMS, David J.; WARRELL, David A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews. Disease Primers**, [S. l.], v. 3, p. 17063, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63.

GUTIÉRREZ, José María; SANZ, Libia; ESCOLANO, José; FERNÁNDEZ, Julián; LOMONTE, Bruno; ANGULO, Yamileth; RUCAVADO, Alexandra; WARRELL, David A.; CALVETE, Juan J. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 4396–4408, 2008. DOI: 10.1021/pr8003826.

GUTIÉRREZ, José María; THEAKSTON, R. David G.; WARRELL, David A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. e150, 2006. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030150. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0030150>. Acesso em: 17 jun. 2026.

GUTIÉRREZ, José María; VARGAS, Mariángela; SEGURA, Álvaro; HERRERA, María; VILLALTA, Mauren; SOLANO, Gabriela; SÁNCHEZ, Andrés; HERRERA, Cristina; LEÓN, Guillermo. In Vitro Tests for Assessing the Neutralizing Ability of Snake Antivenoms: Toward the 3Rs Principles. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 617429, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.617429.

HAMZEH-MIVEHROUD, Maryam; ALIZADEH, Ali Akbar; MORRIS, Michael B.; BRET CHURCH, W.; DASTMALCHI, Siavoush. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 18, n. 23, p. 1144–1157, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.09.001. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644613002894>. Acesso em: 17 jun. 2024.

HARRIS, John B.; SCOTT-DAVEY, Tracey; HARRIS, John B.; SCOTT-DAVEY, Tracey. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. **Toxins**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 2533–2571, 2013. DOI: 10.3390/toxins5122533. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/5/12/2533>. Acesso em: 19 jan. 2026.

HARTMANN, Jan; HERMELIN, Daniela; LEVY, Jerrold H. Viscoelastic testing: an illustrated review of technology and clinical applications. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 100031, 2023. DOI: 10.1016/j.rpth.2022.100031. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S247503792202283X>. Acesso em: 27 maio. 2026.

HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.

HEINE, Philip Alexander; RUSCHIG, Maximilian; LANGREDER, Nora; WENZEL, Esther Veronika; SCHUBERT, Maren; BERTOGLIO, Federico; HUST, Michael. Antibody Selection in Solution Using Magnetic Beads. *Em*: HUST, Michael; LIM, Theam Soon (org.). **Phage Display**. New York, NY: Springer US, 2023. v. 2702p. 261–274. DOI: 10.1007/978-1-0716-3381-6_13. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-3381-6_13. Acesso em: 20 maio. 2026.

HOOGENBOOM, Hennie R.; DE BRUÏNE, Adriaan P.; HUFTON, Simon E.; HOET, René M.; ARENDS, Jan-Willem; ROOVERS, Rob C. Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–20, 1998. DOI: 10.1016/S1380-2933(98)00007-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1380293398000074>. Acesso em: 7 abr. 2025.

ICCVAM — INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method**. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 262, n. 7, p. 3132–3135, 1987.

JALILZADEH-RAZIN, Sepideh; MANTEGI, Malihe; TOHIDKIA, Mohammad R.; PAZHANG, Yaghub; POURSEIF, Mohammad M.; BARAR, Jaleh; OMIDI, Yadollah. Phage antibody library screening for the selection of novel high-affinity human single-chain variable fragment against gastrin receptor: an in silico and in vitro study. **Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 21–34, 2019. DOI: 10.1007/s40199-018-0233-1.

JAROSZEWICZ, Weronika; MORCINEK-ORŁOWSKA, Joanna; PIERZYNOWSKA, Karolina; GAFFKE, Lidia; WĘGRZYN, Grzegorz. Phage display and other peptide display technologies. **FEMS microbiology reviews**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. fuab052, 2022. DOI: 10.1093/femsre/fuab052.

JIANG, Hanjie; COLE, Philip A. N-Terminal Protein Labeling with *N*-Hydroxysuccinimide Esters and Microscale Thermophoresis Measurements of Protein-Protein Interactions Using Labeled Protein. **Current Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. e14, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.14. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.14>. Acesso em: 27 maio. 2026.

JORGE, Roberta Jeane B. et al. Venomics and antivenomics of Bothrops erythromelas from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 114, p. 93–114, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.11.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439191400534X>. Acesso em: 27 maio. 2026.

JUMPER, John et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [S. l.], v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

KAASGAARD, Thomas; MOURITSEN, Ole G.; JØRGENSEN, Kent. Screening effect of PEG on avidin binding to liposome surface receptors. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 214, n. 1–2, p. 63–65, 2001. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00633-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517300006335>. Acesso em: 27 maio. 2026.

KALLEL, Hatem et al. Early vascular toxicity induced by Bothrops atrox venom in the chorioallantoic membrane assay: Kinetic profile and translational insights. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. e0013969, 2026. DOI: 10.1371/journal.pntd.0013969. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0013969>. Acesso em: 31 maio. 2026.

KAMAT, Vishal; RAFIQUE, Ashique. Designing binding kinetic assay on the bio-layer interferometry (BLI) biosensor to characterize antibody-antigen interactions. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 536, p. 16–31, 2017. DOI: 10.1016/j.ab.2017.08.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269717303342>. Acesso em: 20 maio. 2026.

KANG, Tae Hyun; SEONG, Baik Lin. Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 1927, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01927. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01927/full>. Acesso em: 20 maio. 2026.

KASHIMA, Simone et al. Analysis of Bothrops jararacussu venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 211–219, 2004. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.02.002.

KASTURIRATNE, Anuradhani; LALLOO, David G.; JANAKA DE SILVA, H. Chronic health effects and cost of snakebite. **Toxicon: X**, [S. l.], v. 9–10, p. 100074, 2021. DOI: 10.1016/j.toxcx.2021.100074. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590171021000102>. Acesso em: 17 jun. 2026.

KIM, Dohyun; HERR, Amy E. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. **Biomicrofluidics**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 041501, 2013. DOI: 10.1063/1.4816934. Disponível em: <https://pubs.aip.org/bmf/article/7/4/041501/386021/Protein-immobilization-techniques-for-microfluidic>. Acesso em: 27 maio. 2026.

KINI, R. Manjunatha. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, [S. l.], v. 34, n. 4–5, p. 200–204, 2005. DOI: 10.1159/000092424.

KINI, R. Manjunatha. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **The Biochemical Journal**, [S. l.], v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006. DOI: 10.1042/BJ20060302.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, [S. l.], v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975. DOI: 10.1038/256495a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/256495a0>. Acesso em: 4 jun. 2026.

KOIDE, Akiko; WOJCIK, John; GILBRETH, Ryan N.; REICHEL, Annett; PIEHLER, Jacob; KOIDE, Shohei. Accelerating phage-display library selection by reversible and site-specific biotinylation. **Protein engineering, design & selection: PEDS**, [S. l.], v. 22, n. 11, p. 685–690, 2009. DOI: 10.1093/protein/gzp053.

KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo; KODAMA, Roberto Tadashi; CAJADO-CARVALHO, Daniela; IWAI, Leo Kei; KITANO, Eduardo; DA SILVA, Cristiane Castilho Fernandes; DUZZI, Bruno; DIAS DA SILVA, Wilmar; PORTARO, Fernanda Calheta. Experimental antivenom against serine proteases from the *Bothrops jararaca* venom obtained in mice, and its comparison with the antithrombotic serum from the Butantan Institute. **Toxicon**, [S. l.], v. 169, p. 59–67, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.09.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011930443X>. Acesso em: 9 abr. 2025.

KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo; ROCHA, Marisa; CAJADO CARVALHO, Daniela; JULIANO, Maria Aparecida; JULIANO NETO, Luiz; TAMBOURGI, Denise Vilarinho; PORTARO, Fernanda Calheta Vieira. Angiotensin-degrading serine peptidase: A new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 124–131, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.11.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111003473>. Acesso em: 9 abr. 2025.

KURIEN, Biji T.; SCOFIELD, R. Hal. Western blotting. **Methods**, Methods for Analyzing Cytokines. [S. l.], v. 38, n. 4, Methods for Analyzing Cytokines, p. 283–293, 2006. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202306000065>. Acesso em: 20 maio. 2026.

KURODA, Daisuke; TSUMOTO, Kouhei. Structural Classification of CDR-H3 in Single-Domain VHH Antibodies. *Em*: TSUMOTO, Kouhei; KURODA, Daisuke (org.). **Computer-Aided Antibody Design**. New York, NY: Springer US, 2023. v. 2552p. 61–79. DOI: 10.1007/978-1-0716-2609-2_2. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-2609-2_2. Acesso em: 20 maio. 2026.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0>. Acesso em: 16 fev. 2026.

LARRÉCHÉ, Sébastien et al. Bothrops atrox and Bothrops lanceolatus Venoms In Vitro Investigation: Composition, Procoagulant Effects, Co-Factor Dependency, and Correction Using Antivenoms. **Toxins**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 614, 2023. DOI: 10.3390/toxins15100614. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/15/10/614>. Acesso em: 17 jun. 2026.

LAUSTSEN, Andreas H. et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 146, p. 151–175, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.03.004.

LAUSTSEN, Andreas H. Recombinant snake antivenoms get closer to the clinic. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 225–227, 2024. DOI: 10.1016/j.it.2024.03.001.

LEDGAARD, Line et al. Discovery and optimization of a broadly-neutralizing human monoclonal antibody against long-chain α -neurotoxins from snakes. **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 682, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-36393-4.

LEDGAARD, Line; JENKINS, Timothy P.; DAVIDSEN, Kristian; KRAUSE, Kamille Elvstrøm; MARTOS-ESTEBAN, Andrea; ENGMARK, Mikael; RØRDAM ANDERSEN, Mikael; LUND, Ole; LAUSTSEN, Andreas Hougaard. Antibody Cross-Reactivity in Antivenom Research. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 393, 2018. a. DOI: 10.3390/toxins10100393.

LEDGAARD, Line; KILSTRUP, Mogens; KARATT-VELLATT, Aneesh; MCCAFFERTY, John; LAUSTSEN, Andreas H. Basics of Antibody Phage Display Technology. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 236, 2018. b. DOI: 10.3390/toxins10060236.

LEDUC, Richard D. et al. Proteomics Standards Initiative's ProForma 2.0: Unifying the Encoding of Proteoforms and Peptidoforms. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 1189–1195, 2022. DOI: 10.1021/acs.jproteome.1c00771. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.1c00771>. Acesso em: 20 maio. 2026.

LEE, Yu-Ching et al. Single chain antibody fragment with serine protease inhibitory property capable of neutralizing toxicity of Trimeresurus mucrosquamatus venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 460, n. 2, p. 170–176, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.169. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15004258>. Acesso em: 20 maio. 2026.

LEFRANC, Marie-Paule; POMMIÉ, Christelle; RUIZ, Manuel; GIUDICELLI, Véronique; FOULQUIER, Elodie; TRUONG, Lisa; THOUVENIN-CONTET, Valérie; LEFRANC, Gérard. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. **Developmental & Comparative Immunology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 55–77, 2003. DOI: 10.1016/S0145-305X(02)00039-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X02000393>. Acesso em: 20 maio. 2026.

LI, Xue et al. Acetylation of TIR domains in the TLR4-Mal-MyD88 complex regulates immune responses in sepsis. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 43, n. 21, p. 4954–4983, 2024. DOI: 10.1038/s44318-024-00237-8.

LISOWSKA, E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 445–455, 2002. DOI: 10.1007/s00018-002-8437-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-002-8437-3>. Acesso em: 27 maio. 2026.

LOMONTE, Bruno et al. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. **Toxicon**, [S. l.], v. 122, p. 7–25, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.09.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010116302719>. Acesso em: 17 jun. 2026.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985. DOI: 10.1016/0278-6915(85)90030-4.

MA, Wenzhe; TANG, Chao; LAI, Luhua. Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 1183–1193, 2005. DOI: 10.1529/biophysj.104.057158. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505727661>. Acesso em: 20 maio. 2026.

MALACHIAS-PIRES, Geovanna. **Avaliação dos Efeitos dos Venenos Botrópicos no Processo de Coagulação Sanguínea**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade de Araraquara, Araraquara, 2024.

MAMEDE, Carla Cristine Neves; DE SOUSA SIMAMOTO, Bruna Barbosa; DA CUNHA PEREIRA, Deborah Fernanda; DE OLIVEIRA COSTA, Júnia; RIBEIRO, Mariana Santos Matias; DE OLIVEIRA, Fabio. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. **Toxicon**, [S. l.], v. 187, p. 10–18, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.08.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010120303573>. Acesso em: 9 maio. 2024.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 1749–1800, 1998. DOI: 10.1016/s0041-0101(98)00126-3.

MARKLAND, Francis S.; SWENSON, Stephen. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 62, p. 3–18, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004.

MARTIN-EAUCLAIRE, Marie-France; BOUGIS, Pierre E.; DE LIMA, Maria Elena. Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. **Toxicon**, [S. l.], v. 152, p. 106–120, 2018. a. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.07.024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010118303283>. Acesso em: 17 jun. 2026.

MARTIN-EAUCLAIRE, Marie-France; BOUGIS, Pierre E.; DE LIMA, Maria Elena. Ts1 from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*: A half-century of studies on a multifunctional beta like-toxin. **Toxicon**, [S. l.], v. 152, p. 106–120, 2018. b. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.07.024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010118303283>. Acesso em: 27 maio. 2026.

MATSUI, Tai; FUJIMURA, Yoshihiro; TITANI, Koiti. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1477, n. 1, p. 146–156, 2000. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00268-X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016748389900268X>. Acesso em: 19 jan. 2026.

MCCAFFERTY, John; GRIFFITHS, Andrew D.; WINTER, Greg; CHISWELL, David J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, [S. l.], v. 348, n. 6301, p. 552–554, 1990. DOI: 10.1038/348552a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/348552a0>. Acesso em: 4 jun. 2026.

MEGALE, Ângela Alice Amadeu; MAGNOLI, Fábio Carlos; KUNIYOSHI, Alexandre Kazuo; IWAI, Leo Kei; TAMBOURGI, Denise V.; PORTARO, Fernanda C. V.; DA SILVA, Wilmar Dias. Kn-Ba: a novel serine protease isolated from Bitis arietans snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 24, p. 38, 2018. DOI: 10.1186/s40409-018-0176-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6293559/>. Acesso em: 21 abr. 2024.

MENEZES, Milene C.; FURTADO, Maria F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, Silvia R.; CAMARGO, Antonio C. M.; SERRANO, Solange M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 304–312, 2006. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.11.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105003995>. Acesso em: 19 jan. 2026.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 13, n. 28, p. 2893–2905, 2007. DOI: 10.2174/138161207782023711.

MURALI, Shruthi; RUSTANDI, Richard; ZHENG, Xiwei; PAYNE, Anne; SHANG, Liang. Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus–Ligand Binding. **Viruses**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 717, 2022. DOI: 10.3390/v14040717. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/717>. Acesso em: 20 maio. 2026.

NAZARI, Ali; SAMIANIFARD, Maedeh; RABIE, Hadi; MIRAKABADI, Abbas Zare. Recombinant antibodies against Iranian cobra venom as a new emerging therapy by phage display technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, p. e20190099, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0099. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992020000100317&tlng=en. Acesso em: 20 maio. 2026.

NEIVA, Márcia et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 427–436, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.006.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, New York, N.Y., v. 224, n. 4647, p. 350–357, 1984. DOI: 10.1126/science.6369538.

NOY-PORAT, Tal; ALCALAY, Ron; MECHALY, Adva; PERETZ, Eldar; MAKDASI, Efi; ROSENFELD, Ronit; MAZOR, Ohad. Characterization of antibody-antigen interactions using biolayer interferometry. **STAR protocols**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 100836, 2021. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100836.

NÚÑEZ, Vitelbina; CID, Pedro; SANZ, Libia; DE LA TORRE, Pilar; ANGULO, Yamileth; LOMONTE, Bruno; GUTIÉRREZ, José María; CALVETE, Juan J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil,

Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 57–78, 2009. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.07.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391909002383>. Acesso em: 27 maio. 2026.

OLIVEIRA, Ana L.; VIEGAS, Matilde F.; DA SILVA, Saulo L.; SOARES, Andreimar M.; RAMOS, Maria J.; FERNANDES, Pedro A. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 451–469, 2022. a. DOI: 10.1038/s41570-022-00393-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41570-022-00393-7>. Acesso em: 5 jun. 2025.

OLIVEIRA, Ana L.; VIEGAS, Matilde F.; DA SILVA, Saulo L.; SOARES, Andreimar M.; RAMOS, Maria J.; FERNANDES, Pedro A. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 451–469, 2022. b. DOI: 10.1038/s41570-022-00393-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41570-022-00393-7>. Acesso em: 18 jun. 2025.

PAES LEME, A. F.; PREZOTO, B. C.; YAMASHIRO, E. T.; BERTHOLIM, L.; TASHIMA, A. K.; KLITZKE, C. F.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1363–1372, 2008. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.02995.x.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 337–360, 1995. DOI: 10.1002/pro.5560040301.

PESSENDA, Gabriela; SILVA, Luciano C.; CAMPOS, Lucas B.; PACELLO, Elenice M.; PUCCA, Manuela B.; MARTINEZ, Edson Z.; BARBOSA, José E. Human scFv antibodies (Afribumabs) against Africanized bee venom: Advances in melittin recognition. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 112, p. 59–67, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.01.062.

PIDDE-QUEIROZ, Giselle; FURTADO, Maria de Fátima; FILGUEIRAS, Carlos F.; PESSOA, Lucas A.; SPADAFORA-FERREIRA, Mônica; VAN DEN BERG, Carmen W.; TAMBOURGI, Denise V. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from Bothrops genus. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 47, n. 16, p. 2537–2544, 2010. DOI: 10.1016/j.molimm.2010.07.003.

POLIKARPOV, Igor; MATILDE, Mario Sanches; MARANGONI, Sergio; TOYAMA, Marcos H.; TEPLYAKOV, Alexei. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from Tityus serrulatus provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 290, n. 1, p. 175–184, 1999. DOI: 10.1006/jmbi.1999.2868. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283699928681>. Acesso em: 17 jun. 2026.

PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; NOVELLO, J. C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian Bothrops atrox venom. **The Protein Journal**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 387–394, 2007. DOI: 10.1007/s10930-007-9078-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9078-z>. Acesso em: 11 maio. 2024.

PUCCA, Manuela B. et al. Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, p. 611, 2020. a. DOI: 10.3389/fphar.2020.00611.

PUCCA, Manuela B. et al. Chronic kidney failure following lancehead bite envenoming: a clinical report from the Amazon region. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, p. e20200083, 2020. b. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0083. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/kp3sWvkHTgkfVnchXY6QN5B/?lang=en>. Acesso em: 23 maio. 2024.

PUCCA, Manuela B. et al. Crotalus Durissus Ruruima: Current Knowledge on Natural History, Medical Importance, and Clinical Toxinology. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, p. 659515, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.659515. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.659515/full>. Acesso em: 17 jun. 2026.

PUCCA, Manuela B.; CAMPHORA, Ana Lucia. The potential risks of equine serum therapy in transmitting new infectious diseases: lessons from a post-pandemic era. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 12, p. 1366929, 2024. DOI: 10.3389/fpubh.2024.1366929. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10899399/>. Acesso em: 18 fev. 2026.

PUCCA, Manuela B.; CERNI, Felipe A.; JANKE, Rahel; BERMÚDEZ-MÉNDEZ, Erick; LEDSGAARD, Line; BARBOSA, José E.; LAUSTSEN, Andreas H. History of Envenoming Therapy and Current Perspectives. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, p. 1598, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01598.

PUCCA, Manuela Berto; CERNI, Felipe Augusto; PEIGNEUR, Steve; ARANTES, Eliane Candiani; TYTGAT, Jan; BARBOSA, José Elpidio. Serrumab: a novel human single chain-fragment antibody with multiple scorpion toxin-neutralizing capacities. **Journal of Immunotoxicology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 133–140, 2014. DOI: 10.3109/1547691X.2013.809175.

PUCCA, Manuela Berto; ZOCCAL, Karina Furlan; RONCOLATO, Eduardo Crosara; BERTOLINI, Thaís Barboza; CAMPOS, Lucas Benício; COLOGNA, Camila Takeno; FACCIOI, Lúcia Helena; ARANTES, Eliane Candiani; BARBOSA, José Elpidio. Serrumab: A human monoclonal antibody that counters the biochemical and immunological effects of *Tityus serrulatus* venom. **Journal of Immunotoxicology**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 173–183, 2012. DOI: 10.3109/1547691X.2011.649220. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1547691X.2011.649220>. Acesso em: 20 jan. 2024.

RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J.; FINN, Robert. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. D1, p. D343-350, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1118.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 328, n. 2, p. 314–324, 2014. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.06.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482714002572>. Acesso em: 27 maio. 2026.

RICHARDSON, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Advances in Protein Chemistry**, [S. l.], v. 34, p. 167–339, 1981. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60520-3.

RIMBAULT, Charlotte; KNUDSEN, Pelle D.; DAMSBO, Anna; BODDUM, Kim; ALI, Hanif; HACKNEY, Celeste M.; ELLGAARD, Lars; BOHN, Markus-Frederik; LAUSTSEN, Andreas H. A single-chain variable fragment selected against a conformational epitope of a recombinantly produced snake toxin using phage display. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 76, p. 23–32, 2023. a. DOI: 10.1016/j.nbt.2023.04.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678423000171>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RIMBAULT, Charlotte; KNUDSEN, Pelle D.; DAMSBO, Anna; BODDUM, Kim; ALI, Hanif; HACKNEY, Celeste M.; ELLGAARD, Lars; BOHN, Markus-Frederik; LAUSTSEN, Andreas H. A single-chain variable fragment selected against a conformational epitope of a recombinantly produced snake toxin using phage display. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 76, p. 23–32, 2023. b. DOI: 10.1016/j.nbt.2023.04.002.

RIVERA-DE-TORRE, Esperanza; LAMPADARIOU, Stefanos; MØINICHE, Mark; BOHN, Markus F.; KAZEMI, Seyed Mahdi; LAUSTSEN, Andreas H. Discovery of broadly-neutralizing antibodies against brown recluse spider and Gadim scorpion sphingomyelinases using consensus toxins as antigens. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. e4901, 2024. DOI: 10.1002/pro.4901. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10868436/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RODRIGUES, Renata S.; BOLDRINI-FRANÇA, Johara; FONSECA, Fernando P. P.; DE LA TORRE, Pilar; HENRIQUE-SILVA, Flávio; SANZ, Libia; CALVETE, Juan J.; RODRIGUES, Veridiana M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 75, n. 9, p. 2707–2720, 2012. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.028.

ROMANAZZI, Marcela et al. The Versatility of Serine Proteases from Brazilian *Bothrops* Venom: Their Roles in Snakebites and Drug Discovery. **Biomolecules**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 154, 2025. DOI: 10.3390/biom15020154.

RONCOLATO, Eduardo Crosara; CAMPOS, Lucas Benício; PESSEDA, Gabriela; COSTA E SILVA, Luciano; FURTADO, Gilvan Pessoa; BARBOSA, José Elpidio. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 93, p. 79–84, 2015. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.001.

RONCOLATO, Eduardo Crosara; PUCCA, Manuela Berto; FUNAYAMA, Jaqueline Carlos; BERTOLINI, Thaís Barboza; CAMPOS, Lucas Benício; BARBOSA, José Elpidio. Human antibody fragments specific for *Bothrops jararacussu* venom reduce the toxicity of other *Bothrops* sp. venoms. **Journal of Immunotoxicology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 160–168, 2013. DOI: 10.3109/1547691X.2012.703253. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1547691X.2012.703253>. Acesso em: 4 jun. 2026.

SAGUCHI, Ken-ichi; HAGIWARA-SAGUCHI, Yuki; MURAYAMA, Nobuhiro; OHI, Hiroaki; FUJITA, Yoshiaki; CAMARGO, Antonio C. M.; SERRANO, Solange M. T.; HIGUCHI, Shigesada. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. **Toxicon**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 72–83, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.03.011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105001182>. Acesso em: 23 set. 2024.

SAHA, Bedabrata; SONGE, Pål; EVERS, Toon H.; PRINS, Menno W. J. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles. **The Analyst**, [S. l.], v. 142, n. 22, p. 4247–4256, 2017. DOI: 10.1039/C7AN01424D. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C7AN01424D>. Acesso em: 31 maio. 2026.

SAHYOUN, Christina; RIMA, Mohamad; MATTEI, César; SABATIER, Jean-Marc; FAJLOUN, Ziad; LEGROS, Christian. Separation and Analytical Techniques Used in Snake Venomics: A Review Article. **Processes**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1380, 2022. DOI: 10.3390/pr10071380. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/10/7/1380>. Acesso em: 17 jun. 2026.

SALADINI, Lucas Yuri et al. Evaluation of the Inhibitory Potential of Synthetic Peptides Homologous to CDR3 Regions of a Monoclonal Antibody against Bothropic Venom Serine Proteases. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 5181, 2024. DOI: 10.3390/ijms25105181.

SALDARRIAGA, Mónica María; OTERO, Rafael; NÚÑEZ, Vitelbina; TORO, Maria Fabiola; DÍAZ, Abel; GUTIÉRREZ, José María. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 405–411, 2003. DOI: 10.1016/s0041-0101(03)00171-5.

SANT'ANA, Carolina D. et al. BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from Bothrops jararacussu snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S. l.], v. 151, n. 3, p. 443–454, 2008. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.02.036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643307009075>. Acesso em: 20 maio. 2026.

SANTORO, Rita; MOLINARI, Angelo; LEOTTA, Marzia; MARTINI, Tiziano. Isolated Prolongation of Activated Partial Thromboplastin Time: Not Just Bleeding Risk! **Medicina**, [S. l.], v. 59, n. 6, p. 1169, 2023. DOI: 10.3390/medicina59061169. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/59/6/1169>. Acesso em: 27 maio. 2026.

SANTOS, Isabela C. Dos et al. Phospholipases A2 (PLA2s) and Related Peptides from Bothrops Snake Venoms: History, Structure, Pharmacology, and Inhibitors. **Biomolecules**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 1583, 2025. DOI: 10.3390/biom15111583. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/15/11/1583>. Acesso em: 4 jun. 2026.

SANZ, Libia; DE FREITAS-LIMA, Lucas N.; QUESADA-BERNAT, Sarai; GRAÇA-DE-SOUZA, Viviane K.; SOARES, Andreimar M.; CALDERÓN, Leonardo De A.; CALVETE, Juan J.; CALDEIRA, Cleópatra A. S. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: Micrurus frontalis, Micrurus spixii spixii, and Micrurus surinamensis. **Toxicon**, [S. l.], v. 166, p. 39–45, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.05.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004101011930145X>. Acesso em: 17 jun. 2026.

SANZ, Libia; PÉREZ, Alicia; QUESADA-BERNAT, Sarai; DINIZ-SOUSA, Rafaela; CALDERÓN, Leonardo A.; SOARES, Andreimar M.; CALVETE, Juan J.; CALDEIRA, Cleópatra A. S. Venomomics and antivenomics of the poorly studied Brazil's lancehead, Bothrops brazili (Hoge, 1954), from the Brazilian State of Pará. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, p. e20190103, 2020. DOI:

10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0103. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992020000100308&tlng=en. Acesso em: 27 maio. 2026.

SEIFERT, Steven A.; ARMITAGE, James O.; SANCHEZ, Elda E. Snake Envenomation. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 386, n. 1, p. 68–78, 2022. DOI: 10.1056/NEJMr2105228.

SERRANO, Solange M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, Milestones and future prospects in snake venom research. [S. l.], v. 62, Milestones and future prospects in snake venom research, p. 19–26, 2013. a. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112007465>. Acesso em: 23 set. 2024.

SERRANO, Solange M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, Milestones and future prospects in snake venom research. [S. l.], v. 62, Milestones and future prospects in snake venom research, p. 19–26, 2013. b. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112007465>. Acesso em: 23 set. 2024.

SERRANO, Solange M. T.; HAGIWARA, Yuki; MURAYAMA, Nobuhiro; HIGUCHI, Shigesada; MENTELE, Reinhard; SAMPAIO, Claudio A. M.; CAMARGO, Antonio C. M.; FINK, Edwin. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 251, n. 3, p. 845–853, 1998. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510845.x. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.1998.2510845.x>. Acesso em: 13 maio. 2024.

SERRANO, Solange M. T.; MAROUN, Rachid C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, Snake toxins and hemostasis. [S. l.], v. 45, n. 8, Snake toxins and hemostasis, p. 1115–1132, 2005. a. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020.

SERRANO, Solange M. T.; MAROUN, Rachid C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005. b. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020.

SHAH, Arnik; CUI, Weidong; HARRAHY, John; IVANOV, Alexander R. Characterization of charge variants, including post-translational modifications and proteoforms, of bispecific antigen-binding protein by cation-exchange chromatography coupled to native mass spectrometry. **Talanta**, [S. l.], v. 266, p. 125062, 2024. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.125062. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914023008135>. Acesso em: 20 maio. 2026.

SILVA, G. M. et al. Synergistic effect of serine protease inhibitors and a bothropic antivenom in reducing local hemorrhage and coagulopathy caused by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 199, p. 87–93, 2021. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.06.009.

SLAGBOOM, Julien; KOOL, Jeroen; HARRISON, Robert A.; CASEWELL, Nicholas R. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 177, n. 6, p. 947–959, 2017. DOI: 10.1111/bjh.14591.

SMITH, George P.; PETRENKO, Valery A. Phage Display. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997. DOI: 10.1021/cr960065d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr960065d>. Acesso em: 18 fev. 2026.

SOARES, Tatiane Sanches; SOARES TORQUATO, Ricardo Jose; ALVES LEMOS, Francisco Jose; TANAKA, Aparecida Sadae. Selective inhibitors of digestive enzymes from *Aedes aegypti* larvae identified by phage display. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 9–16, 2013. DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.10.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174812001488>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SONG, Brenda Pei Chui; CH'NG, Angela Chiew Wen; LIM, Theam Soon. Review of phage display: A jack-of-all-trades and master of most biomolecule display. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 256, p. 128455, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128455. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813023053540>. Acesso em: 4 jun. 2026.

SØRENSEN, Christoffer V. et al. Antibody-dependent enhancement of toxicity of myotoxin II from *Bothrops asper*. **Nature Communications**, [S. l.], v. 15, p. 173, 2024. DOI: 10.1038/s41467-023-42624-5.

SOUSA, Leijiane F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. e2442, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002442. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002442>. Acesso em: 23 set. 2024.

SOUSA, Leijiane F. et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 159, p. 32–46, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.03.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391917300775>. Acesso em: 17 jun. 2026.

SOUSA, Leijiane F. et al. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 411, 2018. DOI: 10.3390/toxins10100411. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6215258/>. Acesso em: 7 abr. 2025.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592805000264>. Acesso em: 18 fev. 2026.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1760, n. 9, p. 1450–1457, 2006. DOI:

10.1016/j.bbagen.2006.04.008. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416506001309>. Acesso em: 4 jun. 2026.

TAN, Nget Hong; FUNG, Shin Yee; TAN, Kae Yi; YAP, Michelle Khai Khun; GNANATHASAN, Christeine Ariarane; TAN, Choo Hock. Functional venomics of the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii*) and its toxinological correlations. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 128, p. 403–423, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.08.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391915301081>. Acesso em: 17 jun. 2026.

TASHIMA, Alexandre K.; SANZ, Libia; CAMARGO, Antonio C. M.; SERRANO, Solange M. T.; CALVETE, Juan J. Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 473–485, 2008. DOI: 10.1016/j.jprot.2008.07.007.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 290, 2017. a. DOI: 10.3390/toxins9090290. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/9/290>. Acesso em: 17 jun. 2026.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, [S. l.], v. 9, n. 9, 2017. b. DOI: 10.3390/toxins9090290. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/9/290>. Acesso em: 13 abr. 2026.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 290, 2017. c. DOI: 10.3390/toxins9090290.

THORPE, Chavaunne T.; UDEZE, Chineye P.; BIRCH, Helen L.; CLEGG, Peter D.; SCREEN, Hazel R. C. Specialization of tendon mechanical properties results from interfascicular differences. **Journal of the Royal Society, Interface**, [S. l.], v. 9, n. 76, p. 3108–3117, 2012. DOI: 10.1098/rsif.2012.0362.

THORPE, Michael; AKULA, Srinivas; HELLMAN, Lars. Channel catfish granzyme-like I is a highly specific serine protease with metase activity that is expressed by fish NK-like cells. **Developmental & Comparative Immunology**, [S. l.], v. 63, p. 84–95, 2016. DOI: 10.1016/j.dci.2016.05.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X16301665>. Acesso em: 20 jun. 2024.

TU (ORG.). **Handbook of Natural Toxins: Reptile Venoms and Toxins**. New York: Routledge, 2018. DOI: 10.1201/9780203752715.

TU, Anthony T. Neurotoxins from Snake Venom. **CHIMIA**, [S. l.], v. 52, n. 1–2, p. 56–56, 1998. DOI: 10.2533/chimia.1998.56. Disponível em: https://www.chimia.ch/chimia/article/view/1998_056. Acesso em: 19 jan. 2026.

VALENTINI, Paolo; AKULA, Srinivas; ALVARADO-VAZQUEZ, Abigail; HALLGREN, Jenny; FU, Zhirong; RACICOT, Brett; BRAASCH, Ingo; THORPE, Michael; HELLMAN, Lars. Extended Cleavage Specificity of two Hematopoietic Serine Proteases from a Ray-Finned Fish, the Spotted Gar (*Lepisosteus oculatus*). **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 1669, 2024. DOI: 10.3390/ijms25031669. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10855939/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

VALERIANO-ZAPANA, José Antonio; SEGOVIA-CRUZ, Fernando Steve; ROJAS-HUALPA, José Miguel; MARTINS-DE-SOUZA, Daniel; PONCE-SOTO, Luis Alberto; MARANGONI, Sergio. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 231–240, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.11.018.

VARADI, Mihaly et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 50, n. D1, p. D439–D444, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.

VIDAL, Julia F. D.; SCHWARTZ, Matheus F.; GARAY, Aisel V.; VALADARES, Napoleão F.; BUENO, Renata V.; MONTEIRO, Ana Carolina L.; FREITAS, Sônia Maria De; BARBOSA, João Alexandre R. G. Exploring the Diversity and Function of Serine Proteases in Toxicofera Reptile Venoms: A Comprehensive Overview. **Toxins**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 428, 2024. DOI: 10.3390/toxins16100428. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/16/10/428>. Acesso em: 14 out. 2024.

VILCA QUISPE, Augusto. **Estudos comparativos da atividade cinética e trobina-símile de serinoproteases isoladas a partir dos venenos de Bothrops brazili e Bothrops roedingeri**. 2013. Tese Douorado - Universidade Estadual de Campinas, Cammpinas, 2013.

WAIDDYANATHA, Subodha; SILVA, Anjana; SIRIBADDANA, Sisira; ISBISTER, Geoffrey K. Long-term Effects of Snake Envenoming. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 193, 2019. DOI: 10.3390/toxins11040193. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/4/193>. Acesso em: 17 jun. 2026.

WALSH, Gary; JEFFERIS, Roy. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1241–1252, 2006. DOI: 10.1038/nbt1252. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt1252>. Acesso em: 20 maio. 2026.

WENZEL, Esther V.; ROTH, Kristian D. R.; RUSSO, Giulio; FÜHNER, Viola; HELMSING, Saskia; FRENZEL, André; HUST, Michael. Antibody Phage Display: Antibody Selection in Solution Using Biotinylated Antigens. *Em*: ZIELONKA, Stefan; KRAH, Simon (org.). **Genotype Phenotype Coupling**. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2070p. 143–155. DOI: 10.1007/978-1-4939-9853-1_8. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9853-1_8. Acesso em: 20 maio. 2026.

WIEZEL, Gisele A.; SHIBAO, Priscila Y. T.; COLOGNA, Camila T.; MORANDI FILHO, Romualdo; UEIRA-VIEIRA, Carlos; DE PAUW, Edwin; QUINTON, Loïc; ARANTES, Eliane C. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* : An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 3941–3958, 2018. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00610. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.8b00610>. Acesso em: 17 jun. 2026.

WINTJENS, René; BIFANI, Amanda Makha; BIFANI, Pablo. Impact of glycan cloud on the B-cell epitope prediction of SARS-CoV-2 Spike protein. **npj Vaccines**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 81, 2020. DOI: 10.1038/s41541-020-00237-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41541-020-00237-9>. Acesso em: 27 maio. 2026.

WOLFENDEN, R. **Transition state analog inhibitors and enzyme catalysis**. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7991/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

WOOD, Darryl. Clinical Risk Factors Associated with Poor Outcomes in Snake Envenoming: A Narrative Review. **Toxins**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 675, 2023. DOI: 10.3390/toxins15120675.

XIE, Chunfang; SLAGBOOM, Julien; ALBULESCU, Laura-Oana; BRUYNEEL, Ben; STILL, Kristina B. M.; VONK, Freek J.; SOMSEN, Govert W.; CASEWELL, Nicholas R.; KOOL, Jeroen. Antivenom Neutralization of Coagulopathic Snake Venom Toxins Assessed by Bioactivity Profiling Using Nanofractionation Analytics. **Toxins**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 53, 2020. DOI: 10.3390/toxins12010053.

XIONG, Shengwei; HUANG, Chunhong. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 287, p. 142–154, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.02.004.

ZAIDI, Syed Rafay H.; ROUT, Preeti. Interpretation of Blood Clotting Studies and Values (PT, PTT, aPTT, INR, Anti-Factor Xa, D-Dimer). *Em: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604215/>. Acesso em: 27 maio. 2026.

ZAQUEO, Kayena D. et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, p. 595186, 2014. DOI: 10.1155/2014/595186.

ZAQUEO, Kayena D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S. l.], v. 195, p. 15–25, 2016. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.01.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643316300162>. Acesso em: 13 maio. 2024.

ZELANIS, André; HUESGEN, Pitter F.; OLIVEIRA, Ana Karina; TASHIMA, Alexandre K.; SERRANO, Solange M. T.; OVERALL, Christopher M. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 113, p. 260–267, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914004655>. Acesso em: 21 abr. 2024.

ZELANIS, André; KEIJI TASHIMA, Alexandre. Unraveling snake venom complexity with ‘omics’ approaches: Challenges and perspectives. **Toxicon**, [S. l.], v. 87, p. 131–134, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.05.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114001457>. Acesso em: 13 abr. 2026.

ZIELONKA, Stefan et al. *Shark Attack*: High affinity binding proteins derived from shark vNAR domains by stepwise *in vitro* affinity maturation. **Journal of Biotechnology**, Special Issue dedicated to Karl-Erich Jaeger on the occasion of his 60th Birthday. [S. l.], v. 191, Special Issue dedicated to Karl-Erich Jaeger on the occasion of his 60th Birthday, p. 236–245, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165614002041>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ZUO, Kunlan et al. Evolution of Virology: Science History through Milestones and Technological Advancements. **Viruses**, [*S. l.*], v. 16, n. 3, p. 374, 2024. DOI: 10.3390/v16030374.