UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

DESENVOLVIMENTO DE ANTIVENENO PILOTO CONTRA OS VENENOS DE SERPENTES *BOTHROPS AYERBEI, BOTHROPS RHOMBEATUS*, *BOTHROPS ASPER* E *LACHESIS ACROCHORDA,* USANDO NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO IMUNO ADJUVANTE

FORTALEZA

2026

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

DESENVOLVIMENTO DE ANTIVENENO PILOTO CONTRA OS VENENOS DE SERPENTES *BOTHROPS AYERBEI, BOTHROPS RHOMBEATUS*, *BOTHROPS ASPER* E *LACHESIS ACROCHORDA,* USANDO NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO IMUNOADJUVANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Orientadora: Prof.ª. Dra. Alice Maria Costa Martins.
Coorientador: Prof. Dr. Gerardo Corzo Burguete.

FORTALEZA

2026

Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C19d Camilo, Karen Leonor.
Desenvolvimento de antiveneno piloto contra os venenos de serpentes *Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus, Bothrops asper e Lachesis acrochorda* usando nanopartículas de quitosana como imunoadjuvante / Karen Leonor Camilo. – 2026.
73 f.: il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2026.
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.
Coorientação: Prof. Dr. Gerardo Corzo Burguete.

1. Serpente. 2. Veneno. 3. Nanopartículas. 4. Quitosana. 5. Inmunoadjuvant. I. Título.

CDD 615

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

DESENVOLVIMENTO DE ANTIVENENO PILOTO CONTRA OS VENENOS DE SERPENTES *BOTHROPS AYERBEI, BOTHROPS RHOMBEATUS*, *BOTHROPS ASPER* E *LACHESIS ACROCHORDA,* USANDO NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO IMUNOADJUVANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____
Prof.a Dra. Renata Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____
Prof. Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira
UNICHRISTUS

_____
Prof. Dr. Gerardo Corzo Burguete
Instituto de Biotecnologia (IBT), Universidade Nacional Autónoma de México (UNAM)

_____
Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha amada mãe, Ivarluz Camilo Girón, minha tia, Olga Lucia Camilo, pelo seu exemplo de coragem e pela confiança incondicional em mim.

À minha Filha Emma Sofia Guerrero Angel, minha sobrinha Sara Michelle Bolaños, por ser o motor para lutar pelas minhas conquistas.

Ao meu esposo Jimmy Alexander Guerrero pelo apoio incondicional e por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar vida e saúde, fortaleza, paciência e energia em cada um dos meus dias na luta com o doutorado.

À CAPES, pelo apoio financeiro, com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Nacional Autónoma de México, pela acolhida na realização dos experimentos.

À Prof.a. Dra. Alice Maria Costa Martins, pela excelente orientação, confiança depositada em mim, ensino, paciência, escuta e incentivo durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Gerardo Corzo, pela importante contribuição na minha formação, pelas oportunidades, confiança, incentivo, orientações e receptividade no seu laboratório no Instituto de Biotecnologia, em Cuernavaca, México.

Aos colegas Miguel Mejia, Ivan Arenas, Herlinda Clement, pela ajuda, ensino e tempo dedicado nos experimentos realizados.

Aos meus colegas de laboratório - Kennia Garcia, Victor Carpanta, Alid, Angel Ananda, Andrid, Andreí, pela amizade, risadas, agradável convivência, ajuda, ensinamento e motivação neste pedaço da minha vida.

Aos Professores Doutores Patrícia Mosquera e Andres Torres, e à colega Paola Andrea Arciniegas, da Unidade de Microscopia Eletrônica da Universidade do Cauca, pela sua ajuda no processamento das amostras de nanopartículas e pelo apoio.

A minhas tias: Olga Lucia, Ana Milet, Gilma e Lexy Camilo Girón, pela torcida e incondicional apoio.

A minha irmã e a minha sobrinha, Lilibeth Camilo e Sara Michelle Bolanos C, por serem a motivação em cada um dos meus passos.

Ao meu marido, Jimmy A. Guerrero Vargas, pelo amor, confiança, ajuda, e motivação incondicional.

A minha grande amiga Mary Luz Buenos, pele escuta, apoio, conselhos e presença a todo momento.

Ao meu grande amigo Fermín Chamorro, colega de luta e de experiência, pelos ânimos, amizade, carinho, confiança e apoio – sempre!

A meus amigos e colegas Lorena Urbano, Tatiana Arcos, Yamid Mera y Vianny Plaza, pela amizade, motivações e pela escuta.

Aos secretários Maxwilliam e Juliana, pela atenção, ajuda e paciência sempre.

À Senhora Conceição Alves e ao Senhor Nonato Morais, por me acolherem como uma filha na sua casa, pelo carinho e pela confiança.

A todos os profissionais, componentes familiares e amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para concretização desta etapa da minha vida, o meu MUITO OBRIGADA!

"A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana." (Carl Sagan).

RESUMO

O envenenamento por picadas de serpentes é uma doença tropical negligenciada, e um dos principais fatores que agravam esse problema é a escassez de antivenenos eficazes e em quantidade suficiente para o tratamento das vítimas. Em ditas circunstâncias, torna-se fundamental pesquisar novas estratégias para a produção e o aprimoramento dos antivenenos ofídicos, utilizando substâncias capazes de estimular a resposta imune, como é repetidamente reportado para a quitosana. Assim, o objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de um protótipo de antiveneno contra os venenos de *Lachesis acrochorda* (SVLa), *Bothrops ayerbei* (SVBay), *Bothrops rhombeatus* (SVBr) e *Bothrops asper* (SVBas), utilizando nanopartículas (NPs) de quitosana como imuno adjuvantes. As nanopartículas foram obtidas por gelificação iônica, sendo carregadas com os venenos viperídeos (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas) e realizadas a caracterização físico-química e a eficiência de carga. Em seguida, foi efetivado um processo de imunização em coelhos, seguido de ensaios de imuno reconhecimento. As NPs exibiram eficiência de encapsulamento de 77,5%, tamanho médio de 85,1 nm, potencial zeta de aproximadamente +7,4 mV e índice de polidispersão $\leq$ 0,5, o que indica NPs com características físico-químicas estáveis. Ademais, os anticorpos produzidos pelos coelhos imunizados com as NPs de quitosana carregadas com venenos demonstraram resposta imune de reconhecimento de proteínas, igual ou superior à observada nos coelhos controles e aos antivenenos comerciais testados, tanto nos ensaios de *western blot* quanto de ELISA, indicando maior capacidade de reconhecimento antigênico em comparação com os antivenenos convencionais. Relativamente às provas de neutralização *in vivo*, foi observada boa resposta, inibindo as mortes igual ou superiormente ao antiveneno de coelho controle sem nanopartículas. O modelo de imunização em coelhos demonstrou maior eficácia das NPs de quitosana com venenos (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas) em relação aos imuno adjuvantes convencionais, como hidróxido de alumínio e adjuvante de Freund. Assim, as nanopartículas de quitosana carregadas com venenos exprimem-se como uma promissora abordagem biotecnológica para o desenvolvimento de imunoterapias antiofídicas.

Palavras-chave: serpente; veneno; nanopartículas; quitosana; inmuno adjuvante; *Lachesis*; *Bothrops.*

ABSTRACT

Snake bite poisoning is a neglected tropical disease, and one of the main factors aggravating this problem is the scarcity of effective antivenoms in sufficient quantities to treat victims. In such circumstances, it is essential to research new strategies for the production and improvement of snake antivenoms, using substances capable of stimulating the immune response, as has been repeatedly reported for chitosan. Thus, the objective of this research was to develop a prototype antivenom against the venoms of Lachesis acrochorda (SVLa), Bothrops ayerbei (SVBay), Bothrops rhombeatus (SVBr), and Bothrops asper (SVBas), using chitosan nanoparticles (NPs) as immunoadjuvants. The nanoparticles were obtained by ionic gelation, loaded with viper venoms (SVLa, SVBay, SVBr, and SVBas), and characterized in terms of their physical-chemical properties and loading efficiency. Next, a process of immunization in rabbits was carried out, followed by immunorecognition tests. The NPs exhibited an encapsulation efficiency of 77.5%, an average size of 85.1 nm, a zeta potential of approximately +7.4 mV, and a polydispersity index ≤ 0.5, indicating NPs with stable physicochemical characteristics. Furthermore, antibodies produced by rabbits immunized with chitosan NPs loaded with venoms demonstrated a protein recognition immune response equal to or greater than that observed in control rabbits and commercial antivenoms tested, both in Western blot and ELISA assays, indicating greater antigenic recognition capacity compared to conventional antivenoms. Regarding in vivo neutralization tests, a good response was observed, inhibiting deaths equally or more than the control rabbit antivenom without nanoparticles. The immunization model in rabbits demonstrated greater efficacy of chitosan NPs with poisons (SVLa, SVBay, SVBr, and SVBas) compared to conventional immunoadjuvants, such as aluminum hydroxide and Freund's adjuvant. Thus, chitosan nanoparticles loaded with venoms represent a promising biotechnological approach for the development of antivenom immunotherapies.

Keywords: snake; venom; nanoparticles; chitosan; immunoadjuvant; *Lachesis*; *Bothrops.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das serpentes do gênero *Lachesis*.....17
Figura 2 - Imagem da serpente *L. acrochorda* 18
Figura 3 - Mapa da distribuição de *B. ayerbei* (Patía), *B. rhombeatus* (Cauca) e *B. asper* (Pacífico).....19
Figura 4 - Imagem da serpente *B. ayerbei*.....20
Figura 5 - Imagem da serpente *B. rhombeatus*.....21
Figura 6 - Imagem da serpente *B. asper*.....22
Figura 7 - Receptores-alvo em células portadoras de antígenos (APCs) para adjuvantes 28
Figura 8 - Perfis cromatográficos dos venenos de viperídeos inteiros e dos sobrenadantes após a formação das partículas. Perfis cromatográficos com A. *L. acrochorda* (SVLa), B. *B. ayerbei* (SVBay), C. *B. rhombeatus* (SVBr), D. *B. asper* (SVBas). SDS PAGE picos representativos.....44
Figura 9 - Perfis cromatográficos dos venenos completos com o respectivo SDS PAGE de 12,5% das frações representativas. A. *L. acrochorda* (SVLa), B. *B. ayerbei* (SVBay), C. *B. rhombeatus* (SVBr), D. *B. asper* (SVBas) 45
Figura 10 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *L. acrochorda* (SVLa) 46
Figura 11 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de B. ayerbei (SVBay) .47
Figura 12 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *B. rhombeatus* (SVBr).....47
Figura 13 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *B. asper* (SVBas).....48
Figura 14 - Micrografias TEM das nanopartículas (NPs). A) NPs de controle sem veneno; B) NPs com veneno de *L. acrochorda*; C) NPs com veneno de *B. ayerbei*; D) NPs com veneno de *B. rhombeatus*; e E) NPs com veneno de *B. asper* 49
Figura 15 - SDS-PAGE de viperídeos e western blot utilizando antivenenos comerciais. A) SDS-PAGE com coloração por azul de Coomassie, tamanho dos poros de 12,5%; B) Western blot utilizando anti-INS da Colômbia; e C) Western blot utilizando Antivipmyn do México. *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay),

B. rhombeatus (SVBr) e *B. asper* (SVBas) da Colômbia, e *B. asper* (SVBaM) e *Crotalus basiliscus* (SVCrot) do México.....50
Figura 16 - SDS-PAGE de viperídeos e western blot utilizando antídotos de coelho. A) SDS-PGE com coloração azul de Coomassie, tamanho dos poros de 12,5%; B) Western blot utilizando IgGs de coelho com base em misturas de veneno não encapsuladas; C) Western blot utilizando IgGs de coelho com suporte em misturas de veneno encapsuladas. *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr), *B. asper* (SVBas) da Colômbia e *B. asper* (SVBaM) e *Crotalus basiliscus* (SVCrot) do México 51
Figura 17 - ELISA com anticorpos purificados de coelhos, imunizados com e sem quitosana, e de cavalos (anticorpos comerciais). A) ELISA com anticorpos de coelho usando partículas de quitosana como imuno estimulante; B) ELISA com anticorpos de coelho usando Freund e alumina como imunoestimulantes; C) ELISA com anticorpos de cavalo de antiveneno comercial colombiano; e D) ELISA com anticorpos de cavalo de antiveneno comercial mexicano.....52
Figura 18 - Neutralização de anticorpos produzidos com e sem nanopartículas de quitosana. *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr), *B. asper* (SVBas). Os ratos (n = 5) foram tratados com dose $3DL_{50}$.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das nanopartículas de quitosana, com e sem veneno, das espécies *L. acrochorda, B. ayerbei, B. rhombeatus* e *B. asper*.....*42*

Tabela 2 - Reconhecimento de venenos de serpentes utilizando antídotos de coelhos, imunizados com ou sem quitosana, e antídotos comerciais da Colômbia e do México.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASV	Antiveneno de serpente
AVBay	Veneno de serpente *Bothrops ayerbei*
BPP	Peptídeos semelhantes a potenciadores de bradicinina
CRISP	Proteínas secretoras ricas em cisteína
CTL	Lectina do tipo C/proteínas semelhantes à lectina
DIS	Desintegrinas
DP	Desvio-padrão médio
IgG	Imunoglobulina G
LAO	L-aminoácido oxidases
NGF	Fatores de crescimento dos nervos
PDE	Fosfodiesterases
PDI	Índice de polidispersão
PLA2	Fosfolipases A2
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SE	Snake envenomation
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SVBas	Veneno de serpente *Bothrops asper*
SVBr	Veneno de serpente *Bothrops rhombeatus*
SVLa	Veneno de serpente *Lachesis acrochorda*
SVMP	Metaloproteinase de veneno de serpente
SVSP	Serina proteinase de veneno de serpente-snake venom serine proteas
WHO	World Health Organization

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 Aspecto epidemiológico 15

1.2 Veneno de serpentes 15

1.3 Família *Viperidae* 16

1.4 Gênero *Lachesis* 16

1.5 Espécie *Lachesis acrochorda* 17

1.6 Gênero *Bothrops* 18

1.7 Distribuição das serpentes *B. ayerbeii, B. rhombeatus e B. asper* 19

1.8 *Bothrops ayerbei* 20

1.9 *Bothrops rhombeatus* 20

1.10 *Bothrops asper* 21

1.11 Efeitos hematológicos dos venenos de serpentes 22

1.12 Antivenenos e suas limitações terapêuticas 24

1.13 As imunoglobulinas e os antivenenos 25

1.14 inmunoadjuvantes 26

1.15 Nanopartículas 28

1.16 Nanopartículas de quitosana como adjuvantes 29

1.17 Síntese de nanopartículas de quitosana por gelificação iônica 30

2 JUSTIFICATIVA 31

3 OBJETIVOS 33

3.1 Objetivo geral 33

3.2 Objetivos específicos 33

4 MATERIAIS E MÉTODOS 34

4.1 Obtenção do veneno 34

4.2 Substâncias 34

4.3 Formação das nanopartículas de quitosana 34

4.4 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas 35

4.4.1 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%) 35

4.4.2 Caracterização eletroforética das nanopartículas 35

4.4.3 Índices de polidispersão e valor do potencial zeta da nanopartícula 36

4.4.4 Análise por espectroscopia de infravermelho (IR) 36

4.4.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica 37

4.5 Animais experimentais **37**
4.6 Imunização **38**
4.7 Obtenção do antiveneno **38**
4.8 Purificação de IgGs por precipitação com ácido caprílico **39**
4.9 Avaliação da resposta de anticorpos séricos por ELISA **39**
4.10 Western Blot **40**
4.11 Ensaios de neutralização do antiveneno *in vivo* **40**
4.12 Análise estatística **41**
5 RESULTADOS **42**
5.1 Venenos **42**
5.2 Análise físico-química das nanopartículas **42**
5.3 Análise cromatográfica de venenos de serpente e nanopartículas **43**
5.4 Espectroscopia infravermelha **46**
5.5 Microscopia eletrônica de transmissão **48**
5.6 Western Blot **49**
5.7 Ensaios de imunoreconhecimento **51**
5.8 Concentrações inibitórias 50 (C_{50}) **52**
5.9 Testes de Neutralização *in vivo* **53**
6 DISCUSSÃO **55**
7 CONCLUSÕES **61**
REFERÊNCIAS **62**
APÊNDICE A – COMITÉ DE ÉTICA MÉXICO E COLÔMBIA **73**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspecto epidemiológico

O envenenamento por mordida de serpentes é comum em países da América do Sul, especialmente em regiões tropicais. Esse tipo de acidente constitui um grave problema de saúde pública, afetando principalmente populações rurais, onde a baixa disponibilidade de antídotos (antivenenos) representa um dos principais fatores associados à alta mortalidade (Gutiérrez *et al.*, 2010; WHO, 2023). O envenenamento pela picada de cobra (snakebite envenoming – SE) é reconhecido como uma doença tropical negligenciada, que afeta anualmente cerca de dois milhões de pessoas em todo o mundo, resultando em aproximadamente 81.000 a 138.000 mortes (Alcoba *et al.*, 2022). Esses números refletem, não apenas, a alta toxicidade dos venenos, mas, também, as dificuldades de acesso aos antivenenos em regiões remotas (Gutiérrez *et al.*, 2017; WHO, 2023). Na América Latina, estima-se que ocorram de 137.000 a 150.000 casos de acidentes ofídicos por ano, dos quais 3.400 a 5.000 evoluem para óbito (Gutiérrez *et al.*, 2017; Walteros; Paredes, 2014), evidenciando a gravidade e o impacto desse agravo na saúde pública regional. No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), estima-se que o ano de 2023 registrou 32.595 acidentes ofídicos, o que representa 9,5% dos acidentes causados por animais peçonhentos (Brasil, 2024). Nesse mesmo sentido, para a Colômbia, o Sistema de Vigilância em Saúde Pública (Sivigila), para o ano 2023, notificou 6231 casos de picada de serpentes (Instituto Nacional De Salud, 2024) reforçando a gravidade de problema de envenenamento por picada de cobra como um problema de saúde pública.

1.2 Veneno de serpentes

Os venenos das serpentes são misturas complexas de proteínas que exercem amplas ações tóxicas. A alta variabilidade na composição química do veneno das serpentes está relacionada à variação de manifestações clínicas nos envenenamentos, incluindo dano tecidual local, alterações hemostáticas e efeitos sistêmicos potencialmente letais (Gutiérrez *et al.*, 2017; Mora-Obando *et al.*, 2023). Estes venenos são constituídos de variadas proteínas enzimáticas envolvidas nos sintomas resultantes das complicações nas vítimas de picada de serpente (Cardoso *et al.*, 2003; Mora-Obando *et al.*, 2014; Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012).

1.3 Família *Viperidae*

A família *Viperidae* compreende o grupo de serpentes que têm a característica de serem venenosas e perigosas, passíveis de causar lesões permanentes ou morte. Estas serpentes exibem dentição solenóglifa, geralmente têm cabeça triangular, pupilas verticais e apresentam fossas termo receptoras e rabo curto (Ayerbe-González; Latorre-Ledezma, 2010; Mora-Obando *et al.*, 2023). Em adição, exprimem comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas. Nesta família incluem-se as serpentes que causam a maior quantidade de envenenamentos por ofídios na América (WHO, 2023), incluindo os gêneros *Bothrops* e *Lachesis* que, juntos, representam 95% das serpentes causadoras de envenenamento, sendo o gênero *Bothrops* responsável pela maioria dos casos e, no segundo lugar, as serpentes do gênero *Lachesis* (Gutiérrez *et al.*, 2017; Otero-Patiño, 2011).

Após a picada por serpentes da família *Viperidae*, são frequentemente relatados casos de envenenamento que desencadeiam manifestações clínicas complexas, abrangendo tanto efeitos locais quanto sistêmicos.

Entre os efeitos locais, destacam-se dor intensa, edema, equimoses, linfadenite regional, parestesias, hipotermia, síndrome compartimental, necrose tecidual, abscessos e mionecrose. Já os efeitos sistêmicos incluem choque misto, microtromboses capilares pulmonares e/ou mesentéricas, falência multissistêmica de órgãos, síndrome compartimental e necroses extensas (Ayerbe; Latorre, 2010; Otero-Patiño, 2011).

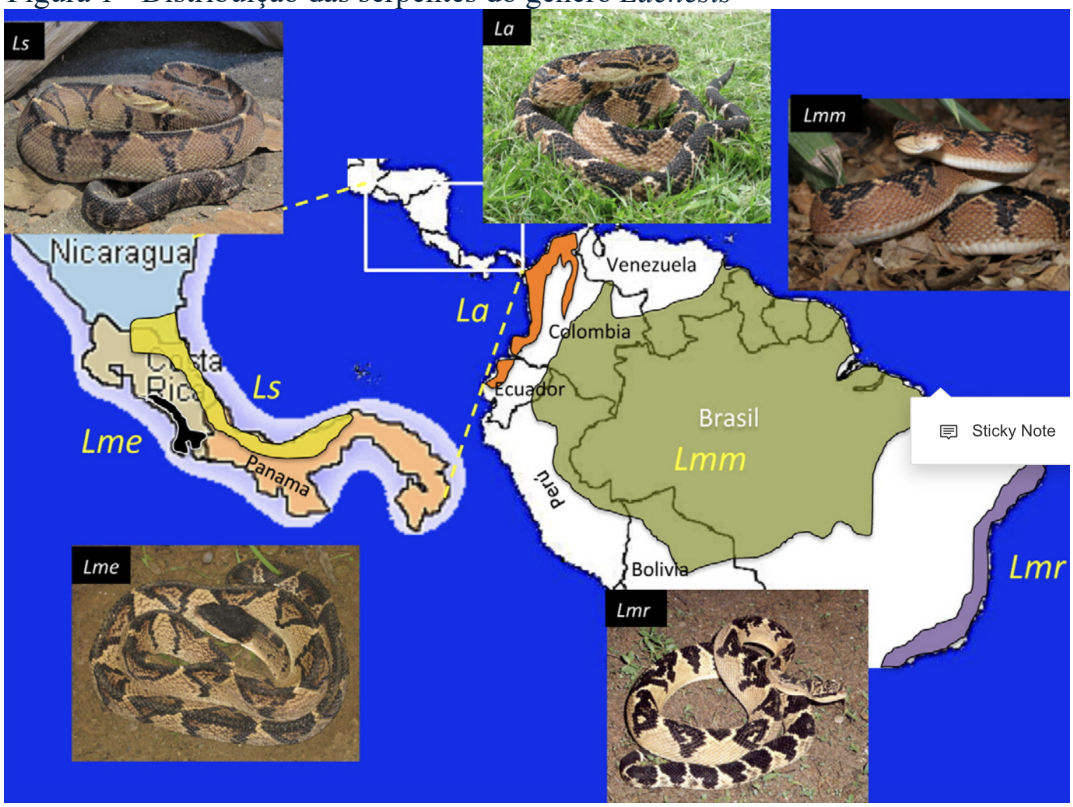
Demais disso, são capazes de causar alterações nos processos de agregação plaquetária e da coagulação no envenenamento por *Lachesis* (Angel-Camilo *et al.*, 2020) e no envenenamento pelas *Bothrops* (Yamashita *et al.*, 2014). Embora existam antivenenos que neutralizam os efeitos sistêmicos, alguns produzidos no Centro e no Sul da América, usando veneno de *Bothrops*, sua eficácia neutralizando efeitos locais é pouca, o que conduz a se demandar por melhoramento na produção de antivenenos (Gutiérrez *et al.*, 1985, 1998).

1.4 Gênero *Lachesis*

As serpentes do gênero *Lachesis* habitam zonas de floresta e remotas na América Central e América do Sul, também na ilha de Trindade. Englobam as maiores víboras do mundo, havendo adultos que alcançam 2-2,5 m de comprimento (o maior espécime conhecido com 4 m de longitude) (Ayerbe; Latorre, 2010; Montoya-Gómez *et al.*, 2023; Pla *et al.*, 2013). O envenenamento humano pela *Lachesis* é pouco frequente, mas é grave, em virtude do

rendimento do veneno produzido (200-400 mg), e por conter sintomas como lesões tissulares (edema, hemorragia e necroses), náuseas, coagulopatias, hipotensão, bradicardia, diarreia, vômitos, transtornos de choque e alterações renais. Atualmente o gênero *Lachesis* (Figura 1) é representado por quatro espécies: *L. stenophrys, L. melanocephala, L. muta,* e a espécie incluída neste estudo - *L. acrochorda* (chochoan bushmaster, em tradução livre "mestre dos arbustos") (Madrigal *et al.*, 2012).

Figura 1 - Distribuição das serpentes do gênero *Lachesis*



Fonte: Adaptado de Madrigal *et al.* (2012).

1.5 Espécie *Lachesis acrochorda*

A serpente *L. acrochorda* é popularmente conhecida como "verrugosa", "chochoan", "bushmaster", "pudridora" ou "surucucu" (Figura 2). É uma das espécies responsáveis por ofidismo na Colômbia, causando de 2 a 3% das picadas e provocando aproximadamente 90% de mortalidade (Angel-Camilo *et al.*, 2020). Embora não sejam reportados relatos de que o veneno da *Lachesis* seja neurotóxico, existem casos clínicos com registro de alterações vasculares e cardíacas, com relatos de coagulação, hipotensão imediata e bradicardia (Ayerbe; Latorre, 2010; Otero *et al.*, 1992). Estas alterações também foram observadas experimentalmente em ratos, oportunidade em que, também, foram reportados

efeitos cardíacos (Ángel-Camilo *et al.*, 2024), hipotensão excessiva, bradicardia e transtornos nos processos de agregação plaquetária e coagulação (Angel-Camilo *et al.*, 2020).

Figura 2 - Imagem da serpente *L. acrochorda*

Fonte: Fotografia feita pela autora. CIBUC-Bioterio, 2020.

1.6 Gênero *Bothrops*

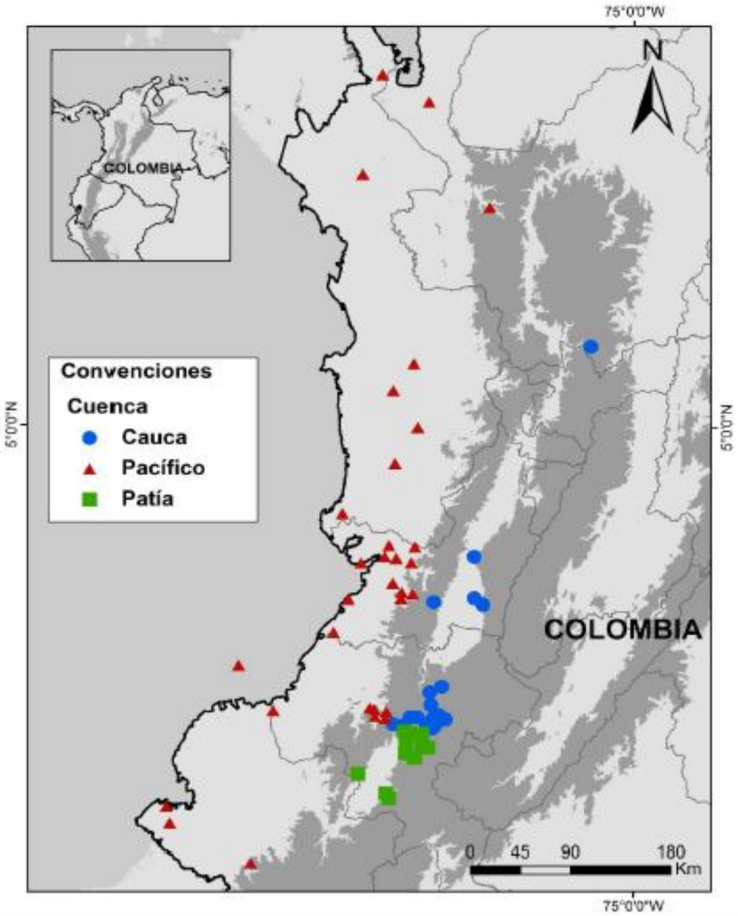
O envenenamento bothropico é causado pelas espécies de serpentes dos gêneros *Bothrops, Bothriechis, Bothrocophias* e *Porthidium*. Destacam-se as *Bothrops,* que têm a maior importância epidemiológica porque causam o maior número dos envenenamentos (Ayerbe-Gonzáles, 2009; Mora-Obando *et al.*, 2020). O gênero *Bothrops* é constituído por 37 espécies distribuídas do México à Argentina (Campbell; Lamar, 2004). O tamanho dos espécimes adultos oscila de 1,5 a 2,2 m, eles têm corpo cilíndrico, longo e grosso, cabeça triangular, olhos da mesma cor do rosto com pupila elíptica e uma grande escama supraocular. Além disso, possuem fossas termo-receptivas, a cabeça pode ter uma configuração alongada, com ou sem desenho supra cefálico, têm dentição solenóglifa, com o aparelho peçonhento mais bem desenvolvido e por isso são maiores produtores de veneno (Campbell; Lamar, 2004). As *Bothrops* também são propícias a mostrar manchas triangulares no dorso, que, quando unidas nos vértices na linha média dorsal, formam um X, daí o nome comum (Folleco, 2010). Portanto, nesta pesquisa, desenvolveu-se o antiveneno utilizando as espécies do gênero *Brothrops,* distribuídas no sudoeste da Colômbia (*B. ayerbeii, B. rhombeatus e B. asper*).

1.7 Distribuição das serpentes *B. ayerbeii, B. rhombeatus e B. asper*

As serpentes do gênero *Bothrops* habitam altitudes de 950 a 2.200 metros acima do nível do mar, em áreas de floresta neotropical baixa e floresta subandina, localizadas desde a bacia hidrográfica dos rios Patía e Cauca até a região norte da Colômbia, conhecida como "La Mojana", abrangendo os departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda, Bolívar e Córdoba (Liévano-Bonilla, 2016; Wallach; Williams; Boundy, 2014) (Figura 3).

As espécies objeto desta pesquisa estão distribuídas, principalmente, no sudoeste da Colômbia, região caracterizada por isolamento geográfico em decorrência das formações montanhosas das cordilheiras Central e Ocidental, o que contribui, com frequência, para a separação biogeográfica entre as espécies *B. ayerbei, B. rhombeatus* e *B. asper.* Essa separação está associada a uma variação fenotípica de caráter geográfico, relacionada à ecologia e ao habitat específico de cada população (Ramírez-Burbano, 2023).

Figura 3 - Mapa da distribuição de *B. ayerbei* (Patía), *B. rhombeatus* (Cauca) e *B. asper* (Pacífico)

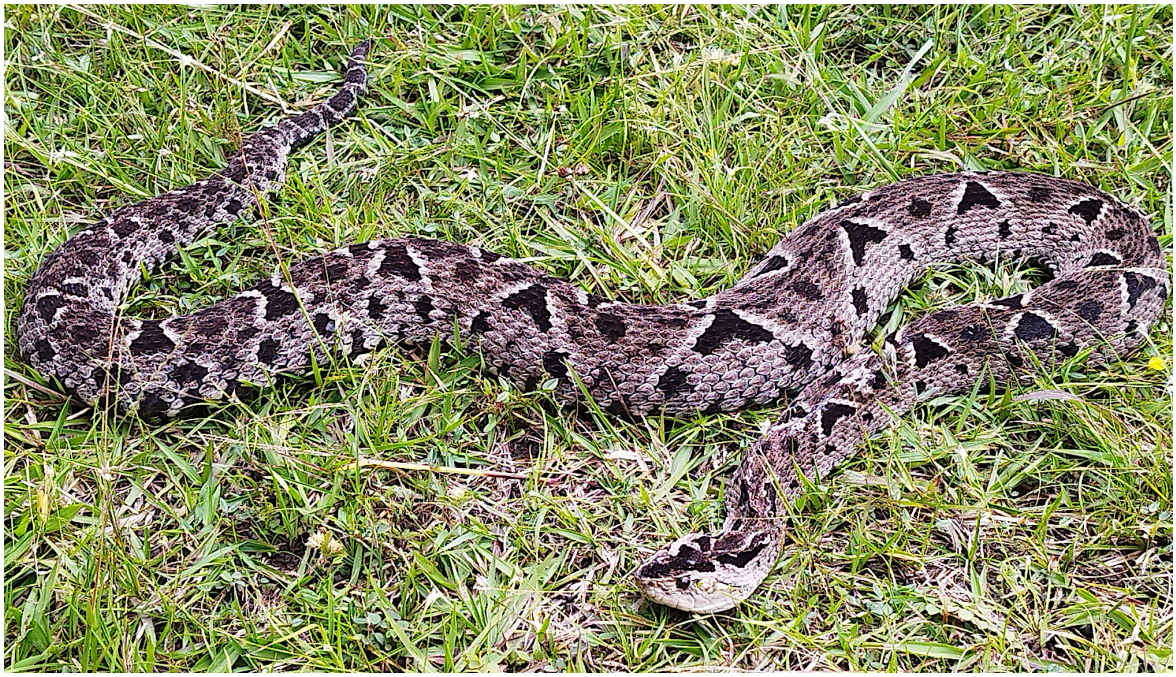


Fonte: adaptado de Liévano-Bonilla (2016).

1.8 *Bothrops ayerbei*

A espécie *B. ayerbei* tem a cabeça em configuração de seta, com uma marca supra cefálica conspícua. O seu comprimento é intermédio, com 14-19 figuras em forma de X no corpo. Tem distribuição na bacia alta do rio Patía, nos departamentos de Cauca e Nariño, de 400 a 1800 m de altitude (Diaz-Florez *et al.*, 2022; Folleco, 2010). No que concerne à composição proteômica do veneno, este expressa várias famílias de toxinas relacionadas com os efeitos sistêmicos e locais reportados para os envenenamentos por serpentes da família *Viperidae* (figura 4), como: metaloproteinases (SVPM); serinoproteinases (SP); lectina do tipo C/proteínas semelhantes à lectina (CTL); fosfolipases A2 (PLA2); proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP); desintegrinas (DIS); peptídeos semelhantes à bradicinina-potenciadores (BPP); outros peptídeos (PEP); L-aminoácido oxidases (LAO); fatores de crescimento dos nervos (NGF); fosfodiesterases (PDE); desconhecido/não identificado (UNK) (Mora-Obando *et al.*, 2014).

Figura 4 - Imagem da serpente *B. ayerbei*



Fonte: Fotografia obtida pela autora. CIBUC-Bioterio, 2020.

1.9 *Bothrops rhombeatus*

B. rhombeatus tem uma cabeça intermédia em relação às outras duas populações, sem marcações supracefálicas e com o tamanho menor, com 11-17 figuras em forma de x ao

longo do corpo (Figura 5). Estas são encontradas na bacia do rio Cauca, ao norte, de 400 a 2200 m de altitude (García, 1896).

A serpente *B. rhombeatus* está isolada da *B. asper* pelas cordilheiras central e ocidental (Figura 2), fazendo com que tivessem um possível fluxo genético diferente, levando uma parte da comunidade científica a concluir que há uma divisão dessas serpentes como espécies (Folleco, 2010). Atualmente, tem curso uma controvérsia taxonômica para esta espécie, porquanto alguns autores consideram uma população isolada de *Bothrops asper* na Colômbia (Liévano-Bonilla, 2016) e outros sugerem que se trata de uma espécie diferente (Folleco, 2010; Ramírez-Burbano, 2023). Para a tese sob comentário, e com suporte no reconhecimento da espécie em Snakes of the World: A Catalog of Living and Extinct Species (Wallach; Williams; Boundy, 2014) foi considerado este grupo de serpentes como *B. rhombeatus.*

Figura 5 - Imagem da serpente *B. rhombeatus*

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

1.10 *Bothrops asper*

B. asper tem a cabeça maior dentre *B. ayerbei* e *B. rhombeatus*, sem marcação supra acéfala, capaz de medir até 2,5 m sendo a mais comprida, tem 15 a 18 figuras em formato de X no dorso (Figura 6) e distribui-se no Chocó Biogeográfico em floresta tropical húmida de zero a1800 m (Folleco, 2010). Ademais, tem coloração ventral creme e coloração dorsal castanha,

cinzenta a cinzenta escura. Mostra uma risca pós-orbital escura que se estende de trás do olho até a boca. O padrão do dorso denota uma série (24 a 28) de manchas triangulares escuras com os ápices em direção à linha ventral ao longo de cada lado do corpo (Mora-Obando *et al.*, 2014; Sasa; Wasko; Lamar, 2009). As *B. asper* compreendem um complexo de espécies amplamente distribuídas do México ao Peru, onde são vulgarmente conhecidas como nauyaca, barba amarela, terciopelo, equis/talla equis, equis patiana, cacica, pelo de gato, boquidorá, mapaná, damá, tapa etc. (Mora-Obando *et al.*, 2021; Otero *et al.*, 1992).

Figura 6 - Imagem da serpente *B. asper*

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

1.11 Efeitos hematológicos dos venenos de serpentes

O envenenamento por serpentes é passível de induzir distúrbios hematológicos significativos, incluindo sangramentos, incoagulabilidade sanguínea, trombocitopenia e disfunções plaquetárias, além de provocar efeitos pró coagulantes em humanos e em modelos animais (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Benvenuti *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2008; Senise; Yamashita; Santoro, 2015; Yamashita *et al.*, 2014).

A trombocitopenia e as alterações na função plaquetária estão entre os principais fatores que contribuem para as manifestações hemorrágicas observadas em vítimas de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. Esses distúrbios hemostáticos figuram entre as principais causas de complicações clínicas, estando diretamente relacionados à ação de duas famílias de proteínas

amplamente ocorrentes nos venenos de viperídeos: as metaloproteinases de veneno de serpente (*snake venom metalloproteinases* – SVMPs) e as serinoproteinases de veneno de serpente (*snake venom serine proteases* – SVSPs) (Yamashita *et al.*, 2014). As metaloproteinases de veneno de serpente (*snake venom metalloproteinases* – SVMPs) estão entre as toxinas mais abundantes em diversos venenos de serpentes da família *Viperidae*. Essas enzimas são consideradas os principais agentes responsáveis pelos efeitos hemorrágicos observados após o envenenamento, uma vez que interferem no sistema hemostático, promovendo a ruptura ou aumento da permeabilidade vascular, o que facilita a perda de sangue a partir da vasculatura da presa (Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012).

As SVMPs constituem um grupo de endopeptidases dependentes de íons zinco, com atividades hemorrágicas, proteolíticas e pró coagulantes bem descritas. Sua ação enzimática é inibível por agentes quelantes de metais, como o Na_2-EDTA, o que confirma a dependência do metal no sítio catalítico para o exercício de sua função biológica (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012; Yamashita *et al.*, 2014).

Os venenos de serpentes viperídeas contêm abundância de serina e metaloproteases. Algumas das serinas proteinases assemelham-se à trombina na sua capacidade de desencadear a coagulação do fibrinogênio mediante a liberação de fibrinopeptídeo; outras carecem de atividade de coagulação com fibrinogênio, mas são suscetíveis de agregar diretamente plaquetas em plasma rico em plaquetas e suspensões de plaquetas lavadas (Serrano *et al*., 1995). As famílias das serinas proteases estão relacionados com efeitos na agregação plaquetária, como o ativador F VI11, BJV-VIIIcp, isolado do veneno de *Bothrops jararacussu*, (Hill-Eubanks; Parker; Lollar, 1989). Também, outra serina proteinase básica, MSP 1, foi isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (Serrano; Sampaio; Mandelbaum, 1993). Todos estes indutores de agregação plaquetária de veneno de serpente foram considerados serina proteinases clássicas sensíveis ao fluorofosfato de diisopropilo (DFP) com atividade amigdolítica em substratos sintéticos de trombina (Serrano *et al.*, 1995). Outra família de proteínas, as proteínas do tipo lectina C (CTLP), que também estão em grandes quantidades em veneno de viperídeos (Nicolau *et al.*, 2017), também atua na modulação da função plaquetária e de proteínas de coagulação sanguínea (Arlinghaus; Eble, 2012). Todas estas toxinas estão relacionadas com efeitos sistêmicos que são dos primeiros a ser neutralizados pelos antivenenos de serpentes para evitar complicações nos pacientes com envenenamento por picada.

1.12 Antivenenos e suas limitações terapêuticas

Os antivenenos, também denominados antiveninas ou soros antiofídicos (ASV – antivenom serum vaccine), são definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023) como frações purificadas de imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas obtidos do plasma de animais previamente imunizados contra um ou mais venenos de serpentes.

Os antivenenos são produzidos por meio da imunização de animais de grande porte, como cavalos, burros, ovelhas ou camelos, usando o veneno bruto ou toxina da cobra. O plasma desses animais é preparado com os glóbulos vermelhos sendo devolvidos aos animais de origem. O plasma é então fracionado para obter as imunoglobulinas, tratadas com enzimas proteolíticas para fornecer anticorpos Fab ou F(ab')2 (Ratanabanangkoon, 2023). Esta terapia centenária, entretanto, tem sérias limitações, incluindo eficácia limitada e alguns efeitos colaterais. Embora terapias alternativas e adjuvantes estejam sendo desenvolvidas, sua comercialização levará tempo. Portanto, melhorar a terapia antiveneno atualmente em uso é de grande relevância para a redução imediata da carga global dos envenenamentos por picada de cobra. O potencial de neutralização e a imunogenicidade dos antivenenos dependem principalmente do *pool* de veneno usado para imunização animal e do hospedeiro de produção, juntamente com o procedimento de purificação de antiveneno e controle de qualidade (Rathore; Kumar; Tiwari, 2023). Em sendo assim, os antivenenos funcionam ligando-se a venenos e neutralizando-os. A ideia por trás do antiveneno é comparável à das vacinas, que Edward Jenner criou. A diferença é que o antiveneno induz imunidade em um animal hospedeiro, que é então transfundido para o ser humano (Antivenom, 2024).

A soroterapia constitui atualmente o método mais amplamente utilizado no tratamento de envenenamentos ofídicos. Essa abordagem, contudo, denota diversas limitações, como reações adversas, baixa eficácia cruzada contra distintas espécies e dificuldades logísticas de produção e distribuição, especialmente em países tropicais (Alirahimi *et al.*, 2018). Em razão das restrições da terapia antivenênica convencional e da crise global de disponibilidade de antivenenos, torna-se urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de envenenamentos por mordida de serpentes (Machado Marinho *et al.*, 2024).

Uma das limitações conhecidas do uso dos antivenenos é a variação na composição dos venenos de serpentes, que tem o desafio de ter maior eficácia terapêutica. Os recentes avanços na venômica e antivenômica, no entanto, dão ensejo a maior e mais rápida aquisição de conhecimento e caracterização destas toxinas e dos seus mecanismos de ação, aumentando o entendimento de como estas variações nos venenos interfere nos processos fisiopatológicos e

no tratamento do envenenamento por mordida de serpentes (Alirahimi *et al.*, 2018; Casewell *et al.*, 2020). Portanto, é importante testar e conhecer novas estratégias de imunização que aumentem a resposta humoral dos animais imunizados para obter desse jeito maior reconhecimento das toxinas dos venenos nas preparações dos antivenenos.

1.13 As imunoglobulinas e os antivenenos

As imunoglobulinas são proteínas formadoras do sistema imunitário, produzidas pelas células B no plasma, capazes de reconhecer antígenos específicos. São geradas mediante a imunização de um animal (mais frequentemente um cavalo) contra um veneno de cobra. A imunoglobulina G (IgG) é a fração da imunoglobulina mais abundante, uma das cinco classes de anticorpos produzidos pelas células B, sintetizada em resposta a invasões por toxinas, bactérias, fungos e vírus. A IgG é uma proteína complexa composta por quatro cadeias peptídicas - duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas dispostas num formato típico em Y dos monômeros de anticorpos. A IgG tem uma massa molecular de aproximadamente 150 kDa, e representa perto de 75% dos anticorpos séricos em humanos (WHO, 2023).

Os antivenenos de serpentes são formulações de imunoglobulinas passíveis de se ligar às toxinas do veneno de serpentes e neutralizar a sua capacidade de induzir danos nos tecidos e outras alterações fisiopatológicas (WHO, 2017). Portanto, a imunização com veneno de cobra é concebida para estimular o sistema imunitário de animais selecionados como fonte de imunoglobulina (por exemplo, cavalos, coelhos ou ovelhas) a produzir quantidades elevadas de anticorpos neutralizantes (Huertas *et al.*, 2023). As fases típicas da elaboração de antivenenos são: 1) produção e validação do veneno de cobra, 2) imunização da fonte animal de imunoglobulinas, 3) recolha de plasma hiperimune, 4) purificação de imunoglobulinas, 5) formulação a granel e esterilização, 6) enchimento e liofilização, 7) rotulagem e embalagem, e 8) libertação do produto para uso humano e farmacovigilância (León *et al.*, 2018).

A imunização de animais para produção de antivenenos é realizada pela injeção repetida de doses diversas de venenos de uma ou mais espécies peçonhentas, seguindo um programa de imunização predefinido. A quantidade de veneno injetado deve ser baixa para evitar danos nos tecidos ou outras manifestações de envenenamento, mas alta o suficiente para desencadear a ativação do sistema imunológico para produzir grandes quantidades de anticorpos antivenenos (León *et al.*, 2018).

1.14 inmunoadjuvantes

Os adjuvantes são tão críticos quanto os antígenos para o desenvolvimento de vacinas e aumentam a eficácia das vacinas, crescendo a resposta imunológica (Reed; Orr; Fox, 2013). Em 1930, adjuvantes de relevo à base de alumínio foram otimizados para uso em vacinas contra tétano, coqueluche e, mais recentemente, covid-19 (Reed; Orr; Fox, 2013). No início foram usados como imuno adjuvantes de vacinas e soros, os adjuvantes contendo alumínio (hidróxido de alumínio AH ou fosfato de alumínio) aprovados pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para uso humano e amplamente aplicados na produção imunobiológica (Li; Aldayel; Cui, 2014). Foram descritas, entretanto, algumas evidências sobre a toxicidade dos sais de alumínio, incluindo-se efeitos como hipersensibilidade tardia (Bergfors; Trollfors; Inerot, 2003; Zaharoff *et al.*, 2007), inflamação granulomatosa grave e nódulos subcutâneos pruriginosos (Aguilar; Rodríguez, 2007). Embora eficazes em aumentar a imunogenicidade, alguns desses sistemas denotam reatogenicidade local significativa e variabilidade de desempenho, o que limita sua aplicabilidade rotineira em programas de produção de antivenenos (Aguilar; Rodríguez, 2007; Arguedas *et al.*, 2022; Zaharoff *et al.*, 2007). Estudos recentes em equinos imunizados com venenos demonstram que emulsões modernas bem compatibilizadas com o antígeno elevam a resposta humoral e são suscetíveis de manter perfis bioquímicos aceitáveis, reforçando a necessidade de selecionar formulações seguras e reprodutíveis (Arguedas *et al.*, 2022).

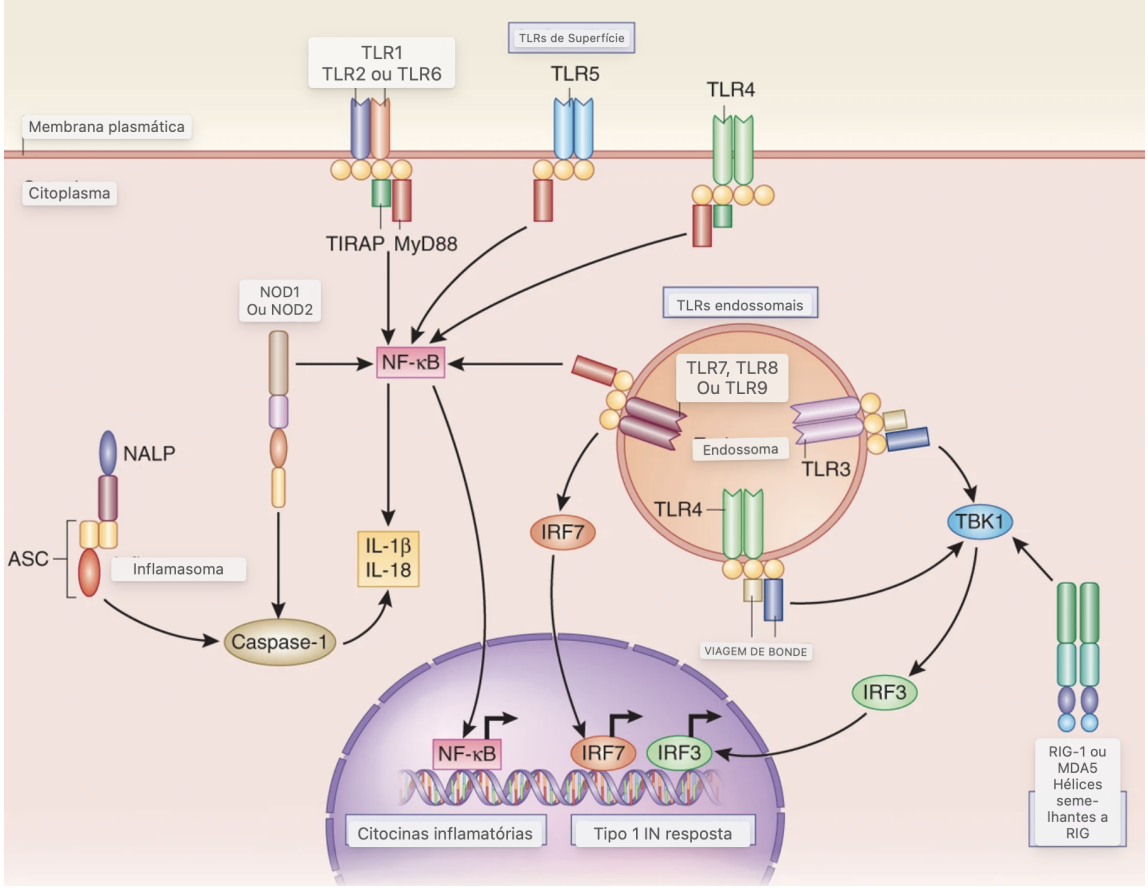
Também existem reportes do uso de adjuvante incompleto de Freund, composto à base de óleo mineral e um emulsionante, utilizado na imunização de animais para melhorar a resposta imunitária aos venenos (WHO, 2023). Durante a imunização de animais, alguns adjuvantes (por exemplo, montanida ou adjuvantes de Freund) causam danos locais nos tecidos, como granulomas e abscessos, e reações gerais, como artrite e febre (Arguedas *et al.*, 2022). Geralmente, estes abcessos fistulizam, expondo o tecido danificado a infecções secundárias que dificultam a cicatrização. Por esta razão, alguns fabricantes evitam a utilização de adjuvantes quando são administradas doses de reforço de venenos após o primeiro ciclo de imunização (Huertas *et al.*, 2023).

Na atualidade, o desenvolvimento de adjuvantes imunes está emergindo como uma área significativa da administração de vacinas e antivenenos com base na necessidade contínua de amplificar as respostas imunes a uma ampla variedade de novos antígenos pouco imunogênicos (Oyewumi; Kumar; Cui, 2010). Consequentemente, houve avanço na inovação

com outros sistemas adjuvantes, incluindo agonistas receptor Toll-like (TLR) (Mifsud; Tan; Jackson, 2014), saponinas, lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas, que modulam vias inatas e adaptativas, controlam liberação antigênica e potencialmente reduzem a dose de antígeno necessária para ativar o sistema imunitário (Khan *et al.*, 2023b). Revisões recentes evidenciam que substâncias nanoparticuladas atuam como carreadoras e/ou como adjuvantes propriamente ditos, prolongando a apresentação de antígeno e melhorando a qualidade da resposta (Wang *et al.*, 2024). Desta forma, vários estudos concentram-se no desenvolvimento de adjuvantes para vacinas humanas com a ideia de gerar vacinas mais fortes, habilitadas a induzir imunidade protetora e duradoura em humanos com efeitos colaterais e toxicidade reduzidos em comparação com formulações convencionais (Aguilar; Rodríguez, 2007).

Pela necessidade de conhecer o mecanismo de ação dos adjuvantes, consoante estudos recentes, é que vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que ativam uma resposta imune inata são direcionados por adjuvantes, através de diferentes vias de sinalização, embaixo são mostrados (Figura 7). Por exemplo, os TLRs, localizados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11) ou no endossomo (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) são alvos para adjuvantes e, quando ativados, estimulam a sinalização que leva à ativação de fatores-chave de transcrição, como o fator nuclear-κB (NF-κB). Esses fatores de transcrição estimulam programas de expressão gênica que levam à produção de quimiocinas e citocinas as quais ajudam a orientar respostas imunes específicas. Os adjuvantes também atingem PRRs citosólicos, como NLRs e helicases semelhantes a RIG. O NLR NALP3 faz parte de um conjunto macromolecular, o inflamassomo, que leva à ativação da caspase 1 e à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. ASC, proteína semelhante a manchas associada à apoptose contendo CARD; IRF3, fator regulador de interferon; MDA5, proteína 5 associada à diferenciação de melanoma; MyD88, fator de diferenciação mieloide 88; TBK1, quinase de ligação ao TANK 1; TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio do receptor Toll-interleucina 1; TRAM, molécula adaptadora relacionada a Trif; TRIF, interferon-β indutor de adaptador contendo domínio TIR (Reed; Orr; Fox, 2013).

Figura 7 - Receptores-alvo em células portadoras de antígenos (APCs) para adjuvantes



Fonte: Adaptado de Reed, Orr e Fox (2013). agonistas receptor Toll-like (TLR), fator nuclear-κB (NF-κB), receptores de reconhecimento de padrões (PRRs).

1.15 Nanopartículas

As nanopartículas (NPs) são partículas muito pequenas de menos de 100 nm de dimensão em pelo menos uma das suas dimensões. As NPs caracterizam-se por uma elevada relação área superficial/volume, o que, juntamente com o seu pequeno tamanho, significa que têm propriedades diferentes e por vezes singulares em comparação com o respectivo material ao nível microscópico (Selmani; Kovačević; Bohinc, 2022). Em decorrência das inúmeras características excepcionais das NPs, como o seu tamanho nanométrico, química de superfície, estabilidade coloidal, alta eficiência de aprisionamento, proteção de compostos lábeis contra degradação prematura, biodegradabilidade, biocompatibilidade, maior penetrabilidade em razão do tamanho ultrafino, versatilidade de funcionalização e direcionamento de nanomateriais funcionalizados para órgãos/tecidos/células específicos, as NPs são extensivamente

investigadas para seu uso na concepção de novos medicamentos (agentes de nanodiagnóstico e nanomedicamentos) e no desenvolvimento de medicamentos personalizados (Chik *et al.*, 2019).

Outras características das NPs são sistematicamente estudadas, como a estabilidade coloidal, elevada eficiência de aprisionamento, e a possibilidade de direcionar nanomateriais para tecidos específicos (Hussain *et al.*, 2020), dando oportunidade à interação com sistemas biológicos, para atuar em alvos específicos. Por exemplo, pesquisa avaliou o desenvolvimento de um novo transportador para entrega do veneno atenuado de *Androctonus australis hector* (Aah) e sua fração tóxica encapsulados em distintas formulações nas nanopartículas de cálcio-alginato (Ca-Alg Nps) para emprego como vacina contra envenenamento por escorpião (Nait Mohamed; Laraba-Djebari, 2016). Portanto, a entrega de proteínas por meio de nanopartículas é uma maneira eficaz de controlar a liberação de medicamentos, bem como projetar um sistema eficiente dessa entrega (Gupta; Mohanty, 2017). No passo dos anos, tem sido estudados vários polímeros que mostram propriedades interessantes, como a quitosana. Foram investigados como sistemas de administração e adjuvantes para preparações de vacinas (Gupta; Mohanty, 2017; Xu; Du, 2003).

1.16 Nanopartículas de quitosana como adjuvantes

A quitosana (CN) é um polissacarídeo natural obtido por desacetilação parcial da quitina por N-desacetilação. É usado como nanotransportador por causa de suas propriedades particulares de biodegradabilidade, biocompatibilidade, hidrofobicidade, propriedades não tóxicas e imunomoduladoras e seu baixo custo (Ramesh Kumar *et al.*, 2016; Rampino *et al.*, 2013; Rocha Soares *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2018). A quitina é um polímero amplamente distribuído na natureza, extraído principalmente da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes. Constitui um polissacarídeo linear, feito de unidades β-(1,4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (N-acetil-D-glucosamina). Em razão da insolubilidade da quitina em solução aquosa e em solventes orgânicos, torna-se limitada a sua aplicação prática, e as atenções se desviam para a quitosana, facilmente dissolvível em meio ácido fraco em consequência da protonação dos seus grupos amino, o que facilita a sua aplicabilidade (Costa *et al.*, 2017; Muxika *et al.*, 2017). Nos últimos anos, e considerando que a quitosana tem robusto potencial antimicrobiano, o foco da comunidade científica mudou para a possível atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana (Costa *et al.*, 2017). Também há reportes da sua capacidade de adjuvante imune na geração de anticorpos na produção de antivenenos ofídicos e escorpiônicos (Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017).

No mundo todo estão sendo testadas metodologias para melhorar a produção de plasmas hiperimunes, fazendo-se soros seguros e eficazes, usando adjuvantes imunológicos, substâncias que aumentam, estimulam, ativam, potencializam ou modulam a resposta imune nos planos celular e humoral (Khan *et al.*, 2023a; Mifsud; Tan; Jackson, 2014). A WHO reconhece que são necessárias medidas urgentes para apoiar o projeto de imunizar misturas de veneno de serpente utilizáveis para produzir antivenenos apropriados para várias áreas geográficas da Terra. A disponibilidade sustentável de imunoglobulinas do antiveneno eficazes e seguras deve ser assegurada e os sistemas de produção para esses tratamentos eficazes devem ser fortalecidos no contexto mundial, assim como se impõe reduzir a quantidade de veneno usado nos cavalos, quando se imunizam, mas garantindo alta imunização.

1.17 Síntese de nanopartículas de quitosana por gelificação iônica

O método de gelificação iônica consiste na formação de micropartículas ou nanopartículas (NPs) com suporte em interações eletrostáticas entre espécies de cargas opostas, envolvendo pelo menos um polímero aniônico ou catiônico, sob condições controladas de agitação mecânica (Hoang *et al.*, 2022). No caso específico da formação de NPs de quitosana por gelificação iônica, as interações moleculares envolvidas na reticulação iônica entre a quitosana e o tripolifosfato (TPP) foram investigadas e elucidadas com base na Teoria Funcional da Densidade Eletrônica (DFT – Density Functional Theory). Os efeitos do solvente foram considerados por meio de modelos implícitos, com vistas a identificar variadas configurações de reticulação iônica primária, definidas como ligação H (hidrogênio), ligação T (topológica) e ligação M (mista), com as respectivas energias de interação quantificadas. Entre essas, as ligações do tipo H, caracterizadas por altas energias de interação e ampla acessibilidade espacial, foram descritas como as configurações de reticulação mais prováveis (Koukaras *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídeos biologicamente ativos que exercem ampla variedade de ações tóxicas. A composição química dos venenos exprime elevada variabilidade intra e interespecífica, o que explica a diversidade de manifestações clínicas observadas nos envenenamentos, incluindo dano tecidual local, distúrbios hemostáticos e efeitos sistêmicos potencialmente letais (Casewell *et al.*, 2020; Gutiérrez, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2017; Mora-Obando *et al.*, 2023). Esses venenos são constituídos, predominantemente, por proteínas enzimáticas responsáveis pelos principais sinais e complicações observados em pacientes acometidos por picadas de serpentes (Benvenuti *et al.*, 2003; Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012). Das famílias ofídicas de maior relevância médica, destaca-se *Viperidae*, responsável por aproximadamente 90% dos acidentes registrados, tanto na Colômbia como no Brasil (Mora-Obando *et al.*, 2021).

Atualmente, as imunoglobulinas derivadas dos antivenenos representam o único tratamento terapêutico eficaz disponível para os casos de envenenamento (Ayerbe; Latorre, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2021; Huertas *et al.*, 2023; Otero-Patiño, 2009). A escassez e a limitada eficácia de alguns antivenenos, contudo, agravam o quadro clínico das vítimas, conduzindo a sequelas graves e até morte. Nestas circunstâncias, a padronização de misturas adequadas de venenos para a produção de plasma hiperimune torna-se essencial para melhorar a qualidade dos antivenenos e mitigar um importante problema de saúde pública, responsável por afetar mais de 4,5 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo (Gutiérrez *et al.*, 2017; WHO, 2017, 2023).

Consequentemente, diversos estudos concentram-se no desenvolvimento de adjuvantes vacinais, habilitados a induzir uma resposta imune protetora e duradoura em humanos, com menores efeitos colaterais e toxicidade (Aguilar; Rodríguez, 2007). A entrega de proteínas por meio de nanopartículas mostra-se uma estratégia eficaz para controlar a liberação de fármacos e aperfeiçoar sistemas de transporte e liberação de antígenos (GUPTA; Mohanty, 2017). Com efeito, diversos polímeros são atualmente estudados como potenciais sistemas carreados e adjuvantes, entre eles a quitosana, a qual tem ressalto por suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e imunomoduladoras (Gupta; Mohanty, 2017; Rocha Soares *et al.*, 2017; Xu; Du, 2003).

A utilização de quitosana como sistema de liberação e adjuvante em formulações vacinais oferece resultados promissores na produção de antivenenos para variadas espécies de escorpiões e serpentes (Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017). Portanto, é estratégico investir em

investigações direcionadas à otimização da qualidade e do rendimento do soro hiperimune, explorando o uso de nanopartículas como imunoadjuvantes, especialmente na produção de antivenenos de espécies endêmicas da América Latina, como *Lachesis acrochorda* (SVLA), *Bothrops ayerbei* (SVBay), *Bothrops rhombeatus* (SVBr) e *Bothrops asper* (SVBas).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir antiveneno piloto contra os venenos de serpentes *Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus*, *Bothrops asper* e *Lachesis acrochorda,* usando nanopartículas de quitosana como imunoadjuvante.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Carregar nanopartículas de quitosana com venenos das serpentes *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus*, *Bothrops asper.*
- ✓ Identificar a eficiência da carga de proteína dos venenos de *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper* e nas nanopartículas.
- ✓ Caracterizar a físico-química das nanopartículas de quitosana carregadas com os venenos de *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper.*
- ✓ Produzir antiveneno, recorrendo a coelhos imunizados com nanopartículas carregadas com venenos das serpentes *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper.*
- ✓ Estabelecer o poder neutralizante *in vitro* do antiveneno produzido contra os venenos de *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper in vitro*;
- ✓ Estabelecer o poder neutralizante *in vivo* do antiveneno produzido contra os venenos de *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do veneno

Os venenos de viperídeos foram fornecidos pelo Centro de Investigaciones Biomédicas da Universidade do Cauca (CIBUC-Bioterio), na Colômbia, e pelo Grupo de Investigaciones Herpetológicas e Toxinológicas (GIHT). Os viperídeos das espécies *L. acrochorda, B. yerbei, B. rhombeatus e B. asper* foram coletados no Pacífico Colombiano e a extração do veneno foi realizada manualmente. Para cada *pool* de veneno utilizado nesta pesquisa, houve pelo menos quatro animais adultos, sem distinção de sexo. Resumidamente, cada um dos animais foi induzido a morder um funil de vidro, previamente coberto com papel parafilme. Um tubo de falco foi usado para coletar o veneno no fundo. Uma vez extraído o veneno, ele foi aliquotado em tubos *eppendorf* estéreis de 1,5 mL, congelado com nitrogênio líquido e liofilizado. Os venenos foram armazenados a -20 °C até o uso.

4.2 Substâncias

A quitosana (85% desacetilado; peso molecular, 90–190 kDa), Hidróxido de alumínio (AH) e o tripolifosfato de sodio (TPP) TP foi comprada de Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, EE. UU.).

4.3 Formação das nanopartículas de quitosana

A incorporação de venenos de *L. acrochorda, B. yerbei, B. rhombeatus* e *B. asper* em partículas de quitosana foi realizada recorrendo-se à técnica de gelificação iônica. Foi utilizada uma solução de TPP (1 mg/mL) em água adicionada gota a gota à quitosana (0,1% p/v em ácido acético 0,175% p/v) sob agitação magnética constante. Após a formação de uma suspensão opalescente, a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 30 minutos. Para carregar proteínas em nanopartículas de quitosana, distintas quantidades de proteínas de veneno (SVLa, AVBay, SVBr ou SVBas) para preparar três concentrações (0,05; 0,1 e 0,15% mg/mL) foram solubilizadas na quitosana (Pan *et al*., 2002). Essas soluções contendo TPP com amostras de proteína de veneno foram tituladas na solução de copolímero, usando o mesmo procedimento descrito acima. Nanopartículas livres de proteína foram usadas como controle para avaliar o efeito da carga proteica nas propriedades físico-químicas das

partículas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em triplicata, e os dados expressos como desvio-padrão médio (DP).

4.4 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

4.4.1 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE%)

Para estabelecer a eficiência de encapsulamento de cada uma das proteínas utilizadas, as nanopartículas de quitosana carregadas com proteínas (SVLa, AVBay, SVBr ou SVBas) foram cuidadosamente transferidas para tubos de centrífuga de 1,5 mL e, em seguida, centrifugadas a 20.000 × g por 30 min a 4 °C. A concentração de proteína de cada sobrenadante foi analisada com um *kit* de ensaio de proteína BCA, de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada utilizando a equação (1) (Gan *et al.*, 2005; Rocha Soares *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2012). Todas as medições foram realizadas em triplicata e os dados são expressos como média ± desvio-padrão (DP).

$$EE\ (\%) = \frac{(Total\ protein - \ protein\ quantified\ in\ supernatant)}{Total\ protein}\ X\ 100$$

(1)

Além disso, como aporte adicional neste experimento, para determinar quais grupos de moléculas foram mais fáceis de encapsular nas nanopartículas, as soluções de TPP com e sem encapsulamento (controle) foram separadas por HPLC (Agilent 1260), com um método de 0-5 min, 0% de solução B; 5-65 min, 0-60% de B; e 65-85 min, 60-100% de B, com uma vazão de 1 mL/min, utilizando uma coluna C4 (4,6 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japão). Com base nessas informações, para corroborar as porcentagens de encapsulamento, a área sob a curva de cada uma das NPs foi utilizada para comparar a solução de TPP com o sobrenadante obtido.

4.4.2 Caracterização eletroforética das nanopartículas

Após a confirmação da eficiência de encapsulamento pelo HPLC, foi realizada a caracterização eletroforética dos venenos encapsulados e livres para identificar os pesos das moléculas que tiveram maior afinidade de encapsulamento. Para isso, foi utilizado um sistema de eletroforese em mini gel (Mini-ProteanII, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) (Laemmli, 1970).

Mistura de proteínas padrão de migração (Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) foi utilizada para determinar as massas moleculares relativas das proteínas dos venenos. Os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie R-250, conforme metodologia descrita por Morrissey (1981).

Para avaliar os pesos moleculares das frações mais abundantes nas amostras encapsuladas com os venenos de *Lachesis acrochorda* (SVLa), *Bothrops ayerbei* (SVBay), *Bothrops rhombeatus* (SVBr) e *Bothrops asper* (SVBas) dentro das nanopartículas de quitosana, foram preparados géis de SDS-PAGE conforme o método de Laemmli (1970), com as devidas adaptações.

4.4.3 Índices de polidispersão e valor do potencial zeta da nanopartícula

As propriedades físico-químicas das NPs foram determinadas como potencial zeta (PZ), que reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica (EDL) das partículas eletroforeticamente móveis e a camada dispersante que as envolve no plano de deslizamento (Bhattacharjee, 2016). O índice de polidispersão (PdI) foi calculado como uma indicação de sua qualidade relativamente à distribuição de tamanho (Danaei *et al*., 2018). As medições do potencial zeta (PZ) foram realizadas utilizando o mesmo equipamento, aplicando-se uma intensidade de campo de aproximadamente 5,9 V cm-1. Cinco execuções foram realizadas para cada amostra para determinar o valor do PZ com o *software* ZS Xplorer versão 3.1.0.64; a mobilidade eletroforética foi utilizada de acordo com a equação de Helmholtz-Smoluchowski. As amostras foram diluídas 1:100 (v/v) com água purificada. Todas as medições se realizaram em triplicata e os dados expressos como média ± desvio-padrão (DP) (Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017).

As medições do tamanho de partículas de variadas nanopartículas foram avaliadas a 25 °C, sob um método de análise cumulativa, no qual a intensidade da luz espalhada (DLS) foi medida em um analisador de tamanho de partículas (Zeta Plus-Brookhaven Instruments, Nova York, NY, EUA) em um comprimento de onda de 659 nm, com um ângulo de detecção de 90°. A correlação foi realizada em modo paralelo, e os dados analisados com o *software* ZS Xplorer V3.1.0.64 (Rocha Soares *et al.*, 2012).

4.4.4 Análise por espectroscopia de infravermelho (IR)

Amostras de quitosana, TPP, veneno e nanopartículas com e sem veneno (SVLa, AVBay, SVBr e SVBas), obtidas por métodos de gelificação iônica, foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, recorrendo-se ao espectrofotômetro FT-IR, Prestige 21 (Shimadzu, Tóquio, Japão). As amostras foram secas em um concentrador a vácuo (Centrivap Labconco, Kansas City, EUA), bem como liofilizadas e analisadas pela ATR e depois processadas em temperatura ambiente, de 500 a 4.000 cm-1 (ROCHA SOARES *et al.*, 2017; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2007). Para os venenos de cada espécie de serpente, foram realizados registros das nanopartículas controle, com veneno total de cada espécie utilizada e registro com quitosana. Todas as amostras realizaram-se por triplicata.

4.4.5 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise, uma gota de cada dispersão de nanopartículas foi depositada sobre uma lâmina de microscópio previamente lavada e seca, sendo mantida em dessecador por 24 h antes da observação. As medições efetivaram-se sob temperatura ambiente, em dessecador sem contato, conforme descrito por Soares *et al*. (2018).

Para as análises em MET, contrastaram-se as amostras, previamente, com acetato de uranila por 1 h, visando a melhor visualização das estruturas internas e contornos das nanopartículas.

4.5 Animais experimentais

Para a imunização, recorreu-se a coelhas brancas, da cepa Nova Zelanda (2-3 kg, 12 semanas de idade), compradas em INVIGO, no México, e mantidas no Biotério do Instituto de Biotecnologia (IBT), da UNAM – Universidade Autônoma do México. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, climatizados com temperatura constante de 22 ± 2 ºC, luminosidade (12h de ciclo claro\escuro), umidade e circulação de ar controlado, recebendo ração-padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Ética na Utilização de Animais (CEUA) do IBT sob o projeto “Animal handling was according with the Animal Care guidelines from the Bioethics Committee at the Instituto de Biotecnología, which administered and authorized the animal work (Ethical approval IBt/Project # 411)".

Para provas de neutralização dos anticorpos, do protótipo de antiveneno, foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas (25–35 g, 6–8 semanas de idade) da "Universidad del Cauca" - Colômbia. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, climatizadas com temperatura constante de 22 ± 2 ºC, luz (ciclo claro/escuro de 12 h), umidade e com circulação de ar controlada. Eles receberam comida e água-padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelas diretrizes do Comitê de Bioética da "Universidad del Cauca (Comitê de Ética para Pesquisa Científica)" e sob a ata de aprovação 6.1-3.24/36 do projeto ID-6124 aprovado em 03/12/2024.

4.6 Imunização

A imunização é um procedimento por via do qual um animal é injetado com veneno para produzir uma resposta de anticorpos de alto título contra os componentes letais e outros componentes deletérios do imunogênico (WHO, 2023). Neste estudo, a imunização foi realizada no biotério do Instituto de Biotecnologia da UNAM, em 13 ocasiões, uma vez a cada semana, mediante administração subcutânea dos compostos teste na região lombar (bilateralmente). Para cada animal injetou-se 1 mL dos venenos de *L. acrochorda, B. ayerbei, B. rhombeatus* e *B. asper* concentração em diferentes (S1) concentrações emulsionadas com as partículas de quitosana (Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017). Para os coelhos controle, foi utilizado adjuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma) alternado com hidróxido de alumínio (Imject Alum; Thermo Fisher) até a 13ª imunização (dia 91). As amostras de sangue foram coletadas da veia marginal da orelha para monitorar o aumento dos títulos de anticorpos (IgG) gerados pela inoculação do veneno. No final do período de imunização, os coelhos foram eutanasiados por overdose dos seguintes anestésicos: ketamina 0,7 mL (100 mg/mL) e xilazina 1,5 mL (20 mg/mL), administrados individualmente por via intramuscular. A amostra final de sangue foi coletada por punção cardíaca e os anticorpos foram purificados (Rocha Soares *et al.*, 2012).

4.7 Obtenção do antiveneno

As amostras de sangue foram inicialmente tratadas para retração do coágulo. Para isso, foram mantidas a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, incubadas a 4 °C por duas horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 15.000 × g por cinco minutos a 4 °C, e o soro (sobrenadante) foi cuidadosamente coletado e armazenado a –20 °C (Rocha Soares *et al.*, 2012). O isolamento das imunoglobulinas (IgGs) foi realizado pelo método do ácido caprílico,

conforme descrito por parte de Rojas, Jiménez e Gutiérrez (1994), seguido de liofilização e armazenamento a –20 °C até o momento do uso (De La Rosa *et al.*, 2019).

4.8 Purificação de IgGs por precipitação com ácido caprílico

O plasma obtido dos coelhos foi diluído em proporção 1:1 com água estéril, e o pH ajustado para 5,0 utilizando ácido acético 3 M. Em seguida, foi adicionado ácido caprílico à solução até atingir uma concentração de 4% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação constante por 30 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 4.000 × g por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado (Whatman® Filter Paper 3MM) e dialisado em membrana de diálise (Spectra/Por® 4, MWCO: 12–14 kDa) contra PBS 0,5 M contendo 150 mM de NaCl, com trocas de tampão a cada seis horas, durante 24 horas. Após a diálise, a solução contendo as imunoglobulinas (IgGs) foi filtrada em membrana de 0,22 µm (Merck Millipore) para esterilização. A quantificação proteica foi realizada por espectrofotometria a 280 nm (UV), e o material final foi liofilizado para armazenamento (De La Rosa *et al.*, 2019).

4.9 Avaliação da resposta de anticorpos séricos por ELISA

Para avaliação das respostas dos anticorpos, as amostras de soro foram submetidas a diluições seriadas com um diluente padrão (solução salina tamponada com fosfato (PBS)/0,1% p/p de soro de albumina bovina (BSA)), iniciando na diluição 1:30 e continuando com dez diluições a mais, nesse mesmo fator. As reações de anticorpos específicos para antígenos também foram determinadas pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando o protocolo descrito por Fernandes Pedrosa *et al*. (2002). Cada placa de microtitulação de poliestireno 96-MicroWell™ de fundo plano (Maxisorp Nunc) foi sensibilizada com 100 µL/poço de uma solução de veneno (5 µg/mL), seguida da incubação durante a noite a 4 ºC. Depois, os poços foram lavados três vezes com solução de PBS, bloqueadas as ligações específicas com 150 µL de solução de bloqueio (PBS / 5% p/p de BSA) e incubada a 37 °C por 2 h. Depois a solução de bloqueio foi descartada e os poços lavados três vezes. Para continuar, adicionaram-se na primeira linha da placa 150 µL de antiveneno numa dissolução 1:10 em *buffer* de reação para ELISA e 100 µL/poço da solução de reação desde a coluna 2 até a 12, bem como diluições seriadas de 1:3 dos anticorpos até a coluna 10, deixando a 11 e 12 como controles. Foi feita incubação por uma hora, em temperatura ambiente. Ademais, foi feita a lavagem com 200 µL/poço dissolução

de lavado de ELISA por três vezes. Adicionaram-se 100 µL/poço do segundo anticorpo de coelho ou cavalo conjugado a enzima de peroxidase (Gt X Rb IgG ALK Phos), diluindo-se 1:2000 em *buffer* de reação para ELISA, incubando-se mais 1 h e fazendo as três lavagens. Também foi revelada a reação com 100 µL/poço de substrato ABTS, incubando-se por dez minutos no ambiente. A reação foi parada com 25 µL/ poço de 20% de SDS, sendo procedida à leitura das placas no leitor de ELISA a 405 nm.

Para avaliar as respostas dos anticorpos purificados, foi realizado o mesmo protocolo de ELISAS, mas com anticorpos purificados obtidos dos coelhos, tanto dos controles como dos imunoadjuvantes comerciais (Freund e hidróxido de alumínio), como com quitosana. Também foram testados com os antivenenos comerciais, tanto da Colômbia (Antiveneno INS) como do México (SILANES).

4.10 Western Blot

Foram realizados geles SDS-PAGE, com poro de 12,5% com 10 µg de amostra de venenos de *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SNBr), *B. asper* da Colômbia (BasCol), *B. asper* do México (BasMex) y *Crotalus basiliscos* (SVCrot). Para os experimentos, utilizou-se câmara semiúmida para realizar a transferência em papel de nitrocelulose. Depois a transferência foi bloqueada com leite por duas horas e, além disso, foram feitas duas lavagens para eliminar os excessos de solução de bloqueio e continuar com a incubação por 1 h com o primeiro anticorpo (Antiveneno do Instituto Nacional de Saúde, Antiveneno de SILANES ou protótipo de antiveneno de coelho). Depois da incubação com anticorpo 1, procedeu-se a três lavagens com solução de TBST e foi adicionado o segundo anticorpo (para cavalo ou coelho, dependente do primeiro anticorpo utilizado) para incubar por mais 1h e fazer as lavagens finais. Eis que foi, então, mostrada a solução de revelação.

4.11 Ensaios de neutralização do antiveneno *in vivo*

Para confirmar neutralizações dos anticorpos, foram utilizados camundongos BALB/c (n=5) sem distensão de sexo (25–35 g, 6–8 semanas de idade), provenientes do Cibuc-Bioterio da Universidade do Cauca. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, climatizados com temperatura constante de entre 22 ± 2 ºC, luminosidade (12h de ciclo claro\escuro), umidade e circulação de ar controlado, recebendo ração padrão e água *ad libitum.* Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de

Controle de Experimentação com Animal (CONCEA) e submetido à aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade do Cauca. Para as probas de neutralização, as DL50 utilizadas nos experimentos foram as previamente relatadas; ou seja, para *L. acrochorda* 13,6 mg/kg, *B. ayerbei* 2,5 mg/kg, *B. rhombeatus* 2,7 mg/kg, *B. asper* 5,0 mg/kg (Angel-Camilo et al. 2024; Mora-Obando et al., 2021). Para os experimentos de neutralização em camundongos (18 ± 2 g), um grupo controle (n=5) recebeu injeção de 3DL50 de veneno de viperídeo, e quatro grupos (n=5 cada) foram pré-incubados com IgGs purificadas por ácido caprílico (15 ou 20 mg) obtidas da imunização com e sem as NPs. Ou seja, para cada veneno (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas). O grupo controle (n=5) recebeu 3LD50 do respectivo veneno sem anticorpo. Os grupos anti-VNPs (n=5) receberam 3LD50 do veneno de viperídeo, pré-incubado com 15 ou 20 mg de IgG purificada a 37°C por uma hora em um volume final de 200 µL em PBS. Os grupos anti-veneno adjuvante (Al + Freud) (n=5) receberam 3LD50 do veneno de viperídeo, incubado com 15 ou 20 mg de IgG purificada. As amostras foram administradas por injeção intraperitoneal e a sobrevida foi avaliada por 48 h.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos com o desvio-padrão médio. As análises estatísticas efetivaram-se, usando-se os testes t de Student ou análise de variância unidirecional (ANOVA) com os testes de Tukey, usando o GraphPad Prism versão 9.00 (San Diego, CA, EUA). Diferenças nos valores médios com *** $p < 0{,}001$, ** $p < 0{,}01$ ou * $p < 0{,}05$ são consideradas estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Venenos

Os venenos foram obtidos de serpentes adultas das espécies *Lachesis acrochorda, Bothrops ayerbei, Bothrops rhombeatus* e *Bothrops asper*. Para cada espécie, foi preparado um *pool* de veneno, com base, no mínimo, em quatro exemplares adultos da mesma espécie, totalizando quatro *pools* distintos. Os venenos foram extraídos manualmente, congelados a 70 °C com nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a –20 °C até o momento de uso nos experimentos subsequentes. De cada *pool* de veneno incluído neste experimento, foram obtidos, aproximadamente, 300 mg de veneno total.

5.2 Análise físico-química das nanopartículas

As nanopartículas (NPs) obtidas, com e sem venenos, exibiram caráter catiônico (potencial zeta positivo), diâmetro médio inferior a 100 nm e distribuição de tamanho homogêneo. As NPs obtidas mostraram um tamanho médio de 85,1 nm, potencial zeta de aproximadamente +7,4 mV, índice de polidispersão (PDI) ≤ 0,5 e eficiência de encapsulamento de 77,5% (Tabela 1), indicando boa estabilidade coloidal e características adequadas para aplicação biotecnológica.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das nanopartículas de quitosana, com e sem veneno, das espécies *L. acrochorda, B. ayerbei, B. rhombeatus* e *B. asper*

Amostra	Tamanho (nm)	Zeta potential (mV)	PDI	Eficiência de encapsulamento (%)
CNP/	95.2 ± 9.2	6.68 ± 0.48	0.554	-
NP/SVLa	72.4 ± 5.8	8.63 ± 1.24	0.297	65
NP/SVBay	89.3 ± 7.7	6.88 ± 1.35	0.075	85
NP/SVBr	88.7 ± 7.4	7.32 ± 0.89	0.373	82
NP/SVBas	80 ± 8.1	7.60 ± 0.43	0.115	78

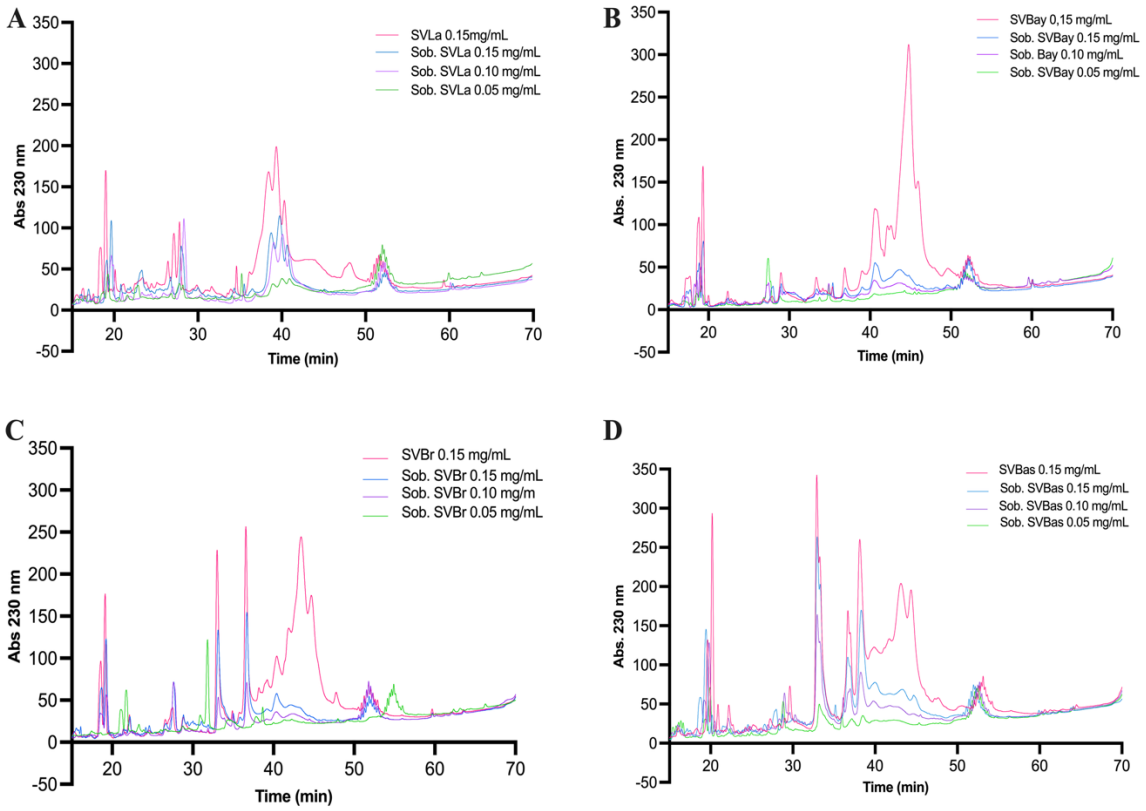
Os valores são a média ± desvio-padrão, n = 3, dos grupos que continham ou não veneno de viperídeo. PDI= índice de polidispersão. Nanopartícula de veneno de serpente *Lachesis acrochorda* (NP/SVLa), Nanopartícula de veneno de serpente *Bothrops ayerbei* (NP/SVBay), Nanopartícula de veneno de serpente *B. rhombeatus* (NP/SVBr), Nanopartícula de veneno de serpente *B. asper* (NP/SVBas).
Fonte: autoria própria.

5.3 Análise cromatográfica de venenos de serpente e nanopartículas

Como parte das análises realizadas, na investigação ora relatada, implementou-se esta análise como uma opção para avaliar o percentual de encapsulamento. Portanto, cada uma das nanopartículas carregadas com veneno foi submetida à avaliação de eficiência de encapsulamento por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizada como método complementar de caracterização. Para fins comparativos, os venenos de serpentes SVLa, SVBay, SVBr e SVBas, também, foram analisados nas mesmas concentrações utilizadas nas formulações das nanopartículas. Os cromatogramas correspondentes ao sobrenadante obtido após a formação das nanopartículas foram registrados (Figura 8). A área sob a curva (AUC) do sobrenadante foi comparada ao perfil cromatográfico do veneno livre, resultando em uma eficiência média de encapsulamento de 75% para os venenos testados, na concentração de 15 mg/mL. As menores porcentagens de encapsulamento foram observadas nas formulações com concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL.

Adicionalmente, verificou-se que algumas frações proteicas que estavam no perfil cromatográfico do veneno total desapareceram após a encapsulação na quitosana, sugerindo interação eficiente dos componentes do veneno com a matriz polimérica. Estes resultados transportaram à realização das eletroforeses para obtenção dos pesos moleculares das toxinas que tiveram maior tendência de encapsulamento.

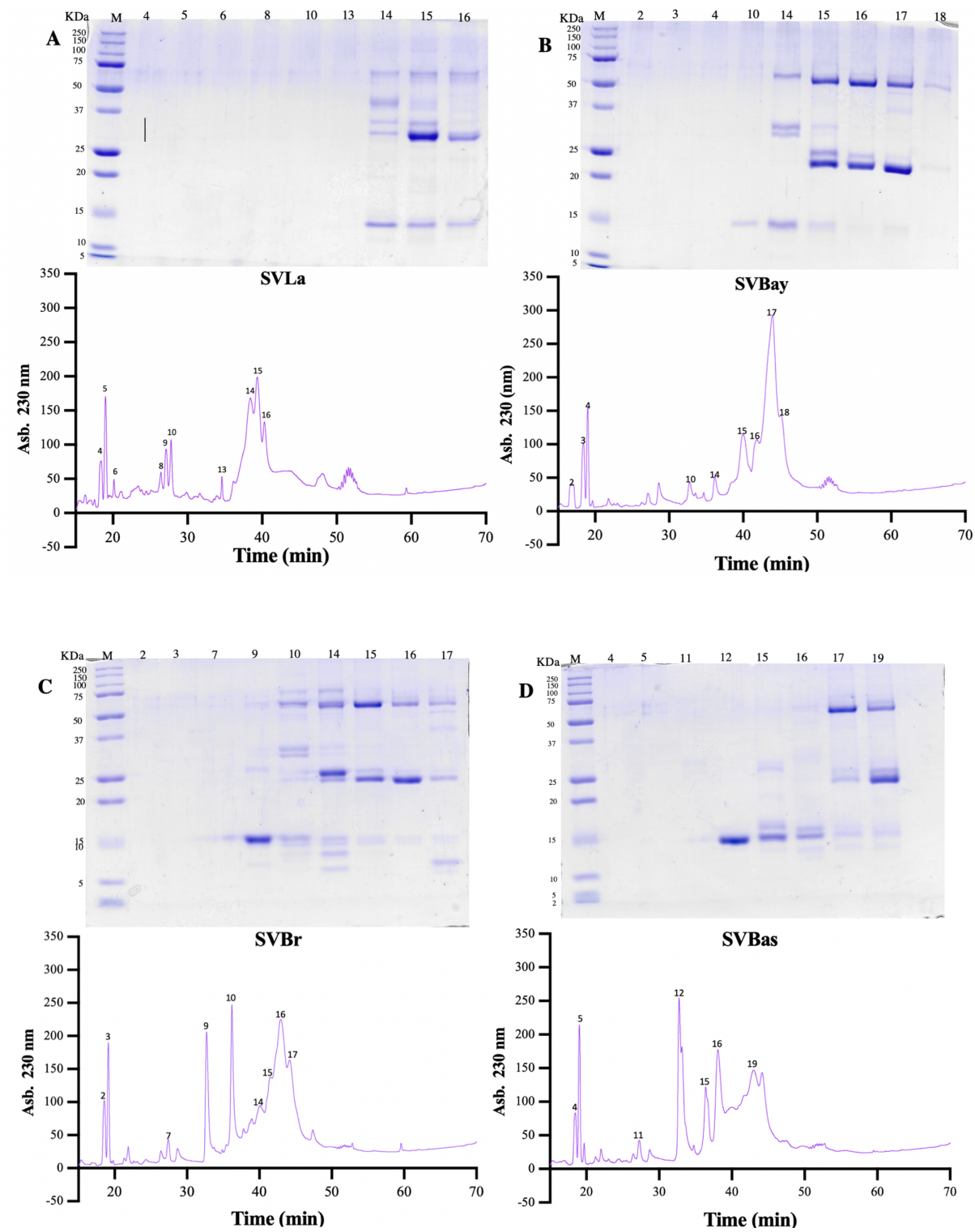
Figura 8 - Perfis cromatográficos dos venenos de viperídeos inteiros e dos sobrenadantes após a formação das partículas. Perfis cromatográficos com A. L. acrochorda (SVLa), B. *B. ayerbei* (SVBay), C. *B. rhombeatus* (SVBr), D. *B. asper* (SVBas). SDS PAGE picos representativos



Fonte: elaboração própria.

Com base nos picos maiores, e os picos que desaparecem depois do encapsulamento, foram escolhidos alguns representativos da figura 8, especialmente aqueles que desapareceram nos perfis cromatográficos dos sobrenadantes das partículas com veneno (Figura 9). Para conhecer as possíveis famílias das toxinas dos venenos encapsulados, os pesos moleculares das toxinas dos picos representativos, foram realizados SDS PAGE como 3mg de proteínas por poço, utilizando tamanho de poro de 12,5% e posterior coloração com azul de Coomassie (Figura 9 A-C), mostrando uns pesos moleculares grandes e de tamanho médio, passíveis de estar relacionados com famílias de proteínas de importância médica nos envenenamentos por estas serpentes.

Figura 9 - Perfis cromatográficos dos venenos completos com o respectivo SDS PAGE de 12,5% das frações representativas. A. *L. acrochorda* (SVLa), B. *B. ayerbei* (SVBay), C. *B. rhombeatus* (SVBr), D. *B. asper* (SVBas)



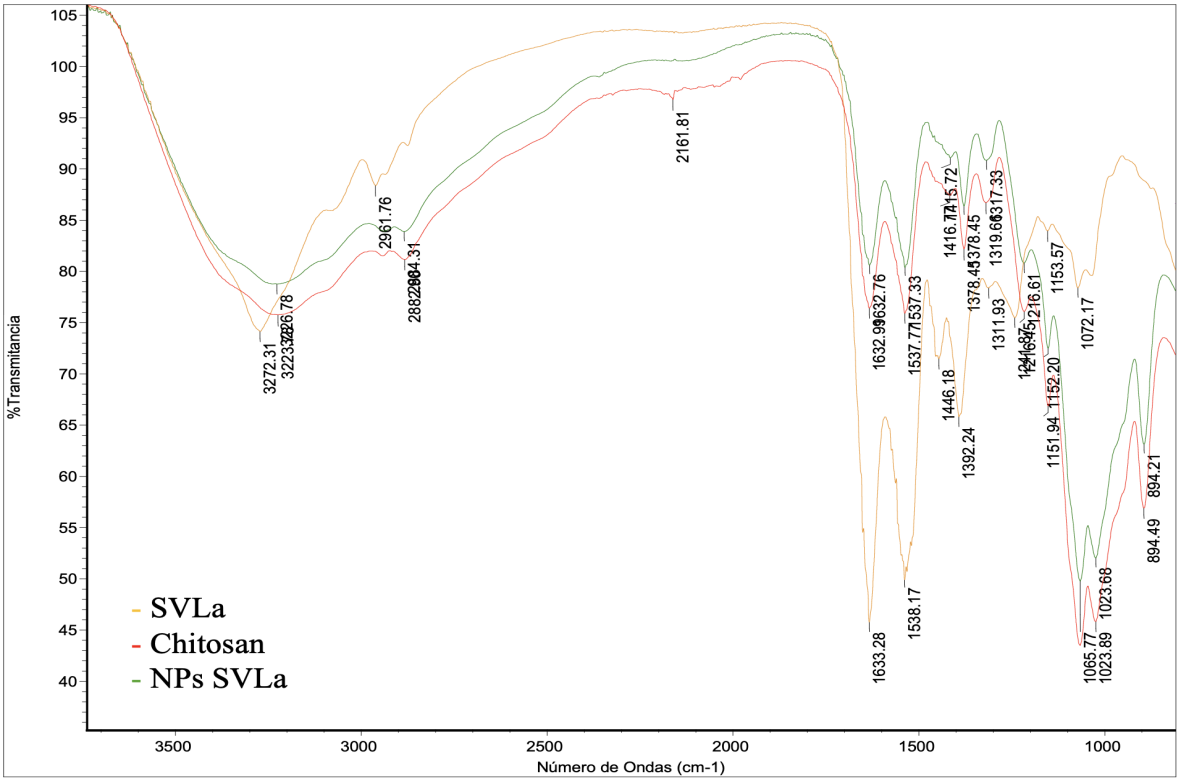
Fonte: elaboração própria, 2024.

5.4 Espectroscopia infravermelha

Para avaliar se a composição molecular das nanopartículas tinha mudado quando da gelificação iônica, foram realizados espectros de absorção na região infravermelha para os compostos separados, tais como quitosana, venenos de serpente (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas) e venenos incorporados em nanopartículas a uma concentração de 0,15 mg/mL.

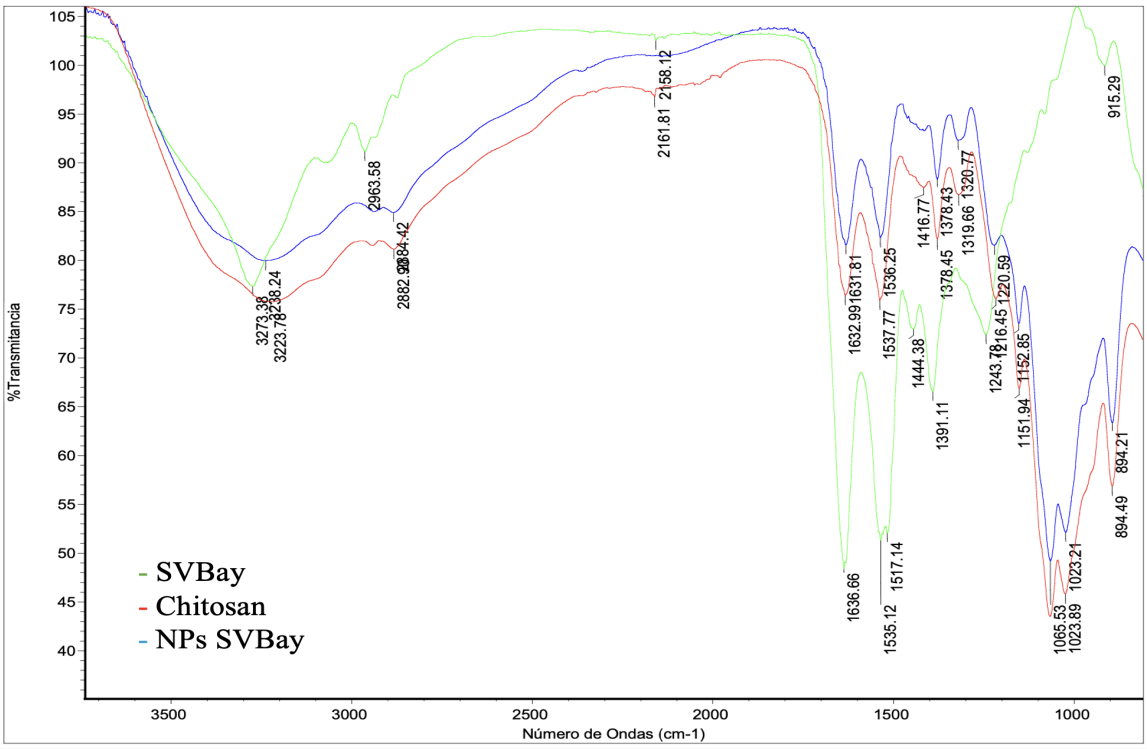
Na figura 10, são divisados os espectros de infravermelho do veneno da *L. acrochorda*, com o seu respectivo controle, e a quitosana. Do mesmo jeito, se observa na figura 11 o veneno de *B. ayerbei*, na figura 12 com o veneno de *B. rhombeatus* e a figura 13 o veneno de *B. asper*. Estas análises espectroscópicas exprimem que os venenos testados foram adsorvidos eficientemente nas nanopartículas de quitosana, mostrando modificações nas estruturas moleculares, porque cada um deles indicou registros diferentes, em comparação com os compostos como a quitosana ou veneno total.

Figura 10 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *L. acrochorda* (SVLa)



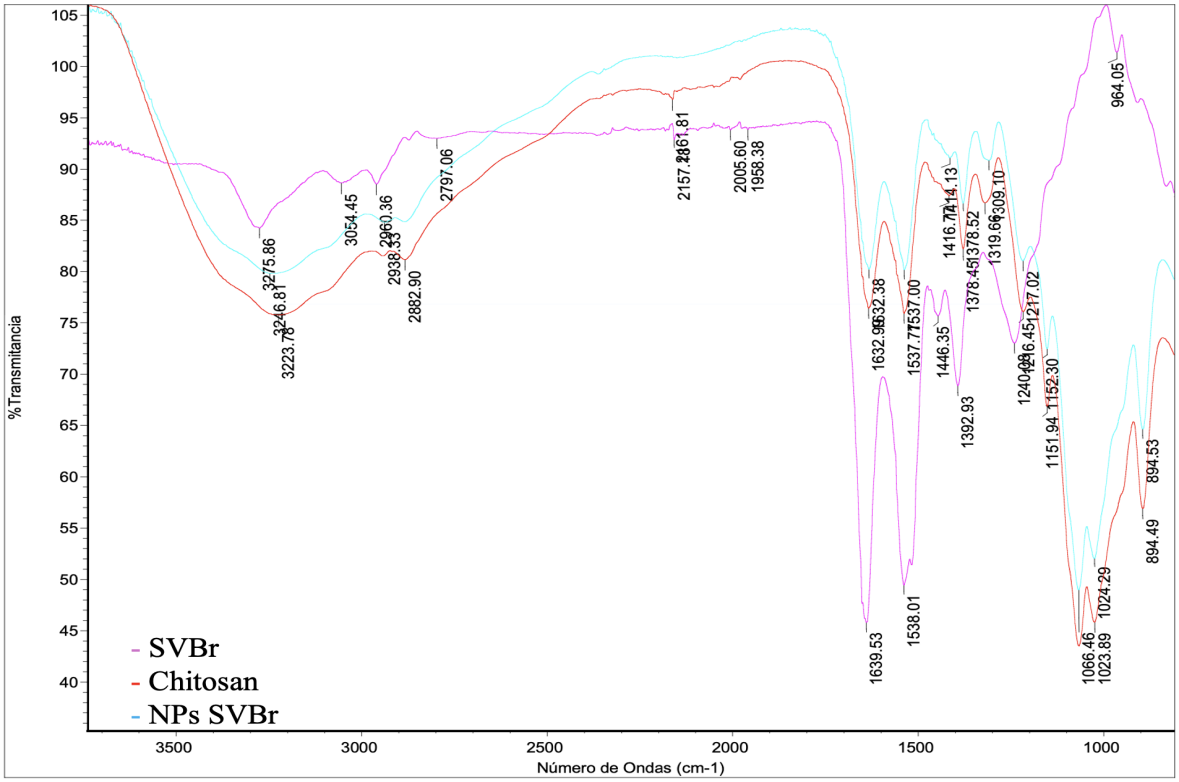
Fonte: elaboração própria, 2024.

Figura 11 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de B. *ayerbei* (SVBay)



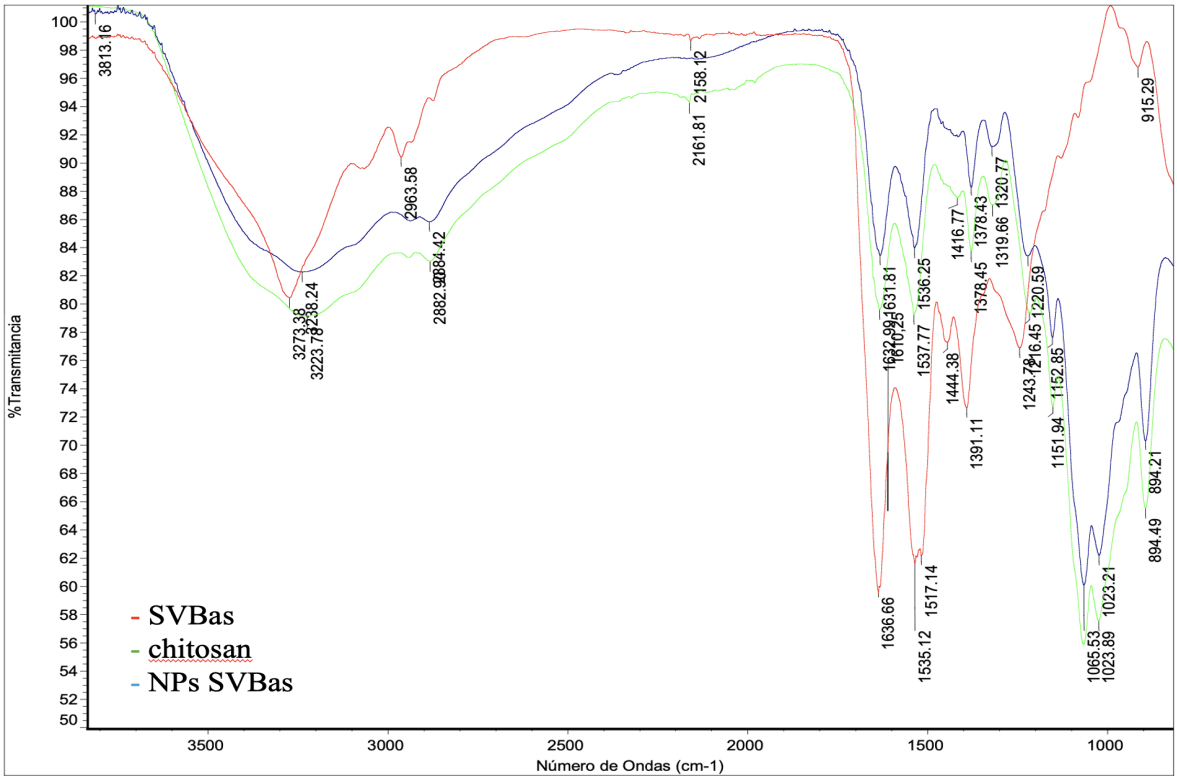
Fonte: elaboração própria, 2024.

Figura 12 -Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *B. rhombeatus* (SVBr)



Fonte: elaboração própria, 2024.

Figura 13 - Espectros infravermelhos (IR) do veneno total, nanopartículas de quitosana de controle e nanopartículas contendo veneno incorporado de *B. asper* (SVBas)

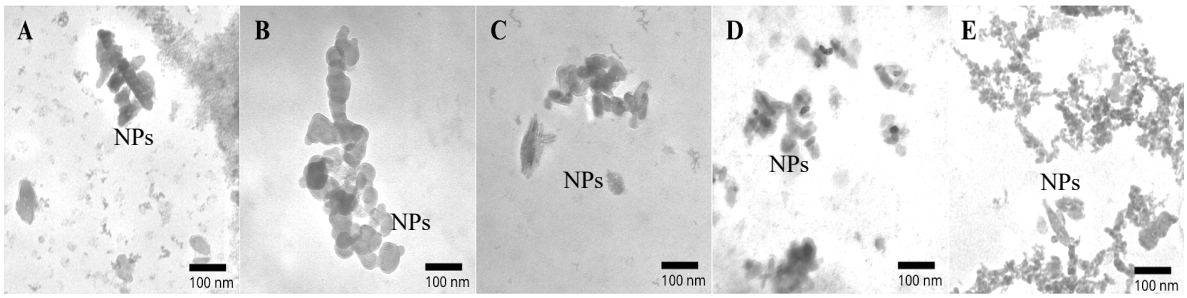


Fonte: elaboração própria, 2024.

5.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Para caracterizar as modalidades e superfícies das NPs nanopartículas, as amostras foram montadas, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão. O diâmetro das nanopartículas foi observado, o que concordou com os diâmetros relatados na análise físico-química, que indicaram diâmetros de <100 nm (Figura 14 A-E). Esse procedimento foi realizado tanto para as nanopartículas de controle (sem veneno) quanto para as nanopartículas carregadas com veneno (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas), dando ensejo à observação de cada um dos tipos de NPs carregados de veneno.

Figura 14 - Micrografias TEM das nanopartículas (NPs). A) NPs de controle sem veneno; B) NPs com veneno de *L. acrochorda*; C) NPs com veneno de *B. ayerbei*; D) NPs com veneno de *B. rhombeatus*; e E) NPs com veneno de *B. asper*



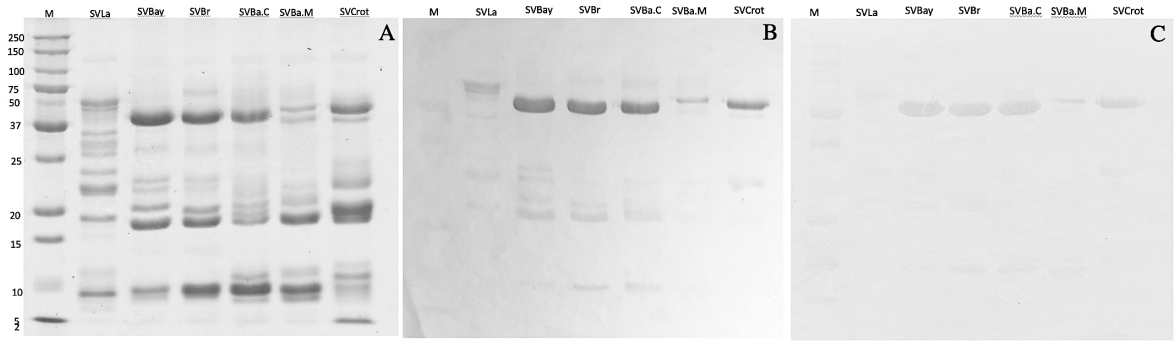
Fonte: elaboração própria, 2025.

5.6 Western Blot

Durante os experimentos, foram realizados western blots utilizando antivenenos comerciais da Colômbia (Instituto Nacional de Saúde) e do México (Silanes Inc.). Para esse processo, foram preparados géis de poliacrilamida utilizando 10 µg de venenos das espécies *L. acrochorda, B. ayerbei, B. rhombeatus e B. asper* da Colômbia, junto com *B. asper* e *Crotalus basiliscos,* do México. Para usar os anticorpos, foi realizada a primeira incubação com anticorpos primários, com uma concentração de 1 µg/mL, e foi usado como segundo anticorpo IgG(H+L) de coelho anti-cavalo++ purificado por afinidade e conjugado com fosfatase alcalina, numa concentração de 1:2000.

Todos os geles foram realizados nas mesmas condições, sendo um deles o controle, corado com azul de Coomassie (Figura 15A); outro, utilizando o antiveneno como anticorpo primário do Instituto Nacional da Colômbia (Figura 15B) e mais um usando o antiveneno produzido no México como anticorpo primário (Figura 15C). Restou mostrado melhor reconhecimento por parte no antiveneno do Instituto da Colômbia, que reconheceu proteínas de elevado peso molecular (37-100 kDa) e algumas de peso molecular médio (15-25 kDa). No que concerne ao antiveneno de SILANES, o reconhecimento foi menor e só teve reconhecimento de proteínas de alto peso molecular. Particularmente, o veneno de *Lachesis* foi o veneno que exprimiu menor reconhecimento para os dos antivenenos comerciais.

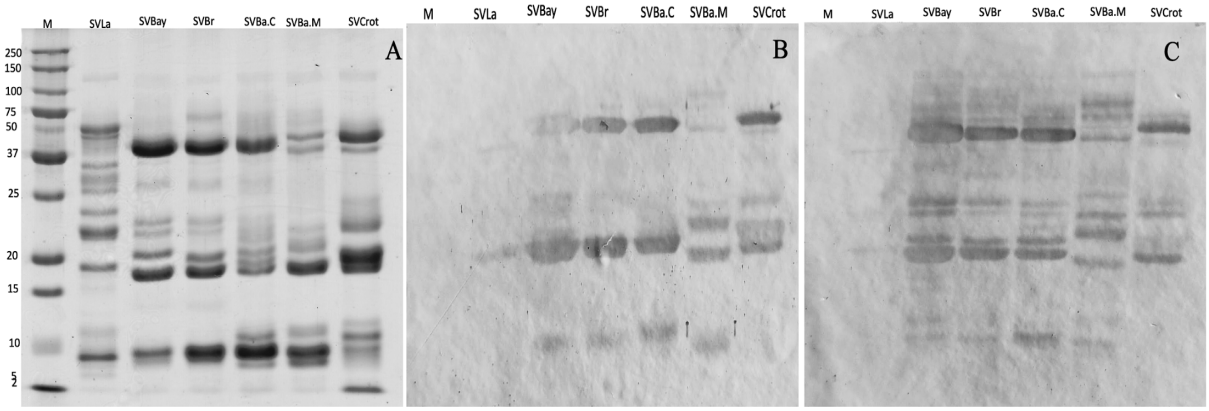
Figura 15 - SDS-PAGE de viperídeos e western blot utilizando antivenenos comerciais. A) SDS-PAGE com coloração por azul de Coomassie, tamanho dos poros de 12,5%; B) Western blot utilizando anti-INS da Colômbia; e C) Western blot utilizando Antivipmyn do México. *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr) e *B. asper* (SVBas) da Colômbia, e *B. asper* (SVBaM) e *Crotalus basiliscus* (SVCrot) do México



Fonte: elaboração própria, 2025.

Em relação aos westerns blots realizados com os anticorpos obtidos dos coelhos imunizados neste trabalho (Figura 16), foi realizada uma SDS-PAGE, com poros de 12,5%, que foram carregados com 10 µg dos seguintes venenos: *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr), *B. asper* (SVBas) da Colômbia e *B. asper* (SVBaM) e *Crotalus basiliscus* (SVCrot) do México (Figura 16A). Géis SDS-PAGE semelhantes foram transferidos para membranas de nitrocelulose para realizar a transferência em uma câmara semiúmida. Posteriormente, uma das membranas foi tratada com anticorpos obtidos de coelhos imunizados com as misturas de venenos sem quitosana (Figura 16B) e a outra com anticorpos de coelho obtidos da imunização com as misturas de venenos usando partículas de quitosana (Figura 16C). Observa-se que houve reconhecimento proteico de algumas famílias de toxinas com pesos moleculares médios e altos, com base nas quais os anticorpos produzidos desde partículas de quitosana utilizadas como adjuvante relataram melhor reconhecimento das proteínas viperídeas, identificando até mesmo proteínas encontradas em menor abundância nesses venenos.

Figura 16 - SDS-PAGE de viperídeos e western blot utilizando antídotos de coelho. A) SDS-PGE com coloração azul de Coomassie, tamanho dos poros de 12,5%; B) Western blot utilizando IgGs de coelho com base em misturas de veneno não encapsuladas; C) Western blot utilizando IgGs de coelho com suporte em misturas de veneno encapsuladas. L. acrochorda (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr), *B. asper* (SVBas) da Colômbia e *B. asper* (SVBaM) e *Crotalus basiliscus* (SVCrot) do México.

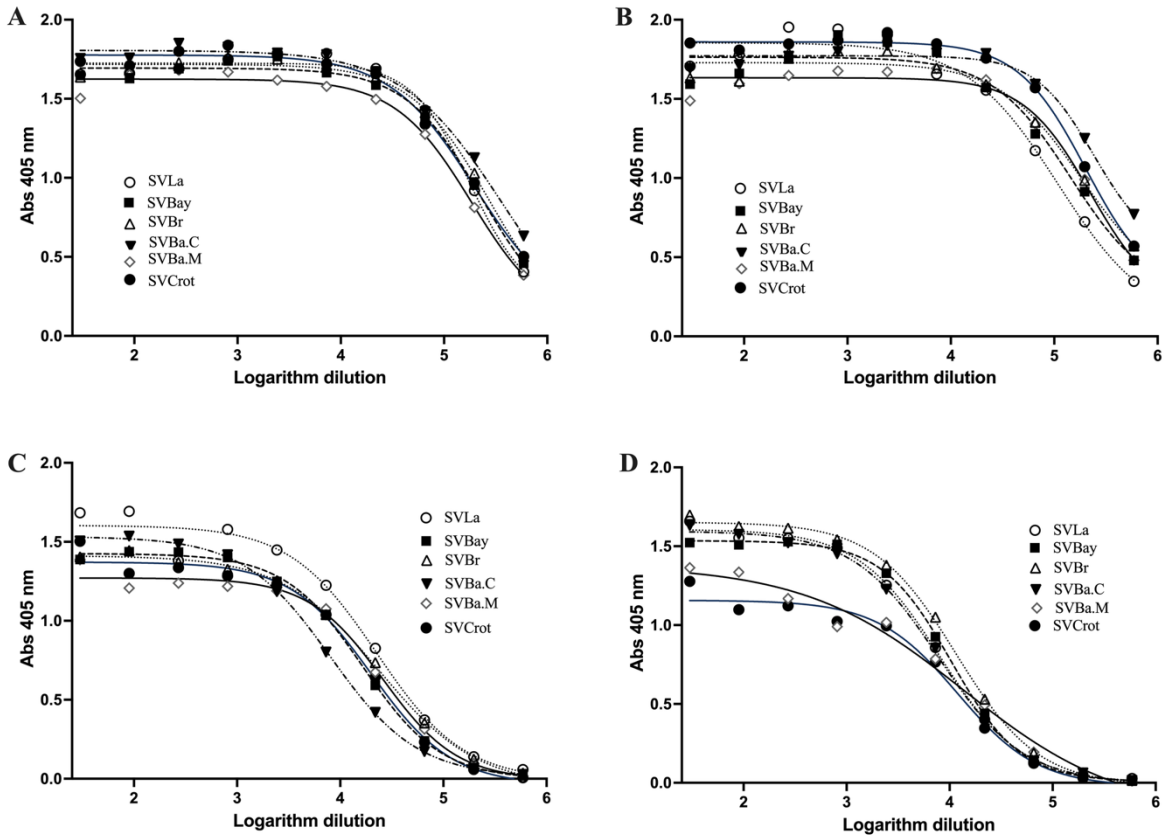


Fonte: elaboração própria, 2025.

5.7 Ensaios de imunoreconhecimento

Os testes de imuno reconhecimento foram realizados no decurso da imunização para observar o comportamento dos anticorpos de coelho aos venenos. É notório o fato de que o veneno de *Lachesis* teve resposta menor do que o de *Bothrops*. O antiveneno obtido de coelhos imunizados com nanopartículas de quitosana como adjuvante (Figura 17A) e o soro de coelhos controle imunizados com Freund e alumina (Figura 17B) também foram avaliados. A resposta imunológica aos venenos das espécies utilizadas neste ensaio também foi testada com os antivenenos comerciais da Colômbia e do México (Figura 17C-D). Os anticorpos que utilizaram quitosana como imuno adjuvantes mostraram um nível de reconhecimento dos venenos mais sustentado e homogêneo do que o controle e os antivenenos comerciais. Estes mostraram uma resposta de reconhecimento menor aos venenos, especialmente ao de *Lachesis*, e ainda menor do que o antiveneno comercial do México.

Figura 17 - ELISA com anticorpos purificados de coelhos, imunizados com e sem quitosana, e de cavalos (anticorpos comerciais). A) ELISA com anticorpos de coelho usando partículas de quitosana como imuno estimulante; B) ELISA com anticorpos de coelho usando Freund e alumina como imunoestimulantes; C) ELISA com anticorpos de cavalo de antiveneno comercial colombiano; e D) ELISA com anticorpos de cavalo de antiveneno comercial mexicano



Fonte: elaboração própria, 2025.

5.8 Concentrações inibitórias 50 (C_{50})

Com os resultados obtidos dos títulos de veneno em comparação com o protótipo e os antivenenos comerciais, foram estabelecidas as concentrações inibitórias (IC_{50}) para cada um dos venenos testados (Tabela 2). O antiveneno de coelho tem um IC_{50} igual ou inferior ao do grupo controle e inferior aos antivenenos comerciais da Colômbia e do México, sugerindo que o veneno incorporado às NPs de quitosana ajuda a melhorar a resposta do sistema imunológico e o conteúdo de anticorpos neutralizantes.

Tabela 2 - Reconhecimento de venenos de serpentes utilizando antídotos de coelhos, imunizados com ou sem quitosana, e antídotos comerciais da Colômbia e do México

	*EC_{50} (μg/mL CI)			
Veneno	**Controle**	**NP Quitosana**	**Anti-Vip (COL)**	**Anti-Vip (MEX**
L. acrochorda	0.45 (0.07 - 0.85)	0.27 (0.1 - 0.4)	2.6 (1.5 – 3.8)	1.0 (0.84 - 1.2)
B. ayerbei	0.34 (0.02 - 0.70)	0.21 (0.08 - 0.32)	3.6 (3.2 – 4.0)	0.79 (0.71 - 0.87)
B. rhombeatus	0.26 (0.01 - 0.52)	0.18 (0.06 - 0.28)	2.4 (2.0 – 2.8)	0.70 (0.61 - 0.81)
B. asper (COL)	0.20 (0.02 - 0.31)	0.13 (0.01 - 0.3)	7.4 (5.7 – 9.4)	1.0 (0.91 – 1.1)
B. asper (MEX)	0.22 (0.04 - 0.36)	0.26 (0.08 - 0.41)	2.3 (1.7 – 2.9)	0.56 (0.17 – 1.0)
C. basiliscus	0.24 (0.07 - 0.36)	0.25 (0.04 - 0.44)	3.0 (2.0 – 4.1)	0.68 (0.50 - 0.90)

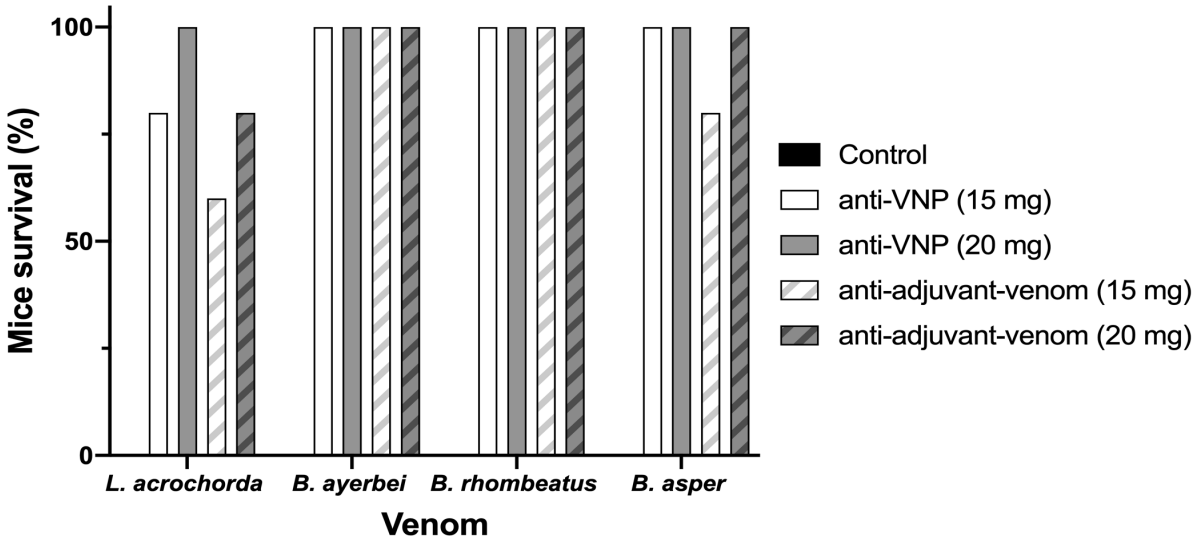
l

O IC_{50} foi calculado utilizando a concentração de anticorpos de 50 mg/mL para o controle e anticorpos IgG de coelho quitosana, 59,8 mg/mL para IgG Anti-Vip COL e 8,2 mg/mL para (Fab)2 Anti-Vip MEX. Os intervalos de confiança (IC) estão entre parênteses (95%). Fonte: elaboração própria, 2025

5.9 Testes de Neutralização *in vivo*

Para caracterizar a capacidade de neutralização do protótipo do antiveneno, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência de camundongos inoculados com venenos de víboras na ocorrência do protótipo de antiveneno de coelho (Figura 18). Os resultados mostraram que os anticorpos de coelho neutralizam 3xLD_{50} de SVBay, SVBr e SVBas, mas não completamente SVLa (80%), exprimindo respostas melhores de neutralização para os venenos das serpentes de gênero *Bothrops*.

Figura 18 - Neutralização de anticorpos produzidos com e sem nanopartículas de quitosana. *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr), *B. asper* (SVBas). Os camundongos foram expostos a uma dose de veneno equivalente a 3LD50, previamente incubada com IgGs (15 ou 20 mg) purificadas por ácido caprílico. O grupo de controle não continha anticorpos de coelho.



Fonte: elaboração própria, 2025.

Portanto, os resultados obtidos na investigação agora sustentada reforçam o princípio de que as nanopartículas de quitosana proporcionam uma excelente abordagem adjuvante nos processos de estimulação da resposta imunológica, além de serem inovadoras, eficazes e seguras para a liberação de proteínas do veneno de serpentes e a fim de melhorar a eficiência e a distribuição do antígeno na promoção de respostas imunológicas.

6 DISCUSSÃO

Os resultados aqui recolhidos reforçam o princípio de que as nanopartículas de quitosana representam uma abordagem adjuvante promissora na estimulação da resposta imunológica. Sobre serem inovadoras, eficazes e seguras, essas nanopartículas demonstraram eficiência na liberação de proteínas do veneno de serpente, melhorando a distribuição e mostra do antígeno, o que potencializa a geração de respostas imunológicas mais amplas e específicas. Dessa maneira, a quitosana destaca-se como um imuno adjuvante alternativo e favorável para a produção de antivenenos ofídicos.

Os venenos utilizados nos experimentos foram obtidos por extração manual em serpentes adultas das espécies *L. acrochorda, B. ayerbei, B. rhombeatus* e *B. asper*. Com os venenos e a quitosana disponíveis, as nanopartículas foram preparadas por gelificação iônica, individualmente, para cada espécie. Esse método foi selecionado por ser eficiente, rápido e de baixo custo, além de possibilitar o desenvolvimento controlado de nanopartículas poliméricas estáveis e homogêneas (Rampino *et al.*, 2013).

Após a obtenção das nanopartículas por gelificação iônica, foram avaliadas suas propriedades físico-químicas, observando-se características compatíveis com as descritas para sistemas semelhantes baseados em quitosana. No estudo agora relatado, as nanopartículas exibiram carga superficial positiva (potencial zeta catiônico), diâmetro médio inferior a 100 nm e distribuição de tamanho homogênea, além de uma alta eficiência de encapsulamento, indicando boa estabilidade coloidal e interação efetiva entre o polímero e os componentes proteicos dos venenos. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que relataram potenciais zeta positivos e tamanhos de partícula na faixa de 100–250 nm para nanopartículas de quitosana, variando conforme a concentração do polímero e a natureza da biomolécula encapsulada (Bhattacharjee, 2016; Costa *et al.*, 2017; Gláucia-Silva *et al.*, 2018; Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017).

De modo semelhante, pesquisas que empregaram nanopartículas de quitosana associadas a venenos de *Bothrops jararaca*, *B. erythromelas, Crotalus durissus cascavella* e ao escorpião *Tityus serrulatus* também reportaram partículas com dimensões reduzidas, baixo índice de polidispersão e potencial zeta positivo, reforçando o comportamento estável e a eficiência desse tipo de sistema como carreador de biomoléculas (Rocha Soares et al. 2012, 2017; Gláucia-Silva et al. 2018). Em consonância, os resultados aqui conquistados sugerem que as nanopartículas formuladas com venenos ofídicos mantêm propriedades físico-químicas adequadas para aplicações biotecnológicas, especialmente como plataformas adjuvantes na

produção de antivenenos e, potencialmente, em abordagens antimicrobianas inovadoras (Gláucia-Silva *et al.*, 2024).

Adicionalmente, nesta perquisição acadêmica *stricto sensu* (tese doutoral), para confirmar o percentual de encapsulamento das NPS, foram realizadas como métodos de avaliação adicional análises por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) do sobrenadante das NPs carregadas ou não com veneno (Figura 1). Posteriormente, a área sob a curva do sobrenadante foi relacionada ao perfil cromatográfico do veneno, obtendo-se uma encapsulação média de 75% para cada um dos venenos testados na formulação de nanopartículas, a uma concentração de 0,15 mg/mL, e a menor porcentagem em concentrações de 0,5 e 0,1 mg/mL. Em aditamento, observou-se que alguns grupos de frações foram detectados no perfil cromatográfico da solução inicial do veneno e desapareceram após a encapsulação na quitosana. Tal sugere que o os venenos têm certas afinidades pelo encapsulamento de alguns grupos de toxinas. Então, partindo dos picos de frações que desapareceram após a encapsulação com quitosana, estes foram selecionados para determinar seu peso molecular aparente no SDS-PAGE. Nesses resultados, observa-se que as moléculas encapsuladas têm compostos de peso molecular bastante variado, mas, de acordo com seus pesos moleculares aparentes, elas são propícias a ser relacionadas a famílias de proteínas, como metaloproteases e fosfolipases viperídeas que já são sistematicamente reportadas nos estudos proteômicos dos venenos de *L. acrochorda* (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Madrigal *et al.*, 2012; Montoya-Gómez *et al.*, 2023), para *B. ayerbei* (Mora-Obando *et al.*, 2014) e *B. rhombeatus* com *B. asper* (Mora-Obando *et al.*, 2020). O anterior sugere que este método adicional testado enseja conhecer os grupos de moléculas que denotam maior facilidade de encapsulamento, informação útil quando tenta se encapsular alguns grupos de substâncias alvos.

Em adição, a encapsulação dessas famílias de proteínas apresentam vantagem, pois contribui para a redução das lesões cutâneas durante o processo de imunização, tendo-se observado que os animais imunizados com o veneno encapsulado exibiram menos inflamação local do que aqueles que utilizaram o controle (com imuno adjuvantes), como Freund e alumina. Essas proteínas estão fisiologicamente relacionadas a efeitos como miotoxicidade e distúrbios sanguíneos. Por exemplo, as fosfolipases A2 estão relacionadas a efeitos miotóxicos (Liu *et al.*, 2021; Lomonte *et al.*, 2015), que causam incapacidade ou amputações (Lomonte, 2023). Quanto às metaloproteinases, elas estão relacionadas a distúrbios de coagulação e processos hemorrágicos (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2016; Yamashita *et al.*, 2014), outro sintoma a causar complicações em pacientes mordidos (WHO, 2023).

Para dar continuidade à caracterização das nanopartículas, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observou-se que o diâmetro das nanopartículas foi compatível com os valores obtidos nas análises físico-químicas, relatando tamanhos inferiores a 100 nm. Esse procedimento foi realizado tanto para as nanopartículas controle (sem veneno) quanto para aquelas carregadas com veneno de serpentes. A microscopia eletrônica deu ensejo a se observar a morfologia e ver o tamanho das nanopartículas, resultados que se mostraram concordantes com os dados físico-químicos previamente obtidos (Gláucia-Silva *et al.*, 2018, 2024; Mosquera-Murillo *et al.*, 2023).

Também foram realizados estudos dos espectros de absorção na região infravermelha para avaliar se a composição molecular das nanopartículas tinha mudado quando da gelificação iônica. Estas análises espectroscópicas corroboraram a ideia de que os distintos venenos testados (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas) foram adsorvidos eficientemente nas nanopartículas de quitosana. Essa adsorção foi confirmada pela observação das interações intermoleculares dos grupos carboxílicos da proteína do veneno com os grupos aminos da quitosana. Os espectros das NPs carregadas com os variados venenos mostraram maior intensidade para alongamento em 1537 e 1633 cm-1 do que as nanopartículas sem veneno, o que teria sido causado pela adsorção de proteínas. Também ficou evidente que havia maior intensidade desses mesmos alongamentos nos registros de venenos sem incorporação nas NPs, mostrando que os venenos têm proteínas no material polimérico que ocorreriam, principalmente, por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas (Gláucia-Silva *et al.*, 2018; Mesquita *et al.*, 2017), em razão da existência de carboxila das aminas primárias (Rocha Soares *et al.*, 2017). Também foram observados aumentos na intensidade da banda, atribuídos aos grupos OH dos carboxilatos (Castañeda-Manquillo *et al.*, 2023; Figueroa López *et al.*, 2014). Existem, também, bandas em 1200 e 894 cm-1, relacionadas a grupos P=O e P-O-P, respectivamente, vinculados à composição química do TPP (Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017) e, nesta pesquisa, ocorriam nas NPs e não sucediam no registro dos venenos puros. Esses resultados sugerem que interações hidrofóbicas das cadeias dos copolímeros alifáticos são propícias a ocorrer com regiões hidrofóbicas das proteínas, compostas por aminoácidos apolares. O caráter hidrofílico e catiônico da quitosana, todavia, parece desempenhar um papel determinante na estabilização dessas interações e na formação das ligações moleculares (Gláucia-Silva *et al.*, 2018).

Enquanto as análises de Western Blot obtidas tanto para os antiveneno do INS da Colômbia, tanto para SILANES do México (observa-se que tanto os anticorpos comerciais colombianos quanto os mexicanos têm a capacidade de reconhecer proteínas de alto peso

molecular, nas quais se destaca o antiveneno colombiano, que identifica, além das proteínas de alto peso molecular (37-100 kDa), também reconhece algumas proteínas de peso molecular médio (15-25 kDa). Nesse sentido, também se divisa que o antiveneno colombiano tem elevada capacidade de reconhecimento de proteínas de alto peso molecular, especialmente de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. Também se observa que o reconhecimento das toxinas dos venenos de serpente do gênero *Lachesis* (SVLa) teve baixo reconhecimento pelo antiveneno polivalente contra *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* produzido pelo INS colombiano. Em relação ao reconhecimento do veneno de *Lachesis* com o antiveneno produzido no México, não houve reconhecimento, o que é atribuível à não inclusão de venenos de serpentes desse gênero na produção do antiveneno e, como se demonstrar, não expressa reatividade cruzada.

Em relação aos westerns blots realizados com os anticorpos obtidos dos coelhos imunizados nesta Tese, nota-se que houve reconhecimento proteico de algumas famílias de toxinas com pesos moleculares médios e altos, com suporte nas quais os anticorpos produzidos desde partículas de quitosana utilizadas como adjuvante exprimiram melhor reconhecimento das proteínas viperídeas, identificando até mesmo proteínas encontradas em menor abundância nesses venenos. O anteriormente exposto sugestiona que as proteínas do veneno foram encapsuladas, embora a porcentagem de encapsulamento tenha sido a mais do 70% e, de acordo com os perfis cromatográficos, algumas proteínas permaneceram no sobrenadante. Portanto, as proteínas do veneno encapsuladas foram suficientes para estimular a produção de anticorpos. As proteínas do veneno que indicaram melhor reconhecimento pelos anticorpos de coelho foram aquelas de 15 a 75 kDa, que, de acordo com seu peso molecular, estão relacionadas às fosfolipases A2, metaloproteinase, lecitina tipo C, fosfodiesterase e serina proteases, já relatadas nos perfis de veneno dessas espécies colombianas (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Montoya-Gómez *et al.*, 2023; Mora-Obando *et al.*, 2020; Salazar-Valenzuela *et al.*, 2014).

Os testes de imuno reconhecimento realizados à extensão do protocolo de imunização tiveram como objetivo avaliar o comportamento dos anticorpos produzidos pelos coelhos ante os distintos venenos testados. Observou-se que o veneno de *Lachesis* induziu uma resposta imunológica inferior àquela obtida com o veneno de *Bothrops*.

O antiveneno obtido de coelhos imunizados com nanopartículas de quitosana utilizadas como adjuvante foi comparado ao soro dos coelhos controle, imunizados com adjuvantes convencionais (Freund e alumina). Ademais, a resposta imunológica aos venenos das espécies utilizadas foi também comparada com a de antivenenos comerciais da Colômbia e do México, evidenciando diferenças nos perfis de reconhecimento antigênico e na intensidade da resposta humoral.

Os anticorpos que utilizaram quitosana como imuno adjuvantes mostraram um nível de reconhecimento dos venenos mais sustentado e homogêneo do que o controle e os antivenenos comerciais. Estes manifestaram uma resposta de reconhecimento menor aos venenos, especialmente ao de *Lachesis*, e ainda menor ao antiveneno comercial do México. Essa observação correlaciona-se à baixa resposta de reconhecimento observada no western blot utilizando os antivenenos comerciais. A baixa resposta imunogênica observada para o veneno de *L. acrochorda* é passível de estar relacionada à composição bioquímica específica desse veneno (Angel-Camilo *et al.*, 2020; Montoya-Gómez *et al.*, 2023) e às cargas eletrostáticas de suas proteínas. Em comparação com os venenos das demais espécies analisadas, este exibiu a menor taxa de encapsulamento, o que é passível de haver contribuído para a resposta imunológica reduzida.

Em consonância com esses resultados, as análises de imuno reconhecimento demonstraram maior afinidade dos anticorpos para toxinas de médio e alto pesos moleculares dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, sugerindo diferenças estruturais e de antigenicidade entre as espécies avaliadas.

Adicionalmente, foram determinadas as concentrações efetivas médias (EC_{50}) para cada um dos venenos testados, com amparo na comparação dos títulos obtidos com o protótipo de antiveneno e os antivenenos comerciais disponíveis. Observou-se que o antiveneno produzido em coelhos expressou valores de EC_{50} iguais ou inferiores aos do grupo controle e inferiores aos registrados para os antivenenos comerciais da Colômbia e do México, indicando maior eficiência neutralizante. Esses achados sugerem que a incorporação do veneno às nanopartículas (NPs) de quitosana potencializa a resposta do sistema imunológico e favorece o aumento da produção de anticorpos específicos.

Os resultados obtidos estão em concordância com estudos prévios utilizando NPs de quitosana em modelos murinos (Gláucia-Silva *et al.*, 2018; Rocha Soares *et al.*, 2012, 2017), os quais relataram o papel das nanopartículas como imuno adjuvantes eficazes na indução de respostas humorais. Neste ensaio, a utilização de coelhos como modelo experimental resultou em achados consistentes com os relatados por esses autores, que empregaram camundongos imunizados com venenos de escorpiões e serpentes de variegadas espécies.

De modo geral, estes resultados reforçam o potencial do encapsulamento dos venenos em NPs de quitosana como estratégia promissora para o desenvolvimento de antivenenos mais eficazes, promovendo a produção de imunoglobulinas G (IgG) de alta afinidade e com elevada capacidade de reconhecimento e neutralização antigênica.

Para a etapa final do estudo, avaliou-se a capacidade de neutralização *in vivo* do protótipo de antiveneno, por meio da determinação da porcentagem de sobrevivência de camundongos tratados com venenos de várias espécies de serpentes, na ocorrência do antiveneno produzido em coelhos. Os resultados demonstraram que os anticorpos de coelho foram capazes de neutralizar $3\times LD_{50}$ dos venenos SVBay, SVBr e SVBas, contudo, indicaram neutralização parcial (80%) perante o veneno de *L. acrochorda* (SVLa).

Esses achados estão em concordância com os resultados obtidos nas análises de imuno reconhecimento por western blot e ELISA, em que o veneno de *L. acrochorda* relatou resposta imunológica menos intensa em comparação com os demais venenos testados. Ainda assim, os resultados são promissores quanto à viabilidade do encapsulamento e à produção de antiveneno utilizando nanopartículas de quitosana como imunoadjuvantes no desenvolvimento de formulações contra os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

De efeito, os resultados obtidos nesta pesquisa, reforçam o potencial das nanopartículas de quitosana como uma estratégia adjuvante inovadora, capaz de estimular eficazmente a resposta imunológica, além de representar uma abordagem segura e eficiente para a liberação controlada de proteínas do veneno e melhoria da distribuição.

7 CONCLUSÕES

Os venenos de *L. acrochorda* (SVLa), *B. ayerbei* (SVBay), *B. rhombeatus* (SVBr) e *B. asper* (SVBas) foram encapsulados por gelificação iônica, utilizando-se nanopartículas (NPs) de quitosana, as quais expressaram boas propriedades físico-químicas e elevada eficiência de encapsulamento, com média de 77%.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) confirmou o sucesso da nanocarga dos venenos nas nanopartículas, representando uma nova contribuição para a identificação de grupos de proteínas com maior afinidade e capacidade de encapsulamento.

Estes exames espectroscópicos corroboraram a noção de que os distintos venenos testados (SVLa, SVBay, SVBr e SVBas) foram adsorvidos eficientemente nas nanopartículas de quitosana, confirmando as interações intermoleculares dos grupos carboxílicos das proteínas do veneno com os grupos aminos da quitosana.

Os anticorpos policlonais de coelho, obtidos com suporte na imunização com NPs de quitosana carregadas com veneno, exibiram respostas imunogênicas superiores às geradas por imuno estimulantes convencionais, como alumina e adjuvante de Freund, sugerindo que as NPs de quitosana atuam como imuno adjuvantes promissores.

Alem disso, os resultados obtidos por ELISA e western blot demonstraram que os anticorpos induzidos por NPs de veneno-quitosana reconhecem toxinas em menores concentrações nos venenos de SVLa, SVBay, SVBr e SVBas, não detectadas pelos anticorpos produzidos com adjuvantes tradicionais.

Em adição, nas provas de neutralização *in vivo,* demostraram que os anticorpos de coelho produzidos com apoio nas NPs de veneno-quitosana $3xLD_{50}$ de SVBay, SVBr e SVBas, e em menor percentual o SVLa (80%), tendo melhor reconhecimento do que os controles de anticorpos obtidos sem utilizar NPs.

De tal jeito, o uso de nanopartículas de quitosana encapsuladas com veneno mostrou-se uma estratégia biotecnológica eficaz e inovadora para a produção de antivenenos, com potencial para aumentar a amplitude e a especificidade da resposta imunológica.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, J. C.; RODRÍGUEZ, E. G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3752-3762, May 2007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X07001703. Acesso em: 28 mar. 2025.

ALCOBA, G.; SHARMA, S. K.; BOLON, I.; OCHOA, C.; BABO MARTINS, S.; SUBEDI, M.; SHAH, B.; GHIMIRE, A.; GIGNOUX, E.; LUQUERO, F.; RUIZ DE CASTAÑEDA, R.; RAY, N.; CHAPPUIS, F. Snakebite epidemiology in humans and domestic animals across the Terai region in Nepal: a multicluster random survey. **The Lancet Global Health**, London, v. 10, n. 3, p. e398-e408, Mar. 2022.

ALIRAHIMI, E.; KAZEMI-LOMEDASHT, F.; SHAHBAZZADEH, D.; HABIBI-ANBOUHI, M.; HOSSEININEJAD CHAFI, M.; SOTOUDEH, N.; GHADERI, H.; MUYLDERMANS, S.; BEHDANI, M. Nanobodies as novel therapeutic agents in envenomation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2955-2965, Dec. 2018. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030441651830285X. Acesso em: 8 abr. 2025.

ÁNGEL-CAMILO, K. L.; BUENO-OSPINA, M. L.; BOLAÑOS BURGOS, I. C.; AYERBE-GONZÁLEZ, S.; BELTRÁN-VIDAL, J.; ACOSTA, A.; ÁLVAREZ-SOLER, J.; GUERRERO-VARGAS, J. A. Cardiotoxic Effects of Lachesis acrochorda Snake Venom in Anesthetized Wistar Rats. **Toxins**, v. 16, n. 9, p. 377, 28 Aug. 2024. Disponível em: https://www.mdpi.com/2072-6651/16/9/377. Acesso em: 12 abr. 2025.

ANGEL-CAMILO, K. L.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; CARVALHO, E. F. de; LIMA-SILVA, K.; DE SIQUEIRA, R. J. B.; FREITAS, L. B. N.; SOUSA, J. A. C. de; MOTA, M. R. L.; SANTOS, A. A. dos; NEVES-FERREIRA, A. G. da C.; HAVT, A.; LEAL, L. K. A. M.; MAGALHÃES, P. J. C. Disorders on cardiovascular parameters in rats and in human blood cells caused by Lachesis acrochorda snake venom. **Toxicon**, v. 184, p. 180-191, Sept. 2020. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010120302889. Acesso em: 2 mar. 2025.

ANTIVENOM. *In*: DICTIONARY of Toxicology. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 82-82.

ARGUEDAS, M.; UMAÑA, D.; MOSCOSO, E.; GARCÍA, A.; PEREIRA, C.; SÁNCHEZ, A.; DURÁN, G.; CORDERO, D.; SÁNCHEZ, A.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; GÓMEZ, A.; SALAS, C.; DÍAZ, C.; MARÍA GUTIÉRREZ, J.; LEÓN, G. Comparison of adjuvant emulsions for their safety and ability to enhance the antibody response in horses immunized with African snake venoms. **Vaccine**: X, [Oxford], v. 12, p. 100233, Dec. 2022.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 512-519, Sept. 2012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010112000633. Acesso em: 28 mar. 2025.

AYERBE, S.; LATORRE, J. **Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico**. [*S. l.*: *s. n.*], 2010.

AYERBE-GONZÁLES, S. Ofidismo en Colombia, enfoque, diagnostico y tratamiento. *In*: ORDÓÑEZ, C. A.; FERRADA, R.; BUITRAFO, R. **Cuidado intensivo y trauma**. 2. ed. Bogotá: Editorial Médica, 2009. p. 1304.

AYERBE-GONZÁLEZ, S.; LATORRE-LEDEZMA, J. **Manual para la prevención y mejoramiento de la atención de paciente con accidente ofídico**. Popayán: Gobernación del Departamento del Cauca, Secretaría Departamental de Salud, 2010.

BENVENUTI, L. A.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; NUNES, J. R.; CARDOSO, J. L. C. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after Bothrops jararacussu snakebite: a case report. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 331-334, Sept. 2003. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010103001673. Acesso em: 30 mar. 2025.

BERGFORS, E.; TROLLFORS, B.; INEROT, A. Unexpectedly high incidence of persistent itching nodules and delayed hypersensitivity to aluminium in children after the use of adsorbed vaccines from a single manufacturer. **Vaccine**, v. 22, n. 1, p. 64-69, Dec. 2003. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X03005310. Acesso em: 28 mar. 2025.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential: What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 235, p. 337-351, Aug. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil em 2023. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 55, n. 15, p. 1-11, 8 out. 2024.

CAMPBELL JA; LAMAR WW. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. London: Comstock Publishing Associates, 2004. 870 p.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. S87, dez. 2003. Disponível em: http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1992-04-.pdf. Acesso em: 28 mar. 2025.

CASEWELL, N. R.; JACKSON, T. N. W.; LAUSTSEN, A. H.; SUNAGAR, K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 41, n. 8, p. 570-581, Aug. 2020.

CASTAÑEDA-MANQUILLO, A. M.; MOSQUERA-MURILLO, K. E.; ARCINIEGAS-GRIJALBA, P. A.; RAMÍREZ DE VALDENEBRO, M. M.; MOSQUERA-SANCHEZ, L. P.; ÁNGEL-CAMILO, K. L.; RODRIGUEZ-PAEZ, J. E. Biosynthesis of ZnO nanobiohybrids and evaluation of their bioactivity on sperm quality of Mus musculus biomodels. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 20, p. 100851, Dec. 2023. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215153223000752. Acesso em: 21 jan. 2025.

CHIK, M. W.; HUSSAIN, Z.; ZULKEFELI, M.; TRIPATHY, M.; KUMAR, S.; MAJEED, A. B. A.; BYRAPPA, K. Polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes: a transformation toward better applications in healthcare. **Drug Delivery and Translational Research**, Berlin, v. 9, n. 2, p. 578-594, 28 Apr. 2019.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; VICENTE, S.; NETO, C.; CASTRO, P. M.; VEIGA, M.; MADUREIRA, R.; TAVARIA, F.; PINTADO, M. M. Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. **Materials Science and Engineering**: C, v. 79, p. 221-226, Oct. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116322184. Acesso em: 2 jul. 2025.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 May 2018. Disponível em: https://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57. Acesso em: 8 jul. 2025.

DE LA ROSA, G.; OLVERA, F.; ARCHUNDIA, I. G.; LOMONTE, B.; ALAGÓN, A.; CORZO, G. Horse immunization with short-chain consensus α-neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. **Nature Communications**, London, v. 10, n. 1, p. 3642, 13 Aug. 2019.

DIAS, L.; RODRIGUES, M. A. P.; RENNÓ, A. L.; STROKA, A.; INOUE, B. R.; PANUNTO, P. C.; MELGAREJO, A. R.; HYSLOP, S. Hemodynamic responses to Lachesis muta (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats. **Toxicon**, v. 123, p. 1-14, Dec. 2016. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004101011630294X. Acesso em: 28 mar. 2025.

DIAZ-FLOREZ, R. A.; BARRERA, F.; ROMERO MUNHOZ, Y.; MONTES-CORREA, A.; MALDONADO, M.; ZÚÑIGA-BAOS, J.; ALARCÓN-NAFORO, D.; AYERBE-GOZÁLEZ, S.; JIMENEZ, J. D.; SANTANA, D.; CALDERÓN MATEUS, J. TIPON, R. C.; PINILLA, C.; LASTRE L.; VARGAS, Y. **Fauna ofidica colombiana**. Colombia: [*s. n.*], 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ronald-Diaz-Florez/publication/359195816_Fauna_ofidica_colombiana_Viboras_de_Colombia/links/63045062ceb9764f7218b026/Fauna-ofidica-colombiana-Viboras-de-Colombia.pdf. Acesso em: 23 set. 2025.

FERNANDES PEDROSA, M. de F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. de L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R. R.; LEE HO, P.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from Loxosceles laeta venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 638-645, Nov. 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X02025214. Acesso em: 8 jul. 2025.

FIGUEROA LÓPEZ, K. J.; TORRES VARGAS, O. L.; PRÍAS BARRGÁN, J. J.; ARIZA CALDERÓN, H. Caracterización óptica y estructural de nanopartículas de Allium sativum L. impregnadas en lomo de bovino. **Acta Agronómica**, Colombia, v. 64, n. 1, p. 54-60, 25 ago. 2014.

FOLLECO, A. Taxonomía del complejo Bothrops asper (Serpentes: Viperidae) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie Bothrops rhombeatus (García 1896) y descripción de una nueva especie. **Novedades Colombianas**, Colombia, v. 12, n. 1, p. 33-70, 2010.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B**: Biointerfaces, v. 44, n. 2/3, p. 65-73, Aug. 2005. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776505001682. Acesso em: 7 mar. 2025.

GLÁUCIA-SILVA, F.; TORRES, J. V. P.; TORRES-RÊGO, M.; DANIELE-SILVA, A.; FURTADO, A. A.; FERREIRA, S. de S.; CHAVES, G. M.; XAVIER-JÚNIOR, F. H.; ROCHA SOARES, K. S.; SILVA-JÚNIOR, A. A. da; FERNANDES-PEDROSA, M. de F. Tityus stigmurus-Venom-Loaded Cross-Linked Chitosan Nanoparticles Improve Antimicrobial Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 18, p. 9893, 13 set. 2024. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/25/18/9893. Acesso em: 12 mar. 2025.

GLÁUCIA-SILVA, F.; TORRES-RÊGO, M.; ROCHA SOARES, K. S.; DAMASCENO, I. Z.; TAMBOURGI, D. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A. da; FERNANDES-PEDROSA, M. de F. A biotechnological approach to immunotherapy: Antivenom against Crotalus durissus cascavella snake venom produced from biodegradable nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 120, p. 1917-1924, Dec. 2018.

GUPTA, R.; MOHANTY, S. Nanoparticle formulation having ability to control the release of protein for drug delivery application. **Materials Science and Engineering**: C, v. 70, p. 327-333, Jan. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116311857. Acesso em: 28 mar. 2025.

GUTIÉRREZ, J. Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public Manufacturing Laboratories. **Toxins**, Swiss, v. 11, n. 1, p. 5, 24 Dec. 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Correction: Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17079, 2017. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nrdp201779. Acesso em: 13 fev. 2025.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; RODAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, [Amsterdam], v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by Bothrops asper (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, [Amsterdam], v. 36, n. 11, p. 1529-1538, Nov. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-1235, 15 Dec. 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951718/. Acesso em: 22 mar. 2025.

GUTIÉRREZ, J. M.; ZANETTE, L.; VIGILATO, M. A. N.; POMPEI, J. C. A.; MARTINS, D.; FAN, H. W. Appraisal of antivenom production in public laboratories in Latin America during the first semester of 2020: The impact of COVID-19. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 15, n. 6, p. e0009469, 17 June 2021.

HILL-EUBANKS, D. C.; PARKER, C. G.; LOLLAR, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 17, p. 6508-6512, Sept. 1989. Disponível em: http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.86.17.6508. Acesso em: 22 mar. 2025.

HOANG, N. H.; LE THANH, T.; SANGPUEAK, R.; TREEKOON, J.; SAENGCHAN, C.; THEPBANDIT, W.; PAPATHOTI, N. K.; KAMKAEW, A.; BUENSANTEAI, N. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. **Polymers**, Basel, v. 14, n. 4, p. 662, 9 Feb. 2022.

HUERTAS, R. M.; ARGUEDAS, M.; ESTRADA, J. M.; MOSCOSO, E.; UMAÑA, D.; SOLANO, G.; VARGAS, M.; SEGURA, Á.; SÁNCHEZ, A.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; ARROYO-PORTILLA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Clinical effects of immunization, bleeding, and albumin-based fluid therapy in horses used as immunoglobulin source to produce a polyspecific antivenom (Echitab-plus-ICP) towards venoms of African snakes. **Toxicon**: X, v. 18, p. 100158, June. 2023. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590171023000103. Acesso em: 5 mar. 2025.

HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; HAIDER, M.; KHAN, S.; SOHAIL, M.; HUSSAIN, F.; KHAN, F. M.; FAROOQ, M. A.; SHUID, A. N. A review of imperative concerns against clinical translation of nanomaterials: Unwanted biological interactions of nanomaterials cause serious nanotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Amsterdam, v. 59, p. 101867, Oct. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Accidente ofídico. **Boletín Epidemiológico Semanal**, Colombia, v. 27, p. 1-37, jun. 2024.

KHAN, M. S.; BASKOY, S. A.; YANG, C.; HONG, J.; CHAE, J.; HA, H.; LEE, S.; TANAKA, M.; CHOI, Y.; CHOI, J. Lipid-based colloidal nanoparticles for applications in targeted vaccine delivery. **Nanoscale Advances**, Cambridge, v. 5, n. 7, p. 1853-1869, 2023a.

KHAN, N. A.; AMORIM, F. G.; DUNBAR, J. P.; LEONARD, D.; REDUREAU, D.; QUINTON, L.; DUGON, M. M.; BOYD, A. Inhibition of bacterial biofilms by the snake venom proteome. **Biotechnology Reports**, London, v. 39, p. e00810, Sept. 2023b.

KOUKARAS, E. N.; PAPADIMITRIOU, S. A.; BIKIARIS, D. N.; FROUDAKIS, G. E. Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, DC, v. 9, n. 10, p. 2856-2862, 1 Oct. 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970. Disponível em: http://www.nature.com/articles/227680a0. Acesso em: 8 jul. 2025.

LEÓN, G.; VARGAS, M.; SEGURA, Á.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SOLANO, G.; GÓMEZ, A.; SÁNCHEZ, M.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. **Toxicon**, [Amsterdam], v. 151, p. 63-73, Sept. 2018.

LI, X.; ALDAYEL, A. M.; CUI, Z. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 173, p. 148-157, Jan. 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591300881X. Acesso em: 27 set. 2025.

LIÉVANO-BONILLA, A. F. **Comparación morfológica de tres poblaciones de serpientes del complejo bothrops asper (serpentes: viperidæ) del suroccidente colombiano.** Popayán: Universidad del Cauca, 2016.

LIU, C.-C.; WU, C.-J.; HSIAO, Y.-C.; YANG, Y.-H.; LIU, K.-L.; HUANG, G.-J.; HSIEH, C.-H.; CHEN, C.-K.; LIAW, G.-W. Snake venom proteome of Protobothrops mucrosquamatus in Taiwan: Delaying venom-induced lethality in a rodent model by inhibition of phospholipase A2 activity with varespladib. **Journal of Proteomics**, [Amsterdam], v. 234, p. 104084, Mar. 2021.

LOMONTE, B.; MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; SANZ, L.; PLA, D.; MARÍA GUTIÉRREZ, J.; CALVETE, J. J. First crotoxin-like phospholipase A2 complex from a New World non-rattlesnake species: Nigroviriditoxin, from the arboreal Neotropical snake Bothriechis nigroviridis. **Toxicon**, v. 93, p. 144-154, Jan. 2015. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010114006060. Acesso em: 23 set. 2025.

MACHADO MARINHO, A. C.; CHAPEAUROUGE, A.; DUTRA, B. M.; QUINTELA, B. C. S. F.; PEREIRA, S. S.; FERNANDES, C. F. C. The role of venom proteomics and single-domain antibodies for antivenoms: Progress in snake envenoming treatment. **Drug Discovery Today**, v. 29, n. 5, p. 103967, May 2024. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644624000928. Acesso em: 25 set. 2025.

MADRIGAL, M.; SANZ, L.; FLORES-DÍAZ, M.; SASA, M.; NÚÑEZ, V.; ALAPE-GIRÓN, A.; CALVETE, J. J. Snake venomics across genus Lachesis. Ontogenetic changes in the venom composition of Lachesis stenophrys and comparative proteomics of the venoms of adult Lachesis melanocephala and Lachesis acrochorda. **Journal of proteomics**, [Amsterdam], v. 77, p. 280-297, 21 Dec. 2012.

MESQUITA, P. C.; DOS SANTOS-SILVA, E.; STRECK, L.; DAMASCENO, I. Z.; MAIA, A. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Cationic functionalized biocompatible polylactide nanoparticles for slow release of proteins. **Colloids and Surfaces A**: Physicochemical and engineering aspects, v. 513, p. 442-451, Jan. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775716309505. Acesso em: 17 jul. 2025.

MIFSUD, E. J.; TAN, A. C. L.; JACKSON, D. C. TLR Agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. **Frontiers in Immunology**, Swiss, v. 5, p. 1-10, 2014.

MONTOYA-GÓMEZ, A.; OSORNO-VALENCIA, D.; GÓMEZ-DÍAZ, M.; BOLÍVAR-GARCÍA, W.; JIMÉNEZ-CHARRIS, E. Proteomic and functional analyses of Lachesis acrochorda snake venom from the Valle del Cauca Department of Colombia. **Acta Tropica**, v. 241, p. 106895, May 2023. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X23000827. Acesso em: 27 set. 2025.

MORA-OBANDO, D.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; PRIETO-SÁNCHEZ, R.; BELTRÁN, J.; RUCAVADO, A.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; AYERBE, S.; LOMONTE, B. Proteomic and functional profiling of the venom of Bothrops ayerbei from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with Bothrops asper venom. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 159-172, Jan. 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391913005617. Acesso em: 8 abr. 2025.

MORA-OBANDO, D.; LOMONTE, B.; PLA, D.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; AYERBE-GONZÁLEZ, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Half a century of research on Bothrops asper venom variation: biological and biomedical implications. **Toxicon**, v. 221, p. 106983, Jan. 2023. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010122003348. Acesso em: 15 mar. 2025.

MORA-OBANDO, D.; PLA, D.; LOMONTE, B.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; AYERBE, S.; CALVETE, J. J. Antivenomics and in vivo preclinical efficacy of six Latin American antivenoms towards south-western Colombian Bothrops asper lineage venoms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 15, n. 2, p. e0009073, 1 Feb. 2021.

MORA-OBANDO, D.; SALAZAR-VALENZUELA, D.; PLA, D.; LOMONTE, B.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; AYERBE, S.; GIBBS, H. L.; CALVETE, J. J. Venom variation in Bothrops asper lineages from North-Western South America. **Journal of Proteomics**, v. 229, p. 103945, Oct. 2020. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391920303134. Acesso em: 28 mar. 2025.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307-310, Nov. 1981. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269781907831. Acesso em: 8 jul. 2025.

MOSQUERA-MURILLO, K. E.; CASTAÑEDA-MANQUILLO, A. M.; ÁNGEL-CAMILO, K. L.; ARCINIEGAS-GRIJALBA, P. A.; DE VALDENEBRO, M. M. R.; MOSQUERA-SANCHEZ, L. P.; MEZA-CABRERA, I. A.; RODRIGUEZ-PAEZ, J. E. Evaluation of the toxicity of ZnO nanoparticles obtained by a chemical route on the nasal respiratory epithelium of the biomodel Mus musculus. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 25, n. 12, p. 258, 15 Dec. 2023. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/s11051-023-05902-3. Acesso em: 28 mar. 2025.

MUXIKA, A.; ETXABIDE, A.; URANGA, J.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 105, p. 1358-1368, Dec. 2017.

NAIT MOHAMED, F. A.; LARABA-DJEBARI, F. Development and characterization of a new carrier for vaccine delivery based on calcium-alginate nanoparticles: Safe

immunoprotective approach against scorpion envenoming. **Vaccine**, v. 34, n. 24, p. 2692-2699, May 2016. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16301761. Acesso em: 8 abr. 2025.

NICOLAU, C. A.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214-231, Jan. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916302688. Acesso em: 8 abr. 2025.

OTERO, R.; TOBÓN, G.; GÓMEZ, L.; OSORIO, R.; VALDERRAMA, R.; HOYOS, D.; URRETA, J.; MOLINA, S.; ARBOLEDA, J. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 - febrero de 1990). **Acta Médica Colombiana**, v. 17, p. 21, 1992. Disponível em: http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1992-04-.pdf. Acesso em: 28 mar. 2025.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of Bothrops asper bites. **Toxicon**: Official journal of the International Society on Toxinology, Oxford, v. 54, n. 7, p. 998-1011, Dez. 2009.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiología, Clínica y Terapéutica del Envenenamiento Ofídico en Colombia. *In*: D'SUZE, G.; CORZO-BURGETE, G. A.; PANIAGUA-SOLIS, J. F. **Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas**. Mexico DF: Instituto Bioclón, 2011. p. 537.

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; CUI, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1095-1107, 9 Sept. 2010. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erv.10.89. Acesso em: 2 maio 2025.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1/2, p. 139-147, dez. 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302004866. Acesso em: 8 jul. 2025.

PLA, D.; SANZ, L.; MOLINA-SÁNCHEZ, P.; ZORITA, V.; MADRIGAL, M.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; NÚÑEZ, V.; ANDRÉS, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomics of Lachesis muta rhombeata and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across Lachesis. **Journal of Proteomics**, [Amsterdam], v. 89, p. 112-23, 26 Aug. 2013.

RAMESH KUMAR, D.; SARAVANA KUMAR, P.; GANDHI, M. R.; AL-DHABI, N. A.; PAULRAJ, M. G.; IGNACIMUTHU, S. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in Aedes aegypti mosquitoes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 89-95, May 2016.

Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016300319. Acesso em: 3 out. 2025.

RAMÍREZ-BURBANO, P. A. **Morfometría geométrica del Complejo Bothrops asper (Garman, 1883) del Suroccidente Colombiano**. Popayán: Universidad del Cauca, 2023.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1/2, p. 219-228, Oct. 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313006601. Acesso em: 8 set. 2025.

RATANABANANGKOON, K. Polyvalent Snake Antivenoms: Production Strategy and Their Therapeutic Benefits. **Toxins**, Swiss, v. 15, n. 9, p. 517, 24 Aug. 2023.

RATHORE, A. S.; KUMAR, R.; TIWARI, O. S. Recent advancements in snake antivenom production. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 240, p. 124478, jun. 2023.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, 5 Dec. 2013. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nm.3409. Acesso em: 4 ago. 2025.

ROCHA SOARES, K. S.; CARDOZO FONSECA, J. L.; OLIVEIRA BITENCOURT, M. A.; SANTOS, K. S. C. R.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Serum production against Tityus serrulatus scorpion venom using cross-linked chitosan nanoparticles as immunoadjuvant. **Toxicon**, v. 60, n. 8, p. 1349-1354, Dec. 2012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010112007532. Acesso em: 29 jun. 2025.

ROCHA SOARES, K. S.; OLIVEIRA, A. R.; DANIELE-SILVA, A.; GLAUCIA-SILVA, F.; CARONI, A. L. P.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; DA SILVA-JÚNIOR, A. A. Self-assembled scorpion venom proteins cross-linked chitosan nanoparticles for use in the immunotherapy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 540-548, Sept. 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732217310310. Acesso em: 28 mar. 2025.

ROJAS, G.; JIMÉNEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, [Amsterdam], v. 32, n. 3, p. 351-363, Mar. 1994.

SALAZAR-VALENZUELA, D.; MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, M. L.; LOAIZA-LANGE, A.; GIBBS, H. L.; LOMONTE, B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of Bothrocophias campbelli, a pitviper species from Ecuador and Colombia. **Toxicon**, v. 90, p. 15-25, Nov. 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010114002086. Acesso em: 2 jul. 2025.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, Bothrops jararaca, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, June 2008.

Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010108001104. Acesso em: 8 maio 2025.

SASA, M.; WASKO, D. K.; LAMAR, W. W. Natural history of the terciopelo Bothrops asper (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. **Toxicon**, [Amsterdam], v. 54, n. 7, p. 904-922, Dec. 2009.

SELMANI, A.; KOVAČEVIĆ, D.; BOHINC, K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 303, p. 102640, May 2022.

SENISE, L. V; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. Bothrops jararaca envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 11, p. 1528-1536, 16 Nov. 2015. Disponível em: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370215590818. Acesso em: 23 mar. 2025.

SERRANO, S. M. T.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A. M.; FINK, E. Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of a Serine Proteinase, PA-B J, with Platelet-Aggregating Activity from the Venom of Bothrops jararaca. **Biochemistry**, California, v. 34, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from Bothrops moojeni (caissaca) venom—II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 483-492, Apr. 1993. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004101019390183J. Acesso em: 28 mar. 2025.

SILVA-JÚNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; PESTANA, K. C.; MERCURI, L. P.; DE MATOS, J. R.; DE OLIVEIRA, A. G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 467, n. 1/2, p. 91-98, Jan. 2007.

SOARES, K.; GLÁUCIA-SILVA, F.; DANIELE-SILVA, A.; TORRES-RÊGO, M.; ARAÚJO, N.; MENEZES, Y.; DAMASCENO, I.; TAMBOURGI, D.; DA SILVA-JÚNIOR, A.; FERNANDES-PEDROSA, M. Antivenom Production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Immunoadjuvant. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 158, 16 Apr. 2018. Disponível em: http://www.mdpi.com/2072-6651/10/4/158. Acesso em: 12 abr. 2025.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, Jan. 2012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963911000951. Acesso em: 25 set. 2025.

TAVARES, I. S.; CARONI, A. L. P. F.; NETO, A. A. D.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. **Colloids and Surfaces B**: Biointerfaces, Amsterdam, v. 90, p. 254-258, Feb. 2012.

WALLACH, V.; WILLIAMS, K. L.; BOUNDY, J. **Snakes of the world a catalogue of living and extinct species**. Florida: CRC Press, 2014.

WALTEROS, D.; PAREDES, A. **Vigilancia y Analisis del Riesgo en Salud Pública Protocolo de Vigilancia en Salud Pública**. Colombia: instituto Nacional de Salud, 2014. p. 1–29. (Accidente Ofidico, 11).

WANG, J.; ZHAO, Z.; WANG, Q.; SHI, J.; WONG, D. W.-C.; CHEUNG, J. C.-W. Advancements in Nanoparticle-Based Adjuvants for Enhanced Tuberculosis Vaccination: A Review. **Vaccines**, Basel, v. 12, n. 12, p. 1335, 27 Nov. 2024.

WHO. **WHO guidelines for the production control and regulation of snake antivenom inmunoglobulins**. [*S. l.*]: WHO, 2023. 134 p.

WHO. **WHO guidelines for the production control and regulation of snake antivenom inmunoglobulins**. [*S. l.*]: WHO, 2017. Anexo 5.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226, Jan. 2003. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517302005483. Acesso em: 23 set. 2025.

YAMASHITA, K. M.; ALVES, A. F.; BARBARO, K. C.; SANTORO, M. L. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2814, 15 May 2014. Disponível em: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002814. Acesso em: 28 mar. 2025.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W.; SCHLOM, J.; GREINER, J. W. Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8673-8686, Dec. 2007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X07011930. Acesso em: 8 jul. 2025.

APÊNDICE A – COMITÉ DE ÉTICA MÉXICO E COLÔMBIA

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T Ó N O M A D E M É X I C O

COMITÉ DE BIOÉTICA

CUESTIONARIO GENERAL

1) Título del proyecto:

Comparación entre anticuerpos obtenidos con venenos de vipéridos y anticuerpos obtenidos con inmunógenos recombinantes

2) Clave del proyecto (sistema de comite): **Clave externa:**

497

3) Descripción breve del proyecto:

En sí, este proyecto pretende comparar las características de los anticuerpos generados por venenos de vipéridos e inmuno´genos recombinantes de vipéridos (rBamPLA2 y rBamSer). Los venenos completos generan tanto anticuerpos relevantes e irrelevantes a la toxicidad, lo cual disminuye la concentración de anticuerpos destinados a la neutralización de los venenos. Por otro lado los inmunógenos recombinates son las proteínas responsables de la letalidad, así que la inmunización de conejos con estas proteínas generaría anticuerpos mas eficaces. Esta propuesta pretende contestar esta hipótesis. El grupo de esta´ formado principalmente por dos estudiantes de doctorado inscritos en Programas de Maestri´a o Doctorado de la UNAM. Los estudiantes aprendera´n te´cnicas de biologi´a molecular, expresio´n de protei´nas, plegamiento y ana´lisis biolo´gicos, entre otros me´todos/te´cnicas. El grupo de trabajo es suficientemente apto y grande para realizar la inmunización de los conejos y se tiene el apoyo te´cnico de tres acade´micos de la UNAM (Dra. Clement, Dr. Arenas y Dr. Corzo) del grupo, asi como técnicos del consorcio de "Venenos y Antivenenos". El grado de e´xito, y de llevar a buen fin este proyecto, esta´ respaldado por nuestra trayectoria acade´mica, la que incluye varios reportes internacionales en este tema. El uso de ratones se realizara´ de modo similar al proyecto aprobado No. 411 por el comite´ de bioe´tica del IBt "Expresio´n de protei´nas u´tiles como inmuno´genos o como agentes terape´uticos" (IT200321). Tambie´n, la inmunizacio´n de conejos se realizara´ de modo similar al proyecto aprobado No. 376 por el comite´ de bioe´tica del IBt "Produccio´n de anticuerpos neutralizantes polivalentes contra el veneno de tres escorpiones de panama´" (IN203118).

4) Investigador responsable:

Gerardo Corzo Burguete

5) Instituciones participantes:

6) Inicio y terminación del proyecto

Del 01/01/2024 al 31/12/2026

7) El proyecto involucra trabajo con animales vertebrados o muestras de animales (incluyendo desarrollo de anticuerpos)?

SI

8) El proyecto involucra trabajo con humanos o muestras de humanos?

NO

U N I V E R S I D A D N A C I O N A L A U T Ó N O M A D E M É X I C O

COMITÉ DE BIOÉTICA

Para proyectos de investigación que involucren animales.

1) Justificación del uso de animales en el proyecto.

Para evaluar las propiedades inmunogénicas de venenos completos y/o toxinas y para la producción de anticuerpos se suelen utilizar conejos blancos de la cepa Nueva Zelanda, dado que su tamaño garantiza la producción de suficiente suero y por tanto de anticuerpos.
Para la neutralización de los anticuerpos el modelo más usado es el ratón CD-1; esto debido a su fácil manejo y mantenimiento.

2) Categoría del daño que se provocará en los animales (según reglamento de Bioética).

Categoría B para conejos ya que según nuestra experiencia es un estrés leve en la inyección de los venenos/inmunógenos y en la toma de muestras de sangre.
Categoría E para ratones ya que se realizarán pruebas de toxicidad y pruebas de letalidad.

3) ¿Requiere administrar sustancias tóxicas u organismos patógenos?

Se inyectarán venenos de diferentes especies de vipéridos e inmunógenos recombinantes.

4) Capacitación del personal que realizará los protocolos.

Los estudiantes de doctorado del grupo, quienes conocen los reglamentos del bioterio, y los principios bioéticos, han tomado el curso de manejo de animales de laboratorio impartido por la MVZ. Elizabeth Mata y la MVZ. Graciela Cabeza. Además, el manejo será supervisado por el Biol. Felipe Olvera y el Sr. Ricardo Mondragón. Además se contará con el apoyo de la MVZ. Elizabeth Maya, y la MVZ. Graciela Cabeza.

5) ¿Requiere intervenciones quirúrgicas con supervivencia?

No

6) Métodos de eutanasia y justificación de su empleo.

Los conejos se sacrificarán primeramente utilizando xilacina de 20 mg (dosis: 3 mg/ kg) y ketamina 1000 mg (dosis: 50 mg/ kg) por vía intramuscular. Una vez inconscientes se realizará un desangrado a blanco por punción cardiaca.
Los ratones se sacrificarán por dislocación cervical.

7) ¿El proyecto involucra producir anticuerpos en algún animal?

Sí, la inmunizacio´n de los conejos New Zeland se realizara´ utilizando un esquema de inmunizacio´n disen~ado para este fin (ver anexo enviado en tabla, ya que por este medio no se puede agregar tablas). Se necesitara´n 8 conejos para venenos de vipéridos e inmunógenos recombinantes. Antes de cada inoculacio´n de veneno o la protei´na recombinante, se extraera´ suero para realizar la caracterizacio´n de la respuesta inmune. Los conejos tendrán un peso de 1.5 – 2.0 kg bajo el esquema presentado (ver tabla). La vi´a de administracio´n de cada protei´na recombinante es subcuta´nea en la zona dorsal. Se utilizara´ como adyuvante alumina (ImjectTM Alum) y adyuvante incompleto de Freud (WHO 2017), siguiendo el siguiente esquema.El protocolo de inmunizacio´n comenzara´ con una dosis de 10 microg de protei´na total en adyuvante incompleto ce Freud (IFA) y se aplicaran dosis similares por una semana alternando con hidro´xido de aluminio (AH) e IFA sobre un periodo de 2 meses. Las inmunizaciones se continuaron utilizando desde 10 hasta 500 microgramos durante otros 2 meses ma´s. Los volu´mes de inmunizacio´n sera´n de 500 microL. Se tomara´n sangri´as de 1 microL para observar la evolucio´n de os anticuerpos. Se analizara´n sueros hiperinmunes capaces de neutralizar la accio´n de los venenos de vipéridos.
La metodología para evaluar la capacidad de neutralizacio´n por parte de los anticuerpos producidos se realizara´n pruebas de neutralizacio´n en los ratones de la cepa CD1. Los ensayos se hara´n en grupos de 3 ratones con pesos entre 18-20 gramos. Las muestras se administran por vi´a intravenosa o intraperitoneal. Se empleará una muestra control que corresponde a dos dosis DL50 de la toxina o veneno solubilizados en PBS. La otra muestra es la mezcla de la toxina o los venenos con los anticuerpos a evaluar en donde generalmente se ensayan diferentes concentraciones. Las muestras se incuban por 30 min a 37°C y posteriormente se administran a los grupos de ratones. Se observan durante un di´a y se compara la presencia o no de si´ntomas y la sobrevivencia de los individuos empleados. El nu´mero estimado de ratones a utilizar por muestra es de 12 (4 grupos de 3 ratones).

8) Descripción del trabajo de investigación

Descripción general

Animales que se utilizan.

Metodología

La inmunizacio´n de los conejos New Zeland se realizara´ utilizando un esquema de inmunizacio´n disen~ado para este fin (ver anexo enviado en tabla, ya que por este medio no se puede agregar tablas). Se necesitara´n 8 conejos para venenos de vipéridos e inmunógenos recombinantes. Antes de cada inoculacio´n de veneno o la protei´na recombinante, se extraera´ suero para realizar la caracterizacio´n de la respuesta inmune. Los conejos tendrán un peso de 1.5 – 2.0 kg bajo el esquema presentado (ver tabla). La vi´a de administracio´n de cada protei´na recombinante es subcuta´nea en la zona dorsal. Se utilizara´ como adyuvante alumina (ImjectTM Alum) y adyuvante incompleto de Freud (WHO 2017), siguiendo el siguiente esquema.El protocolo de inmunizacio´n comenzara´ con una dosis de 10 microg de protei´na total en adyuvante incompleto ce Freud (IFA) y se aplicaran dosis similares por una semana alternando con hidro´xido de aluminio (AH) e IFA sobre un periodo de 2 meses. Las inmunizaciones se continuaron utilizando desde 10 hasta 500 microgramos durante otros 2 meses ma´s. Los volu´mes de inmunizacio´n sera´n de 500 microL. Se tomara´n sangri´as de 1 microL para observar la evolucio´n de os anticuerpos. Se analizara´n sueros hiperinmunes capaces de neutralizar la accio´n de los venenos de vipéridos.

Nombre	Raza	Edad	Sexo	Cantidad
Conejos	New Zealand	2 - 4 Mes	Hembra	8

Sedantes, anestésicos y/o analgésicos que se utilizarán.

Medicamento	Dosis	Vía	Frecuencia
Xilacina de 20 mg (dosis: 3 mg/ kg) y ketamina 1000 mg (dosis: 50 mg/ kg)	Xilacina de 20 mg (dosis: 3 mg/ kg) y ketamina 1000 mg (dosis: 50 mg/ kg)	Intramuscular	No aplica

Restricción de movimiento de animales conscientes.

Grado	Tiempo	Dispositivo
Sí, se restringen manualmente por pocos segundos para la realizar la inyección.	Aproximadamente 10 segundos	Manual

Metodología

Para evaluar la capacidad de neutralizacio´n por parte de los anticuerpos producidos se realizara´n pruebas de neutralizacio´n en los ratones de la cepa CD1. Los ensayos se hara´n en grupos de 3 ratones con pesos entre 18-20 gramos. Las muestras se administran por vi´a intravenosa o intraperitoneal. Se empleará una muestra control que corresponde a dos dosis DL50 de la toxina o veneno solubilizados en PBS. La otra muestra es la mezcla de la toxina o los venenos con los anticuerpos a evaluar en donde generalmente se ensayan diferentes concentraciones. Las muestras se incuban por 30 min a 37°C y posteriormente se administran a los grupos de ratones. Se observan durante un di´a y se compara la presencia o no de si´ntomas y la sobrevivencia de los individuos empleados. El nu´mero estimado de ratones a utilizar por muestra es de 12 (4 grupos de 3 ratones).

Nombre	Raza	Edad	Sexo	Cantidad
Ratón	CD-1	1 - 3 Semana	Macho	48

Sedantes, anestésicos y/o analgésicos que se utilizarán.

Medicamento	Dosis	Vía	Frecuencia
No aplica	No aplica	Intramuscular o intravenosa	una sola vez

Restricción de movimiento de animales conscientes.

Grado	Tiempo	Dispositivo
Sí, se restringen manualmente por pocos segundos para la realizar la inyección.	5 segundos	Restricción Manual

Universidad del Cauca | Vicerrectoría de Investigaciones

008

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

CERTIFICA:

Que el proyecto titulado "DESARROLLO DE PROTOTIPO DE ANTIVENENO CONTRA ENVENENAMIENTO CAUSADO POR SERPIENTES BOTHROPS AYERBEI, B. RHOMBEATUS, B. ASPER Y LACHESIS ACROCHORDA, USANDO PARTÍCULAS DE QUITOSANO COMO INMUNOADYUVANTE", registrado en el Sistema de Información de la Vicerrectoría de Investigaciones con ID 6124, dirigido por la investigadora KAREN LEONOR ANGEL CAMILO, al dar cumplimiento a los requerimientos ético legales, fue avalado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca, según acta 6.1-3.24/36 del día 3 de diciembre de 2024.

La presente se expide a solicitud de la parte interesada.

Se firma en Popayán, a los veinte (20) días del mes de junio de dos mil veinticinco (2025).

FRANKLYN FAJARDO SANDOVAL
Presidente
Comité de Ética para la Investigación Científica

Proyectó: Vanessa Ramos