

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/07/2026.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

ELOISA FORNARO CLEMENTE

**Desenvolvimento de uma matriz cromatográfica para
purificação de F(ab')₂ específicas do antiveneno botrópico
comercial.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucilene Delazari dos Santos
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Bruna Cavecci Mendonça

**Botucatu
2024**

ELOISA FORNARO CLEMENTE

DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ CROMATOGRÁFICA PARA
PURIFICAÇÃO DE F(AB')₂ ESPECÍFICAS DO ANTIVENENO BOTRÓPICO
COMERCIAL.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Lucilene Delazari dos Santos
Co-orientadora: Prof^a.Dr^a. Bruna Cavecci Mendonça

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Clemente, Eloisa Fornaro.

Desenvolvimento de uma matriz cromatográfica para purificação de $F(AB')_2$ específicas do antiveneno botrópico comercial / Eloisa Fornaro Clemente. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: Bruna Cavecci Mendonça

Capes: 20801017

1. Antivenenos. 2. Sefarose. 3. Cromatografia em Agarose. 4. Técnicas imunoenzimáticas. 5. Jararaca (Cobra).

Palavras-chave: Antiveneno botrópico comercial; CNBr Sepharose 4B; Cromatografia líquida de afinidade; Ensaio imunoenzimático de fase sólida.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ELOISA FORNARO CLEMENTE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 30 dias do mês de Julho do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ELOISA FORNARO CLEMENTE, intitulada **Desenvolvimento de uma matriz cromatográfica para purificação de F(ab')₂ específicas do antiveneno botrópico comercial**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - Campus Botucatu - Unesp, Prof. Dr. JOÃO PESSOA ARAUJO JUNIOR (Participação Presencial) do(a) Depto. de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. JULIANA MOZER SCIANI (Participação Virtual) do(a) Laboratório de Farmacologia Molecular e Compostos Bioativos / Bragança Paulista - USF. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LUCILENE DELAZARI DOS SANTOS



Aos meus pais Luzia e Ideval, a minha irmã Maria e aos meus primos-irmãos Luciana e Luciano. *O que eu sou, eu sou em par. Não cheguei sozinha, não.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que não tiveram a oportunidade de estudar que eu tive, mas que sempre me incentivaram a seguir esse caminho. Essa dissertação é tão de vocês quanto minha.

À Maria, Luciana, Luciano e Rose, sou grata por sermos família e por todo apoio e carinho ao longo da minha graduação e mestrado. Espero conseguir retribuir tudo o que já fizeram por mim.

À Eloise, por estar sempre no começo, meio e fim de tudo que eu faço. *Te adoro em tudo*, obrigada.

À minha orientadora Dra. Lucilene, por todos os ensinamentos e tempo investidos em mim desde a iniciação científica. Ser sua orientanda foi um grande aprendizado e privilégio.

À minha coorientadora Dra. Bruna, por todo suporte, disponibilidade e paciência com cada fase dessa pesquisa.

Ao IBTEC e em especial às meninas do Laboratório de Proteômica, pela parceria e pela troca de ideias e experiências.

Por fim, agradeço à Unesp e à FAPESP, por possibilitarem as oportunidades acadêmicas que eu tive. Que essas oportunidades, melhoradas, continuem existindo e que infinitas pessoas venham depois de mim.

*“Ousar o risco. Sem chorar, aprendi bem
cedo os versos exemplares: não chores que a
vida é/ luta renhida.”*

Lygia Fagundes Telles

RESUMO

Acidentes ofídicos são uma emergência médica potencialmente fatal resultante do envenenamento por picadas de serpentes. Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, afeta aproximadamente 28 mil brasileiros por ano. As serpentes do gênero *Bothrops* são as mais importantes epidemiologicamente no Brasil e a fisiopatologia desse tipo de acidente inclui mecanismos proteolíticos, coagulantes e hemorrágicos, com manifestações locais e/ou sistêmicas. O único tratamento eficaz é a soroterapia e esta pode levar a efeitos adversos, como reações anafiláticas e doença do soro, que se relacionam às práticas de fabricação e pureza do antiveneno. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma matriz cromatográfica de afinidade capaz de purificar a fração $F(ab')_2$ do antiveneno botrópico comercial que apresenta especificidade com as toxinas do veneno de *Bothrops jararaca* e avaliar a capacidade de ligação antígeno-anticorpo desta fração. Para isso, foi desenvolvida uma matriz cromatográfica de afinidade tendo como ligante específico o veneno de *Bothrops jararaca* acoplado à resina comercial Sepharose CNBr 4B. Em seguida, foram realizados ensaios cromatográficos utilizando a matriz acoplada a um equipamento de baixa pressão a partir da eluição do soro antibotrópico comercial (SABC) e análises por espectrometria de massas para identificar o perfil proteico contido na matriz cromatográfica e da fração $F(ab')_2$ isolada. A avaliação da capacidade de ligação entre toxinas e fração isolada foi realizada através de ensaios de ELISA indireto. Como resultados, a matriz proposta foi capaz de purificar a fração $F(ab')_2$ do SABC que apresenta maior especificidade com as toxinas botrópicas do veneno ofídico. Os fragmentos $F(ab')_2$ purificados e caracterizados proteômicamente possuem 68% de proteínas terapeuticamente relevantes, enquanto o SABC bruto apenas 45%. Os ensaios de ELISA demonstraram que a fração $F(ab')_2$ purificada manteve a capacidade de ligação quando comparada com o SABC. A presente proposta evidencia que a matriz cromatográfica de afinidade elaborada é eficaz na obtenção de anticorpos específicos e estes podem ser utilizados no desenvolvimento de estratégias diagnósticas para acidentes ofídicos brasileiros. Além disso, os achados deste trabalho podem suportar estudos mais aprofundados pelos centros produtores para o enriquecimento dos antivenenos botrópicos comerciais através da inclusão de uma etapa cromatográfica adicional no processo de produção dos mesmos.

Palavras-chave: Antiveneno botrópico comercial; CNBr Sepharose 4B; cromatografia líquida de afinidade; ensaio imunoenzimático de fase sólida.

ABSTRACT

Snakebites are a potentially fatal medical emergency resulting from snake venom poisoning. The World Health Organization (WHO) considers it a neglected tropical disease, affecting approximately 28 thousand Brazilians per year. Snakes of the genus *Bothrops* are the most epidemiologically significant in Brazil, and the pathophysiology of these envenomations includes proteolytic, coagulant, and hemorrhagic mechanisms, with local and/or systemic manifestations. The only effective treatment is serum therapy, which can lead to adverse effects such as anaphylactic reactions and serum sickness, both related to the manufacturing practices and purity of the antivenom. The objective of this study was to develop a chromatographic matrix capable of purifying the F(ab')₂ fraction of commercial *Bothrops* antivenom, ensuring specificity with the toxins of *Bothrops jararaca* venom, and to evaluate the antigen-antibody binding capacity of this fraction. To achieve this, a chromatographic matrix was developed with *Bothrops jararaca* venom as a specific ligand coupled to the commercial resin Sepharose CNBr 4B. Chromatographic analyses were then conducted using the matrix coupled to low-pressure equipment for the elution of commercial antivenom serum (SABC) and mass spectrometry analyses to identify the protein profile of the chromatographic matrix and the isolated F(ab')₂ fraction. The binding capacity was evaluated through indirect ELISA assays. The results showed that the proposed matrix was able to purify the F(ab')₂ fraction of SABC, which has greater specificity for *Bothrops* venom toxins. The purified F(ab')₂ fragments, characterized proteomically, contain 68% therapeutically relevant proteins, compared to 45% in the crude SABC. ELISA assays found that the purified F(ab')₂ fraction maintained binding capacity when compared to SABC. This study demonstrates that an elaborate chromatographic matrix is effective in providing specific antibodies, which can be used in the development of diagnostic strategies for Brazilian snakebites. Furthermore, the results can support further studies by production centers aiming to enrich commercial *Bothrops* antivenoms through the inclusion of an additional chromatographic step in their production process.

Keywords: *Bothrops* antivenom; CNBr Sepharose 4B; Affinity liquid chromatography; Solid-phase enzyme immunoassay.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF - Boas Práticas de Fabricação

BSA - Bovine Serum Albumin

DNT - Doença Tropical Negligenciada

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FL - Fração Ligante

FNL - Fração Não Ligante

IBTEC - Instituto de Biotecnologia

OD - Optical Density

OMS - Organização Mundial da Saúde

PLs - Fosfolipases

SABC - Soro Antibotrópico Comercial

SBE - Snakebite Envenoming

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNACLECs - Snake C-Type Lectins

SUS - Sistema Único de Saúde

SVMPs - Snake Venom Metalloproteinases

SVSPs - Snake Venom Serine Proteinases

TC - Tempo de Coagulação

LISTA DE SOLUÇÕES

A. ELABORAÇÃO DA MATRIZ CROMATOGRÁFICA

Tampão de Acoplamento - NaHCO_3 0,1 M, pH 8,3 com NaCl 0,5 M

Tampão de Bloqueio - Glicina 0,2 M, pH 8,0

Tampão HCl 1mM

B. CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS

Tampão de Eluição - Glicina 0,1 M, pH 2,7

Tampão de Equilíbrio - Fosfato 20 mM, pH 7

C. ENSAIOS DE ELISA

Solução de Parada - H_2SO_4 1M

Solução de Revelação - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina + H_2O_2

Tampão de Bloqueio com BSA - PBS + BSA 5%

Tampão de Bloqueio com Leite - PBS + Leite 5%

Tampão de Incubação com BSA - PBS + Tween-20 0,05% + BSA 5%

Tampão de Incubação com Leite - PBS + Tween-20 0,05% + Leite 5%

Tampão de Lavagem - PBS + Tween-20 0,05%

Tampão de Ligação - Na_2CO_3 0,015 M, NaHCO_3 0,035 M, pH 9,6

Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) - NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10,1 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Acidentes ofídicos.....	13
1.2. Acidentes ofídicos no Brasil	14
1.3. Envenenamento botrópico	16
1.3.1. Composição do veneno botrópico	16
1.3.2. Fisiopatologia.....	17
1.3.3. Sintomatologia e classificação do envenenamento botrópico	18
1.4. Soroterapia	19
1.4.1. Aspectos históricos	19
1.4.2. Produção e controle de qualidade de soros antiofídicos	19
1.4.3. Reações adversas aos soros antiofídicos	22
1.4.4. Limitações da soroterapia	23
1.5. Técnicas biotecnológicas aplicadas à melhoria de soros antiofídicos	24
1.6. Diagnósticos de acidentes ofídicos	26
2. OBJETIVO	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Materiais Biológicos e Aspectos Éticos	29
3.2. Quantificação de Proteínas	29
3.3. Elaboração da Matriz Cromatográfica em Escala Analítica	29
3.4. Elaboração de Matriz Cromatográfica - Fase de Escalonamento	31
3.5. Ensaios de Cromatografia Líquida de Afinidade - Obtenção de F(ab') ₂	32
3.6. Diálise e Liofilização das Frações de F(Ab') ₂	32
3.7. Digestão enzimática das proteínas em solução e identificação por espectrometria de massas.....	32
3.8. Análise dos dados de espectrometria de massas	34
3.9. Avaliação da Capacidade de Ligação da FL, FNL e SABC por Ensaio Imunoenzimático em Fase Sólida (ELISA) Indireto.....	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Elaboração de uma matriz cromatográfica de afinidade.....	36
4.2. Ensaios de Cromatografia Líquida de Afinidade.....	37
4.3. Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas	38
4.4. Ensaios de ELISA (do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	44
4.4.1. Ensaios de ELISA Indireto	44

5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS	55
8. APÊNDICES.....	61
9. MATERIAL SUPLEMENTAR	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos

Acidentes ofídicos são uma emergência médica potencialmente fatal resultante do envenenamento por picada de serpente (*Snakebite Envenoming* - SBE). Em junho de 2017, passou a ser considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) de Categoria A em razão de sua alta taxa de mortalidade e morbidade com predominância nas regiões tropicais e subtropicais, baixo investimento em pesquisas, produção de medicamentos e controle por parte das autoridades sanitárias nacionais e internacionais (1).

A OMS estima que anualmente 5,4 milhões de pessoas são picadas por serpentes no mundo e, dessas, entre 81 mil e 138 mil vem a óbito, enquanto outras 400 mil ficam permanentemente incapacitadas ou desfiguradas (1). Devido a sua natureza ectotérmica, as serpentes são mais abundantes em climas quentes, assim, as regiões do mundo mais afetadas por SBE encontram-se na África Subsaariana, do Sul ao Sudeste Asiático, Papua Nova Guiné e América Latina (2). Os países com baixo Produto Interno Bruto (PIB), baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e baixo investimento em saúde são os mais lesados (3). Nesses locais, o contato entre humanos e serpentes é relativamente comum, particularmente na estação chuvosa, quando a atividade agrícola humana coincide com o período reprodutivo das serpentes (4).

Outros fatores que contribuem para o ofidismo afetar desproporcionalmente os mais pobres, principalmente nas áreas rurais, são: (a) condições de moradias precárias que fornecem barreiras pouco eficazes à entrada de serpentes; (b) o hábito de dormir no chão presente em muitas comunidade que predispõe os moradores a acidentes noturnos; (c) a falta de equipamento agrícola mecanizado que expõe os trabalhadores a picadas enquanto cultivam e pastoreiam; (d) a falta de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como perneiras e calçados apropriados, em razão da inacessibilidade econômica ou desconforto nas condições quentes e úmidas; (e) falta de transporte rápido para centros de saúde e; (f) acesso deficiente ao tratamento eficaz (5).

Em 2019, a OMS iniciou a fase-piloto de seu plano estratégico que tem o propósito de diminuir em 50% os acidentes ofídicos até 2030. Esse plano é dividido em 4 objetivos-estratégicos, sendo eles: educação da comunidade, para que essa seja capaz de se prevenir dos acidentes e ter o conhecimento necessário para socorrer suas vítimas; garantia de tratamento seguro, eficaz e acessível a todos que necessitarem; fortalecimento dos sistemas

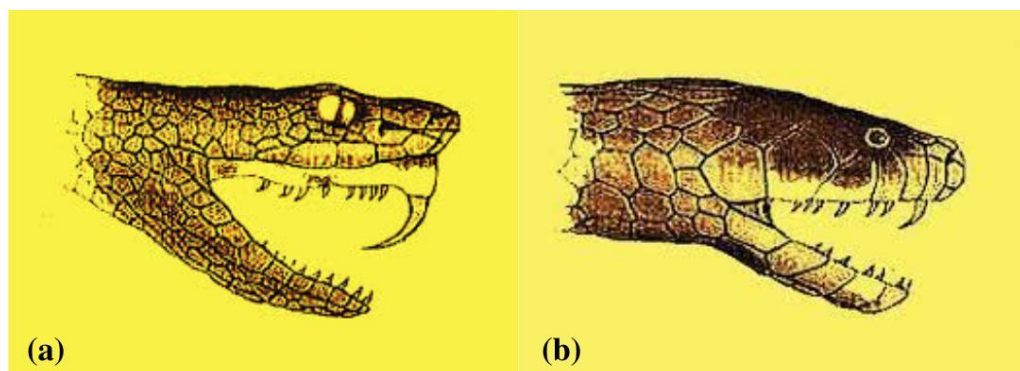
de saúde, assegurando que recursos, informações e profissionais da saúde necessários para o controle de envenenamento por picada de serpente estarão disponíveis e acessíveis; e aumento de parcerias e colaborações, buscando gerar investimento público-privado. A OMS prevê que em 2030, na fase de lançamento completo do plano, todos os países terão acesso às ferramentas e intervenções disponibilizadas pela estratégia e que produtos e processos mais eficazes, seguros e acessíveis para o tratamento de envenenamentos ofídicos estarão disponíveis (1).

1.2. Acidentes ofídicos no Brasil

O Brasil registra anualmente aproximadamente 28 mil casos de acidentes ofídicos por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). A notificação compulsória de ofidismo no Sistema Único de Saúde (SUS) é uma política pública desde 1986, que tem como objetivo subsidiar ações de saúde como o fornecimento e distribuição de antivenenos (6). No entanto, esse número é subestimado devido a subnotificação e insuficiência de dados clínicos e epidemiológicos (7).

As serpentes de interesse em saúde pública no Brasil são pertencentes a duas famílias: Viperidae e Elapidae. A família Viperidae, onde estão as serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, possui glândulas de veneno bem desenvolvidas e de grande porte, com presas grandes e móveis (dentição solenóglifa) e maxilares reduzidos. Por sua vez, a família Elapidae (gênero *Micrurus*) possui 38 espécies descritas no território nacional, com presas inoculadoras pequenas e canaliculadas (dentição proteróglifa) e ausência de fosseta loreal (órgão sensorial termorreceptor) (8).

Figura 1. Dentições em (a) serpente solenóglifa (Viperidae) e em (b) serpente proteróglifa (Elapidae).



Fonte: Manual Educativo “Serpentes da Caatinga: prevenir, sim; matar, não!” LabHerpeto - UFRN

Os acidentes ofídicos brasileiros são divididos em quatro grupos, de acordo com o gênero da espécie causadora: acidentes botrópicos, causados por serpentes do gênero *Bothrops*; acidentes crotálicos, causados pelo gênero *Crotalus*; acidentes laquéuticos, causados pelo gênero *Lachesis*; e acidente elapídico, causado pelo gênero *Micrurus* (8).

Em 2022, o Brasil registrou 283.352 casos de acidentes envolvendo animais peçonhentos - animais capazes de produzir e inocular peçonha - e, destes, 10,12% foram causados por serpentes, resultando em 290 óbitos. A região norte do país concentrou o maior número de notificações 10.285 (35,63%) e os estados que mais notificaram foram Pará 5.695 (19,28%), Bahia 3.002 (10,16%) e Minas Gerais 2.880 (9,75%). Assim como no mundo, a incidência de acidentes ofídicos no Brasil é influenciada por fatores climáticos, socioeconômicos e ambientais. O perfil mais representativo de vítima de ofidismo brasileira é caracterizado por homens autodeclarados pardos de 40 a 49 anos e moradores da zona rural. Ademais, mulheres são mais prováveis de evoluir a óbito, enquanto indígenas apresentam a maior taxa de letalidade (9).

Na Tabela 1 está disponível o número de acidentes por tipo de serpente no ano de 2022.

Tabela 1. Classificação dos Acidentes Ofídicos notificados no Brasil em 2022.

Classificação do Acidente Ofídico	Número de Notificações
Botrópico	19.987
Crotálico	2.331
Elapídico	337
Laquéutico	291
Não-peçonhento	2.050

Fonte: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

O gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae, é o de maior importância epidemiológica no contexto brasileiro e em 2022 foi responsável por 79,95% dos acidentes classificados e por 22,76% (66) dos óbitos pelo agravo (9). As serpentes desse grupo são popularmente conhecidas como jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeira, comboia e caíaca e há aproximadamente 30 espécies e subespécies distribuídas por todo território nacional.

Bothrops erythromelas, *B. leucurus*, *B. muriciensis* e *B. pirajai* são endêmicas no Nordeste; *B. alcatraz*, *B. fonsecai*, *B. insularis*, *B. otavioi* e *B. sazimai* são endêmicas no sudeste; e *B. cotiara*, *B. diporus* e *B. pubescens* são encontrados apenas na região sul. As espécies *B. alternatus*, *B. itapetiningae*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. marmoratus*, *B. neuwiedi* e *B. pauloensis* estão distribuídas da região central ao sul do país, enquanto *B. brazili*, *B. lutzi*, *B. marajoensis*, *B. mattogrossensis* e *B. taeniatus* são encontrados nas regiões centro-norte. *B. atrox*, *B. bilineatus bilineatus* e *B. b. smaragdinus* são comuns na região amazônica. *B. moojeni* é a principal espécie do Cerrado brasileiro (10).

1.3. Envenenamento botrópico

1.3.1. Composição do veneno botrópico

A composição dos venenos botrópicos é rica em proteínas, peptídeos e componentes orgânicos e inorgânicos. As famílias de proteínas mais abundantes são as metaloproteases, fosfolipases e serino-proteases, encontradas na maioria das espécies. Componentes menores, como fosfodiesterases, hialuronidase, nucleotidase, peptidase, inibidor de fosfolipase, aminopeptidases, proteína secretora rica em cisteína (CRISP), desintegrinas e peptídeos, também estão presentes. Proteínas de lectina do tipo C (Snaclecs - *Snake C-type Lectins*) e L-aminoácido oxidase também possuem uma contribuição significativa no veneno, a depender da espécie (11).

As serino proteases de veneno de serpente (*Snake Venom Serine Proteases* - SVSPs) são estruturalmente caracterizadas por um sítio catalítico altamente conservado que inclui um resíduo de serina reativo (Ser195), associado a resíduos de histidina (His57) e aspartato (Asp102). Durante o envenenamento, a ação proteolítica das SVSPs afeta principalmente os processos de hemostasia, interferindo em diferentes pontos de controle da coagulação e desregulando os sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina. A maioria das SVSPs exercem efeitos semelhantes aos da trombina (11).

As metaloproteinases de veneno de serpente (*Snake Venom Metalloproteinases* - SVMs) pertencem a uma subclasse de enzimas dependentes de zinco que são divididas nas classes PI, P-II e P-III, de acordo com seus domínios estruturais. Devido aos seus efeitos proteolíticos, as SVMs desempenham papéis importantes nos eventos hemorrágicos característicos dos acidentes botrópicos. Elas atuam degradando componentes da membrana basal na microvasculatura, causando a ruptura das paredes dos vasos sanguíneos capilares e consequentemente promovendo o extravasamento de sangue (12). Além disso, induzem apoptose, ativam a protrombina e o fator X e inibem a agregação

plaquetária. As SVMPs também estão associadas à resposta inflamatória nos envenenamentos, que culmina na formação de edema, recrutamento de neutrófilos, ativação do sistema complemento e liberação de citocinas como interleucinas 1 β , 6 e 10 (IL-1 β , IL-6 e IL -10, respectivamente) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (13).

As fosfolipases (PLs) são enzimas que participam da hidrólise dos fosfolipídios das membranas e são divididas em cinco classes, A1, A2, B, C e D, de acordo com a especificidade da hidrólise da ligação éster aos fosfolipídios. No veneno botrópico, os grupos presentes são A₂ (PLA₂s) e B (PLB), sendo as PLA₂s o mais abundante. As PLA₂s de veneno de serpente apresentam uma ampla gama de efeitos, que podem ou não estar relacionados à atividade catalítica, como neurotóxico, miotóxico, hemolítico, edematogênico, hiperalgésico, hipotensor, pró-inflamatório, bactericida, anticoagulante e atividades antiplaquetárias (11).

As L-aminoácido oxidases podem inibir a agregação plaquetária e contribuir com os edemas, inflamações, apoptose, hemólise e hemorragia. Por fim, as Snaclecs ligam-se à galactose e induzem agregação plaquetária (14).

1.3.2. Fisiopatologia

O envenenamento botrópico possui três mecanismos de ação fisiopatológicos: proteolítica, coagulante e hemorrágica. (a) Ação proteolítica: também chamada de necrosante, é responsável pelas lesões no local da picada, como edema, bolhas e necrose. Ocorre devido à atividade de proteases, hialuronidases e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno; (b) Ação coagulante: ativação do fator X e da protrombina. O veneno possui também ação semelhante à trombina e é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina. Tais ações trazem consequências à coagulação, caracterizadas por consumo dos seus fatores, geração de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, ocasionando, assim, incoagulabilidade sanguínea. Esse cenário se assemelha ao da coagulação intravascular disseminada, condição patológica onde coágulos são formados dentro dos vasos sanguíneos. Os venenos botrópicos também são capazes de causar alterações da função plaquetária, assim como plaquetopenia; (c) Ação hemorrágica: hemorragias que provocam lesões na membrana basal dos capilares, associadas à plaquetopenia e alterações da coagulação (15).

1.3.3. Sintomatologia e classificação do envenenamento botrópico

O quadro sintomatológico dos acidentes botrópicos é dividido em manifestações locais e sistêmicas. As manifestações locais incluem dor, edema e equimose na região da picada (pode progredir ao longo do membro acometido). As marcas de picada e sangramento nem sempre são visíveis nos pontos de introdução das presas. Bolhas com conteúdo seroso ou sero-hemorrágico podem surgir e originar áreas de necrose, que, juntamente com infecção secundária, constituem as principais complicações locais e podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro. Por sua vez, as manifestações sistêmicas descritas são: sangramentos em pele e mucosas, hematúria, hematêmese e hemorragia em outras cavidades, hipotensão decorrente de sequestro de líquido no membro picado ou hipovolemia consequente a sangramentos, que podem contribuir para o desenvolvimento de insuficiência renal aguda. Tais manifestações auxiliam na classificação do acidente em leve, moderado ou grave (Tabela 2), que por sua vez suportam a terapêutica da condição (16).

Tabela 2. Classificação dos acidentes botrópicos, antivenenos e número de ampolas indicadas diante da gravidade dos acidentes.

Antiveneno	Gravidade	Nº de ampolas
SAB*	Leve: quadro local discreto, sangramento discreto em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação	2 a 4
SABL** ou	Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação	4 a 8
SABC***	Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal, anúria; pode haver distúrbio na coagulação	12

*Soro Antibotrópico (pentavalente); **Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquétrico; ***Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico. Fonte: Centro Nacional De Epidemiologia (Brazil). Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, Df: Ministério Da Saúde, Fundação Nacional De Saúde, Centro Nacional De Epidemiologia; 1998.

7. REFERÊNCIAS

1. Snakebite Envenoming: a Strategy for Prevention and Control [Internet]. World Health Organization; 2019 [cited 2024 May 10]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/324838>
2. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. Winkel K, editor. PLoS Medicine [Internet]. 2008 Nov 4;5(11):e218. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050218>
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nature Reviews Disease Primers. 2017 Sep 14;3(1).
4. Longbottom J, Shearer FM, Devine M, Alcoba G, Chappuis F, Weiss DJ, et al. Vulnerability to Snakebite envenoming: a Global Mapping of Hotspots. The Lancet. 2018 Aug;392(10148):673–84.
5. Harrison R, Gutiérrez J. Priority Actions and Progress to Substantially and Sustainably Reduce the Mortality, Morbidity and Socioeconomic Burden of Tropical Snakebite. Toxins. 2016 Nov 24;8(12):351.
6. Melo C, Câmara JT, Guedes TB. Snakebites in Northeastern Brazil: accessing clinical-epidemiological profile as a strategy to deal with Neglected Tropical Diseases. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical. 2023 Jan 1;56.
7. Mise Y, Lira-da-Silva R, Carvalho F. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. Revista Panamericana de Salud Pública. 2018;1–6.
8. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico [Internet]. 2023 [cited 2024 May 10]. Available from: www.saude.gov.br/svsa
9. Ministério da Saúde. SINAN [Internet]. portalsinan.saude.gov.br. [cited 2024 May 10]. Available from: <http://portalsinan.saude.gov.br/>
10. Costa HC, Bérnils RS. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. Herpetologia Brasileira. 2018;11–57.
11. Mamede CCN, de Sousa Simamoto BB, da Cunha Pereira DF, de Oliveira Costa J, Ribeiro MSM, de Oliveira F. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. Toxicon [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 May 11];187:10–8. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041010120303573?msclkid=8b077740cf2c11ec9221778a2f4d2006>

12. Bernardes CP, Menaldo DL, Camacho E, Rosa JC, Escalante T, Rucavado A, et al. Proteomic analysis of Bothrops pirajai snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *Journal of Proteomics*. 2013 Mar 1;80:250–67.
13. Burin SM, Menaldo DL, Sampaio SV, Frantz FG, Castro FA. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Apr;109:664–71.
14. Larréché S, Chippaux JP, Chevillard L, Mathé S, Résière D, Siguret V, et al. Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of Bothrops Venom-Related Hemostasis Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 May 11];22(17):9643. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9643>
15. Fundação Nacional De Saúde (Brazil). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Ministério Da Saúde, Fundação Nacional De Saúde; 1998.
16. Centro Nacional De Epidemiologia (Brazil). Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, Df: Ministério Da Saúde, Fundação Nacional De Saúde, Centro Nacional De Epidemiologia; 1998.
17. Sant’Anna OA, Faria M. Origens da imunologia: os anti-soros e a caracterização da especificidade na resposta imune. *Rev Med*. 2005 Mar;
18. Cunha LER. Soros Antiofídicos: história, evolução e futuro. *Journal Health NPEPS*. 2017;1–4.
19. Bermúdez-Méndez E, Fuglsang-Madsen A, Føns S, Lomonte B, Gutiérrez JM, Laustsen AH. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. *Toxins* [Internet]. 2018 Nov 2 [cited 2024 May 11];10(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6265855/>
20. Alangode A, Rajan K, Nair BG. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochemical Pharmacology*. 2020 Jul;181:114135.
21. Morais V. Antivenom therapy: efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2018 Feb 28;24(1).

22. León G, Vargas M, Segura Á, Herrera M, Villalta M, Sánchez A, et al. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon*. 2018 Sep;151:63–73.
23. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de Imunização e Doenças Imunopreveníveis . Informe de Distribuição de Imunobiológicos aos Estados. 2023.
24. Instituto Butantan. Bula Profissional da Saúde Soro Antibotrópico. 2022;
25. Williams HF, Layfield HJ, Vallance T, Patel K, Bicknell AB, Trim SA, et al. The Urgent Need to Develop Novel Strategies for the Diagnosis and Treatment of Snakebites. *Toxins* [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2024 May 11];11(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31226842/>
26. Albuquerque PLMM, N. Jacinto C, Silva Junior GB, Lima JB, Veras M do SB, Daher EF. Acute Kidney Injury Caused by Crotalus and Bothrops Snake Venom: A Review of Epidemiology, Clinical Manifestations and Treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [Internet]. 2013 Sep;55(5):295–301. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105065/>
27. Gutierrez JM, Leon G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for Snakebite Envenomings. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 2011 Oct 1;10(5):369–80.
28. Wagstaff SC, Laing GD, Theakston RDG, Papaspyridis C, Harrison RA. Bioinformatics and Multiepitope DNA Immunization to Design Rational Snake Antivenom. Winkel K, editor. *PLoS Medicine*. 2006 Jun 6;3(6):e184.
29. Segura Á, León G, Su CY, Gutiérrez JM, Burnouf T. Assessment of the impact of solvent/detergent treatment on the quality and potency of a whole IgG equine antivenom. *Biologicals*. 2009 Oct;37(5):306–12.
30. Segura Á, Herrera M, González E, Vargas M, Solano G, José María Gutiérrez, et al. Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon*. 2009 May 1;53(6):609–15.
31. Knudsen C, Jürgensen JA, Føns S, Haack AM, Friis RUW, Dam SH, et al. Snakebite Envenoming Diagnosis and Diagnostics. *Frontiers in Immunology*. 2021 Apr 28;12.
32. Theakston R, Laing G. Diagnosis of Snakebite and the Importance of Immunological Tests in Venom Research. *Toxins*. 2014 May 23;6(5):1667–95.

33. Pawade BS, Salvi NC, Shaikh IK, Waghmare AB, Jadhav ND, Wagh VB, et al. Rapid and selective detection of experimental snake envenomation – Use of gold nanoparticle based lateral flow assay. *Toxicon*. 2016 Sep;119:299–306.
34. Liu CC, Yu JS, Wang PJ, Hsiao YC, Liu CH, Chen YC, et al. Development of sandwich ELISA and lateral flow strip assays for diagnosing clinically significant snakebite in Taiwan. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. 2018 Dec 3 [cited 2024 May 11];12(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6292642/>
35. Santos L, Oliveira C, Vasconcelos BM, Vilela D, Melo L, Ambrósio L, et al. Good management practices of venomous snakes in captivity to produce biological venom-based medicines: achieving replicability and contributing to pharmaceutical industry. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2020 Dec 14;24(1):30–50.
36. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* [Internet]. 1976 Jan 29;72(1-2):248–54. Available from: https://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf
37. Laustsen AH, Lohse B, Lomonte B, Engmark M, Gutiérrez JM. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon*. 2015 Sep;104:43–5.
38. Pla D, Rodriguez Y, Calvete JJ. Third Generation Antivenomics: Pushing the Limits of the In Vitro Preclinical Assessment of Antivenoms. *Toxins* [Internet]. 2017 May 10 [cited 2024 May 11];9(5):158. Available from: <https://core.ac.uk/display/84778642>
39. Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*. 2017 Mar;116:84–94.
40. BTG Pharmaceuticals. CroFab.com: The Official Site for US Healthcare Professionals [Internet]. Crofab.com. 2018 [cited 2024 May 11]. Available from: <https://crofab.com/>
41. Sintiprungrat K, Chaisuriya P, Watcharatanyatip K, Ratanabanangkoon K. Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies: Various parameters that can affect the results. *Toxicon*. 2016 Sep 1;119:129–39.
42. Hedayati Ch M, Amani J, Sedighian H, Amin M, Salimian J, Halabian R, et al. Isolation of a new ssDNA aptamer against staphylococcal enterotoxin B based on

- CNBr-activated sepharose-4B affinity chromatography. *Journal of Molecular Recognition*. 2016 Apr 19;29(9):436–45.
43. Mousavi Hosseini K, Nasiri S. Preparation of factor VII concentrate using CNBr-activated Sepharose 4B immunoaffinity chromatography. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* [Internet]. 2015 Jan 28 [cited 2024 Jun 7];29:170. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431444/>
 44. Balkani S, Shamekhi S, Raoufinia R, Parvan R, Abdolalizadeh J. Purification and Characterization of Bovine Serum Albumin Using Chromatographic Method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2016 Dec 22;6(4):651–4.
 45. Pla D, Rodríguez Y, Resiere D, Mehdaoui H, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Third-generation antivenomics analysis of the preclinical efficacy of Bothrofav® antivenom towards Bothrops lanceolatus venom. *Toxicon: X* [Internet]. 2024 Jun 7 [cited 2024 Jun 7];1:100004. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171018300043>
 46. Darkaoui B, Hilal I, Khourcha S, Lafnoute A, Chakir S, Aarab A, et al. Development and Efficacy of the Antivenom Specific to Severe Envenomations in Morocco and North Africa: Advancements in Scorpion Envenomation Management. *Toxins*. 2024 May 4;16(5):214–4.
 47. Botros HG, Grégoire C, Rabillon J, David B, Dandeu J. Cross-antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards specific human IgE and IgG antibodies. *Immunology*. 1996 Jul 1;88(3):340–7.
 48. Moraes J, Magalhães-Gama F, Silva F, Barro M, Araújo N, Hanna F, et al. Avaliação do Perfil de Anafilotoxinas em Pacientes Pediátricos com Leucemia. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* . 2022 Oct 1;44:S340–1.
 49. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*. 2013 Dec;76:63–76.
 50. Segura Á, Herrera M, Villalta M, Vargas, M, Gutiérrez JM, León G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2024 Jun 7];41(2):93–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105612001777>

51. Sutherland SK. Serum Reactions An Analysis Of Commercial Antivenoms And The Possible Role Of Anticomplementary Activity In De-novo Reactions To Antivenoms And Antitoxins. *Medical Journal of Australia*. 1977 Apr;1(17):613–5.
52. Attarde S, Iyer A, Khochare S, Shaligram U, Vikharankar M, Sunagar K. The Preclinical Evaluation of a Second-Generation Antivenom for Treating Snake Envenoming in India. *Toxins* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Jun 7];14(3):168. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/3/168/htm>
53. Nong JF, Huang Z, Huang ZZ, Yang J, Li J, Yang F, et al. Development of sandwich ELISA and lateral flow assay for the detection of Bungarus multicinctus venom. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2023 Mar 30;17(3):e0011165–5.
54. PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE VENENO DE ABELHA NO SORO DO PACIENTE E KIT [Internet]. *vitrinetecnologica.mec.gov.br*. [cited 2024 Jun 7]. Available from: <https://vitrinetecnologica.mec.gov.br/patentes-de-invencao/654-patente654>
55. Rocha G, Farias AS, Alcântara JA, Machado VA, Murta F, Val F, et al. Validation of a Culturally Relevant Snakebite Envenomation Clinical Practice Guideline in Brazil. *Toxins*. 2022 May 28;14(6):376–6.