

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Pedro Riva de Oliveira

Novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento de Antivenenos

São Paulo
2022

Pedro Riva de Oliveira

Novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento de Antivenenos

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientadora: Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski

São Paulo

2022

Catlogação na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Oliveira, Pedro Riva de

Novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento de Antivenenos / Pedro Riva de Oliveira ; orientador(a) Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski - São Paulo, 2022.
50 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Ofidismo 2. Epidemiologia. 3. Antivenenos. 4. Tratamentos I. Chudzinski, Sonia Aparecida de Andrade. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Pedro Riva de Oliveira, aluno do curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____

Justifique:

São Paulo, 30 de janeiro de 2022.



Aluno: Pedro Riva de Oliveira



De acordo:

Orientadora: Sonia Aparecida Andrade Chudzinski

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por sempre apoiarem as minhas escolhas e acreditarem no meu potencial. A vocês, minha eterna gratidão por terem sido essenciais em minhas formações e pelo incentivo em buscar um propósito naquilo que faço;

A minha amada Ingydd Freitas, por todo amor, carinho e incentivo sem o qual não conseguiria ultrapassar momentos difíceis durante o curso;

À Sonia Andrade, por aceitar me orientar durante a Especialização, aos ensinamentos passados, por despertar em mim o sentimento de buscar respostas e melhorias através da pesquisa e pela dedicação incondicional com todos seus alunos;

Ao pessoal do laboratório de Dor e Sinalização Celular, que apesar de pouco tempo de convívio, sempre foram solícitos e receptivos;

Ao pessoal do laboratório de Biofármacos, por receberem o nosso grupo de braços abertos e pela amizade construída ao longo dos meses, compartilhando ideias e conhecimentos, tornando nossa estadia mais leve. Em especial a Dr. Lilian Rumi Tsuruta, pelo apoio no entendimento de técnicas de produção de anticorpos recombinantes.

Ao Centro de Formação de Recursos Humanos Para o SUS/SP (CEFOR) "Dr. Antônio Guilherme de Souza", pelo financiamento deste curso, sem o qual seria impossível de realizar;

E por fim, ao Instituto Butantan – pelo qual carrego enorme admiração pelos serviços prestados. Por ter me aberto às portas durante o período do curso e por despertar em mim, a vontade de, um dia, integrar este local como pesquisador.

"O atraso das ciências econômicas e sociais em relação às ciências da matéria é uma das causas das atuais infelicidades da humanidade. A técnica arrasta o homem para horizontes imprevistos."

Jean Fourastié

RESUMO

OLIVEIRA, Pedro Riva de. **Novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento de Antivenenos**. 2022. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

O envenenamento por serpentes impacta de maneira expressiva na saúde pública devido sua gravidade e frequência. Estima-se que no mundo, 5,4 milhões de picadas de serpentes ocorram anualmente e como consequência, milhares de mortes, amputações e outras incapacidades permanentes. Baseado nas diversas dificuldades e limitações na produção e utilização do antiveneno, novas pesquisas, métodos de obtenção, desenvolvimento e melhorias desses biofármacos são propostas. Entre elas estão a utilização de anticorpos humanos, frações de anticorpos, aptâmeros, pequenas moléculas inibidoras e a utilização de tecnologias “ômicas” para pesquisa de reatividade cruzada. O presente trabalho tem como objetivo abordar os principais impactos do ofidismo no mundo, os problemas relacionados ao tratamento atual e quais diretrizes podem ser adotadas com estratégias inovadoras, a fim de minimizar esse problema mundial de saúde pública. O estudo foi realizado através de uma revisão narrativa, de abordagem qualitativa e profundidade exploratória, sobre a temática das principais perspectivas para o futuro no combate ao ofidismo. Foi possível observar que para a geração desses novos biofármacos, ações como investimentos, sejam governamentais ou do setor privado e o melhor conhecimento das serpentes/venenos de cada região são necessárias.

Palavras-chave: Envenenamento. Antiveneno. Novas Perspectivas. Epidemiologia. Tratamento.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Pedro Riva de. **Novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento de Antivenenos**. 2022. 50 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Snakebite envenoming has a significant impact on public health due to its severity and frequency. It is estimated that worldwide, 5.4 million snake bites occur annually and, as a consequence, thousands of deaths, amputations and other permanent disabilities. Based on the various difficulties and limitations in the production and use of antivenom, new research, methods of obtaining, developing and improving these biopharmaceuticals are proposed. Among them are the use of human antibodies, antibody fractions, aptamers, small inhibitory molecules and the use of “omics” technologies for cross-reactivity research. The present work aims to address the main impacts of snakebite in the world, the problems related to the current treatment and which guidelines can be adopted with innovative strategies in order to minimize this global public health problem. The study was carried out through a narrative review, with a qualitative approach and exploratory depth, on the theme of the main perspectives for the future in the fight against snakebite envenoming. It was possible to observe that for the generation of these new biopharmaceuticals, actions such as investments, whether governmental or from the private sector, and a better knowledge of the snakes/venoms of each region are necessary.

Keywords: Envenoming. Antivenom. New Perspectives. Epidemiology. Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica do número estimado de envenenamentos por serpentes e mortes anuais.	12
Figura 2 - Espécies responsáveis pela maior taxa de mortalidade e morbidade em humanos e sua distribuição geográfica.	14
Figura 3 - Modos de neutralização da toxina pelo anticorpo.	16
Figura 4 - Processo de fabricação do antiveneno.	17
Figura 5 - Extração manual de veneno de serpentes.	19
Figura 6 - Processos de fabricação do antiveneno.....	23
Figura 7 – Possíveis efeitos adversos do antiveneno derivado do plasma animal. ..	27
Figura 8 - Produção de toxinas recombinantes e antiveneno utilizando tecnologia de phage display.	29
Figura 9 - Ilustração esquemática de ferramentas bioquímicas, bioinformáticas e "ômicas" que podem auxiliar a produção de antivenenos.	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OFIDISMO NO MUNDO	12
3 ANTIVENENO	15
3.1 Histórico	15
3.2 Princípio de Ação	16
3.3 Processos de Fabricação	17
3.3.1 Definição do Escopo	17
3.3.2 Produção do <i>pool</i> de veneno de referência	18
3.3.3 Obtenção do Plasma Hiperimune	20
3.3.4 Purificação das Imunoglobulinas	21
3.3.5 Formulação	23
3.3.6 Estabilização por Liofilização	23
3.3.7 Controle de Qualidade e Produto Final	24
3.3.8 Problemas de Reprodutibilidade Associados à Produção	24
3.4 Limitações	25
3.5 Instabilidade	25
3.6 Reações Adversas	26
4 NOVAS PERSPECTIVAS DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ANTIVENENOS	27
4.1 Anticorpos Humanos	27
4.2 Tecnologias Baseadas em Proteínas, Peptídeos e Oligômeros	29
4.3 Terapias Utilizando Pequenas Moléculas	30
4.4 Pesquisa por Reatividade Cruzada de Antivenenos	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O envenenamento por picada de serpentes é um problema que assola diversas comunidades no mundo, especialmente as regiões rurais de países tropicais e subtropicais, causando efeitos como hemorragia, paralisia, lesões renais e danos a músculos e outros tecidos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). O ofidismo tem um grande impacto na saúde pública devido sua gravidade e frequência. Estima-se que no mundo, 5,4 milhões de picadas de serpentes ocorram anualmente e como consequência, milhares de mortes, amputações e outras incapacidades permanentes (WHO, 2021). No Brasil, apenas em 2018, 28.961 pessoas estiveram envolvidas em casos de ofidismo e dessas 105 vieram a óbito, uma incidência, portanto, de 13,8 casos/100 mil habitantes e letalidade de 0,4% (BRASIL, 2021).

Apesar dos avanços alcançados via utilização de novas tecnologias, o ofidismo ainda impacta de maneira significativa a sociedade e os sistemas de saúde, o que eleva demasiadamente os custos de assistência, logística e tratamento, especialmente nos continentes asiático, africano, oceânico e latino americano. Embora, o envenenamento por serpentes tenha números expressivos ao redor do mundo, suas métricas não são muito precisas, visto à subnotificação de casos (WILLIAMS *et al.*, 2019).

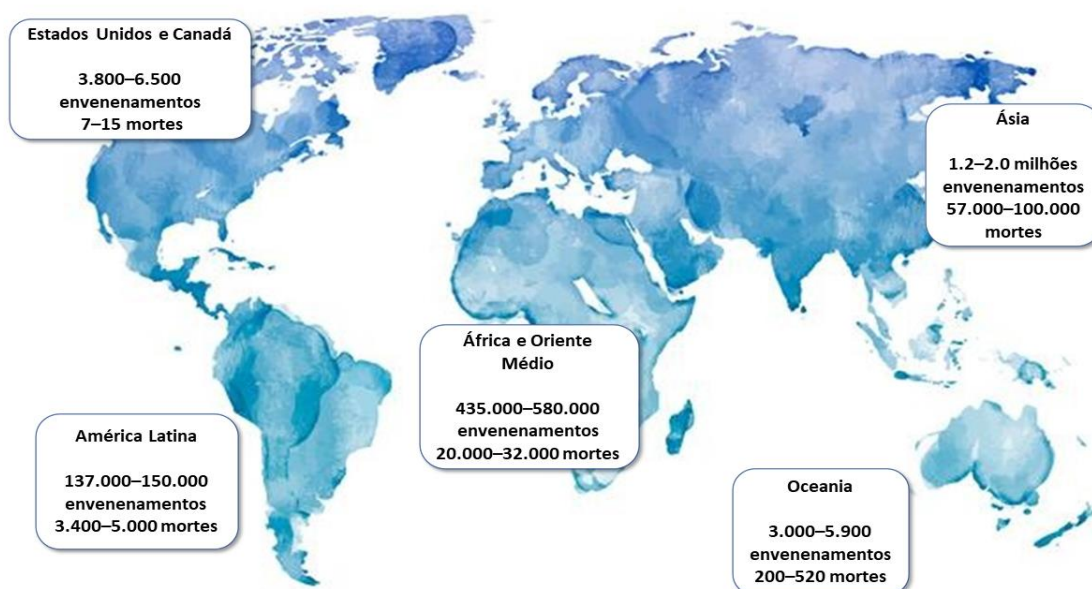
A Organização Mundial da Saúde (OMS) voltou a considerar o ofidismo, em 2017, como uma doença tropical negligenciada (DTN) de maior prioridade. Tal decisão é de suma importância e atrai novos esforços e novas estratégias na produção de antivenenos, melhoria do tratamento atual e no desenvolvimento de novos, mais eficazes (WHO, 2019).

O presente trabalho tem como objetivo abordar os principais impactos do ofidismo no mundo, os problemas relacionados ao tratamento atual e quais diretrizes podem ser adotadas com estratégias inovadoras, a fim de minimizar esse problema mundial de saúde pública. O estudo foi realizado através de uma revisão narrativa, de abordagem qualitativa e profundidade exploratória, sobre a temática das principais perspectivas para o futuro no combate ao ofidismo. As buscas foram realizadas no banco de dados PubMed utilizando as palavras-chave: “*snakebite*”, “*snake antivenom*”, “*envenomation treatment*”, “*snake venom toxins*”, “*antivenom development*”, “*antivenom reactions*” e “*antivenom neutralization*”.

2 OFIDISMO NO MUNDO

O ofidismo possui grande impacto no mundo, especialmente em países com climas tropicais e subtropicais, devido a um conjunto de fatores, como avanço populacional em áreas densamente habitadas por serpentes venenosas, falta de conhecimento, condições precárias de habitação, ausência de equipamentos de proteção básica e baixo acesso ao atendimento de maneira rápida e eficaz (FRY, 2018). As regiões mais afetadas são a África Subsaariana, Sul e Sudeste Asiático, Papua Nova Guiné e América Latina. Apenas na Índia ocorrem cerca de 58.000 mortes anualmente e no continente Africano, essa taxa pode variar entre 3.500 a 32.000. Contudo, outras regiões como América do norte, Europa e Oceania, possuem menor incidência de acidentes ofídicos em virtude do clima, distribuição geográfica da população (de modo a evitar encontros com serpentes venenosas) e pelas condições de moradia e desenvolvimento social (Figura 1) (HALILU *et al.*, 2019; SURaweera *et al.*, 2020).

Figura 1 - Distribuição geográfica do número estimado de envenenamentos por serpentes e mortes anuais.



Fonte: Adaptado de GUTIÉRREZ *et al.*, 2017.

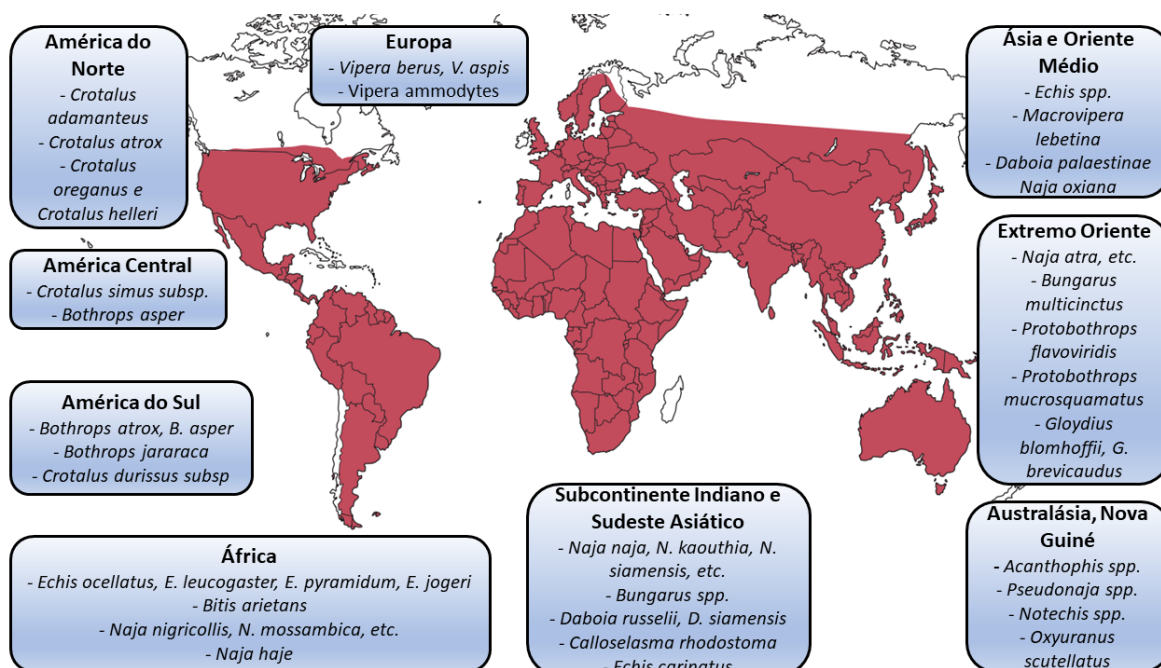
As vítimas são em sua grande maioria, do sexo masculino, de 15 a 49 anos. Os impactos causados por estes acidentes podem ter consequências desoladoras,

como comprometer a sobrevivência de uma família inteira, visto que, geralmente o acidentado é o mantenedor, e assim, torna-se incapaz por tempo indeterminado, a depender da gravidade, do socorro e do tratamento recebido. Os primeiro-socorros no momento do acidente são cruciais para o sucesso no tratamento. Contudo, atos ineficazes, como o uso de torniquetes, o corte ou queima do local, uso de ervas no local da picada, choque elétrico, sucção, uso de conhecimentos empíricos ou de líderes religiosos na comunidade, ainda são utilizados em países que sofram da doença (MOOS *et al.*, 2021). Soma-se a esses fatores a falta e/ou problemas de transporte para chegar aos postos médicos, os altos custos do tratamento e/ou falta de confiança no tratamento. Neste cenário, as taxas de morbidade e mortalidade da doença aumentam a cada ano (KADAM *et al.*, 2021).

Devido à grande extensão geográfica que as serpentes habitam no planeta (Figura 2), a variedade de espécies que despertam interesse clínico ao causarem o acidente é grande. Esta grande variedade de espécies também dificulta na minimização dos eventos ocasionados pela doença, visto que o veneno varia em sua composição de maneira intra e interespecífica (CASEWELL *et al.*, 2020). As espécies que causam o maior número de acidentes são as do gênero *Daboia* spp. (Ásia), *Echis* spp. (África), *Pseudonaja* spp. (Oceania), *Vipera* spp. (Europa), *Bothrops* spp. e *Crotalus* spp. (Américas) (WARREL, 2014).

A produção mundial de antiveneno é heterogênea de modo que os produtores de antivenenos diferem pela variabilidade das plataformas de produção, treinamento de profissionais capacitados, volume e regiões de abrangência. A necessidade de algumas melhorias como melhorar a capacidade de laboratórios já existentes, programas de transferência de tecnologia para produção e o comprometimento de laboratórios já consolidados em fornecer as doses para os locais mais necessitados, são alguns dos pontos a serem melhorados (GUTIÉRREZ, 2012).

Figura 2 - Espécies responsáveis pela maior taxa de mortalidade e morbidade em humanos e sua distribuição geográfica.



Fonte: Adaptado de WARRELL, 2014.

O único tratamento disponível é o antiveneno formulado a partir do plasma hiperimune de grandes mamíferos. No entanto, os antivenenos apresentam algumas limitações, como a parcial neutralização de alguns componentes do veneno, baixa eficácia contra os efeitos locais do envenenamento e grande quantidade de anticorpos irrelevantes na composição. Além disso, a variação na qualidade de produção dos antivenenos, pode causar reações adversas e piorar o quadro clínico do acidentado (KUNIYOSHI et al., 2012; KUNIYOSHI et al., 2017; DE SILVA et al., 2016). Neste cenário de envenenamento e limitações do tratamento, a busca por meios alternativos para sanar os problemas oriundos do ofidismo é muito importante e necessária. Vários esforços por parte de laboratórios públicos e privados têm sido empenhados ao redor do mundo. Porém, ainda em alguns países, esses problemas ainda persistem e o antiveneno/tratamento não estão facilmente disponíveis ou totalmente inacessíveis para as vítimas (HABIB et al., 2020).

3 ANTIVENENO

O antiveneno é o único biofármaco aceito pela OMS como tratamento dos acidentes ofídicos e tem salvado milhares de vidas por mais de um século. O tratamento do acidente ofídico deve seguir um protocolo, de acordo com o diagnóstico e severidade do envenenamento. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) oferece um manual que auxilia o profissional da saúde quanto à gravidade do acidente, como a terapia a ser utilizada (BRASIL, 2001).

Entretanto, há uma série de problemas associados a esse produto como: baixa estabilidade na forma líquida, reações adversas, baixa eficácia em alguns casos, e dificuldades na produção. Esses problemas, normalmente são potencializados em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2016b).

3.1 Histórico

Em um meio a diversas pesquisas relacionadas ao entendimento de toxinas bacterianas e dos venenos animais, seus efeitos e compreensão da resposta imune, a soroterapia foi descoberta como tratamento para picadas de animais peçonhentos. Esse importante achado ocorreu primordialmente na França, em 1894, de forma paralela entre três pesquisadores: Césaire Auguste Phisalix, Gabriel Bertrand e Albert Calmette. Vital Brazil Mineiro da Campanha foi quem liderou as pesquisas no Brasil, e foi o primeiro a descrever a especificidade dos venenos e da importância de antivenenos para diferentes espécies (BOCHNER, 2016).

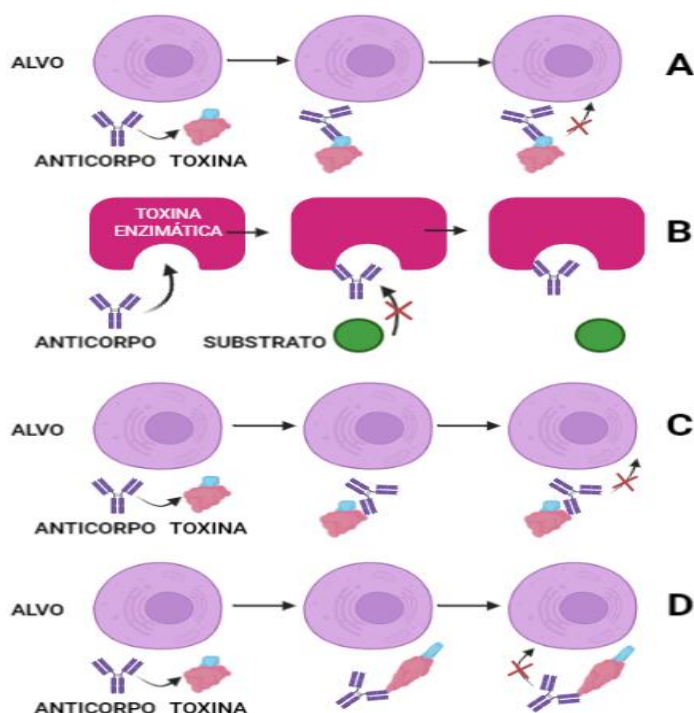
Desde então, a administração do antiveneno é o tratamento recomendado pela OMS para o acidente ofídico. O soro (antiveneno) antiofídico é definido como “uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equídeos hiperimunizados, contra o veneno da serpente a que se refere” (BRASIL, 1996). No Brasil, o Ministério da Saúde é o responsável pela distribuição dos antivenenos pelo território nacional, os quais são produzidos por quatro laboratórios: Instituto Butantan (IBu - SP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED - MG), Instituto Vital Brazil (IVB-RJ) e o Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI - PR) (FAN *et al.*, 2019).

3.2 Princípio de Ação

O veneno das serpentes é uma mistura especializada de diferentes toxinas, proteínas e enzimas, com uma ampla gama de propriedades. Isso resulta em diferentes sintomas após o envenenamento, de lesão local a efeitos sistêmicos, como coagulopatia de consumo, paralisia neuromuscular, lesões renais, colapso cardiovascular (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Essas toxinas agem por interação molecular com seus respectivos substratos. O princípio de ação de um antiveneno é ligar-se ao sítio antigênico de toxinas, neutralizando suas ações. A neutralização das toxinas pode acontecer como demonstrado na figura 3 (SILVA; ISBISTER, 2020).

Figura 3 - Modos de neutralização da toxina pelo anticorpo.



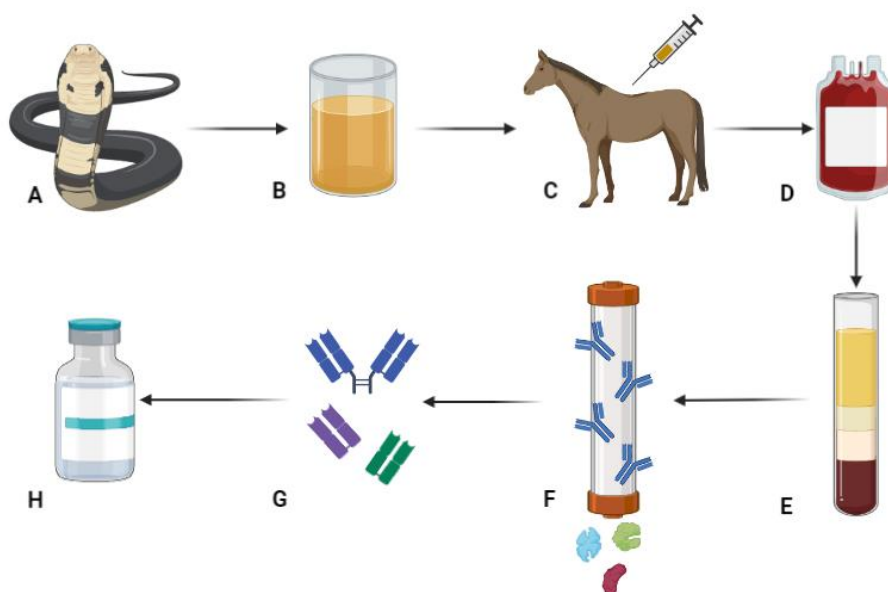
Fonte: SILVA; ISBISTER, 2020.

(A) Inibição direta de toxinas não-enzimáticas: O anticorpo interfere no sítio ativo da toxina, inibindo sua ligação ao alvo; **(B) Inibição direta de toxinas enzimáticas:** O anticorpo se liga ou altera a conformação do sítio catalítico da enzima, inibindo a clivagem do substrato; **(C) Inibição por impedimento estérico:** O anticorpo se liga em uma região próxima do sítio ativo da toxina, inibindo sua ligação ao alvo; **(D) Inibição alostérica:** O anticorpo se liga a um sítio distal da toxina, induz mudanças conformacionais e diminui e/ou inibe a ação enzimática da proteína.

3.3 Processos de Fabricação

A produção de antivenenos deve seguir padrões de confiabilidade, identificação, pureza, perfis de segurança e eficácia de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Após validação clínica, a produção em larga escala requer a estruturação de implementação de processos, tais como: produção de venenos de referência e do plasma hiperimune, purificação das imunoglobulinas, formulação do antiveneno, estabilização da formulação e controle de qualidade. O processo para obtenção do antiveneno, de maneira simplificada, pode ser observado na figura 4 (LEÓN *et al.*, 2018).

Figura 4 - Processo de fabricação do antiveneno.



Fonte: (LEÓN *et al.*, 2018)

(A) Seleção da espécie de interesse; **(B)** Obtenção do veneno; **(C)** Imunização do equino; **(D)** Sangria e plasmaférese; **(E)** Obtenção do plasma; **(F)** Separação de anticorpos IgG; **(G)** Tratamento para obter as porções F(ab')₂ ou Fab; **(H)** Concentração, formulação e envase.

3.3.1 Definição do Escopo

Antes da formulação do antiveneno uma análise criteriosa por parte dos produtores deve ser realizada. Critérios, como conhecimento das serpentes de maior interesse médico dessa região, as composições de seus venenos e do antiveneno necessário devem ser adotados. A variabilidade da composição do veneno e da sua antigenicidade ocorre entre serpentes da mesma espécie, que habitam diferentes

regiões, e ainda por idade, tamanho e tipo de alimentação. Portanto, os venenos para a hiperimunização devem ser coletados de espécies de diferentes locais, de diferentes sexos e idades, o que gerará um antiveneno com maior capacidade de neutralização (CASEWELL *et al.*, 2020).

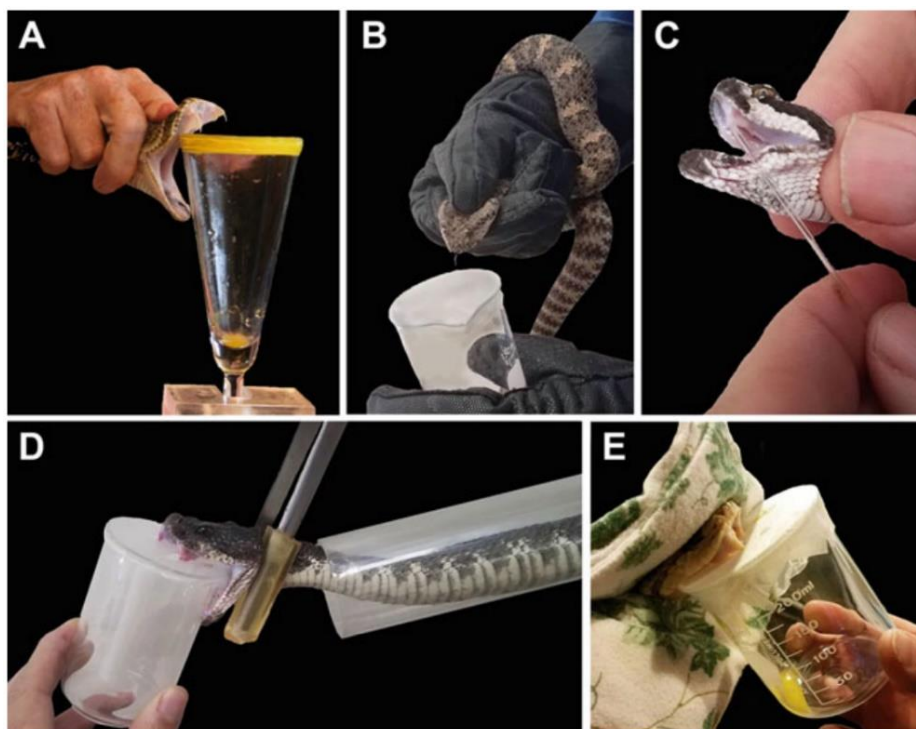
Definido o escopo das espécies que irão compor o antiveneno, a decisão passa a ser quanto ao espectro de ação. Os antivenenos monoespecíficos são efetivos apenas para uma espécie. Sua utilização se restringe a área da espécie responsável pelos acidentes. Já a produção de antivenenos poliespecíficos deriva da inoculação de uma mistura de venenos de espécies relevantes e sequente obtenção do plasma, da mistura do plasma de diferentes animais imunizados por venenos específicos ou da mistura de antivenenos monoespecíficos. De modo geral, visto a abundância e variedade de espécies de interesse médico (RAWWEERITH; RATANABANANGKON, 2005), em países tropicais, os antivenenos poliespecíficos oferece vantagens econômicas na produção e maior cobertura de acidentes (WHO, 2016b).

3.3.2 Produção do *pool* de veneno de referência

Após a análise física e hematológica do animal, o veneno de interesse é obtido de forma manual via estimulação mecânica da glândula de veneno de espécies cativas ou selvagens (Figura 5). Durante este processo, pode ser observado diferença na quantidade obtida, de modo que impacte na produção e seja necessário um maior número de espécies para atingir um volume adequado (GÓMEZ *et al.*, 2016; SASA *et al.*, 2017).

De forma ideal, a composição relativa da mistura do veneno de referência é determinada por análises bioquímicas e toxicológicas, tais como cromatografias e eletroforeses. Contudo, na impossibilidade, a quantidade de animais e de regiões selecionados é arbitrária (GUTIÉRREZ, 2018). Para a produção de venenos em larga escala considera-se a quantidade necessária para a imunização e para os testes de controle de qualidade e ainda a produção de veneno pelo animal em cativeiro. Durante o processo de obtenção do veneno, pode ser observado diferenças nas quantidades obtidas por diferentes espécies (SANTOS *et al.*, 2021).

Figura 5 - Extração manual de veneno de serpentes.



Fonte: HAYES; FOX; NELSEN, 2020

(A) Extração com mãos nuas pressionando a boca da serpente contra fraco coberto por membrana, incentivando a mordida; **(B)** Extração auxiliada pelo uso de luvas de proteção (não necessariamente à prova de picadas); **(C)** Extração por inserção da presa em tubo capilar; **(D)** Extração com serpente imobilizada em cilindro transparente com auxílio de fórceps; **(E)** Extração com auxílio de toalha de pano dobrada, quando a serpente não expulsa o veneno espontaneamente é utilizada compressão mecânica das glândulas de veneno.

Após a obtenção do veneno, para evitar degradação de seus componentes, esse deve ser congelado e condicionado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até estabilização. Assim, os venenos mantêm suas propriedades antigênicas por longos períodos (HATAKEYAMA *et al.*, 2018). A estabilização do veneno pode ser alcançada pelo método de dessecação ou liofilização. Na dessecação é aplicada pressão negativa ao veneno em estado líquido para evaporação das moléculas de água. Contudo, esta técnica pode promover a denaturação de proteínas, e perda de atividade enzimática e antigenicidade. Já na liofilização, o veneno congelado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, é submetido a pressão negativa, o que causa a sublimação das moléculas de água, de forma mais sublime. O controle de qualidade do veneno se faz necessário para garantir a qualidade do antiveneno (WHO, 2016b).

3.3.3 Obtenção do Plasma Hiperimune

Os cavalos e as ovelhas são as grandes “fontes” de imunoglobulinas para a produção de antivenenos. Ainda em fases experimentais alguns antivenenos estão em desenvolvimento via imunização de camelídeos. De grande potencial para compor futuros antivenenos, os anticorpos são mais estáveis, o que é de grande valia, sobretudo em países tropicais e com deficiências de infraestrutura (BRILHANTE-DA-SILVA *et al.*, 2021). Durante o processo de imunização, injeções por via subcutânea (a mais utilizada) de um veneno e/ou de misturas, são realizadas repetidamente nesses animais, para induzir a produção de anticorpos neutralizantes (DA SILVA; TAMBOURGI, 2011).

A produção de anticorpos pode ser aumentada ao adicionar adjuvantes imunológicos, como adjuvante completo de Freund e/ou sais minerais (hidróxido de alumínio e fosfato de cálcio) à mistura de venenos (OLMEDO *et al.*, 2014; VALVERDE *et al.*, 2017). Entretanto, seu uso pode causar efeitos adversos ao animal imunizado, como lesão local do tecido, granulomas, abscessos, entre outros. Portanto, os adjuvantes devem ser utilizados apenas nas primeiras injeções do cronograma, o que minimiza o desconforto dos animais e produzir uma melhor resposta neutralizante (WHO, 2016b). Novos adjuvantes, como lipossomos e nanopartículas demonstram grande potencial de uso, pois induzem melhor resposta imune e diminuem a lesão local do tecido. Vale mencionar que, alguns produtores não utilizam adjuvantes, apenas o veneno solubilizado em solução salina (LEÓN *et al.*, 2018).

Após o processo de imunização, os animais são averiguados, pela condição física, ausculta do sistema cardiorrespiratório e digestório, avaliação da mucosa gengival e valores de hemoglobina e hematócrito. Feito isso, o sangue contendo os anticorpos é coletado dos animais em boas condições de saúde. Além disso, para evitar o desenvolvimento de anemias, realiza-se transfusão sanguínea após os cronogramas de coleta (LEÓN *et al.*, 2018). Fator essencial nesta parte da produção do antiveneno, a assepsia durante os processos supracitados é determinante para a qualidade e a baixa contaminação microbiológica por endotoxinas (WHO, 2016b).

3.3.4 Purificação das Imunoglobulinas

A primeira geração “bruta” de antiveneno é composta pela porção total do anticorpo; enquanto a segunda geração é formada por uma mistura de imunoglobulinas já purificadas das proteínas plasmáticas por cromatografia (MORAIS; MASSALDI, 2009). A terceira geração de antiveneno é alcançada pela digestão enzimática da porção Fc com papaína ou pepsina. A utilização da papaína na digestão cliva as ligações da região de “dobradiça” resultando em fragmentos Fab, enquanto a pepsina mantém essas regiões, formando fragmentos F(ab')₂ (THEAKSTON *et al.*, 2003).

Atualmente, existe uma diversidade de métodos para purificar imunoglobulinas oriundas de plasma hiperimune em escala industrial (Figura 6) (por exemplo, digestão por pepsina, precipitação ácida e/ou pela adição de sais, cromatografia e ultrafiltração) (WHO, 2016b).

A digestão do plasma equino com pepsina é realizada para eliminar outras proteínas presentes no plasma, como fibrinogênio e albumina, e para remover o fragmento Fc de imunoglobulinas, e assim obter fragmentos F(ab')₂. Por outro lado, usa-se papaína nessa etapa na produção de imunoglobulinas de ovelhas, onde obtém-se porções Fab (LÉON *et al.*, 2018). Assim como o antiveneno CroFab, específico para serpentes de interesse na América do Norte.

Após a digestão enzimática do plasma, as proteínas não neutralizantes são denaturadas frequentemente via termocoagulação (PÉPIN-COVATTA *et al.*, 1997).

Normalmente, a precipitação diferencial de proteínas plasmáticas ocorre por adição de sais, como sulfato de amônio (*salting-out*) e é considerada uma etapa preliminar de purificação, a cromatografia um método físico-químico de separação com maior resolução, independente se a molécula a ser purificada é IgG ou F(ab')₂ (LÉON *et al.*, 2018).

Dentre outros métodos de separação prévios à cromatografia, estão a precipitação por ácido caprílico (MORAIS *et al.*, 2014) e sistemas aquosos bifásicos, que utilizam cloreto de sódio, fosfato de sódio e polietilenoglicol. Esse último método é mais eficaz em relação a precipitação proteica, gerando maior pureza e o rendimento. Contudo, esse método somente foi utilizado em produções testes para ensaios pré-clínicos (VARGAS *et al.*, 2015).

Método físico-químico de separação de misturas, na cromatografia, os componentes migram por de maneiras diferentes, de acordo com as interações entre a fase móvel e estacionária (AMORIM, 2019).

A cromatografia de troca iônica é utilizada por alguns fabricantes para aumentar a pureza de IgGs ou fragmentos F(ab')₂ após etapas de purificação primárias, como digestão enzimática, precipitação com sais e/ou ácido caprílico (JONES E LANDON, 2002; RAWEERITH E RATANABANANGKOON, 2003). Após a purificação primária, os anticorpos constituem mais de 90% de proteínas totais. A cromatografia de troca aniônica (por exemplo, DEAE ou géis de amônio quaternário, a pH 7,0-8,0), é o método mais frequente utilizado; os contaminantes se ligam a fase estacionária, enquanto as imunoglobulinas são eluídas na fração não retida. Em contraste, na cromatografia de troca catiônica (por exemplo, usando trocadores como carboximetil ou ácido sulfônico, pH de 4,0-5,0) as imunoglobulinas se ligam a fase estacionária, sendo assim um método menos pragmático (Gutiérrez et al., 2011).

Uma vantagem da cromatografia de troca aniônica é a remoção de endotoxinas, que gera riscos na fabricação do antiveneno, durante o processo de sangria do animal doador, na separação do plasma ou na purificação de imunoglobulinas, podendo permanecer na preparação após a etapa de purificação primária (LEE *et al.*, 2003).

Por outro lado, a cromatografia de afinidade tem sido sugerida como uma alternativa para purificar imunoglobulinas. Nesse tipo de cromatografia, o plasma hiperimune diluído e microfiltrado (digerido ou não), contendo IgG ou fragmento purificado é submetido a purificação utilizando uma fase estacionária, que tem componente(s) do veneno imobilizado(s) em uma matriz (normalmente *sepharose*) ativada. O antiveneno tem afinidade de ligação ao veneno e assim fica “retido” a fase estacionária, enquanto o restante do material é eluído na solução não ligada. Em seguida, as imunoglobulinas são eluídas usando pH baixo ou mudanças na força iônica do sistema tamponante (LÉON *et al.*, 2018).

As imunoglobulinas obtidas por cromatografia de afinidade são recuperadas com pureza e rendimento superior a 97% (SEGURA *et al.*, 2013). Contudo, esse método é caro e requer altas quantidades de veneno.

Figura 6 - Processos de fabricação do antiveneno.



Fonte: Adaptado de MONACO (org), 2018

(A) Centrifugação – etapa de purificação do plasma hiperimune; **(B)** Concentração do soro; **(C)** Filtração ultramolecular.

3.3.5 Formulação

Após a purificação, a concentração das imunoglobulinas deve ser ajustada de acordo com as especificações de neutralização e potência. Feito isso, o antiveneno é formulado com a adição de sais, como o cloreto de sódio e/ou outros produtos como osmólitos, glicina e manitol. O pH é acertado entre 7,2-7,4, para manter as características físico-químicas das imunoglobulinas (HERRERA *et al.*, 2017).

3.3.6 Estabilização por Liofilização

O processo consiste em três etapas: congelamento, sublimação e dessorção. A estabilidade dos antivenenos depende da qualidade da formulação, liofilização e condições de acondicionamento (WHO, 2016b).

A liofilização é uma das maneiras de estabilizar e prevenir a denaturação térmica do antiveneno. Além disso, minimiza a dependência de refrigeração, como ocorre na formulação líquida. A obtenção de antivenenos na forma liofilizada seria de grande valia nas regiões mais remotas do mundo com altos índices de ofidismo. Contudo, o processo de liofilização altera o potencial de neutralização das imunoglobulinas (MENDONÇA-DA-SILVA *et al.*, 2017).

3.3.7 Controle de Qualidade e Produto Final

O controle de qualidade deve ser integrado durante todo o processo de fabricação do antiveneno. Deve-se garantir a limpeza das salas, qualidade da água utilizada, sanitização dos equipamentos de produção, a qualidade das matérias primas, entre outros processos. O antiveneno é um produto muito variável; um maior título de imunoglobulinas não necessariamente garante a maior eficácia. Deve-se aplicar Boas Práticas de Fabricação (BPF) e boas metodologias, a fim de minimizar os antivenenos com qualidade abaixo da média, que apresentam baixa eficácia e segurança (PATRA *et al.*, 2021). De maneira geral, para se obter um antiveneno de qualidade deve-se atentar a todos os parâmetros de cada etapa de produção, minimizando a variabilidade de cada lote produzido pelo mesmo fabricante e entregando um produto de qualidade, a fim de minimizar as sequelas do ofidismo (WHO, 2016b).

3.3.8 Problemas de Reprodutibilidade Associados à Produção

Como descrito nesta revisão, a produção de antiveneno é desafiadora, desde a obtenção das amostras de veneno de serpentes até a inoculação nos animais selecionados para produção das imunoglobulinas.

O processo de obtenção do plasma rico em anticorpos, além de ser demasiadamente demorado, possui grande variabilidade em cada lote, devido às variações de resposta do sistema imune do animal doador ao antígeno (SEGURA *et al.*, 2013). Para minimizar os problemas de reprodutibilidade é recomendado que seja feito uma mistura de veneno de 20 a 50 espécies, pertencentes a uma mesma

região geográfica, podendo ser comparado ao veneno de referência nacional (WHO, 2016b).

3.4 Limitações

Apesar de o antiveneno ser o único tratamento mundialmente aceito para os acidentes ofídicos e em sua grande maioria ser eficaz, reduzir os efeitos tóxicos, salvar milhares de vidas, esse produto possui algumas limitações, como neutralizar efeitos de certos componentes do veneno. Gutiérrez e colaboradores (2014) identificaram que o antiveneno polivalente produzido pelo Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, amplamente utilizado na América Central, reconhece e neutraliza apenas alguns componentes de venenos de viperídeos. Neste estudo, por antivenômica, foi demonstrado que peptídeos vasoativos de baixa massa molecular, desintegrinas e algumas fosfolipases A2, metaloproteinases P-I e serina proteases não são neutralizadas de modo eficaz (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014).

O antiveneno antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan, Brasil, também foi avaliado quanto a neutralização de componentes do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Foi demonstrado que esse antiveneno neutraliza de forma eficaz as metaloproteinases, o que ocorre de forma fraca em relação às serina proteases do veneno de *Bothrops jararaca*. Além disso, os efeitos locais, como hemorragia, causados pelo envenenamento botrópico não são totalmente neutralizados pela ação do antiveneno disponível. (KUNIYOSHI *et al.*, 2012; KUNIYOSHI *et al.*, 2017). Em suma, é necessário pesquisas mais abrangentes que melhorem o entendimento da composição e das ações dos venenos, assim como a imunogenicidade dos mesmos, com o intuito de tentar melhorar a composição/ação do antiveneno.

3.5 Instabilidade

O antiveneno pode apresentar relativa instabilidade em sua forma líquida, o que compromete a sua viabilidade, sobretudo em países tropicais e sem infraestrutura de refrigeração. Em sua forma líquida, o antiveneno necessita de conservantes e refrigeração entre 4°C e 6°C para manter sua eficácia neutralizante. Além disso, o armazenamento errôneo em temperatura diferente da faixa

recomendada pode causar a formação de agregados proteicos e aumentar a probabilidade de desenvolver reações adversas em seu uso (ROJAS *et al.*, 1990).

Alguns estudos demonstram que imunoglobulinas de camelídeos possuem maior estabilidade térmica, contornando o problema da necessidade de armazenamento em baixas temperaturas. Além disso, essas proteínas são menos suscetíveis a causarem reações adversas (OMIDFAR *et al.*, 2007), porém como já mencionado no presente trabalho, ainda não há no mercado um antiveneno oriundo desses animais.

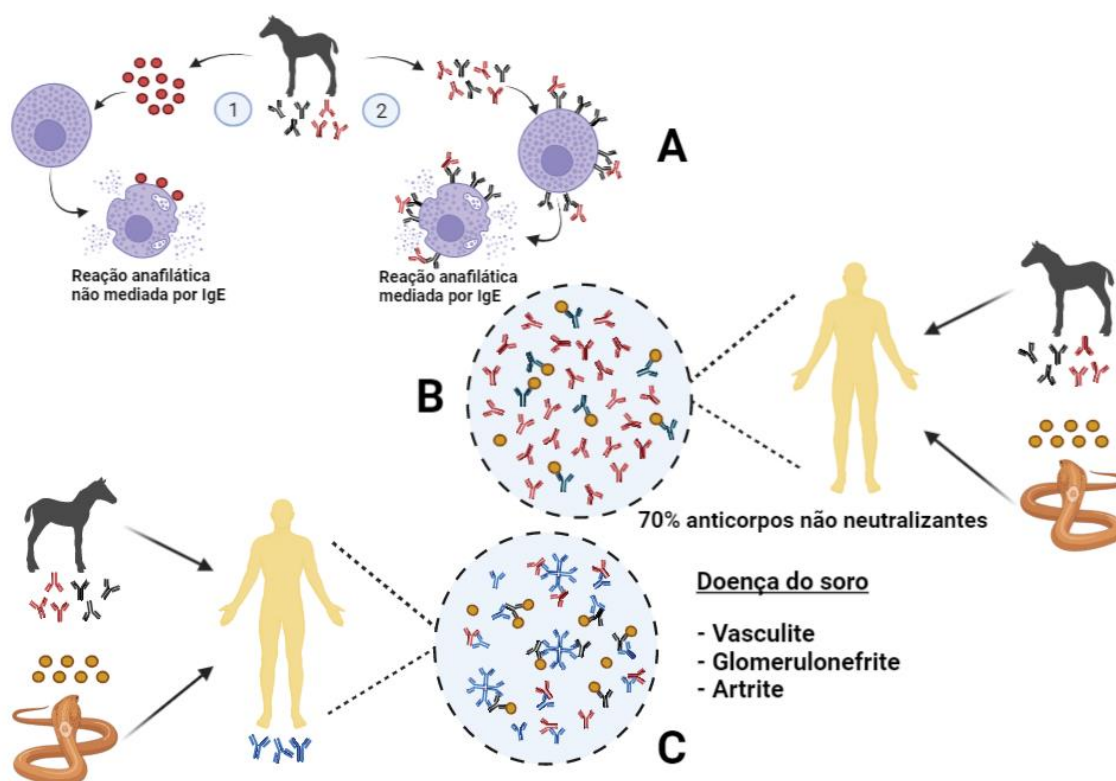
3.6 Reações Adversas

Segundo a OMS, as reações adversas do antiveneno são classificadas como agudas (reações anafiláticas e pirogênicas) que ocorrem nas primeiras 24 horas após administração, e tardias (doença do soro) que se desenvolvem entre 5 e 24 dias após o tratamento (Figura 7) (WHO, 1981). As reações agudas manifestam sintomas, como urticária, tosse, vômito, diarreia, cefaléia e náusea. As reações pirogênicas estão associadas a contaminação por endotoxinas bacterianas no processo de desenvolvimento do antiveneno. Elas causam sintomas como febre, hipotensão, sudorese, cefaléia, vasodilatação e calafrios (LEÓN *et al.*, 2013).

As reações tardias estão associadas a um aumento da resposta de anticorpos mediada por IgGs, pela formação de complexos antígeno-anticorpo que não foram eliminados corretamente pelo sistema imune. O sistema complemento é ativado, desencadeando reações inflamatórias pela presença dos complexos imunes em tecidos, articulações e linfonodos, manifestando sintomas como erupção cutânea, febre, mal-estar, artralgia, artrite, albuminúria e adenopatia (HUANG *et al.*, 2010). Estas reações adversas são contornadas, geralmente, pela administração de drogas profiláticas como adrenalina, anti-histamínico e hidrocortisona, antes do tratamento com o antiveneno, reduzindo a permeabilidade capilar e broncoespasmo (DE SILVA *et al.*, 2011).

As reações sistêmicas pelo tratamento com antiveneno estão intimamente relacionadas ao nível de purificação das imunoglobulinas, quanto maior o nível de purificação, menor serão as manifestações (MALASIT *et al.*, 1986).

Figura 7 – Possíveis efeitos adversos do antiveneno derivado do plasma animal.



Fonte: Adaptado de LAUSTSEN *et al.*, 2018b.

(A1) Pacientes podem desenvolver reações adversas aguda (primeiras 24h), resultante da ativação do sistema complemento (reações não mediadas por IgE), ou **(A2)** em casos de exposição prévia aos anticorpos animais, por reações anafiláticas mediadas por IgE; **(B)** Cerca de 70% dos anticorpos presentes no antiveneno não são específicos para as toxinas de interesse, causando reações adversas; **(C)** A grande quantidade de anticorpos animal, combinados com anticorpos humanos anti-equinos podem resultar na formação de imunocomplexos. Estes são depositados em vasos sanguíneos, glomérulo renal e articulações, causando a doença do soro. **Anticorpos pretos:** Anticorpos equinos específicos a toxinas; **Anticorpos vermelhos:** Anticorpos equinos não específicos; **Anticorpos azuis:** Anticorpos humanos contra anticorpos equinos; **Círculos laranjas:** toxinas da serpente.

4 NOVAS PERSPECTIVAS DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ANTIVENENOS

Baseado nas diversas dificuldades e limitações na produção e utilização do antiveneno, única forma de tratamento do ofidismo reconhecida pela OMS, novas pesquisas, métodos de obtenção e desenvolvimento desses biofármacos são necessárias.

4.1 Anticorpos Humanos

Nas últimas décadas, tratamentos utilizando anticorpos monoclonais humanos tornaram-se mais evidentes devido aos avanços no desenvolvimento de

tecnologias para sua produção (SANTOS *et al.*, 2018). Os anticorpos monoclonais apresentam especificidade para um epítopo e o seu desenvolvimento começou com a técnica do hibridoma que é obtido pela fusão de linfócito B de animal imunizado com célula de mieloma (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Esta técnica permite que a célula híbrida seja cultivada *in vitro*, produzindo os anticorpos desejados ilimitadamente. A obtenção de anticorpos monoclonais humanos foi possível com o desenvolvimento das plataformas de apresentação de fragmentos de anticorpos (*phage display*, *ribosomal display*, etc), animais transgênicos e *cell sorting* de linfócitos B humanos (SANTOS *et al.*, 2018).

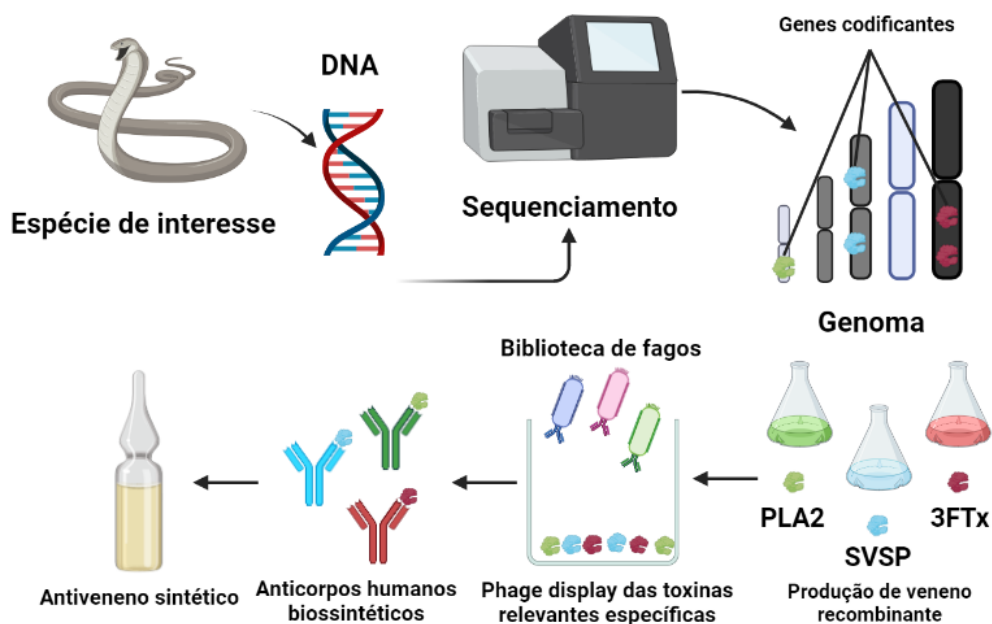
No âmbito dos acidentes ofídicos, uma nova perspectiva de tratamento refere-se ao uso de antivenenos oligoclonais biossintéticos (BOA - Biosynthetic Oligoclonal Antivenom) que é uma mistura de anticorpos humanos neutralizantes produzidos de forma recombinante, precisamente e cuidadosamente selecionados. Essas misturas agem de maneira mais específica quando comparadas aos anticorpos oriundos do soro de animais hiperimunizados. Dependendo da quantidade e especificidade de anticorpos monoclonais incluídos na formulação, essas misturas podem ser monovalentes ou polivalentes (KINI *et al.*, 2018). As vantagens de BOA em relação ao antiveneno obtido de cavalo são: **a)** total compatibilidade com organismos humanos; **b)** utilização de apenas anticorpos neutralizantes na mistura; **c)** excelente consistência e reprodutibilidade na produção; **d)** anticorpos customizados com ótima farmacocinética e farmacodinâmica; **e)** maior perfil de segurança e rapidez na administração do tratamento; **f)** maior aceitação no meio clínico; **g)** melhor cobertura às variações geográficas de venenos; **h)** reatividade cruzada para outras toxinas do veneno; **i)** eliminação do processo de obtenção de venenos; **j)** inibição da lesão do tecido local; **k)** uso potencial de maneira profilática (KINI *et al.*, 2018).

A tecnologia de *phage display* vem sendo aplicada no desenvolvimento de antivenenos oligoclonais (Figura 8) (RONCOLATO *et al.*, 2015). Esta tecnologia permite a descoberta e a maturação de anticorpos monoclonais humanos *in vitro* e simula o sistema imune, utilizando bacteriófagos que apresentam anticorpos a determinados antígenos. Os anticorpos são selecionados pela ligação ao alvo

O desenvolvimento viável e de baixo custo de anticorpos terapêuticos, requer a utilização de algumas tecnologias já existentes, como o *phage display*, que permite a descoberta e a maturação de anticorpos monoclonais humanos *in vitro*, evitando

reações adversas e perda de eficácia no tratamento. O conceito da tecnologia de *phage display* é simular o sistema imune humano em laboratório, utilizando bacteriófagos que apresentam anticorpos a determinados antígenos, selecionando os fragmentos que melhor se ligarem (RONCOLATO *et al.*, 2015).

Figura 8 - Produção de toxinas recombinantes e antiveneno utilizando tecnologia de *phage display*.



Fonte: Próprio autor, 2022.

A partir do sequenciamento do DNA da espécie alvo, obtêm-se os genes dos principais componentes tóxicos do veneno; A produção recombinante de veneno elimina a necessidade de manejo de espécies; Uso de anticorpos biossintéticos aumenta a gama de neutralização de toxinas e especificidade.

Uma mistura oligoclonal de IgGs humanas foi obtida usando abordagens de toxicovenômica e *phage display* e demonstrou bons resultados na neutralização de toxinas de *Dendroaspis polylepis* em modelo murino (LAUSTSEN *et al.*, 2018a).

4.2 Tecnologias Baseadas em Proteínas, Peptídeos e Oligômeros

Além da utilização de IgGs monoclonais humanos, outra abordagem que vem ganhando notoriedade é a utilização de fragmentos variáveis de anticorpo de cadeia única (do inglês, Single Chain Variable Fragments - scFvs). Este possui grande potencial no tratamento de acidentes ofídicos, causando menos reações adversas e

pode ser aplicado para o desenvolvimento de inibidores para diversas proteínas (SILVA *et al.*, 2018).

Os *nanobodies* (sdAb – Single-domain Antibody), contêm domínios variáveis da cadeia pesada e apresentam potencial para o tratamento do ofidismo. Os fragmentos de VHH de camelídeos são pequenos, termoestáveis e apresentam alta afinidade pelo epítopo. Sua utilização pode ter grande potencial por serem termoestáveis (ALIRAHIMI *et al.*, 2018).

Outra abordagem envolvendo fragmento de anticorpo é a utilização de *diabodies*, que são dímeros formados por dois scFv que podem se ligar a epítopos distintos, e demonstraram a neutralização de toxinas de escorpiões e aranhas (DI TOMMASO *et al.*, 2012; KARIM-SILVA *et al.*, 2016) e provavelmente também poderão ser utilizados contra venenos de serpentes.

Os aptâmeros, oligonucleotídeos sintéticos, como RNA e DNA de fita única, se ligam a seus alvos com alta afinidade e especificidade, devido suas estruturas. Eles mimetizam a função do anticorpo em uma gama de aplicações, porém são mais vantajosos por serem mais termoestáveis, pouco imunogênicos e com grande abrangência de alvos (ASCOËT; DE WAARD, 2020). Alguns estudos demonstraram que essas pequenas sequências de nucleotídeos são capazes de neutralizar toxinas de serpentes (YE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

4.3 Terapias Utilizando Pequenas Moléculas

O antiveneno botrópico produzido pelo Instituto Butantan é um dos melhores da América Latina e salva milhares de vidas todos os anos. Ele mostra-se eficaz para o controle dos sintomas sistêmicos, porém, algumas limitações do antiveneno são relatadas, como é o caso das manifestações locais, cuja aplicação, mesmo em grandes quantidades, não foi capaz de reverter o edema, a hemorragia local e as lesões necróticas. Outra limitação apresentada pelo antiveneno botrópico é a neutralização incompleta da fração das serina proteases, ao contrário das metaloproteinasas, que são totalmente neutralizadas pelo antiveneno (GUTIÉRREZ, 2018). A aplicação de peptídeos, como moléculas terapêuticas, é de grande importância para o tratamento de várias doenças, devido à alta especificidade, afinidade com o alvo e a baixa toxicidade dessas moléculas e seus metabólitos

(FOSGERAU, K. & HOFFMANN, 2015). Entre as recentes estratégias promissoras para o aprimoramento do tratamento de envenenamentos, está a associação de peptídeos inibitórios ao soro antiofídico. Neste contexto, Silva e colaboradores, desenhou e sintetizou inibidores peptídicos para essa classe de enzimas símile. Esses inibidores quando associados ao antiveneno botrópico melhoraram a coagulopatia e hemorragia local em camundongos, demonstrando potencial biotecnológico em relação às limitações do antiveneno botrópico (SILVA *et al.*, 2021a; 2021b). A utilização de Varespladib (LY315920) também demonstrou ótimos resultados em neutralizar as atividades tóxicas de fosfolipases A2, a associação desses inibidores peptídicos a anticorpos ou outras moléculas inibitórias podem ter grande papel no tratamento do ofidismo (LEWIN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; BRYAN-QUIRÓS *et al.*, 2018).

4.4 Pesquisa por Reatividade Cruzada de Antivenenos

A capacidade de neutralização cruzada de um antiveneno é altamente desejável, sendo muito mais produtivo e rentável quando anticorpos neutralizam toxinas diversas. Se um antiveneno é caracterizado por apresentar reatividade cruzada a outros venenos, que não aquele para o qual foi idealizado para neutralizar, esse é chamado de para-específico. Nesse contexto, duas funções de anticorpos devem ser analisadas em relação aos antígenos: a ligação e a neutralização. Um anticorpo que se liga a diferentes antígenos, não necessariamente irá desempenhar a função de neutralizar sua ação tóxica à um organismo, demonstrando uma relação complexa entre afinidade e neutralização da toxicidade (LEDSCGAARD *et al.*, 2018).

A pesquisa por reatividade cruzada de anticorpos pode ser feita através de diferentes métodos. Dentre os métodos tradicionais estão os testes *in vitro* como imunodifusão, *immunoblotting*, ELISA e ensaios enzimáticos (LAURIDSEN *et al.*, 2016; CASEWELL *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2017; TANAKA *et al.*, 2010). Os testes *in vivo* são considerados padrão ouro na determinação da capacidade de um antiveneno na prevenção da letalidade de um veneno. Somente com a experimentação animal é possível realmente determinar a capacidade neutralizante

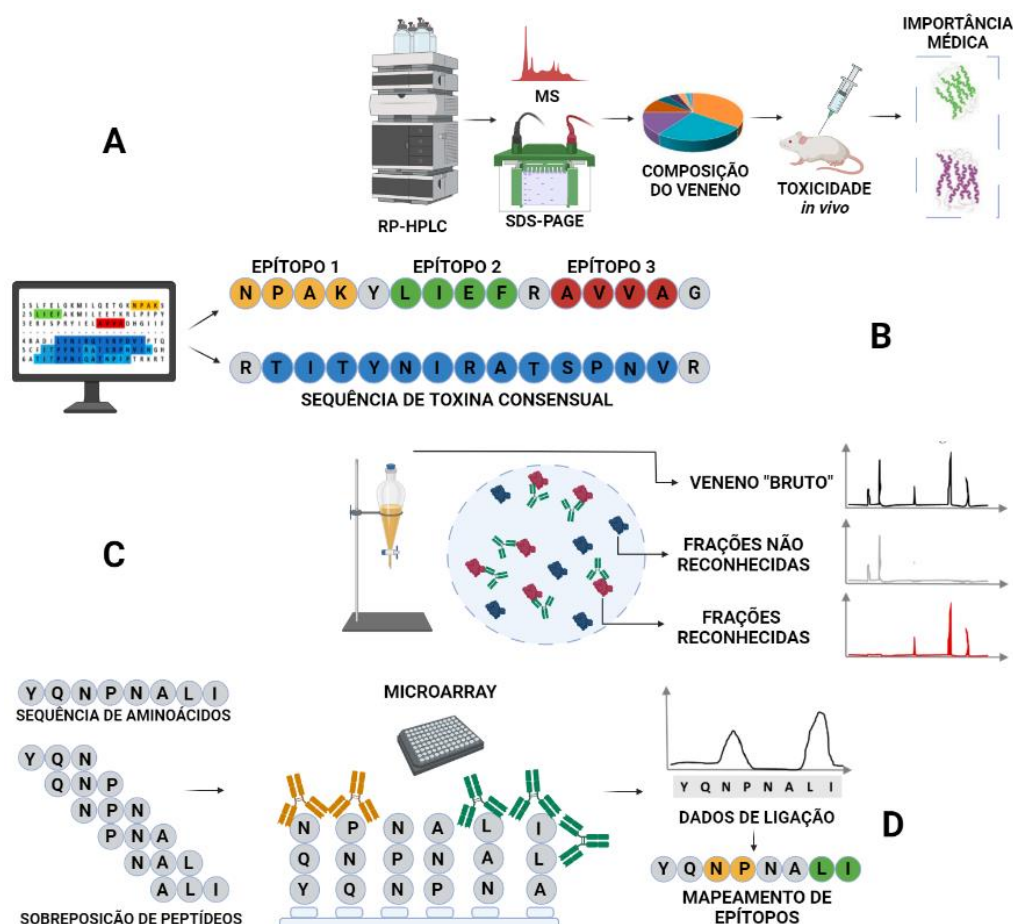
de um antiveneno. Contudo, os custos são elevados e considerações éticas impactam no processo (TAN *et al.*, 2015).

Além destes métodos supracitados, outros que envolvem tecnologias mais avançadas abrem novas possibilidades e aumentam as chances de desenvolvimento de anticorpos com maior amplitude de neutralização. A ressonância plasmônica de superfície (SPR) reúne alguns benefícios, como a quase completa automação do processo, a riqueza de dados fornecidos, como especificidade, afinidade relativa de ligação e a possibilidade de estudar a região de ligação de um determinado anticorpo.

A pesquisa antivenômica também proporciona melhor entendimento de reatividade cruzada caracterizando qualitativamente e quantitativamente o perfil imunológico das ligações veneno/antiveneno, o que contribui para viabilizar os ensaios *in vivo* e *in vitro* pré-clínicos, utilizando menos animais. No entanto, para sua aplicação é necessário a caracterização do perfil de toxinas do veneno de interesse através de estudo transcriptômicos, proteômicos e genômicos, envolvendo espectrometria de massas (MS) e cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

Mais recentemente, a tecnologia de microarray de peptídeos de alta densidade (HDPMT), proporcionou melhor entendimento das interações moleculares entre os epítomos das toxinas do veneno e parátomos dos anticorpos. Esta técnica permite identificar quais sequências lineares de um peptídeo imobilizado (toxina), serão reconhecidas. Ela permite uma análise muito maior de toxinas e vários antivenenos simultaneamente, possibilitando a identificação específica do local de ligação anticorpo-epítomo e locais de reconhecimento compartilhado entre toxinas homólogas (ENGMARK *et al.*, 2017).

Figura 9 - Ilustração esquemática de ferramentas bioquímicas, bioinformáticas e "ômicas" que podem auxiliar a produção de antivenenos.



Fonte: Adaptado de BERMÚDEZ-MÉNDEZ *et al.*, 2018.

(A) Toxicovenômica: O veneno é fracionado por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC). Os componentes de cada fração de veneno são identificados pela combinação das técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massas (MS). A toxicidade de cada fração de veneno é avaliada *in vivo* para identificar os componentes alvo para antivenenos; **(B) Bioinformática:** Recursos online são usados para predição *in silico* de elementos epitópico e regiões homólogas de toxinas. Estas podem ser usadas para gerar sequências multi-epitópicas ou consensuais. Essa estratégia visa gerar resposta imune contra sequências múltiplas em apenas uma molécula ou para gerar anticorpos para-específicos; **(C) Antivemômica:** Essa abordagem é empregada para avaliar a reatividade e reatividade cruzada de antivenenos por imunoafinidade, ao comparar os perfis cromatográficos das frações utilizadas; **(D) Microarray de peptídeos de alta densidade:** A sobreposição de pequenos peptídeos das sequências de toxinas, são sintetizados para estudos de ligação de epítopos e parátomos por incubação com anticorpos. Esta técnica proporciona dados de alta qualidade para avaliação de reatividade cruzada.

5 DISCUSSÃO

O ofidismo é um problema de saúde pública no mundo, causando incapacitações e mortes (KASTURIRATNE *et al.*, 2008). Negligenciado por muitos anos, por autoridades de saúde e indústria farmacêutica, o acidente ofídico impacta na educação, saúde, renda e conseqüentemente na qualidade de vida de uma população (WHO, 2016a; SWAROOP e GRAB, 1954; CHIPPAUX, 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Durante a realização dessa revisão, verificou-se que a falta de tratamento não é o único problema associado ao ofidismo e sim oriundo de um conjunto de fatores, como falta de equipamentos básicos de segurança no trabalho, especialmente o rural; a falta de planejamento de moradias e o desequilíbrio ambiental, que proporciona o encontro acidental entre homens e serpentes; a falta de conhecimento sobre o ofidismo, quais ações tomar após o acidente; a falta de meios de locomoção e de unidades de saúde aptas a tratar o acidentado e a ignorância sobre o tratamento indicado, que conduz à busca por curandeiros (WARRELL, 2010). A falta de antivenenos e de ações necessárias para um tratamento eficaz agravam esse problema de saúde, sobretudo entre os mais pobres, como na África e Ásia (ALIROL *et al.*, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2011; BROWN, 2012; SURAWEEERA, 2020; HARRISON *et al.*, 2009). Bhargava e colaboradores (2020) demonstram após aplicação de um questionário sobre o ofidismo no estado de Haryana, Índia, a necessidade de integração entre governo e população para disseminação do conhecimento, o que aumentaria o conhecimento da população e dos profissionais de saúde (BHARGAVA *et al.*, 2020). Assim, é imprescindível que políticas públicas sejam elaboradas para minimizar esses impactos, principalmente em vilarejos e comunidades que não possuem acesso à informação.

O único tratamento atualmente para o envenenamento é a soroterapia (WHO, 2016b). Como visto nesta revisão, o processo de obtenção dos antivenenos é desafiadora (LÉON *et al.*, 2018), e apesar de melhorias dos procedimentos, da eficácia e da abrangência, ainda apresenta limitações. Dentre essas, estão: altos custos, a falta de padronização, diferenças de qualidade, pureza e eficácia, de acordo com cada fabricante (SIMPSON e NORRIS, 2007; ARAUJO *et al.*, 2008; BUSH *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017b).

Apesar de salvar milhares de vidas, diversos estudos (KUNIYOSHI *et al.*, 2012; SEGURA *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2014; KUNIYOSHI *et al.*, 2017; GUTIÉRREZ, 2018; ZDENEK *et al.*, 2020) demonstram que os antivenenos apresentam limitações, como a parcial neutralização das serina proteases e da ineficácia no tratamento dos efeitos locais do envenenamento, o que gera a necessidade de discussões e ações para sobrepor esses problemas.

Outro problema relacionado ao tratamento com antivenenos é a possibilidade de causar reações adversas (HUANG *et al.*, 2010; LÉON *et al.*, 2013; DE SILVA *et al.*, 2016). As reações se diferem entre agudas (anafiláticas e pirogênicas) e tardias (doença do soro). Antigamente, a molécula de IgG era utilizada de forma integral, sem remoção da fração cristalizável (Fc), e sua utilização era associada ao surgimento de reações adversas (OTERO *et al.*, 1999). O desenvolvimento de antivenenos utilizando apenas as frações Fab ou F(ab')₂ por técnicas de clivagem surgiram para minimizar esses efeitos (JONES e LANDON, 2002).

Contudo, OTERO-PATIÑO e colaboradores (2012) demonstram que a segurança dos antivenenos está relacionada ao nível de purificação, independente da clivagem de suas frações (OTERO-PATIÑO *et al.*, 2012). A utilização de técnicas modernas de purificação e a subsequente avaliação da segurança dos antivenenos são imprescindíveis para uma boa evolução do tratamento. Hifumi e colaboradores (2011) demonstram que no Japão, a incidência dessas reações é de 2,4-8% (HIFUMI *et al.*, 2011); no continente Europeu é de aproximadamente 1,5% (LAMB *et al.*, 2017, no Sudeste Asiático os números são bem mais expressivos (30-80%) (ARIARATNAM *et al.*, 2001) e no Brasil o estudo de Nogueira e colaboradores (2021), mostra que as reações agudas chegam a 47% a partir de um estudo observacional (NOGUERIA *et al.*, 2021). Os estudos randomizados por De Silva e colaboradores (2001), mostram que essas reações podem ser minimizadas com administração prévia ao antiveneno de baixas doses de adrenalina (DE SILVA *et al.*, 2011). Outros fármacos preliminares ao antiveneno, como hidrocortisona e anti-histamínicos foram utilizados por muitos anos, apesar da falta de indícios de sua efetividade (KULARATNE *et al.*, 2016).

A melhoria nos processos de fabricação é um ponto chave no fornecimento de antivenenos melhores e mais eficazes (WHO, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2018).

A partir desse cenário de urgência na melhoria e/ou garantia de acesso ao antiveneno, novas perspectivas de pesquisa e de desenvolvimento são necessárias, para melhorar a qualidade, custo, melhor distribuição do antiveneno. Para tanto, parcerias entre instituições de pesquisas, governos, agências de saúde pública e iniciativas privadas são necessárias.

Essas possíveis melhorias em relação à produção de antivenenos mais específicos, eficazes e estáveis podem ser obtidas via plataformas que utilizem técnicas mais modernas, como obtenção de anticorpos recombinantes, monoclonais humanos (RONCOLATO *et al.*, 2015; LAUSTSEN *et al.*, 2018a; KINI *et al.*, 2018), anticorpos camelídeos, *nanobodies* (sdAb) (ALIRAHIMI *et al.*, 2018), scFvs (SILVA *et al.*, 2018), seus dímeros (*diabodies*) (DI TOMMASO *et al.*, 2012; KARIM-SILVA *et al.*, 2016) e aptâmeros (DNA e RNA sintéticos) (YE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016) e ainda pequenas moléculas, como inibidores peptídicos (FOSGERAU, K. & HOFFMANN, 2015; SILVA *et al.*, 2021a; 2021b).

Nessa revisão ainda foi abordado a relevância da reatividade cruzada e para-especificidade de um anticorpo para obtenção de antivenenos mais abrangentes e com menor custo, visto a variedade de toxinas e suas ações (LEDSCGAARD *et al.*, 2018). Dentre as técnicas utilizadas para estudar a interação entre parátomos e epítomos, podemos destacar as técnicas de antivenômica (CALVETE *et al.*, 2018), e a tecnologia de *microarray* de peptídeos (ENGMARK *et al.*, 2017). A associação dessas técnicas fornece um entendimento mais amplo dos mecanismos fundamentais de interação e neutralização via anticorpos.

Contudo, apesar de promissoras no desenvolvimento de novos antivenenos, essas abordagens trazem implicações na geração de antivenenos, como altos custos.

A utilização de anticorpos monoclonais humanos (mAbs) também pode fornecer melhorias no tratamento do envenenamento, como especificidade e menor chance de causar efeitos adversos. Contudo, há desvantagens, como o alto custo de produção dessas proteínas e a necessidade de misturas oligoclonais para a neutralização de diferentes toxinas de um veneno. O emprego desta nova modalidade de produção precisará de validações rigorosas de produção e eficácia, apesar de estudos demonstrarem boas perspectivas para o tratamento eficaz e com bom custo-benefício (LAUSTSEN *et al.*, 2017).

A utilização das frações de mAbs (do inglês, *Monoclonal Antibodies*), também apresentam vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens, está a baixa massa molecular, o que permite a melhor difusão pelo organismo. Contudo, os scFvs e sdAbs possuem alta taxa de eliminação renal (MUYLDERMANS *et al.*, 2009), apesar de tentativas de melhorias, como glicosilação (FALCK *et al.*, 2021), fusão a fração cristalizada de um anticorpo humano (Fc) (RICHARD *et al.*, 2013) ou a proteínas abundantes do sangue (e.g. albumina) (ZAMAN *et al.*, 2019).

Os aptâmeros de DNA e RNA são fáceis de sintetizar, purificar de maneira reprodutível e bom custo-benefício. Ainda possuem ação seletiva e neutralizante com baixa imunogenicidade e alta difusão tecidual. Suas desvantagens são: rápida eliminação da circulação; incapacidade de atingir alvos intracelulares (ASCOËT; DE WAARD, 2020). Estudos demonstram diferentes utilizações de aptâmeros, sendo no reconhecimento de toxinas, como a β -Bungarotoxin e como na propriedade em apresentar reatividade cruzada, tanto para uma α -Bungarotoxin, quanto para cardiotoxinas, respectivamente (YE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÕES

Diante do cenário aqui apresentado, pode-se concluir que há novas perspectivas de pesquisa, desenvolvimento e produção de antivenenos mais eficazes. Contudo, para a geração desses novos biofármacos, ações como investimentos, sejam governamentais ou do setor privado e o melhor conhecimento das serpentes/venenos de cada região são necessárias.

REFERÊNCIAS

- 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, p. 2955–2965, 2018. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.08.019.
- ALIROL, E.; SHARMA, S. K.; BAWASKAR, H. S.; KUCH, U.; CHAPPUIS, F. Snake Bite in South Asia: A Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000603.
- AMORIM, A. F. V. **Métodos Cromatográficos**. 1ª Ed. Fortaleza: UECE, 2019.
- ARAUJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C.; BOLLER, M. A. A.; DIAS, A. A. S. O.; LUCAS, E. P. R.; SANTOS, I. C.; DELGADO, I. F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 502-514, 2008. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.11.002.
- ARIARATNAM, C. A.; SJÖSTRÖM, L.; RAZIEK, Z.; KULARATNE, S. A.; ARACHCHI, R. W.; SHERIFF, M. H.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. An open, randomized comparative trial of two antivenoms for the treatment of envenoming by Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii russelii*). **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 95, n. 1, p. 74-80, 2001. DOI: 10.1016/s0035-9203(01)90339-6.
- ASCOËT, S.; DE WAARD, M. Diagnostic and Therapeutic Value of Aptamers in Envenomation Cases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 3565, 2020. DOI: 10.3390/ijms21103565.
- BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E.; FUGLSANG-MADSEN, A.; FØNS, S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LAUSTSEN, A. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. **Toxins** v. 10, p. 452, 2018. DOI: 10.3390/toxins10110452
- BHARGAVA, S.; KUMARI, K.; SARIN, R. K.; SINGH, R. First-hand knowledge about snakes and snake-bite management: an urgent need. **Nagoya J Med Sci**, v. 82, n. 4, p. 763-774, 2020. DOI: 10.18999/nagjms.82.4.763.
- BOCHNER, R. Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 20, p. 1-7, 2016. DOI: 10.1186/s40409-016-0074-7.
- BRILHANTE-DA-SILVA, N.; DE OLIVEIRA SOUSA, R. M.; ARRUDA, A.; DOS SANTOS, E. L.; MARINHO, A. C. M.; STABELI, R. G.; FERNANDES, C. F. C.; PEREIRA, S. D. S. Camelid Single-Domain Antibodies for the Development of Potent Diagnosis Platforms. **Mol Diagn Ther**, v. 25, n. 4, p. 439-456, 2021. DOI: 10.1007/s40291-021-00533-7.

BROWN, N. I. Consequences of neglect: analysis of the sub-Saharan African snake antivenom market and the global context. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001670.

BRYAN-QUIRÓS, W.; FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEWIN, M. R.; LOMONTE, B. Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v. 157, p. 1-7, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.11.292

BUSH, S. P.; RUHA, A. -M.; SEIFERT, S. A.; MORGAN, D. L.; LEWIS, B. J.; ARNOLD, T. C.; CLARK, R. F.; MEGGS, W. J.; TOSCHLOG, E. A.; BORRON, S. W.; FIGGE, G. R.; SOLLEE, D. R.; SHIRAZI, F. M.; WOLK, R.; DE CHAZAL, I.; QUAN, D.; GARCÍA-UBBELOHDE, W.; ALAGÓN, A.; GERKIN, R. D.; BOYER, L. V. Comparison of F(ab')₂ versus Fab antivenom for pit viper envenomation: A prospective, blinded, multicenter, randomized clinical trial. **Clinical Toxicology**, v. 53, p. 37-45, 2015. DOI:10.3109/15563650.2014.974263.

CALVETE, J. J.; RODRÍGUEZ, Y.; QUESADA-BERNAT, S.; PLA, D. Toxin-resolved antivenomics-guided assessment of the immunorecognition landscape of antivenoms. **Toxicon**, v. 148, p. 107-122, 2018.

CASEWELL, N. R.; AL-ABDULLA, I.; SMITH, D.; COXON, R.; LANDON, J. Immunological cross-reactivity and neutralisation of European viper venoms with the monospecific *Vipera berus* antivenom ViperaTAb. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2471-2482, 2014. DOI: 10.3390/toxins6082471.

CASEWELL, N. R.; JACKSON, T. N. W.; LAUSTSEN, A. H.; SUNAGAR, K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 41, n. 8, p. 570-581, 2020. DOI: 10.1016/j.tips.2020.05.006.

CHEN, Y.-J.; TSAI, C.-Y.; HU, W.-P.; CHANG, L.-S. DNA Aptamers against Taiwan Banded Krait α -Bungarotoxin Recognize Taiwan Cobra Cardiotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 66, 2016. DOI: 10.3390/toxins8030066.

CHIPPAUX, J. P. "Snake-bites: appraisal of the global situation." **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

DA SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 343-57, 2011. DOI: 10.2174/187152811797200623.

DE SILVA, H. A.; PATHMESWARAN, A.; RANASINHA, C. D.; JAYAMANNE, S.; SAMARAKOON, S. B.; HITTHARAGE, A.; KALUPAHANA, R.; RATNATILAKA, G. A.; ULUWATTHAGE, W.; ARONSON, J. K.; ARMITAGE, J. M.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. Low-Dose Adrenaline, Promethazine, and Hydrocortisone in the Prevention of Acute Adverse Reactions to Antivenom following Snakebite: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **PLOS Medicine**, v. 8, n. 5, p. 1-10, 2011. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000435.

DE SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; DE SILVA, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, p. 446-452, 2016. DOI: 10.1111/bcp.12739.

DI TOMMASO, A.; JUSTE, M. O.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.-F.; DIMIER-POISSON, I.; BILLIALD, P.; AUBREY, N. Diabody Mixture Providing Full Protection against Experimental Scorpion Envenoming with Crude *Androctonus australis* Venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 14149-14156, 2012. DOI: 10.1074/jbc.m112.348912.

ENGMARK, M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LAUSTSEN, A. H.; DE MASI, F.; ANDERSEN, M. R.; LUND, O. Cross-recognition of a pit viper (Crotalinae) polyspecific antivenom explored through high-density peptide microarray epitope mapping. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1-23, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005768.

FALCK, D.; THOMANN, M.; LECHMANN, M.; KOELEMAN, CAM.; MALIK, S.; JANY, C., WUHRER, M.; REUSCH, D. Glycoform-resolved pharmacokinetic studies in a rat model employing glycoengineered variants of a therapeutic monoclonal antibody. **MAbs**, v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.1080/19420862.2020.1865596.

FAN, H. W.; NATAL VIGILATO, M. A.; AUGUSTO POMPEI, J. C.; GUTIÉRREZ, J. M., en representación de la Red de Laboratorios Públicos Productores de Antivenenos de América Latina (RELAPA). Situation of public laboratories manufacturing antivenoms in Latin America. **Pan American Journal of Public Health**, v. 43, n. 92, p. 1-9, 2019. DOI: 10.26633/rpsp.2019.92.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.

FRY, B. Snakebite: When the Human Touch Becomes a Bad Touch. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 1-24, 2018. DOI: 10.3390/toxins10040170.

GÓMEZ, A.; ARROYO, C.; ASTORGA, W.; CHACÓN, D.; RODRÍGUEZ, S.; JIMÉNEZ, M. Hematological and biochemical reference intervals for *Bothrops asper* and *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae), maintained in captivity for venom extraction. **Comp Clin Pathol**, v. 25, p. 615-623, 2016. DOI: 10.1007/s00580-016-2240-2.

GUTIÉRREZ, J. M. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 676-687, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.02.008.

GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of snake antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review. **Toxicon**, v. 146, p. 138-150, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.02.053.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, n. 17063, p. 1-21, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63. Erratum in: **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, n. 17079, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.79.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y. Antivenoms for snakebite envenomings. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 369-380, 2011. DOI: 10.2174/187152811797200669.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 340-350, 2014. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.02.021.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; HERRERA, C.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; FOX, J. W. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 148, p. 123-131, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.016

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; CALVETE, J. J.; LEÓN, G. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: from the lethality neutralization assay to antivenomics. **Toxicon**, v. 169, p. 168-179, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.016.

GUTIÉRREZ, J. M., SOLANO, G., PLA, D., HERRERA, M., SEGURA, Á., VARGAS, M., VILLALTA, M., SÁNCHEZ, A., SANZ, L., LOMONTE, B., LEÓN, G., CALVETE, J. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. **Toxins**, v. 9, n. 163, p. 1-22, 2017b. DOI: 10.3390/toxins9050163

HABIB, A. G.; MUSA, B. M.; ILIYASU, G.; HAMZA, M.; KUZNIK, A.; CHIPPAUX, J.-P. Challenges and prospects of snake antivenom supply in sub-Saharan Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008374.

HALILU, S.; ILIYASU, G.; HAMZA, M.; CHIPPAUX, J. P.; KUZNIK, A.; HABIB, A. G. Snakebite burden in Sub-Saharan Africa: estimates from 41 countries. **Toxicon**, v. 1, n. 159, p. 1-4, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.12.002.

HARRISON, R. A.; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000569.

HATAKEYAMA, D. M.; MORAIS-ZANI, K.; SILVA, C. S.; GREGO, K. F.; SANT'ANNA, S. S.; FERNANDES, W., *et al.* Examination of biochemical and biological activities of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae; Wied-Neuwied 1824) snake venom after up to 54 years of storage. **Toxicon**, v. 141, p. 34-42, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.11.011.

HAYES, W. K.; FOX, G. A.; NELSEN, D. R. Venom Collection from Spiders and Snakes: Voluntary and Involuntary Extractions ("Milking") and Venom Gland Extractions. **Methods Mol Biol**, v. 2068, p. 53-71, 2020. DOI: 10.1007/978-1-4939-9845-6_3.

HERRERA, M.; SOLANO, D.; GÓMEZ, A.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; SÁNCHEZ, A.; *et al.* Physicochemical characterization of commercial freeze-dried snake antivenoms. **Toxicon**, v. 126, p. 32-37, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.12.004.

HIFUMI, T.; YAMAMOTO, A.; MOROKUMA, K.; OGASAWARA, T.; KIRIU, N.; HASEGAWA, E.; INOUE, J.; KATO, H.; KOIDO, Y.; TAKAHASHI, M. Surveillance of the clinical use of mamushi (*Gloydius blomhoffii*) antivenom in tertiary care centers in Japan. **Jpn J Infect Dis**, v. 64, n. 5, p. 373-376, 2011.

HUANG, C. Y.; HUNG, D. Z.; CHEN, W. K. Antivenin-related Serum Sickness. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 73, p. 540–542, 2010. DOI: 10.1016/s1726-4901(10)70117-9.

JONES, R. G. A.; LANDON, J. Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 263, n. 1-2, p. 57-74, 2002. DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00031-5

KADAM, P.; AINSWORTH, S.; SIRUR, F. M.; PATEL, D. C.; KURUVILLA, J. J.; MAJUMDAR, D. B. Approaches for implementing society-led community interventions to mitigate snakebite envenoming burden: the SHE-India experience. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 1-7, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009078.

KARIM-SILVA, S.; MOURA, J. DE; NOIRAY, M.; MINOZZO, J. C.; AUBREY, N.; ALVARENGA, L. M.; & BILLIALD, P. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. **Immunology Letters**, v. 176, p. 90-96, 2016. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.05.019.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, 2008. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050218.

KINI, R.; SIDHU, S.; LAUSTSEN, A. Biosynthetic Oligoclonal Antivenom (BOA) for Snakebite and Next-Generation Treatments for Snakebite Victims. **Toxins** v. 10, n. 12, p. 534, 2018. DOI: 10.3390/toxins10120534

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n.5517, p. 495-497, 1975. DOI: 10.1038/256495a0

KULARATNE, S. A. M.; WEERAKOON, K.; SILVA, A.; MADUWAGE, K.; WALATHARA, C.; RATHNAYAKE, I.; ... KUMARASIRI, P. V. R. Efficacy of intravenous hydrocortisone administered 2–4 h prior to antivenom as prophylaxis against adverse drug reactions to snake antivenom in Sri Lanka: An open labelled randomized controlled trial. **Toxicon**, v. 120, p. 159–165, 2016. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.08.011.

KUNIYOSHI, A. K.; KODAMA, R. T.; MORAES, L. H. F.; DUZZI, B.; IWAI, L. K.; LIMA, I. F.; *et al.* In vitro cleavage of bioactive peptides by peptidases from Bothrops jararaca venom and its neutralization by bothropic antivenom produced by Butantan Institute: Major contribution of serine peptidases. **Toxicon**, v. 137, p. 114-119, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.07.020.

KUNIYOSHI, A. K.; ROCHA, M.; CAJADO CARVALHO, D.; JULIANO, M. A.; JULIANO NETO, L.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. C. V. Angiotensin-degrading serine peptidase: A new chymotrypsin-like activity in the venom of Bothrops jararaca partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon**, v. 59, p. 124-131, 2012. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.11.001.

LAMB, T.; DE HARO, L.; LONATI, D.; BRVAR, M.; EDDLESTON, M. Antivenom for European Vipera species envenoming. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 55, n. 6, p. 557-568, 2017. DOI: 10.1080/15563650.2017.1300261.

LAURIDSEN, L. P.; LAUSTSEN, A. H.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*). **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 248-261, 2016. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.02.003.

LAUSTSEN, A. H.; JOHANSEN, K. H.; ENGMARK, M.; ANDERSEN, M. R. Recombinant snakebite antivenoms: A cost-competitive solution to a neglected tropical disease?. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 11, p. 1-14, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005361

LAUSTSEN, A. H.; KARATT-VELLATT, A.; MASTERS, E. W.; ARIAS, A. S.; PUS, U.; KNUDSEN, C.; OSCOZ, S.; SLAVNY, P.; GRIFFITHS, D. T.; LUTHER, A. M.; LEAH, R. A.; LINDHOLM, M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MCCAFFERTY, J. In vivo neutralization of dendrotoxin-mediated neurotoxicity of black mamba venom by oligoclonal human IgG antibodies. **Nature Communications**, v. 9, n. 3928, p. 1-9, 2018a. DOI: 10.1038/s41467-018-06086-4. Erratum in: **Nature Communications**, v. 9, n. 4957, 2018.

LAUSTSEN, A. H.; MARÍA GUTIÉRREZ, J.; KNUDSEN, C.; JOHANSEN, K. H.; BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E.; CERNI, F. A.; JÜRGENSEN, J. A.; LEDSGAARD, L.; MARTOS-ESTEBAN, A.; ØHLENSCHLÆGER, M.; PUS, U.; ANDERSEN, M.R.; LOMONTE, B.; ENGMARK, M.; PUCCA, M.B. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, v. 146, p. 151-175, 2018b. DOI:10.1016/j.toxicon.2018.03.004.

LEDSGAARD, L.; JENKINS, T. P.; DAVIDSEN, K.; KRAUSE, K. E.; MARTOS-ESTEBAN, A.; ENGMARK, M.; RØRDAM ANDERSEN, M.; LUND, O.; LAUSTSEN, A. H. Antibody Cross-Reactivity in Antivenom Research. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 393, DOI: 10.3390/toxins10100393.

LEE, S.-H.; KIM, J.-S.; KIM, C.-W. Optimization of buffer conditions for the removal of endotoxins using Q-sepharose. **Process Biochemistry**, v. 38, n.7, p. 1091-1098, 2003. DOI: 10.1016/s0032-9592(02)00243-1

LEÓN, G.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63-76, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.09.010.

LEÓN, G.; VARGAS, M.; SEGURA, Á.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; SÁNCHEZ, A.; *et al.* Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 151, p. 63-73, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.06.084.

LEWIN, M.; SAMUEL, S.; MERKEL, J.; BICKLER, P. Varespladib (LY315920) Appears to Be a Potent, Broad-Spectrum, Inhibitor of Snake Venom Phospholipase A2 and a Possible Pre-Referral Treatment for Envenomation. **Toxins**, v. 8, n. 9, 2016. DOI: 10.3390/toxins8090248.

MALASIT, P.; WARRELL, D. A.; CHANTHAVANICH, P.; VIRAVAN, C.; MONGKOLSAPAYA, J.; SINGTHONG, B.; SUPICH, C. Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. **BMJ**, v. 292, p. 17–20, 1986. DOI: 10.1136/bmj.292.6512.17.

MENDONÇA-DA-SILVA, I.; MAGELA TAVARES, A.; SACHETT, J.; SARDINHA, J. F.; ZAPAROLLI, L.; GOMES SANTOS, M. F.; LACERDA, M.; MONTEIRO, W. M. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1-21, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006068. Erratum in: **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010031

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância Sanitária. **Boletim Epidemiológico: doenças tropicais negligenciadas**. Brasília, p. 34-51, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf. Acesso em: 10 de outubro de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde: FUNASA 2001, p. 9-35. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-deDiagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 1-22, 1996. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1996/prt0174_11_11_1996.html. Acesso em: 04 dez 2021.

MONACO, L. M. (org.). **Soros e Vacinas do Butantan**. 1.ed., 24p. São Paulo: Instituto Butantan, 2018.

MOOS, B.; WILLIAMS, D.; BOLON, I.; MUPFASONI, D.; ABELA-RIDDER, B.; RUIZ DE CASTANEDA, R. A scoping review of current practices on community engagement in rural East Africa: Recommendations for snakebite envenoming. **Toxicon**, v. 11, n. 100073, p. 1-9, 2021. DOI:10.1016/j.toxcx.2021.100073.

MORAIS, V.; BERASAIN, P.; MASSALDI, H. Immunoglobulin purification by caprylic acid. **Methods Mol Biol**, v. 1129, p. 137-143, 2014; DOI: 10.1007/978-1-62703-977-2_13.

MORAIS, V.; MASSALDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2-18, 2009. DOI:10.1590/s1678-91992009000100002

MUYLDERMANS, S.; BARAL, T. N.; RETAMOZZO, V. C.; DE BAETSELIER, P.; DE GENST, E.; KINNE, J.; LEONHARDT, H.; MAGEZ, S.; NGUYEN, V. K.; REVETS, H.; ROTHBAUER, U.; STIJLEMANS, B.; TILLIB, S.; WERNERY, U.; WYNS, L.; HASSANZADEH-GHASSABEH, G.; SAERENS, D. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 178-183, 2009. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.299.

NOGUEIRA, D. C. S.; CALIL, I. P.; SANTOS, R. M. M. D.; ANDRADE FILHO, A.; COTA, G. A phase IV, prospective, observational study of the clinical safety of snake antivenoms. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 63, e. 79, 2021. DOI: 10.1590/S1678-9946202163079.

OLMEDO, H.; HERRERA, M.; ROJAS, L.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; LEIGUEZ, E.; TEIXEIRA, C.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; MONTERO, M. L. Comparison of the adjuvant activity of aluminum hydroxide and calcium phosphate on the antibody response towards *Bothrops asper* snake venom. **Journal of Immunotoxicology**, v. 11, p. 44-49, 2014. DOI:10.3109/1547691x.2013.772267

OMIDFAR, K.; RASAEI, M. J.; KASHANIAN, S.; PAKNEJAD, M.; BATHAIE, Z. Studies of thermostability in *Camelus bactrianus* (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by *Pichia*. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 46, pt. 1, p. 41-49, 2007. DOI: 10.1042/BA20060104

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A.; MIRANDA, E.; ... LOZANO, R. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. **Toxicon**, v. 37, n. 6, p. 895-908, 1999. DOI: 10.1016/s0041-0101(98)00220-7.

OTERO-PATIÑO, R.; SEGURA, Á.; HERRERA, M.; ANGULO, Y.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; ... ORTIZ, R. (2012). Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')₂] antivenoms, in *Bothrops asper* bites in Colombia. **Toxicon**, 59(2), 344–355. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.11.017

PATRA, A.; HERRERA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUKHERJEE, A. K. The application of laboratory-based analytical tools and techniques for the quality assessment and improvement of commercial antivenoms used in the treatment of snakebite envenomation. **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n, 8, p. 1471-1489, 2021. DOI: 10.1002/dta.3108

PÉPIN-COVATTA, S.; LUTSCH, C.; GRANDGEORGE, M.; SCHERRMANN, J.-M. Immunoreactivity of a new generation of horse F(ab')₂ preparations against European viper venoms and the tetanus toxin. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 411-422, 1997. DOI: 10.1016/s0041-0101(96)00144-4

RAWEERITH, R.; RATANABANANGKOON, K. Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 282 n. 1-2, p. 63-72, 2003. DOI: 10.1016/j.jim.2003.07.014

RAWEERITH, R.; RATANABANANGKOON, K. Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalent and polyvalent snake antivenoms. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 369-375, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.10.019.

RICHARD, G.; MEYERS, A. J.; MCLEAN, M. D.; ARBABI-GHAHROUDI, M.; MACKENZIE, R.; HALL, J. C. In Vivo Neutralization of α -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody. **PLOS ONE**, v. 8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069495.

ROJAS, G.; ESPINOZA, M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 28, p. 101-105, 1990. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90011-u.

RONCOLATO, E. C.; CAMPOS, L. B.; PESSEDA, G.; COSTA E SILVA, L.; FURTADO, G. P.; BARBOSA, J. E. Phage display as a novel promising antivenom therapy: A review. **Toxicon**, v. 93, p. 79-84, 2015. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.001

SANTOS, L.; OLIVEIRA, C.; VASCONCELOS, B. M.; VILELA, D.; MELO, L.; AMBRÓSIO, L.; DA SILVA, A.; MURBACK, L.; KURISSIO, J.; CAVALCANTE, J.; CASSARO, C. V.; BARROS, L.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA, R. S. JUNIOR. Good management practices of venomous snakes in captivity to produce biological venom-based medicines: achieving replicability and contributing to pharmaceutical industry. **J Toxicol Environ Health B Crit. Rev.**, v. 24, n. 1, p. 30-50, 2021. DOI: 10.1080/10937404.2020.1855279.

SANTOS, M. L. DOS; QUINTILIO, W.; MANIERI, T. M.; TSURUTA, L. R.; MORO, A. M. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 78-92, 2018. DOI: 10.1590/s2175-97902018000001007

SASA, M.; ARIAS ORTEGA, J.; BONILLA-MURILLO, F. Assessing survival of wild-caught snakes in open venom production systems. **Toxicon**, v. 138, p. 49-52, 2017. DOI: DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.08.001.

SEGURA, Á.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. **Biologicals**, v. 41, p. 93-97, 2013. DOI: 10.1016/j.biologicals.2012.11.001.

SILVA, A.; ISBISTER, G. K. Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, p. 537-546, 2020. DOI: 10.1042/bst20190739.

SILVA, G. M.; BERTO, D. H.; LIMA, C. A.; WAITMAN, K. B.; LIMA, C. F. G.; PREZOTO, B. C.; ... ANDRADE, S. A. Synergistic effect of serine protease inhibitors and a bothropic antivenom in reducing local hemorrhage and coagulopathy caused by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 199, p. 87-93, 2021a. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.06.009

SILVA, G. M. D.; SOUZA, D. H. B. D.; WAITMAN, K. B.; EBRAM, M. C.; FESSEL, M. R.; ZAINESCU, I. C.; PORTARO, F. C. V.; HERAS, M.; ANDRADE, S. A. Design, synthesis, and evaluation of *Bothrops* venom serine protease peptidic inhibitors. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, p. 1-7, 2021. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0066.

SILVA, L. C.; PUCCA, M. B.; PESSEDA, G.; CAMPOS, L. B.; MARTINEZ, E. Z.; CERNI, F. A.; BARBOSA, J. E. Discovery of human scFvs that cross-neutralize the toxic effects of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms. **Acta Tropica**, v. 177, p. 66-73, 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.09.

SIMPSON, I. D.; NORRIS, R. L. Snake antivenom product guidelines in India: "the devil is in the details". **Wilderness Environ Med.**, v. 18, n. 3, p. 163-168, 2007. DOI: 10.1580/07-WEME-ED-099R.1.

SURAWEEERA, W.; WARRELL, D. A.; WHITAKER, R.; MENON, G.; RODRIGUES, R.; FU, S. H.; BEGUM, R.; SATI, P.; PIYASENA, K.; BHATIA, M.; BROWN, P.; JHA, P. Trends in snakebite deaths in India from 2000 to 2019 in a nationally representative mortality study. **eLife**, v. 9, p. 1-37, 2020. DOI: 10.7554/elife.54076.

SWAROOP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bull World Health Organ**, v. 10, n. 1, p. 35-76, 1954.

TAN, C. H.; TAN, K. Y.; LIM, S. E.; TAN, N. H. Venomics of the beaked sea snake, *Hydrophis schistosus*: A minimalist toxin arsenal and its cross-neutralization by heterologous antivenoms. **Journal of Proteomics**, v. 126, p. 121-130, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.05.035.

TAN, C. H.; WONG, K. Y.; TAN, K. Y.; TAN, N. H. Venom proteome of the yellow-lipped sea krait, *Laticauda colubrina* from Bali: Insights into subvenomic diversity, venom antigenicity and cross-neutralization by antivenom. **Journal of Proteomics**, v.166, p. 48-58, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.07.002.

TANAKA, G. D.; FURTADO, M. F. D.; PORTARO, F. C. V.; SANT'ANNA, O. A.; TAMBOURGI, D. V. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic

effects and the prospective of antivenom neutralization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-12, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000622.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541-557, 2003. DOI: 10.1016/s0041-0101(02)00393-8.

VALVERDE, J. M.; RODRÍGUEZ, K.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILLALTA, M.; MONTERO, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G. Comparison of the adjuvant activity of emulsions with different physicochemical properties on the antibody response towards the venom of West African carpet viper (*Echis ocellatus*). **Toxicon**, v. 127, p. 106-111, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.01.011.

VARGAS, M.; SEGURA, Á.; WU, Y. W.; HERRERA, M.; CHOU, M. L.; VILLALTA, M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Human plasma-derived immunoglobulin G fractionated by an aqueous two-phase system, caprylic acid precipitation, and membrane chromatography has a high purity level and is free of detectable in vitro thrombogenic activity. **Vox Sang**, v. 108, n. 2, p. 169-177, 2015. DOI: 10.1111/vox.12209.

WANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, D.; XIAO, H.; XIONG, S.; HUANG, C. Exploration of the Inhibitory Potential of Varespladib for Snakebite Envenomation. **Molecules**, v. 23, 2018. DOI: 10.3390/molecules23020391

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61754-2. Erratum in: **Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 640, 2010.

WARRELL, D. A. 75 - Venomous and Poisonous Animals (Twenty-third Edition). In: **Manson's Tropical Infectious Diseases**. W. B. Saunders, ed. 23, p. 1096-1127, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-7020-5101-2.000765.

WILLIAMS, D. J.; FAIZ, M. A.; ABELA-RIDDER, B.; AINSWORTH, S.; BULFONE, T. C.; NICKERSON, A. D.; HABIB, A. G.; JUNGHANSS, T.; FAN, H. W.; TURNER, M.; HARRISON, R. A.; WARRELL, D. A. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1-12, 2019. DOI:10.1371/journal.pntd.0007059.

WILLIAMS, D. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; WÜSTER, W.; RATANABANANGKON, K.; PAIVA, O.; BROWN, N. I.; CASEWELL, N. R.; HARRISON, R. A.; ROWLEY, P. D.; O'SHEA, M.; JENSEN, S. D.; WINKEL, K. D.; WARRELL, D. A. Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1735-1767, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.05.027.

WILLIAMS, D. J.; HABIB, A. G.; WARRELL, D. A. Clinical studies of the effectiveness and safety of antivenoms. **Toxicon**, v. 150, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress in the characterization of venom and standardization of antivenoms**, n. 58, p. 1-44, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Management of Snakebite.** Switzerland, 2 ed., p. 1-208, 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.** Switzerland, p. 1-138, 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control.** Geneva, p. 1-70, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1230920/retrieve>. Acesso em: 15 de outubro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite envenoming**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/snakebiteenvenoming>. Acesso em: 10 de outubro de 2021.

YE, F.; ZHENG, Y.; WANG, X.; TAN, X.; ZHANG, T.; XIN, W.; WANG, J.; HUANG, Y.; FAN, Q.; WANG, J. Recognition of *Bungarus multicinctus* Venom by a DNA Aptamer against β -Bungarotoxin. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0105404.

ZAMAN, R.; ISLAM, R. A.; IBNAT, N.; OTHMAN, I.; ZAINI, A.; LEE, C. Y.; CHOWDHURY, E. H. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. **J Control Release**, v. 301, p. 176-189, 2019. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.02.016.

ZDENEK, C. N.; YOUNGMAN, N. J.; HAY, C.; DOBSON, J.; DUNSTAN, N.; ALLEN, L.; MILANOVIC, L.; FRY, B. G. Anticoagulant activity of black snake (Elapidae: Pseudechis) venoms: Mechanisms, potency, and antivenom efficacy. **Toxicol Lett**, v. 330, p. 176-184, 2020. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.05.014.