



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**DNA LIVRE DE CÉLULAS COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE  
GRAVIDADE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS**

**ENDILA DE SOUZA BARBOSA**



**MANAUS**

**2020**

**ENDILA DE SOUZA BARBOSA**

**DNA LIVRE DE CÉLULAS COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE  
GRAVIDADE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador (a): **Profª Dra.** Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett

Co-orientador (a): **Profª Dra.** Gisely Cardoso de Melo

**MANAUS**

**2020**

**FOLHA DE JULGAMENTO****DNA LIVRE DE CÉLULAS COMO POTENCIAL BIOMARCADOR  
DE GRAVIDADE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS****ENDILA DE SOUZA BARBOSA**

**“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.**

**Banca Julgadora:**

---

**Presidente**

---

**Membro**

---

**Membro**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Gilcilene Soares, minha avó Maria Soares e meus irmãos Marcos Felipe e Ruan Hortenses pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha fortaleza.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Jacqueline Sachett, que me concedeu a oportunidade de inscrição no programa de mestrado e desde a graduação me inspira pela sua paciência, ética e postura como profissional.

À minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisely Melo por embarcar nesta jornada conosco com toda a paciência, principalmente no laboratório, por toda as orientações, ajudando a conduzir este trabalho da melhor maneira possível.

Ao Prof. Dr. Wuelton por todas as orientações e valiosas contribuições durante a realização deste trabalho, inspirando confiança e senso crítico como pesquisadora.

À Prof.<sup>a</sup> Me. Siuhelem Rocha que com toda paciência e humildade me conduziu durante os primeiros procedimentos da pesquisa no laboratório.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que desempenha um papel fundamental na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu* no país, pelo incentivo através da concessão de uma bolsa de estudos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical (PPGMT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) representada pelo coordenador Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro e Vice Coordenador Prof. Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos.

Às funcionárias da secretaria do PPGMT Conceição Tufic, Altariza Freitas e Jordania Dantas.

A todos os contribuintes e coautores desta pesquisa que dedicaram seu tempo para que tudo fosse realizado da melhor maneira possível.

Ao grupo de pesquisa CEPCLAM que a cada reunião contribuiu fortemente para a minha formação como pesquisadora.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical por toda dedicação e conhecimentos compartilhados durante o curso.

Aos queridos amigos da turma de pós-graduação, a qual ingressei no programa, sempre envolvidos pelo espírito de união prestando apoio uns aos outros nos momentos difíceis.

À minha família, em especial minha mãe Gilcilene Soares e minha avó Maria Soares, meus irmãos Marcos Felipe e Ruan Hortenses, que mesmo distantes fisicamente sempre me apoiam e incentivam a buscar os melhores caminhos.

Ao Sérgio Ferreira, Sandra Aquino, Maurisérgio Aquino e Marília Aquino que me apoiaram durante esta caminhada com carinho e paciência.

Aos meus amigos Elisângela Frota, Frandson Gean, Leilaine Santos, Brenda Rachel, Viviane Mendes, Moyara Lima e Salete Sara por todos os conselhos, carinho e cumplicidade.

À Universidade do Estado do Amazonas, instituição a qual tenho grande apreço, que me proporcionou a oportunidade da graduação e pós-graduação.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

O desenvolvimento deste trabalho contou com auxílio de uma bolsa de estudos disponibilizada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Além disso, neste estudo foram utilizadas informações e amostras de um estudo realizado anteriormente, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Os recursos necessários posteriormente foram provenientes do Centro de Pesquisa Clínica em Acidentes com animais peçonhentos (CEPCLAM).

## EPÍGRAFE

“A felicidade tem base no dever cumprido.”

*Emmanuel*



## RESUMO

Na Amazônia, ~ 90% das picadas de cobra são causadas pelo gênero *Bothrops*. Nestes envenenamentos as complicações são comuns como resultado de atividades inflamatórias e coagulotóxicas de toxinas encontradas no veneno dessas serpentes. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial do DNA livre de células (cfDNA) como um biomarcador de gravidade em acidentes ofídicos por *Bothrops*. Os pacientes foram incluídos na *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), em Manaus, Amazônia Brasileira. Os níveis plasmáticos de cfDNA foram medidos amplificando a sequência da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) por RT-PCR quantitativa. Os níveis medianos de cfDNA foram comparados entre voluntários saudáveis e envenenados e entre pacientes com diferentes complicações. Dos pacientes incluídos, 82,9% eram do sexo masculino, principalmente de áreas rurais e 39,5% classificados em acidentes graves. Na caracterização laboratorial, foram observados valores elevados de leucócitos, neutrófilos, tempo de protrombina, razão normalizada internacional e níveis de fibrinogênio consideravelmente abaixo dos parâmetros normais. Na análise da curva ROC, quando comparados aos doadores saudáveis, os níveis de cfDNA na previsão do envenenamento demonstrou um AUROC de 0,722. A análise de correlação demonstrou correlação positiva com Lactato Desidrogenase ( $p = 0,033$ ) e contagem de plaquetas ( $p = 0,003$ ). Ao comparar os níveis de cfDNA entre as complicações clínicas, diferenças estatísticas significantes foram encontradas apenas entre os indivíduos com dor leve e intensa ( $p < 0,05$ ). Os resultados demonstram que o cfDNA entre os pacientes de acidentes por *Bothrops*, em diferentes níveis de gravidade, assim como nos que apresentam ou não complicações clínicas, não apresentaram diferenças estatísticas significantes. Por outro lado, os níveis são significativamente mais altos nas vítimas do que em doadores saudáveis. Assim, trabalhos podem ser realizados para que, no futuro, o cfDNA talvez possa ser utilizado para detecção do envenenamento.

**Palavras-chaves:** Picadas de cobra, *Bothrops*, ácidos nucléicos livres de células, Biomarcadores.

## ABSTRACT

In the Amazon, around 90% of snakebites are caused by the *Bothrops* genus. Complications arising from *Bothrops* envenomations are common as a result of the inflammatory and coagulotoxic activities of toxins found in the venom of these snakes. The aim of this study was to investigate the potential of cell-free DNA (cfDNA) as a biomarker of severity in *Bothrops* snakebites. Patients were treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazilian Amazon. cfDNA levels in plasma were measured by amplifying the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) sequence using quantitative RT-PCR. Median levels of cfDNA were compared between envenomed and healthy volunteers and among patients presenting different complications. Of the patients included, 82.9% were male, mainly from rural areas, with a mean age of 32.8 years, and accidents were mainly classified as serious (39.5%). In the laboratorial characterization, elevated values of leukocytes, neutrophils, prothrombin time, international normalized ratio and fibrinogen levels were observed to be considerably below normal parameters. In the analysis of the ROC curve, when compared to healthy blood donors, cfDNA levels demonstrated an AUROC of 0.722. A correlation analysis using laboratory variables showed positive correlation with lactate dehydrogenase ( $p = 0.033$ ) and platelet count ( $p = 0.003$ ). When cfDNA levels were compared with clinical complications, significant statistical differences were only found among individuals with mild and severe pain ( $p < 0.05$ ). The results show that the cfDNA in patients after *Bothrops* envenomations of different levels of severity, as well as those with or without clinical complications, did not present statistically significant differences. On the other hand, levels are significantly higher in victims of *Bothrops* envenomation when compared to healthy blood donors. Thus, further studies should be carried out so that, in the future, cfDNA can perhaps be used to confirm the detection of poisoning.

**Keywords:** Poisonous Animals, Snake Bites, *Bothrops*, Free Nucleic Acids.

## RESUMO LEIGO

Na Amazônia grande parte dos envenenamentos são pelas serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas). Complicações dos acidentes por esse tipo de serpente são comuns e o conhecimento de novas substâncias marcadoras que identifiquem esses problemas rapidamente são de grande importância para ajudar no atendimento. Por isso, o objetivo deste trabalho foi pesquisar se o DNA livre de células pode atuar como marcador para as complicações dos acidentes por serpentes *Bothrops*. Este trabalho foi realizado na Fundação de Medicina Tropical com 76 pacientes picados por serpentes comparados com 20 pacientes saudáveis. Os resultados mostraram que a maioria dos pacientes foram homens e indivíduos da zona rural. Diferenças foram encontradas entre o DNA livre nos pacientes comparando as pessoas não doentes. Entre os doentes diferenças foram encontradas apenas entre os que sentem menos dor e os que sem mais dor. Esses resultados mostram que o DNA livre não apresenta diferenças importantes entre os pacientes picados, mesmo nos mais graves.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Distribuição Global de envenenamentos e óbitos por acidentes ofídicos.....	02
<b>Figura 2</b> – Espécies de <i>Bothrops</i> envolvidas na maioria dos acidentes na Amazônia.....	03
<b>Figura 3</b> – Manifestações locais após acidentes por <i>Bothrops</i> .....	07
<b>Figura 4</b> – Complicações locais após acidente ofídico por <i>Bothrops</i> .....	08
<b>Figura 5</b> – Complicações sistêmicas após acidentes ofídicos por <i>Bothrops</i> .....	09
<b>Figura 6</b> - Origens do DNA livre de células (cfDNA) no corpo humano.....	15
<b>Figura 7</b> – Comparação de genes de referência múltipla para quantificação de cfDNA plasmático.....	20
<b>Figura 8</b> – CfDNA levels according to complications in <i>Bothrops</i> snakebite accident patients in the Brazilian Amazon .....	70

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1** - Atividades fisiopatológicas do veneno botrópico e seus efeitos. ... 5

**Quadro 2** – Número de ampolas de soro indicadas de acordo com a gravidade nos envenenamentos por serpentes de importância médica no País.  
..... 12

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA**

ANCs	Ácidos Nucleicos Circulantes
Cf-DNA	<i>Cell-free</i> DNA, DNA livre de células circulante
CLT	Lectina do tipo-C
CRISP	Proteína secretora rica em cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNT	Doença Tropical Negligenciada
DP	Desvio padrão
FLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
IRA	Insuficiência renal aguda
LAAO	L-aminoácido oxidase
miRNA	Micro RNAs
µL	Microlitro
mtDNA	DNA mitocondrial
nDNA	DNA nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
qPCR	PCR em tempo real / PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
SAB	Soro antibotrópico
SABC	Soro antibotrópico-crotálico
SABL	Soro antibotrópicolaquético
SVMP	Metaloproteinases do veneno de serpente

SVSP	Serino proteinases
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Acidente ofídico botrópico .....	1
1.2 Veneno botrópico .....	4
1.3 Aspectos clínicos do envenenamento botrópico.....	7
1.4 DNA livre de células em outras patologias .....	12
1.4.1 Gene <i>hTERT</i> .....	18
1.5 Preditores de gravidade nos envenenamentos.....	20
1.6 Justificativa .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Geral .....	25
2.2 Específicos.....	25
<b>3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	26
<b>4 RESULTADOS COMPLEMENTARES</b> .....	69
<b>5 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS</b> .....	71
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
<b>8 ANEXOS E APÊNDICES</b> .....	86
Anexo I – Parecer Comitê de Ética da Universidade do Estado do Amazonas .....	86
Anexo II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.....	89
Anexo III – Notificação para utilização de dados .....	91
Apêndice A – Pop de realização da extração de DNA .....	93



Apêndice B – Pop de realização da PCR em tempo real ..... 97

## 1 INTRODUÇÃO

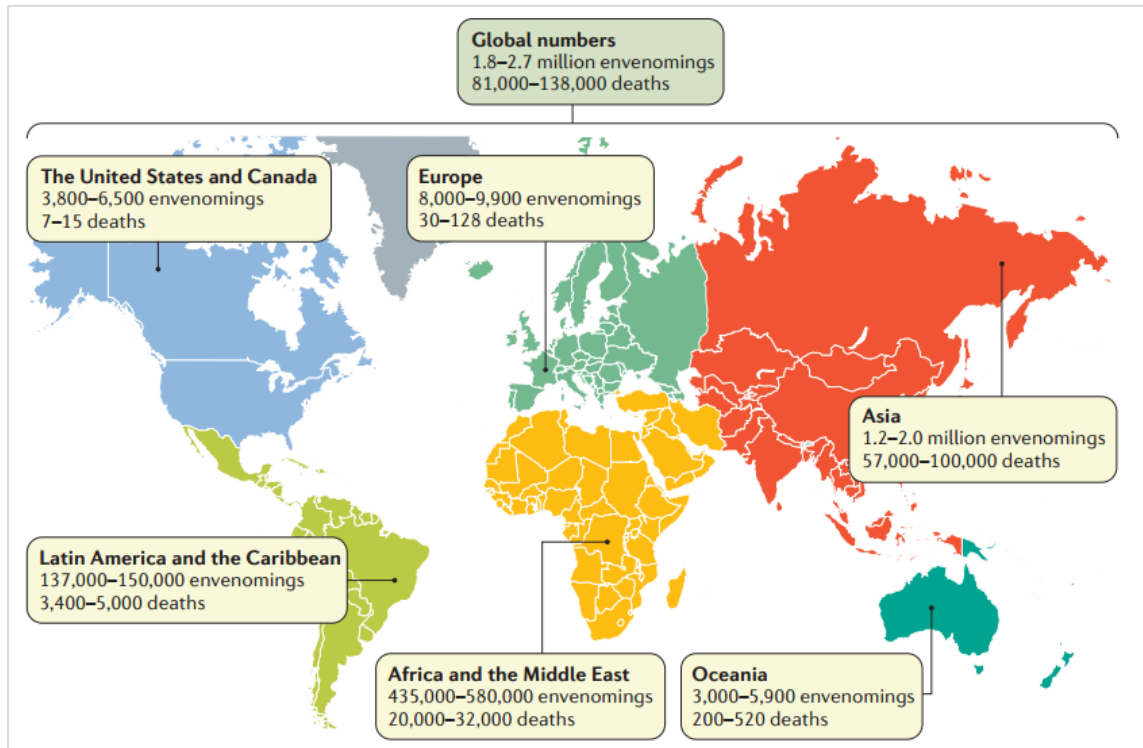
### 1.1 Acidente ofídico botrópico

Acidentes ofídicos ocorrem principalmente em países tropicais e subtropicais do mundo (1). Este problema tem grande importância em saúde pública pela gravidade dos casos e frequência com que acontecem, pelos altos índices de morbidade e mortalidade, sendo responsável por sofrimentos, incapacitações e mortes prematuras, especialmente em locais onde existe uma maior exposição das populações e dificuldade de acesso aos serviços de saúde (2).

Em 2017, o ofidismo foi classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) de alta emergência e em 2018 resolveu combater o agravo, com a meta de redução dos casos em 50% até o ano de 2030. As estratégias consistem na prevenção da picada, principalmente por meio da educação em saúde; fornecimento de tratamento eficaz e seguro; fortalecimento dos sistemas de saúde; aumento de parceria, coordenação e recursos (3).

O número real de prejuízos decorrentes desses acidentes ainda é subestimado por várias razões: prevalência desses acidentes em comunidades rurais que vivem da agricultura e pastoreio de animais, empobrecidas, de países com renda de baixa a média, com pouco acesso aos serviços de saúde e em locais distantes onde a coleta de dados específicos não acontece (2).

No mundo, a estimativa é de que ocorrem cerca de 1.200.000 a 5.500.000 casos de acidentes ofídicos anualmente (1), com envenenamentos em 1,8 a 2,7 milhões de vítimas e 81 mil a 138 mil mortes (Figura 1). Esses agravos atingem, principalmente, a Ásia, África e América Latina, (4) com uma estimativa de incapacitações permanentes em 400 mil pessoas (3).



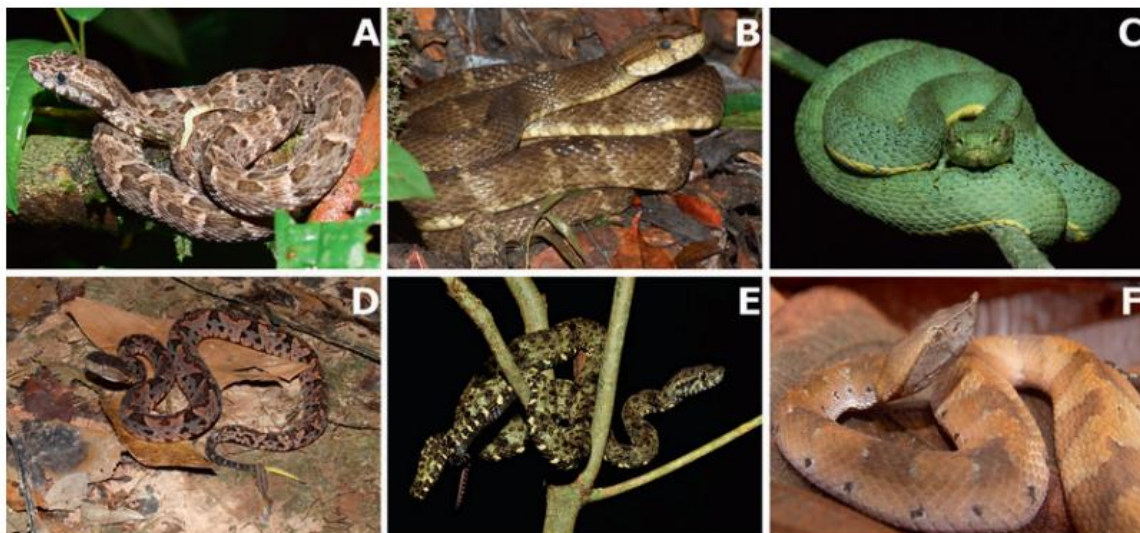
**Figura 1** – Distribuição Global de envenenamentos e óbitos por acidentes ofídicos (4).

No Brasil, quatro gêneros de serpentes são considerados de interesse médico: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (5). As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos envenenamentos, tendo ampla distribuição geográfica no país e comportamento agressivo frente a ameaças. Esse gênero faz parte da família Viperidae que abrange cerca de 30 espécies distribuídas em todo o país. Essas serpentes possuem hábitos majoritariamente noturnos ou crepusculares, geralmente estão mais presentes na zona rural, em periferias de cidades, preferindo locais com umidade como áreas cultivadas e matas onde haja a proliferação de roedores (6).

Os acidentes botrópicos são responsáveis por cerca de 90% dos envenenamentos notificados no Brasil (7). Entre 2000 e 2016 foram notificados 443.912 acidentes ofídicos, com uma média de 26 mil casos/ano (8) e predominância no norte do país (9). Na Amazônia Brasileira e áreas de cerrado existem 12 espécies de serpentes que fazem parte dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (Figura 2), desses apenas cinco estão presentes no serrado

(*Bothrops lutzi*, *B. marmoratus*, *B. mottogrossensis*, *B. moojeni* e *B. pauloensis*) e o restante presentes na região da floresta Amazônica (*Bothrops atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. marajoensis*, *B. taeniatus*, *Bothrocophias hyoprora* e *B. microphthalmus*) (10).

Na Região Norte muitos indivíduos ainda vivem no meio da floresta, como os indígenas e moradores de comunidades rurais, sendo esses grupos os mais vulneráveis (8). No acontecimento dos acidentes ofídicos o itinerário dessas populações para o atendimento médico é difícil, o que torna o número de casos notificados oficialmente muito menor do que o real (11). Contudo, a incidência anual desses agravos na região ainda é a mais elevada com 52,8 casos por 100 mil habitantes (12).



**Figura 2** - Espécies de *Bothrops* envolvidas na maioria das picadas na Amazônia. **(A e B)** *Bothrops atrox*, **(C)** *Bothrops bilineatus*, **(D)** *Bothrops brasili*, **(E)** *Bothrops taeniatus* e **(F)** *Bothrocophias hyohora* (57).

Os estudos evidenciam que os afetados são, principalmente, indivíduos do sexo masculino, provenientes de áreas rurais (13–16) e economicamente ativos, sobretudo, os que desenvolvem atividades na agricultura, pesca e coleta de frutos da floresta (17,18). Os que sobrevivem a esses acidentes têm uma grande probabilidade de permanecerem desfigurados, destituídos e estigmatizados (3). Além disso, a predominância dos acidentes em áreas rurais

é um fato preocupante, visto que, as características geográficas locais e longas distâncias, dificultam o acesso aos serviços de saúde, podendo levar horas ou dias até o atendimento (19).

O Estado do Amazonas é o segundo da Região Norte com o maior número de casos de acidentes ofídicos, possuindo uma taxa de incidência anual de 62,8/100 mil habitantes, a maior da região (20) e taxa de letalidade de 0,7% (21). A *Bothrops atrox* é a principal espécie causadora, sendo responsável por cerca de 80 a 90% dos envenenamentos (11). Essa serpente é conhecida popularmente por diferentes nomes, dependendo da localidade: jararaca, jararacuçu, surucucu, surucucu-do-barranco (22), surucucu-boca-podre e jararaquinha-do-rabo-branco (juvenil) (23). Em alguns lugares da Amazônia os indivíduos atribuem mais de um nome para a mesma espécie, conforme a idade e o tamanho do animal, como no caso da *B. atrox*, que na região do Alto Juruá, as juvenis são conhecidas principalmente como jararacas e adultas como surucucus (22). Esses agravos possuem características sazonais em paralelo com estação chuvosa (13,19), ocorrendo, principalmente, entre os meses de dezembro a junho e o grande número de acidentes demonstra a carga desse problema na região (19).

## 1.2 Veneno botrópico

O envenenamento ofídico é provocado pela inoculação de substâncias tóxicas na vítima, produzidas por um par de glândulas especializadas, conectadas por um duto ao aparelho inoculador, que são conhecidos como presas ou dentes modificados (4,24). Essas substâncias são misturas complexas de peptídeos e proteínas, muitas das quais apresentam atividade enzimática (25,26).

As serpentes *B. atrox* apresentam as mesmas famílias de toxinas em seu veneno, com algumas variações quantitativas, apesar da ampla distribuição geográfica dessa espécie pela Amazônia (27). A análise proteômica do veneno de *B. atrox* revelou a presença de onze famílias de proteínas, sendo mais

abundantes: metaloproteinases (SVMP), Lectina do tipo-C (CLT), Serino-proteases (SVSP), Fosfolipases A2 (PLA2), L-aminoácido oxidase (LAAO) e proteína secretora rica em cisteína (CRISP) (27,28).

Após a liberação, as toxinas presentes no veneno começam a desempenhar efeitos patológicos no local da picada e nas adjacências do tecido, com disseminação através dos vasos sanguíneos e linfáticos. Conforme a distribuição no organismo começam a agir a nível sistêmico, atingindo vários órgãos (29). As ações fisiopatológicas exercidas pelas toxinas presentes no veneno botrópico são: hemorrágica, coagulante e inflamatória aguda ou proteolítica, podendo ocasionar efeitos diversos (Quadro 1) (30). Essas atividades são de grande complexidade e alguns efeitos podem ser atribuídos a componentes em específico, mas diferentes toxinas podem interagir para induzir um determinado efeito, enquanto uma toxina pode ter várias atividades distintas (31).

**Quadro 1** - Atividades fisiopatológicas do veneno botrópico e seus efeitos (adaptado) (30).

Atividade Fisiopatológica	Efeitos
<b>Inflamatória aguda</b>	Lesão endotelial e necrose no local da picada Liberação de mediadores inflamatórios
<b>Coagulante</b>	Incoagulabilidade sanguínea
<b>Hemorrágica</b>	Sangramentos na região da picada (equimose) e à distância (gengivorragia, hematúria, etc.)

As SVMPs são as toxinas mais abundantes no veneno de *B. atrox* (27,32,33). Entre as ações fisiopatológicas das SVMPs, atenta-se para o desenvolvimento de hemorragias locais e sistêmicas decorrentes da sua

inoculação no organismo (34), visto que estas são capazes de lesionar a membrana basal dos vasos sanguíneos por meio da hidrólise de componentes da membrana (35–37). As SVMPs juntamente com as PLA2 são as proteínas mais importantes, quando se trata de dano local, com contribuição das SVSPs para a patogênese desses efeitos (38). Isso porque as SVSPs podem destruir a membrana celular pela ação enzimática direta nos fosfolípidos da membrana (39), levando a um aumento da concentração de cálcio no citosol, causando danos celulares e necrose com a liberação de componentes celulares (29,40).

Além dos danos locais severos ocasionados pela toxicidade dos componentes do veneno pode ocorrer o agravamento pela resposta inflamatória (34,38,41–43). Na resposta inflamatória aguda local ocorre o aumento da permeabilidade vascular e influxo de leucócitos, principalmente macrófagos e neutrófilos, com paralela indução na produção de mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas e eicosanóides (44). Em pacientes que sofreram acidentes ofídicos botrópicos com o desenvolvimento de Complicação Local Grave foi demonstrado que estes apresentam uma resposta imunológica local mais intensa (45).

Na resposta inflamatória aguda local os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo, pela rápida migração aos tecidos afetados (46,47). De um modo geral, suas funções vão desde a organização da resposta imunológica adaptativa, produção e liberação de mediadores inflamatórios, liberação de enzimas, realização de fagocitose (47,48). Além disso, podem agir na defesa do organismo por meio da liberação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) (49), ocorrendo através da NETosis, um tipo de morte celular na qual os neutrófilos ativos liberam essas armadilhas em resposta a inflamação, infecção ou hipóxia (50–52). E o veneno botrópico é capaz de induzir a liberação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) (53).

### 1.3 Aspectos clínicos do envenenamento botrópico

As manifestações clínicas locais mais descritas nos acidentes botrópicos, na região Amazônica, são a dor intensa e o edema (14–16,54,55). Outras manifestações locais que podem ocorrer: sangramento no local da picada, eritema, bolhas, equimoses, linfadenopatia regional e necrose (Figura 3) (54,55). As manifestações sistêmicas mais apresentadas inicialmente são: dor de cabeça, náusea e vômito (14–16,54,55). Além destas, podem ocorrer, tontura, visão turva, dor abdominal, sudorese e diarreia (54,55). Quanto aos distúrbios hemostáticos, a incoagulabilidade sanguínea é o mais comum, acometendo entre 43,1 e 61,1% das vítimas (15,16,55,56).



**Figura 3** – Manifestações locais após acidentes por *Bothrops*. A) Ulceração e sangramento local em dedo do pé direito com menos de 12h após acidente. B) Presença de bolhas na região dorsal do pé esquerdo após envenenamento. C) Envenenamento no membro superior esquerdo com presença de edema, bolhas com conteúdo de sero-hemorrágico e sangue incoagulável; paciente chegou 12h após picada. D) Presença de bolha em região distal do dedo anelar da mão direita 24h após picada. E) Pé direito com edema intenso, sangramento local e equimose em dedos. F) Acidente grave com edema extenso em cinco segmentos da perna esquerda (do pé a coxa) em menos de 20h após envenenamento (57).



Além dessas manifestações, podem ocorrer complicações decorrentes do acidente. A nível local, bolhas com conteúdo sero-hemorrágico podem surgir, assim como necrose, infecções secundárias bacterianas e síndrome compartimental, podendo levar a amputações ou déficit funcional do membro acometido (Figura 4) (58). Em pacientes de acidente ofídico botrópico com Complicação Local Grave, definidos como aqueles que apresentam envenenamento moderado ou grave e presença de manifestações locais como edema intenso, equimoses, flictena e necrose no local, foi demonstrado que desenvolvem uma resposta imunológica local mais intensa e que CCL-2 e CXCL-10 podem atuar como biomarcadores para Complicação Local Grave nesses acidentes (45).



**Figura 4** – Complicações locais após acidente ofídico por *Bothrops*. (A) Envenenamento na mão esquerda, paciente com mais de 48 horas após a picada, com extensa área de edema e necrose no membro superior esquerdo e gangrena do quarto dedo. (B) O mesmo paciente mostrado em A, após amputação do quarto dedo (na fase de cicatrização). (C) Envenenamento na parte distal do dedo mínimo da mão direita com evolução para necrose após 48 horas após a picada. (D) Envenenamento na região dorsal da mão direita, estendendo-se para a palma da mão, exigindo desbridamento cirúrgico da área de necrose no 5 dia após a picada. (E) envenenamento grave na mão esquerda; esse paciente chegou 24 horas após a mordida, apresentando síndrome compartimental no membro superior esquerdo, necessitando de fasciotomia. (F) Paciente apresentando abscesso e celulite por infecção bacteriana secundária, na área dorsal do pé esquerdo, 48 horas após a picada (57).

As complicações sistêmicas incluem insuficiência renal aguda; hemorragias, que podem ocorrer de forma mais graves como a intracraniana; hipotensão e choque pelo sequestro de líquido para o local da picada, hipovolemia por sangramento e liberação de substâncias vasoativas (5,58). As complicações mais frequentemente descritas são infecção secundária (14–16,59), insuficiência renal aguda (14,15,59–61) e sangramento sistêmico espontâneo (Figura 5) (15,55,59,62).



**Figura 5** – Complicações sistêmicas após acidentes ofídicos por *Bothrops*. (A) Paciente de acidente por serpente do gênero *Bothrops* realizando hemodiálise, após o desenvolvimento de insuficiência renal aguda decorrente do acidente. (B) Paciente com hemorragia sistêmica, evidenciada no por equimose a distância do local da picada. Fonte: CEPCLAM.

A infecção secundária ocorre com frequência variada e na região Amazônica atinge aproximadamente 40% dos indivíduos que sofrem acidentes por serpentes desse gênero (14,16,59). Os microrganismos envolvidos nessa complicação podem ter origem da cavidade oral da serpente, microbiota da própria vítima e de produtos inadequados colocados no local da punctura (6). A infecção secundária causa intensa reação inflamatória no local da picada desencadeada pelos microrganismos patogênicos causando danos teciduais.

A insuficiência renal aguda é uma complicação sistêmica importante em envenenamentos botrópicos e sua frequência varia de 10,9 a 38,5% (14,15,59–61). Os componentes do veneno possuem ação renal direta causando alterações

estruturais nos nefrões (25,63,64) e na fisiologia renal (65,66), sendo a necrose tubular aguda a causa mais comum de lesão renal no acidente ofídico (67). Apesar de hipóteses formuladas, a patogênese desse problema ainda não foi totalmente compreendida (14), mas acredita-se que a combinação de múltiplos fatores acarretem o desenvolvimento dessa condição. Dentre estes fatores incluem a nefrotoxicidade direta, processos inflamatórios, reação imunológica e alterações hemodinâmicas (64,66,68,69), representando um dos principais fatores de risco na fatalidade de acidentes botrópicos na Amazônia (21).

O sangramento sistêmico espontâneo é uma das alterações hemodinâmicas mais comuns nos envenenamentos por *Bothrops* (15,55,59), estando presente em cerca de 15% das vítimas que evoluem para óbito no estado do Amazonas (21). Fatores associados ao risco de sangramento sistêmico na região foram o sangue incoagulável e trombocitopenia, entretanto os autores não identificaram associação com a curva ROC, acreditando que apenas esses parâmetros não são os únicos e principais responsáveis pelas hemorragias sistêmicas (62). Além desses distúrbios, as SVMs, proteínas presentes em abundância no veneno botrópico, são capazes de causar sangramentos por inibir a agregação plaquetária, hidrolisar fibrina, degradar componentes da matriz extracelular dos vasos e pela ação direta na membrana dos capilares (26,70–73).

Fatores associados com a gravidade são: idade  $\leq 15$  anos e  $\geq 65$  anos, acidente relacionado a atividades de trabalho e o tempo entre a picada e atendimento superior a 6 horas (12). Além dos sintomas físicos, as consequências psicológicas do envenenamento decorrente da picada de serpentes como estresses pós-traumáticos e depressão devem ser considerados (2).

No tratamento dos envenenamentos por serpentes de importância médica no Brasil, a administração do soro antiveneno específico é realizada para a neutralização das toxinas. O antiveneno no país está disponível em hospitais de

referência pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sua classificação está atrelada a classificação de gravidade do acidente que possui protocolo definido pelo Ministério da Saúde de acordo com características clínico-epidemiológicas do acidente. Após essa classificação, a soroterapia antiveneno deve ser realizada o mais precocemente possível e de acordo com a classificação de gravidade da vítima (Quadro 2) (74).

Os acidentes botrópicos podem ser classificados como leves, moderados ou graves. Os caracterizados como leves são aqueles em que se pode verificar quadro local discreto e sangramento no local da picada. Nos moderados, as manifestações já assumem um caráter mais sistêmico, podendo apresentar edema e equimoses evidentes, sangramento sem comprometimento no estado geral da vítima. No quadro grave as alterações locais são intensas, pode haver hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal e anúria. Nas três classificações pode haver distúrbio na coagulação sanguínea (75). O tratamento incompleto ou não administração do antiveneno tem grande associação com a letalidade das vítimas (21).

O soro antiveneno é o único tratamento específico para a neutralização das toxinas nesses envenenamentos e tem sua eficácia comprovada (25,76), mas em alguns casos, pode necessitar de reclassificação e administração de quantidade adicional de soro (5). Mesmo com a administração da soroterapia, as toxinas do veneno levam a danos celulares irreversíveis com o desenvolvimento de complicações (14,16,55) e processos patológicos levam liberação de várias substâncias como DNA livre de células (77).

**Quadro 2** – Número de ampolas de soro indicadas de acordo com a gravidade nos envenenamentos por serpentes de importância médica no País (30).

Acidente	Antiveneno	Gravidade	Nº de ampolas
Botrópico	SAB <sup>b</sup> SABL <sup>c</sup> ou SABC <sup>d</sup>	Leve: quadro local discreto, sangramento discreto em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação	2 a 4
		Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação	4 a 8
		Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal, anúria; pode haver distúrbio na coagulação	12
Laquético <sup>a</sup>	SABL	Moderado: quadro local presente; pode haver sangramentos, sem manifestações vagas	10
		Grave: quadro local intenso, hemorragia intensa, com manifestações vagas	20
Crotálico	SAC <sup>e</sup> ou SABC	Leve: alterações neuromusculares discretas; sem mialgia, escurecimento da urina ou oligúria	5
		Moderado: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria (urina escura) discretas	10
		Grave: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria intensas, oligúria	20
Elapídico	SAEl <sup>f</sup>	Considerar todos os casos como potencialmente graves pelo risco de insuficiência respiratória	10

Fonte: Adaptado do Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) e do Guia de Vigilância Epidemiológica (2009).

<sup>a</sup>Devido à potencial gravidade do acidente laquético, são considerados clinicamente moderados ou graves, não havendo casos leves.

<sup>b</sup>SAB = Soro antitetrápico (pentavalente);

<sup>c</sup>SABL = Soro antitetrápico (pentavalente) e antilaquético;

<sup>d</sup>SABC = Soro antitetrápico (pentavalente) e anticrotálico;

<sup>e</sup>SAC = Soro anticrotálico;

<sup>f</sup>SAEl = Soro antielapídico (bivalente).

#### 1.4 DNA livre de células em outras patologias

A estrutura e função do DNA foram explicadas por Watson e Crick, em 1953, trazendo o conceito da estrutura formada por dupla hélice, constituída por duas cadeias complementares de nucleotídeos e unidas de forma complementar pelo pareamento das bases nitrogenadas. Com essa descoberta, ocorreram muitos avanços nas pesquisas e compreensão de eventos biológicos (78). Antes das descobertas de Watson e Crick, a presença de fragmentos dos ácidos nucleicos livres de células no plasma humano, já haviam sido descritas, pelos pesquisadores Mandel e Metais, em 1948, mas sem grandes interesses nesses fragmentos como marcadores (79).

Apesar da presença desses fragmentos no plasma humano ter sido descrita há mais de 70 anos (79), o interesse no uso dos ácidos nucleicos livres de células como marcadores, surgiu mais tarde. Em 1966, foram demonstrados

altos níveis de DNA circulante no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (80) e em 1977 foi detectada a presença de níveis plasmáticos elevados em pacientes com câncer, com diminuição dos níveis de DNA circulante naqueles que respondiam a radioterapia (81). A partir desses trabalhos iniciais, a detecção dessas moléculas como possíveis marcadoras para diagnóstico e monitoramento de doenças vem crescendo ao longo dos anos com estudos referentes a diversas condições de anormalidade celular.

Os Ácidos Nucleicos Circulantes (ANCs) são fragmentos de DNA ou RNA livres de células, presentes em fluidos corporais, provenientes, principalmente, de células sanguíneas (82). Esses fragmentos encontram-se, em sua maioria, no interior das células, mas existem quantidades fisiológicas dessas moléculas livres na circulação. Níveis aumentados refletem processos patológicos, incluindo o câncer e lesões benignas, acidente vascular cerebral, sepse, trauma e doenças inflamatórias (77), mas também ocorrem em algumas condições fisiológicas (83).

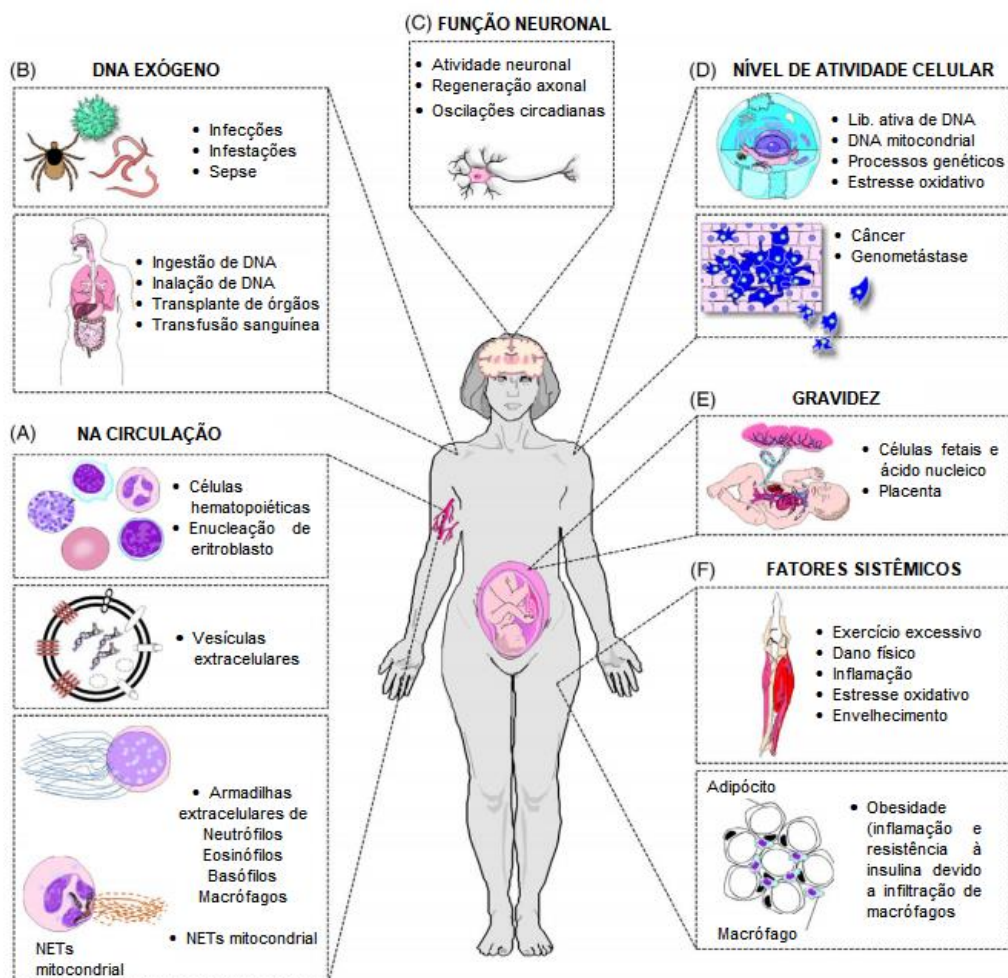
As pesquisas realizadas nessa área, utilizam principalmente o DNA como alvo, seja com base na avaliação da expressão gênica (80,84) ou para verificação da quantidade total circulante (82,85,86). A quantidade de DNA livre de células (cfDNA) presente na circulação sanguínea está relacionada com os mecanismos de liberação e além deles, com a capacidade de eliminação desses fragmentos. Estudos mostram que a forma como ele se apresenta livre no sangue influencia na sua permanência, como por exemplo em DNA circular e dupla-fita que podem permanecer por mais tempo em comparação com DNA linear e de fita simples (77).

Quanto a principal forma de liberação do cfDNA, não existe um consenso constituindo um evento não totalmente compreendido, sendo os principais candidatos os mecanismos de degradação celular e mecanismos ativos de liberação de DNA (87). Os estudos apontam como causas primordiais do aparecimento desses fragmentos, livres nos fluidos corporais, a apoptose e

necrose (84,87–89). Além disso, o cfDNA pode ser derivado de outras condições mais específicas como tumores, órgãos de doadores após o transplante e do feto durante a gravidez (90).

De um modo geral, características biológicas diversas podem contribuir como fontes de cfDNA e/ ou causas de liberação de DNA na circulação, incluindo: estruturas celulares em circulação que contêm ou liberam DNA durante atividade normal, desenvolvimento, dano ou morte; DNA estranho/exógeno que entrou no corpo por digestão de fontes alimentares, inalação, transplante ou transfusão, infecção e/ ou infestação; liberação de DNA no sistema nervoso modulado por funções neurológicas; atividades celulares que liberam DNA em circulação intencionalmente e/ ou devido ao estresse, degradação e erro / adaptação genética; durante a gravidez fragmentos de DNA fetal são liberados na circulação materna; efeitos sistêmicos da atividade fisiológica (por exemplo, exercício excessivo) e/ ou status (por exemplo, obesidade ou envelhecimento) (Figura 4). Essas supostas fontes ou causas de liberação de DNA também podem interagir e formar uma cascata de eventos resultando em liberação de cfDNA adicional (87).

Com a descoberta desses fragmentos aumentados em indivíduos doentes, novas expectativas de diagnóstico e acompanhamento, minimamente invasivos, surgiram (91–93). Essas novas possibilidades, estimularam pesquisas visando a substituição de alguns métodos convencionais de diagnóstico molecular, que utilizam abordagens invasivas, como a retirada de tecido em biópsias (93), assim como a busca por métodos mais sensíveis e específicos. Com isso, muitas áreas da medicina vêm avaliando o uso desses marcadores para testes diagnósticos.



**Figura 6** - Origens do DNA livre de células (cfDNA) no corpo humano. **(A)** Causas provenientes da circulação sanguínea; **(B)** DNA de razões/ microrganismos exógenos; **(C)** de origem neuronal; **(D)** de atividades celulares; **(E)** liberação na gestação; **(F)** Causas sistêmicas (87).

Como possível biomarcador para o câncer, alguns autores usam o termo “biópsia líquida” (94–99) pela possibilidade de diagnóstico não-invasivo, utilizando apenas amostras de sangue e permitindo verificar mudanças nos níveis dos ANCs durante o curso natural da patologia ou tratamento (91–93,100). Diante disso, a relevância dos ANCs como marcadores promissores para pacientes com câncer vem sendo confirmada (77,94,96,99,101,102).



No trauma, as concentrações plasmáticas de cfDNA foram significativamente mais altas em casos graves do que nos menos graves (103–105). As descobertas evidenciam em favor do uso de cfDNA como ferramenta prognóstica em relação a pacientes vítimas de trauma, também como ferramenta prognóstica para o desfecho de complicações pós-traumáticas (103–105). No Traumatismo Craniano Encefálico (TCE) os níveis plasmáticos mais altos de cfDNA foram correlacionados com gravidade e mortalidade (103,105–107). Concentrações médias de DNA plasmático em pacientes de TCE, foram significativamente maiores no grupo não sobrevivente, quando comparado com o grupo de sobreviventes (107).

Dosagens também têm sido realizadas em pacientes com doenças infecciosas agudas como na malária por *Plasmodium vivax*, em que os níveis de cfDNA dos pacientes foram mensurados e comparados a indivíduos saudáveis, demonstrando que nos indivíduos doentes, foram significativamente mais elevados. Os resultados sugeriram que nos pacientes com malária por *P. vivax* os níveis plasmático foram até 8 vezes maiores que no grupo controle (82). No quadro de dengue grave, os níveis de cfDNA foram significativamente maiores do que no grupo que não desenvolveu dengue grave com um ponto de corte capaz de prever dengue grave com boa sensibilidade e especificidade, sendo este  $> 36,9$  ng / mL capaz de prever dengue grave com boa sensibilidade (87,5%), especificidade (54,7%) e área sob a curva ROC (AUROC) ( 0,72, IC 95% 0,55-0,88;  $p = 0,0493$ ) (108).

Em quadros clínicos inflamatórios, a pesquisa desses fragmentos como biomarcadores também tem sido investigada. Na sepse, que é uma resposta inflamatória sistêmica, o cfDNA apresentou-se significativamente mais elevado (109,110), com níveis consideravelmente mais altos nos pacientes que desenvolveram lesão renal aguda e sem diferenças significantes entre os tipos de microrganismos envolvidos (110). De forma semelhante, em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, o cfDNA apresentou níveis plasmáticos significativamente mais altos quando comparado aos controles saudáveis (111–

113). Após a terapia ocorreu uma diminuição considerável nos pacientes, com potencial de tornar-se um marcador de acompanhamento no tratamento dessa condição clínica (112,114).

Em gestações complicadas por pré-eclâmpsia ou trabalho de parto prematuro, o cfDNA fetal apresentou níveis plasmáticos significativamente mais elevados na circulação materna. A presença desses fragmentos em níveis aumentados pode contribuir para uma reação inflamatória tendo como resultado o parto prematuro espontâneo e esse aumento pode demonstrar sinal de perigo, funcionando como marcador de complicações (115).

Os trabalhos para a identificação de biomarcadores envolvendo o cfDNA estão crescendo cada vez mais para patologias de origens diversas, seja de caráter infeccioso, inflamatório, crônico ou agudo. Assim, o acidente ofídico é um evento agudo que pode causar trauma no local da picada, pelas presas do animal. Entretanto, os danos ocasionados pelo veneno e a resposta inflamatória induzida assumem maiores proporções, dependendo de vários fatores como a quantidade de veneno inoculado e condição de saúde ou orgânica da vítima (12).

No Brasil os acidentes por serpentes gênero *Bothrops* causam maioria dos envenenamentos (5,6), que frequentemente evoluem para complicações (14,16,55). Os componentes do veneno desse gênero são responsáveis por danos teciduais locais importantes e alterações a nível sistêmico. Nesses pacientes a piora do quadro clínico está atrelada, em muitos casos, com complicações ligadas a fatores orgânicos do indivíduo como a presença de comorbidades, sistema imunológico e estado nutricional, assim como fatores externos relacionados a condutas como torniquete, uso de terapias alternativas tópicas e ingeridas (116,117) e o tempo entre a picada e atendimento (5,12). Com destaque para as complicações que mais ocorrem: infecção secundária (14–16,59), lesão renal (14,15,59–61) e sangramento sistêmico espontâneo (15,55,59).

A piora do quadro clínico está muito ligada ao desenvolvimento de complicações (14,16,55), sendo importante o uso de ferramentas que possam identificar essas possíveis complicações de forma precoce para auxiliar a equipe no planejamento das ações preventivas e curativas. Com os danos decorrentes desses acidentes pode haver a liberação de cfDNA na circulação sanguínea, com possibilidade de atuarem como preditores de gravidade nesses acidentes.

#### 1.4.1 Gene *hTERT*

A pesquisa de cfDNA como biomarcador tem sido cada vez mais realizada, e para a identificação desses fragmentos sequências genéticas são amplificadas por técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). E para a escolha do gene é necessário considerar um gene de boa referência para eficácia do ensaio e para evitar viés na quantificação do cfDNA (118).

O *hTERT* é um gene de cópia única que está localizado no braço curto do cromossomo 5 na posição 15.33 (119) e contém a informação genética para a produção de um dos principais componentes da telomerase (120,121). A telomerase é um complexo enzimático essencial para a manutenção do comprimento dos telômeros (122,123), que são estruturas compostas por segmentos repetidos da sequência de DNA, encontrados na extremidade dos cromossomos, protegendo-os contra degradação e outras reações indevidas (124), mantendo a integridade do genoma (122,125).

A telomerase é formada por dois componentes principais que trabalham de forma conjunta: a subunidade de RNA da telomerase (produzida a partir do gene *hTERC* ou *hTR*) fornecendo o modelo para o alongamento repetido dos telômeros e a subunidade transcriptase reversa da telomerase TERT (produzida a partir do gene *hTERT*), sendo responsável pela adição das repetições de telômeros nas extremidades dos cromossomos (119,123,126).

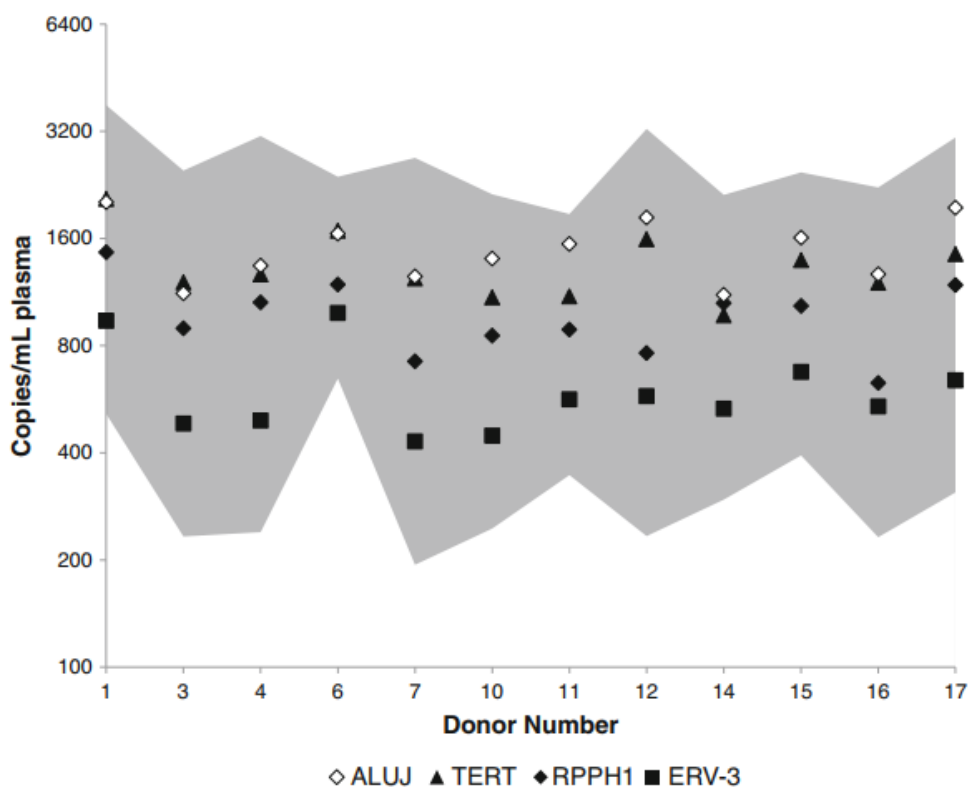
A telomerase é indetectável ou ativa em níveis baixos na maioria dos tipos celulares, mas altamente ativa em células com rápida divisão (127–129). Sua atividade nessas células permite que se dividam muitas vezes, sem danos ou apoptose (130). Mutações nos genes de manutenção dos telômeros podem resultar em perda precoce da capacidade regenerativa de tecidos e doenças (125). Alterações genéticas no gene *hTERT* estão relacionadas com patologias como leucemia mielóide aguda (131), disceratose congênita (132–136), fibrose pulmonar idiopática (137,138) e câncer (119,139–141).

Além do interesse no estudo da expressão desse gene pelas alterações genéticas como causa de patologias, outros ramos da biologia molecular o utilizam para estudos em humanos devido as suas características. Em estudos baseados na detecção da quantidade total de DNA nuclear por PCR em tempo real, representa um alvo ideal por ser um gene de cópia única, assim como por sua amplificação que é específica e robusta como demonstrado em estudos anteriores (82,86). Além disso, quando comparado a outros genes que são utilizados com a mesma finalidade, foi demonstrada uma superioridade do *hTERT* (Figura 7), fornecendo uma estimativa confiável da quantidade total de cfDNA (118).

Estudos utilizando esse gene como alvo para verificação do cfDNA foram realizados em indivíduos com patologias diversas, como em casos de pacientes pós parada cardíaca (142), câncer de pulmão (86), pancreatite aguda (85,143) e malária (82), demonstrando bons resultados na amplificação do *hTERT*, com valores significativamente mais altos em indivíduos doentes (82,86) ou mais graves (85,142,143).

Seja na avaliação da sua expressão ou em outras situações devido as suas características, estudos importantes estão utilizando cada vez mais o gene *hTERT*. Na sua amplificação por ensaios de PCR em tempo real, para verificação da quantidade total de cfDNA, os resultados são muito positivos demonstrando

que é um alvo ideal para estudos dessa natureza na pesquisa de cfDNA como biomarcador.



**Figura 7** – Comparação de genes de referência múltipla para quantificação de cfDNA plasmático. O intervalo de confiança de 95% (representado pela área cinza) associado a uma quantidade média normalizada de cfDNA calculada com base em três genes de referência (TERT, RPPH1, ERV3) e três experimentos independentes de qPCR é comparado com estimativas médias para cada uma das referências acima mencionadas genes e ALUJ para cada doador (118).

### 1.5 Preditores de gravidade nos envenenamentos

Os métodos imunoenzimáticos são utilizados para a detecção de veneno circulante, sendo estes empregados principalmente em estudos para confirmação do diagnóstico (6). Na rotina clínica de atendimento desses agravos, exames laboratoriais para a confirmação do tipo de acidente não são utilizados, sendo estes realizados de forma exclusivamente clínica (58).

Após o diagnóstico clínico do envenenamento, exames laboratoriais complementares são solicitados para o acompanhamento da vítima e para verificar a eficácia da soroterapia (5,58). Nesses acidentes os exames para avaliação da coagulação sanguínea são importantes devido as desordens hemostáticas que podem ocorrer pela ação dos componentes do veneno. Nos envenenamentos botrópicos que acontecem na Amazônia Brasileira o distúrbio hemostático mais comum é a incoagulabilidade sanguínea (15,16,55,56).

Na prática clínica, para verificar a atividade sistêmica e acompanhamento da reversão de coagulopatia os parâmetros de coagulação geralmente são avaliados: tempo de trombina, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. O tempo de coagulação (TC) é um exame muito útil que auxilia no diagnóstico e acompanhamento, sendo um teste simples e rápido que determina se o tempo da coagulação sanguínea do indivíduo está normal, prolongado ou incoagulável (5,6,58). Em pacientes com diminuição do nível de consciência é recomendado que seja realizada tomografia computadorizada de crânio para verificar a possibilidade de sangramento intracraniano (58).

Pacientes que sofreram envenenamentos por *Bothrops* na Amazônia brasileira foram avaliados quanto aos distúrbios hemostáticos, demonstrando que os níveis de fibrinogênio estavam diminuídos nos que apresentaram sangue coagulável e significativamente diminuídos ( $p < 0,001$ ) nos que apresentaram sangue o incoagulável. Na avaliação de produto de degradação de fibrina / fibrinogênio (FDP) e D-dímero, estes apresentaram níveis normais em pacientes com sangue coagulável e significativamente aumentados em pacientes com sangue não coagulável ( $p < 0,001$ ). Alfa-2-antiplasmina também esteve normal em pacientes com sangue coagulável e diminuiu significativamente em pacientes com sangue incoagulável ( $p < 0,001$ ) (55).

Na infecção secundária a acidentes ofídicos um ensaio clínico demonstrou que a incidência de infecções secundárias esteve significativamente associada a níveis mais elevados de fibrinogênio, alanina transaminase e

proteína C reativa, sugerindo a utilização desses marcadores para auxílio no diagnóstico de infecções secundárias (16).

A avaliação do perfil de moléculas imunológicas solúveis, locais e sistêmicas, foi realizada em pacientes que sofreram acidentes ofídicos por *Bothrops* Amazônia brasileira, com diferentes desfechos clínicos. O perfil imunológico circulante demonstrou diferenças na resposta Th1 entre os que desenvolveram complicações locais graves (púrpura, equimoses, edema grave, formação de bolhas e necrose) do grupo que não apresentou essas complicações, demonstrando um perfil misto e outro mais polarizado, respectivamente. Os que desenvolveram complicação local grave apresentaram uma resposta imune local mais exacerbada, sugerindo que CCL-2 e o CXCL-10 podem atuar como biomarcadores para identificação da resposta local mais intensa no envenenamento por *Bothrops* (45).

A insuficiência renal aguda, após esses acidentes, não tem patogênese completamente esclarecida, com sugestão de origem multifatorial (144), em que os fatores atuam de maneira combinada ou isolada (14,60,145,146). Na avaliação exames laboratoriais de creatinina e ureia podem ser solicitados e a elevação desses marcadores pode ocorrer em vigência da IRA (5). Devido as múltiplas definições de IRA um grupo multidisciplinar internacional propôs uma definição e classificação para uniformizar os conceitos e facilitar o diagnóstico, que é realizado baseado na dosagem da creatinina sérica ou volume urinário (147).

Em envenenamentos por *Bothrops* na região Amazônica, os fatores associados a IRA foram altos níveis de lactato desidrogenase, sangramento local e presença de comorbidades como a hipertensão arterial sistêmica (14). O sódio sérico mais baixo e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) na admissão (normal vs. anormal ou incoagulável) foram fatores associados independentemente ao desenvolvimento de IRA em acidentes botrópicos (68).

A solicitação de outros exames laboratoriais pode ser necessária dependendo da evolução clínica da vítima (5). O conhecimento de novos marcadores na área de acidentes ofídicos possui grande importância, visto que esse problema acontece em larga escala e está associado com índices importantes de morbimortalidade. Além disso, ainda existem lacunas para a identificação de ferramentas que ajudem no fortalecimento do diagnóstico e acompanhamento das vítimas desse agravo.

### 1.6 Justificativa

O ofidismo é um problema de saúde pública negligenciado que acomete milhões de pessoas, levando ao desenvolvimento de complicações e deixando sequelas permanentes. Nesses envenenamentos, o diagnóstico atualmente é realizado apenas com base nas características clínicas e fatores epidemiológicos, assim como algumas complicações decorrentes desses acidentes também são identificadas por meio de dados clínicos. De acordo com o tipo de complicação alguns exames podem indicar a presença de: insuficiência renal (ureia e creatinina), hemorragias (TC, fibrinogênio), complicação local grave (CCL-2 e o CXCL-10) e infecção (VHS, PCR). E no âmbito desses envenenamentos mais estudos são necessários para a identificação de marcadores cada vez mais sensíveis e/ ou específicos para a prevenção de complicações e acompanhamento, principalmente dos acidentes por *O* que possuem alta frequência no país e pela gravidade dos casos, devido ao grande potencial inflamatório desses acidentes.

Estudos têm evidenciado que o cfDNA é um potencial biomarcador no diagnóstico e prognóstico de várias patologias. A detecção desses fragmentos como marcadores proporciona entre suas vantagens a realização da coleta de material biológico por técnica minimamente invasiva, utilização de uma quantidade pequena de amostra e apresenta-se como uma ferramenta sensível, pois a amplificação é por meio da PCR em tempo real de um gene de cópia única.



A dosagem de cfDNA nos envenenamentos ofídicos e em suas complicações ainda é desconhecida e a identificação de novas ferramentas mais precisas e eficazes são necessárias, podendo auxiliar no diagnóstico facilitando uma tomada de decisão ainda mais individualizada, aprimoramento da avaliação inicial, identificar rapidamente potenciais casos graves, detecção prévia de complicações, melhorar o manejo clínico, redução de sequelas permanentes, podendo reduzir o impacto causado por envenenamentos ofídicos e custos das internações prolongadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar o potencial do DNA livre de células como biomarcador de gravidade em acidentes botrópicos.

### 2.2 Específicos

- Identificar sinais clínicos e laboratoriais das vítimas de acidentes botrópicos através do banco de dados;
- Identificar a presença DNA livre de células no plasma dos pacientes que sofreram esses acidentes;
- Associar os níveis de DNA livre de células com aspectos clínicos e laboratoriais para gravidade desses eventos;

### 3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

#### **PLASMA CELL-FREE DNA IS A POOR MARKER OF THE SEVERITY OF *BOTHROPS* ENVENOMATIONS**

Endila de Souza Barbosa<sup>1,2</sup>, Siuhelem Rocha da Silva<sup>3</sup>, Hiochelson Najibe Santos Ibiapina<sup>1,2</sup>, Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,4,5</sup>, Marco Aurélio Sartim<sup>4</sup>, Fernando Fonseca Val<sup>1,2</sup>, Iran Mendonça-da-Silva<sup>1,2</sup>, Luiz Carlos de Lima Ferreira<sup>1,2,6</sup>, Wuelton Marcelo Monteiro<sup>1,2</sup>, Gisely Cardoso de Melo<sup>1,2</sup>, Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett<sup>1,2,7\*</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil

2 Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazil

3 Ciências da Saúde, Centro Universitário do Norte (UniNorte), Manaus, Brazil

4 Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil

5 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil

6 Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

7 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Brazil

## Abstract

In the Amazon, around 90% of snakebites are caused by the *Bothrops* genus. Complications arising from *Bothrops* envenomations are common as a result of the inflammatory and coagulotoxic activities of toxins found in the venom of these snakes. The aim of this study was to investigate the potential of cell-free DNA (cfDNA) as a biomarker of severity in *Bothrops* snakebites. Patients were treated at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), Manaus, Brazilian Amazon. cfDNA levels in plasma were measured by amplifying the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) sequence using quantitative RT-PCR. Median levels of cfDNA were compared between envenomed and healthy volunteers and among patients presenting different complications. Of the patients included, 82.9% were male, mainly from rural areas, with a mean age of 32.8 years, and accidents were mainly classified as serious (39.5%). In the laboratorial characterization, elevated values of leukocytes, neutrophils, prothrombin time, international normalized ratio and fibrinogen levels were observed to be considerably below normal parameters. In the analysis of the ROC curve, when compared to healthy blood donors, cfDNA levels demonstrated an AUROC of 0.722. A correlation analysis using laboratory variables showed positive correlation with lactate dehydrogenase ( $p = 0.033$ ) and platelet count ( $p = 0.003$ ). When cfDNA levels were compared with clinical complications, significant statistical differences were only found among individuals with mild and severe pain ( $p < 0.05$ ). The results show that the cfDNA in patients after *Bothrops* envenomations of different levels of severity, as well as those with or without clinical complications, did not present statistically significant

differences. On the other hand, levels are significantly higher in victims of *Bothrops* envenomation when compared to healthy blood donors. Thus, further studies should be carried out so that, in the future, cfDNA can perhaps be used to confirm the detection of poisoning.

**Keywords:** Snakebites, *Bothrops*, Cell-free nucleic acids, Biomarkers.

## 1. Introduction

Snakebites are a worldwide neglected health problem (World Health Organization, 2019). The estimate is that there are 1.8 to 2.7 million envenomations per year, with 81 to 138 thousand deaths (Gutiérrez et al., 2017) and 400 thousand permanent disabilities worldwide (The Lancet, 2019). In Brazil, the average annual number of snakebites is around 28,000 cases, and these occur predominantly in the Brazilian Amazon (Chippaux, 2017). The *Bothrops* genus is responsible for around 90% of recorded envenomations (Silva et al., 2015). In the Brazilian Amazon, incidence rates are higher than 60 cases per 100,000 inhabitants in some areas (Magalhães et al., 2019), with a case-fatality rate of 0.7% (Souza et al., 2018).

Proteomic analysis of *B. atrox* venom has revealed that the most abundant proteins are metalloproteinases (SVMP), type-C lectin (CLT), serineproteases (SVSP), phospholipases A2 (PLA2), L-amino acid oxidase (LAAO) and cysteine-

rich secretory protein (CRISP) (Calvete et al., 2011; Sousa et al., 2017). After inoculation, toxins begin to cause pathological effects at the site of the bite, on the adjacent tissue and, as the distribution of the venom occurs in the body, the toxins begin to act systemically, reaching various organs (Warrell, 2010). Local manifestations include severe pain and edema (Alves et al., 2018; Bernal et al., 2019; S. S. de Oliveira et al., 2019; S. S. Oliveira et al., 2019; Sachett et al., 2017). Prolonged clotting time is the most common coagulation disorder, observed in around 50% of the patients (Bernal et al., 2019; Moreno et al., 2005; S. S. de Oliveira et al., 2019; Sachett et al., 2017). The most prevalent complications are secondary infection (40%) (Sachett et al., 2017), acute kidney failure (Alves et al., 2018) and spontaneous bleeding (15,3%) (S. S. de Oliveira et al., 2019).

According to Brazilian and other official guidelines, clinical severity is used in order to define antivenom dosage (Brasil, 2019). Tissue injury after snakebites leads to the alteration of some blood parameters, such as fibrinogen, fibrin/fibrinogen degradation product (FDP), D-dimers, clotting time, kidney function markers, creatine phosphokinase (CK), C-reactive protein, and other markers that can be used to monitor the patient (Brasil, 2001). Recently, severe local complications were associated to chemokines MCP-1 (CCL-2) and IP-10 CXCL-10 levels (Ibiapina et al., 2019). In the context of *Bothrops* envenomations, the search for new markers that are indicative of both inflammatory and cell lysis is of great importance to accurately classify patients according to severity and thus provide better management.

Cell-free DNA (cfDNA) has been widely studied for diagnosis and prognosis (Aucamp et al., 2018). Increased levels of cfDNA reflect various clinical conditions, including cancer (Cheng et al., 2016; Jung et al., 2010; Lim et al., 2015; Mader and Pantel, 2017; Schwarzenbach et al., 2011; Sorber et al., 2017), trauma (Gögenur et al., 2017; Lam et al., 2003; Ren et al., 2013), lupus (Atamaniuk et al., 2012; Hendy et al., 2016), sepsis (Clementi et al., 2016; Hou et al., 2016), malaria (Franklin et al., 2011) and dengue (Phuong et al., 2019). To the best of our knowledge, the levels of these markers in snakebites have never been studied. Thus, the aim of this study was to investigate the potential of cfDNA as a biomarker of severity in *Bothrops* snakebites.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Study design and participants**

The study included patients who had been envenomed by *Bothrops* and were treated at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD). The *Bothrops* snakebite diagnosis was made based on clinical characteristics, further confirmed by identifying the snake brought to the hospital by the patient and/or by enzyme immunoassay. Patients were hospitalized and followed-up for seven days. Patients who arrived at the hospital more than 24 hours after the bite had occurred, those who received antivenom in other health

units before admission to the FMT-HVD, pregnant women and patients with chronic diseases were not enrolled.

Control samples were collected from 20 healthy subjects who had never suffered snakebites were selected as blood donors at the *Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas* (FHEMOAM), the city's blood bank.

Demographic and clinical data were collected using a standardized questionnaire. Blood samples were collected by venipuncture on admission (D0 – on admission; 24 hours post-admission – D1; 48 hours post-admission – D2; 72 hours post-admission – D3; and 7 days post-admission – D7).

## **2.2. Definition of complications**

Patients were classified according to severity in accordance with the Brazilian Ministry of Health guidelines in which: i) Mild cases: patients with pain and/or edema and bruising at the site of the bite; Moderate cases: patients with more evident local manifestations, without necrosis and systemic signs, such as coagulopathy and bleeding without impairment of the general condition; and iii) Severe cases: patients with heavy bleeding, hypotension, shock and/or acute renal failure (Brasil, 2019). In this study, secondary infection was defined as the presence of abscess or cellulitis (Stevens et al., 2014, 2005) at the site of the bite



up to 7 days after admission (Sachett et al., 2017). The hemorrhages were spontaneous systemic bleeding (gingival bleeding, conjunctival hemorrhage, hemoptysis and hematuria) (Brasil, 2001). Acute renal failure was defined according to guidelines of the acute kidney injury network (AKIN), in which: Stage I – is defined as an increase in basal creatinine levels by 199% or >0.3 mg/dL; Stage II – is an increase of 200-299% ; and Stage III – is an increase of more than 300% in basal creatinine or serum creatinine levels above 4.0 mg/dL, with a sudden increase of at least 0.5 mg/dL (Kellum et al., 2012). All patients who developed this complication were followed up by the institution's nephrologist. Numerical scale and classification with values from 1 to 10 were used to assess pain (Huskisson EC (1982), n.d.).

### **2.3. Quantification of cfDNA in plasma**

The cfDNA was extracted using QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen ®), following the manufacturer's instructions. The human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) target was used to quantify cfDNA in plasma. Primers and probes with the following initiator and probe sequences were used: Primer Forward: 5 - GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3; Primer Reverse: 5-GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3; probe VIC5-TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3 TAMRA, as previously described (Franklin et al., 2011; Sozzi et al., 2003). DNA quantification was performed by serial dilution in plasmids

containing the target region and included in three concentrations:  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$ . The cfDNA was amplified in an Applied Biosystems 7500 Fast System®.

#### **2.4. Statistical analysis**

Data normality was tested using the Shapiro-Wilk test and demonstrated a nonparametric distribution. In the comparison, the cfDNA between the pairs of patients and healthy controls, the Mann-Whitney test was performed for comparison of medians. The analysis of the receiver operating characteristics curve (ROC) was performed to evaluate the cfDNA and to confirm snakebite envenomation. Correlations between continuous variables were tested using Pearson's correlation test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.0) and Stata (version 15.1). Differences in results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

#### **2.5. Ethics statement**

This study was approved by the Research Ethics Committee of the *Universidade do Estado do Amazonas* (UEA), under approval number 3.456.147 (2019). All participants signed an informed consent form. Treatment with antivenom followed the protocol of the Ministry of Health (Brasil, 2019).

### 3. Results

Among 186 patients included, 84 had plasma samples available and, after the application of the aforementioned exclusion criteria, 76 patients were included in the study. A total of 8 individuals were excluded due to the presence of comorbidities and use of medications (Figure 1). All included patients had suffered an envenomation caused by a *Bothrops* sp. which was confirmed via enzyme immunoassay.

Of the subjects included, 82.9% were male, 90.8% were from rural areas, and their mean age was 32.8 years. The lower limbs were most often affected (88.2%) and the time between the bite and care being given predominated between 0 – 6 hours (84.2%). Previous snakebites were reported by 17.1% of victims and the tourniquet was used by 22.4%. Adverse reaction occurred in 16.0%, severe pain in 60.5% and mild edema in 48.7%. Snakebites were classified mainly as severe (39.5) (Table 1).

The laboratory tests performed on admission (Table 2) showed that the levels of leukocytes, neutrophils, international normalized ratio (INR) and prothrombin time (PT) were above normal parameters. On the other hand, fibrinogen levels were considerably below the normal parameter, and in many of the patients levels were undetectable.

When compared to healthy donors [Median (IQR): 130.3 copies/ $\mu$ L (51.9 - 1427)], patients showed statistically significant differences during follow-up: D0 (admission) [1591 copies/ $\mu$ L (351.8 - 4114)], D1 [1173 copies/ $\mu$ L (324.3 - 3284)], D2 [1051 copies/ $\mu$ L (211.6 - 2483)], D3 [931.4 copies/ $\mu$ L (365.6 - 2667)] and D7 [911.8 copies/ $\mu$ L (213.4 - 3506)], with a p value  $<0.05$  (Figure 2A). Plasma cell-free DNA in patients who suffered envenomation versus healthy donors (control) showed AUC of 0.722 (95% CI = 0.630 to 0.897;  $p = 0.003$ ) (Figure 2B). With a cut-off point  $> 242.5$  copies/ $\mu$ L, cfDNA had a sensitivity of 88.3% (95% CI = 77.4% - 95.2%) and a specificity of 63.2% (95% CI: 38, 4 - 83.71%) in the detection of snakebite poisoning.

In the correlation analysis between cfDNA (copies/ $\mu$ L) and laboratory variables, we investigated the possible correlation with creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinine, urea, edema, leukocytes, neutrophils, erythrocyte sedimentation rate, erythrocytes prothrombin time, international standardized ratio, fibrinogen and platelets. Among all evaluated parameters, a positive linear correlation was found with lactate dehydrogenase (LDH) (Pearson  $r = 0.227$ ,  $p = 0.033$ ) and platelet count (Pearson  $r = 0.372$ ,  $p = 0.003$ ), as shown in Figure 3.

The levels of cfDNA were evaluated in relation to clinical parameters and expressed as medians and interquartile range. In the classification of the envenomation, the mild cases had a median of 1565 copies/ $\mu$ L (IQR: 249 - 3237), a moderate 1032 copies/ $\mu$ L (456.4 - 4015) and severe 2369 copies/ $\mu$ L (248 -

4526) (Figure 4A). In mild edema 1565 copies/ $\mu$ L (243.9 - 4056), moderate 1245 copies/ $\mu$ L (444.7 - 3663) and intense 2647 copies/ $\mu$ L (720.3 - 10091) (Figure 4B). Normal bleeding time presented 1032 copies/ $\mu$ L (592.2 - 8688), and prolonged bleeding time 1591 copies/ $\mu$ L (273.2 - 4056) (Figure 4C).

In the presence of secondary infection 2227 copies/ $\mu$ L (432.9 - 7223) and in the absence of secondary infection 1495 copies/ $\mu$ L (268.7 - 3994). In those who had hemorrhages 1495 copies/ $\mu$ L (253 - 5553) were observed and in the absence of this complication, 1660 copies/ $\mu$ L (385.4 - 4173). In acute renal insufficiency (ARI) 2208 copies/ $\mu$ L (92.3 - 6472) and in the absence of ARI, 1591 copies/ $\mu$ L (409.2 - 3624). In victims with mild pain, 289.7 copies/ $\mu$ L (139.3-1197), with moderate pain, 860.9 copies/ $\mu$ L (263.6 - 2535), and with intense pain 2581 copies  $\mu$ L (450.6 - 6693). Significant statistical differences were found among patients who had mild and severe pain ( $p < 0.05$ ).

## **Discussion**

This is the first study to investigate whether plasma levels of cfDNA can be used as a biomarker of severity in victims of *Bothrops* snakebites. Elevated plasma levels of these fragments are usually associated with various pathological processes (Schwarzenbach et al., 2011). As a result, studies have been conducted to evaluate these fragments as being possible markers for prognosis and diagnosis of clinical conditions, such as cancer (Cheng et al., 2016; Jung et al., 2010; Lim et al., 2015; Mader and Pantel, 2017; Schwarzenbach et al., 2011;

Sorber et al., 2017), trauma (Gögenur et al., 2017; Lam et al., 2003; Ren et al., 2013), inflammatory diseases (Atamaniuk et al., 2011; Hendy et al., 2016; Rykova et al., 2017) and infectious diseases (Clementi et al., 2016; Franklin et al., 2011; Phuong et al., 2019).

In this study, we have shown that cfDNA levels were significantly elevated in snakebite cases when compared to healthy donors during the follow-up period. In addition, the analysis of the ROC curve for the prediction of envenomation demonstrated an AUROC of 0.722. On the other hand, we found no significant difference in cfDNA levels between patients who develop or do not develop complications. This suggests that cfDNA does not vary between patients with and without complications arising from the snakebite.

Among the various known causes of cfDNA release are inflammation (Atamaniuk et al., 2011; Hendy et al., 2016; Rykova et al., 2017), infection (Clementi et al., 2016; Franklin et al., 2011; Phuong et al., 2019), oxidative stress (Ermakov et al., 2013) or causes arising from poor circulation, such as the release of neutrophil extracellular traps (NETs), which may be correlated with snakebites (Gould et al., 2015; Jackson Chornenki et al., 2019). *Bothrops* venom is able to induce the release of neutrophil extracellular traps (NETs) (Setubal et al., 2013) that occur through NETosis, a type of cell death in which active neutrophils release traps in response to inflammation, infection, or hypoxia (Gould et al., 2015; Jackson Chornenki et al., 2019; Pokrywka et al., 2015).

As for the causes of DNA release in *Bothrops* envenomations, these remain unknown. The presence of these fragments in the body fluids constitutes an event which is not yet fully understood and, although apoptosis and necrosis are suspected to be the primary causes of the occurrence (Diehl et al., 2008; Lin et al., 2017; Liu et al., 2019), it is suggested that several characteristics are involved in the release of cfDNA, and there may be the interaction of the release mechanisms, resulting in additional release (Aucamp et al., 2018).

The venom of the genus *Bothrops* has two important classes of proteins, these being metalloproteinases and phospholipases. The former are able to destroy the basal membrane of blood vessels by hydrolysis of membrane components (Baldo et al., 2010; Escalante et al., 2011, 2006) and the latter, phospholipases, can destroy cell membranes by direct enzymatic action on membrane phospholipids (Dennis et al., 2011), leading to an increase in the concentration of calcium in the cytosol, causing damage and cell necrosis (Montecucco et al., 2008; Warrell, 2010) with the release of cellular components such as cfDNA (Schwarzenbach et al., 2011). This may be one of the causes of the release of cfDNA after envenomations.

In the laboratory characterization, patients presented values of leukocytes, especially neutrophils, which were above normal parameters. This is because neutrophils rapidly migrate to tissues, and are considered the first line of defense of the organism (Kaplan and Radic, 2012; Nathan, 2006). In this acute local inflammatory response, there is an increase in vascular permeability and influx of

leukocytes, mainly neutrophils and macrophages, with parallel induction in the production of inflammatory mediators (Moreira et al., 2012). In addition, aggravation by the inflammatory response may occur, leading to severe local damage in these envenomations (Bonavita et al., 2006; Chacur et al., 2003; Mamede et al., 2016; Nascimento et al., 2010; Teixeira et al., 2005).

Clinical parameters were evaluated and showed statistically significant differences in cfDNA levels between those who reported mild and severe pain. In these accidents pain and edema are the most evident clinical signs in response to acute local inflammatory reaction (Alves et al., 2018; Pardal et al., 2004). Tissue injury caused by toxins, along with these inflammatory events, activate pain pathways in peripheral sensory fibers through the activation of nociceptors that conduct information to the central nervous system regarding harmful stimuli (Cummins et al., 2007).

In the correlation analysis of cfDNA and laboratory parameters, a positive linear correlation with LDH (Pearson  $r = 0.227$ ,  $p = 0.033$ ) was found. This enzyme presents elevated levels in response tissue injury, necrosis, hypoxia, hemolysis and myocardial infarction (Miao et al., 2013). In snakebites, its increase demonstrated a significant association ( $p < 0.002$ ) with the development of acute renal failure (Alves et al., 2018).

In this study, a positive correlation of cfDNA and platelet count was found (Pearson  $r = 0.372$ ,  $p = 0.003$ ), suggesting that with increasing cfDNA levels this



marker also increases. On the other hand, in patients with *P. vivax* malaria (Pearson  $r = 0.6479$ ,  $p = 0.0027$ ), a correlation with platelet count was negative (Franklin et al., 2011), just as in patients with dengue (Spearman  $r = 0.46$ ,  $p = 0.0003$ ) (Phuong et al., 2019) which indicates that with the increase in cfDNA, there is a decrease in platelet levels.

Patients had prothrombin time (prolonged) and international normalized ratio (INR) above normal parameters, and considerably low fibrinogen levels. This is because in these envenomations, the most common hemostatic disorder is blood incoagulability (Bernal et al., 2019; Moreno et al., 2005; S. S. de Oliveira et al., 2019; Sachett et al., 2017) and, to verify systemic activity and monitor the reversal of coagulopathy, prothrombin time, activated thromboplastin partial time and fibrinogen can be evaluated (Brasil, 2009). Prolongation of prothrombin time was efficient in the identification of hypofibrinogenemia in patients bitten by another snake genus of the viperidae family (Pongpit et al., 2012). In addition, in patients affected by *Bothrops*, fibrinogen levels were significantly different in patients with non-coagulable blood (S. S. de Oliveira et al., 2019). However, there was no correlation between cfDNA and prothrombin time, INR and fibrinogen. In addition, there was no significant difference in cfDNA levels between patients with coagulable and incoagulable blood, or those who had or did not have bleeding.

Plasma cfDNA levels in patients with secondary infections were compared to those who did not develop this complication, and this demonstrated that there

was no significant difference between these two groups. Secondary infection is the main local complication in snakebites (Alves et al., 2018; Bernal et al., 2019; Sachett et al., 2017; Souza, 2002) and the incidence of secondary infection was significantly associated with elevated levels of fibrinogen, alanine transaminase and C-reactive protein (Sachett et al., 2017). However, further studies are needed in the search for markers for this complication as a result of *Bothrops* snakebites.

In other infections such as sepsis, cfDNA levels were significantly higher when compared to the healthy controls (Clementi et al., 2016; Hou et al., 2016; Jackson Chornenki et al., 2019). There were no differences between cfDNA levels in patients with Gram-positive or negative microorganisms and fungal infections (Clementi et al., 2016). In addition, higher levels in septic patients were associated with a negative result (Clementi et al., 2016; Hou et al., 2016). Similarly, in infectious diseases such as malaria (Franklin et al., 2011) and dengue (Phuong et al., 2019), sepsis levels were significantly higher in subjects affected by either disease. CfDNA levels were measured in conjunction with markers of NETosis in sepsis and trauma, and the results showed that the source and mechanisms of release differ between the two diseases. This suggests that, due to sepsis, cfDNA is released mainly by NETosis-activated neutrophils (Jackson Chornenki et al., 2019).

In this study, cfDNA levels in patients with acute renal failure were higher compared to those who did not have this complication, though there were no statistical differences. Acute renal failure is an important systemic complication in

*Bothrops* envenomations (Albuquerque et al., 2014; Alves et al., 2018; Bernal et al., 2019; Otero et al., 2002; Souza, 2002). The components of the poison have direct renal action and cause structural changes in nephrons (Castro et al., 2004; Chippaux, 1998; Sousa et al., 2013) and renal physiology (Barbosa et al., 2002; Júnior et al., 2019); acute tubular necrosis is the most common cause of kidney injury as a result of a snake bite (Sitprija, 2006). In patients undergoing cardiac surgery, in which cardiopulmonary by-pass is used, cfDNA presented significantly increased levels in those who developed acute kidney injury (AKI) (>24 hours) (Merkle et al., 2019). On the other hand, in a similar study, nuclear and mitochondrial cfDNA levels showed no differences when compared to individuals who did not develop kidney injury (Whitaker et al., 2015).

One limitation of the study was the small sample number in the groups of patients who suffered complications, and this was due to the short time period involved. In addition, no dosage of other substances, such as cytokines, as well as NETosis markers was performed to help elucidate the causes of cfDNA release in these cases. However, since this is the first study to evaluate cfDNA plasma levels in snakebites, the data is considered to be of great importance, and it is hoped that it will contribute to the beginning of a better understanding of the role of cfDNA in these envenomations.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the results of this study showed that patients had elevated values of leukocytes, neutrophils, international normalized ratio (INR) and prothrombin

time (PT). On the other hand, fibrinogen levels decreased considerably, and in many of the patients levels were undetectable. Among all of the laboratory parameters evaluated, a significant positive correlation was found between the levels of cfDNA with platelets and LDL. As for the different levels of severity of patients bitten by a *Bothrops*, the levels of cfDNA showed no statistically significant differences. On the other hand, levels were significantly higher in *Bothrops* victims than in the healthy controls. Thus, further studies should be carried out so that, in the future, cfDNA can be used to confirm the diagnosis of envenomation by *Bothrops*. In addition, due to the scarcity of studies involving cfDNA in snake envenomations, additional information on the role of cfDNA in the pathogenesis of the snakebite envenomations is needed.

## 7. Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## 8. References

- Albuquerque, P.L.M.M., Silva Junior, G.B., Jacinto, C.N., Lima, J.B., Lima, C.B., Amaral, Y.S., Veras, M.D.S.B., Mota, R.M.S., Daher, E.F., 2014. Acute kidney injury after snakebite accident treated in a Brazilian tertiary care centre. *Nephrology* 19, 764–770. <https://doi.org/10.1111/nep.12327>
- Alves, E.C., Gonc, J.D.A., Sousa, D.D.B., Oliveira, S. De, Nascimento, F., Santos, S., Moura, M., Wen, F.H., Monteiro, W.M., Carlos, L., Ferreira,

- D.L., 2018. Predicting acute renal failure in Bothrops snakebite patients in a tertiary reference center , Western Brazilian Amazon. PLoS One 01, 1–16.
- Atamaniuk, J., Hsiao, Y.Y., Mustak, M., Bernhard, D., Erlacher, L., Fodinger, M., Tiran, B., Stuhlmeier, K.M., 2011. Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity. Eur. J. Clin. Invest. 41, 579–583.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02435.x>
- Atamaniuk, J., Kopecky, C., Skoupy, S., Säemann, M.D., Weichhart, T., 2012. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant. 27, 902–905. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr695>
- Aucamp, J., Bronkhorst, A.J., Badenhorst, C.P.S., Pretorius, P.J., 2018. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. Biol. Rev. 93, 1649–1683.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12413>
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000727>
- Barbosa, P.S.F., Havt, A., Facó, P.E.G., Sousa, T.M., Bezerra, I.S.A.M., Fonteles, M.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C., Monteiro, H.S.A., 2002. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. Toxicon 40, 1427–1435. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00156-3)
- Bernal, J.C.C., Bisneto, P.F., Pereira, J.P.T., Ibiapina, H.N. dos S., Sarraff,

L.K.S., Monteiro-Júnior, C., da Silva Pereira, H., Santos, B., de Moura, V.M., de Oliveira, S.S., Lacerda, M., Sampaio, V., Kaefer, I.L., Gutiérrez, J.M., Bernarde, P.S., Fan, H.W., Sachett, J., da Silva, A.M.M., Monteiro, W.M., 2019. “ *Bad things come in small packages* ”: predicting venom-induced coagulopathy in *Bothrops atrox* bites using snake ontogenetic parameters. Clin. Toxicol. 0, 1–9.

<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1648817>

Bonavita, A.G.C., da Costa, A.S., Pires, A.L.A., Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Cordeiro, R.S.B., Martins, M.A., e Silva, P.M.R., 2006. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. Toxicol 47, 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.02.017>

Brasil, 2019. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico].

Brasil, 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: zoonozes. Brasília.

Brasil, 2001. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Funasa 120.

Calvete, J.J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A.M., Lomonte, B., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., Chalkidis, H.M., Mourão, R.H.V., Furtado, M.F.D., Moura-Da-Silva, A.M., 2011. Snake population venomomics and

antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J. Proteomics* 74, 510–527.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>

Cardoso, J.L.C., Fan, H.W., Franca, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Tomy, S.C., Santoro, M.L., 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *QJM An Int. J. Med.* 315–325. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068818>

Castro, I. de, Burdmann, E.D.A., Seguro, A.C., Yu, L., 2004. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon* 43, 833–839.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.015>

Chacur, M., Longo, I., Picolo, G., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Guerra, J.L., Teixeira, C.F.P., Cury, Y., 2003. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon* 41, 667–678.

[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00007-2)

Cheng, F., Su, L., Qian, C., 2016. Circulating tumor DNA: A promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* 7, 48832–48841.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9453>

Chippaux, J.-P., 1998. Reviews / Analyses Snake-bites : appraisal of the global situation. *Bull. World Health Organ.* 76, 515–524.

Chippaux, J., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas.

PLoS Negl. Trop. Dis. 11(6): e0003939.

Clementi, A., Virzì, G.M., Brocca, A., Pastori, S., De Cal, M., Marcante, S.,

Granata, A., Ronco, C., 2016. The Role of Cell-Free Plasma DNA in

Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif.* 41, 34–40.

<https://doi.org/10.1159/000440975>

Cummins, T.R., Sheets, P.L., Waxman, S.G., 2007. The roles of sodium

channels in nociception : Implications for mechanisms of pain 131, 243–

257. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.026>

Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase

A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication,

Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–

6185.

Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton,

K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Diaz,

L.A., 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.*

14, 985–990. <https://doi.org/10.1038/nm.1789>

Ermakov, A. V, Konkova, M.S., Kostyuk, S. V, Izevskaya, V.L., Baranova, A.,

Veiko, N.N., 2013. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human

Cells 2013.

Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson, M., Jay, W.,

2011. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability : Exploring

the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom



Metalloproteinases 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028017>

Escalante, T., Shannon, J., Moura-da-silva, A.M., María, J., Fox, J.W., 2006.

Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases : A biochemical and immunohistochemical study 455, 144–153.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.09.018>

Franklin, B.S., Vitorino, B.L.F., Coelho, H.C., Menezes-Neto, A., Santos, M.L.S.,

Campos, F.M.F., Brito, C.F., Fontes, C.J., Lacerda, M. V., Carvalho, L.H.,

2011. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of plasmodium vivax malaria. PLoS One 6.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019842>

Gögenur, M., Burcharth, J., Gögenur, I., 2017. The role of total cell-free DNA in

predicting outcomes among trauma patients in the intensive care unit : a systematic review. Crit. Care 1–10. [https://doi.org/10.1186/s13054-016-](https://doi.org/10.1186/s13054-016-1578-9)

1578-9

Gould, T.J., Lysov, Z., Liaw, P.C., 2015. Extracellular DNA and histones:

Double-edged swords in immunothrombosis. J. Thromb. Haemost. 13,

S82–S91. <https://doi.org/10.1111/jth.12977>

Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J.,

Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. Nat. Publ. Gr. 3, 1–21.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>

Hendy, O.M., Abdel, T., El, M.A., Khalaf, F.A., Kotb, S.E., Khalil, A., Ali, S.R.,

2016. Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus

erythematosus severity and monitoring of therapy. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 79–85.

Hou, Y.Q., Liang, D.Y., Lou, X.L., Zhang, M., Zhang, Z. huan, Zhang, L. rong, 2016. Branched DNA-based Alu quantitative assay for cell-free plasma DNA levels in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *J. Crit. Care* 31, 90–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.10.013>

Huskisson EC (1982), n.d. Measurement of pain. *J Rheumatol* 9: 768–769.

Ibiapina, H.N.S., Costa, A.G., Sachett, J.A.G., Silva, I.M., Tarragô, A.M., Neves, J.C.F., Kerr, M.W.A., Santana, M.F., Martins-Filho, O.A., Lacerda, M.V.G., Ferreira, L.C.L., Malheiro, A., Monteiro, W.M., 2019. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in bothrops atrox snakebites. *Front. Immunol.* 10, 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01882>

Jackson Chornenki, N.L., Coke, R., Kwong, A.C., Dwivedi, D.J., Xu, M.K., McDonald, E., Marshall, J.C., Fox-Robichaud, A.E., Charbonney, E., Liaw, P.C., 2019. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med. Exp.* 7.  
<https://doi.org/10.1186/s40635-019-0251-4>

Jung, K., Fleischhacker, M., Rabien, A., 2010. Clinica Chimica Acta Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — A critical appraisal of the literature. *Clin. Chim. Acta* 411, 1611–1624.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.032>

Júnior, F., Jorge, A., Marinho, A., Silveira, J., Alves, N., Costa, P., Silva, P., Chaves-Filho, A., Lima, D., Sampaio, T., Morais, G., Evangelista, J., Martins, A., Jr, R., Macedo, D., Jorge, R., Monteiro, H., 2019. Bothrops alternatus snake venom induces cytokine expression and oxidative stress on renal function. *Curr Top Med Chem*.

Kamiguti, A.S., Cardoso, J.L.C., Theakston, R.D.G., Sano-Martins, I.S., Hutton, R.A., Rugman, F.P., Warrell, D.A., Hay, C.R.M., 1991. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. *Toxicon* 29, 961–972. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90079-7)

Kaplan, M.J., Radic, M., 2012. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J. Immunol.* 2688–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>

Kellum, J.A., Lameire, N., Aspelin, P., Barsoum, R.S., Burdmann, E.A., Goldstein, S.L., Joannidis, M., Herzog, C.A., Kribben, A., Levey, A.S., MacLeod, A.M., Mehta, R.L., Murray, P.T., 2012. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury [Internet] .*Kidney international supplements.*, Official Journal of The International of Nephology.

Lam, N.Y., Rainer, T.H., Chan, L.Y., Joynt, G.M., Lo, Y.M., 2003. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 49, 1286–1291. <https://doi.org/10.1373/49.8.1286>

Lim, S.H., Spring, K.J., De Souza, P., Mackenzie, S., Bokey, L., 2015. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur. J.*

Surg. Oncol. 41, 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.12.005>

Lin, Z., Neiswender, J., Fang, B., Ma, X., Zhang, J., Hu, X., 2017. Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8, 26625–26636. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15775>

Liu, Z.-B., Ezzedine, N.E., Eterovic, A.K., Ensor, J.E., Huang, H.J., Albanell, J., Choi, D.S., Lluch, A., Liu, Y., Rojo, F., Wong, H., Martínez-Dueñas, E., Guerrero-Zotano, Á., Shao, Z.-M., Darcourt, J.G., Mills, G.B., Dave, B., Chang, J.C., 2019. Detection of breast cancer stem cell gene mutations in circulating free DNA during the evolution of metastases. *Breast Cancer Res. Treat.* <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05374-x>

Mader, S., Pantel, K., 2017. Liquid biopsy: Current status and future perspectives. *Oncol. Res. Treat.* 40, 404–408. <https://doi.org/10.1159/000478018>

Magalhães, S.F.V., Peixoto, H.M., Moura, N., Monteiro, W.M., De Oliveira, M.R.F., 2019. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: A descriptive study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 113, 143–151. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try121>

Mamede, C.C.N., De Sousa, B.B., Pereira, D.F.D.C., Matias, M.S., De Queiroz, M.R., De Moraes, N.C.G., Vieira, S.A.P.B., Stanziola, L., De Oliveira, F., 2016. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon* 117, 37–45.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.006>

Merkle, J., Daka, A., Deppe, A.C., Wahlers, T., Paunel-Görgülü, A., 2019. High levels of cell-free DNA accurately predict late acute kidney injury in patients after cardiac surgery. *PLoS One* 14, 1–15.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548>

Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., Huang, G., 2013. Lactate dehydrogenase a in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 65, 904–910. <https://doi.org/10.1002/iub.1216>

Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912.

<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>

Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., da Silva, H.B., Fernandes, C.M., D'Império Lima, M.R., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* 60, 12–20.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.004>

Moreno, E., Queiroz-Andrade, M., Lira-Da-Silva, R.M., Tavares-Neto, J., 2005. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 15–21.

Nascimento, N.G., Sampaio, M.C., Amaral Olivo, R., Teixeira, C., 2010. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory

mediators involved. *Toxicon* 55, 343–352.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.08.009>

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev.* 6, 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>

Oliveira, S.S. de, Alves, E.C., Santos, A.S. dos, Nascimento, E.F., Pereira, J.P.T., Silva, I.M. da, Sachett, J., Ibiapina, H.N. dos S., Sarraf, L.K.S., Bernal, J.C.C., Sousa, L.A.F. de, Colombini, M., Marques, H.O., Lacerda, M.V.G. de, Moura-da-Silva, A.M., Fan, H.W., Ferreira, L.C. de L., Sano Martins, I.S., Monteiro, W.M., 2019. Bothrops snakebites in the Amazon: recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy. *Clin. Toxicol.* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1634273>

Oliveira, S.S., Alves, E.C., Santos, A.S., Pereira, J.P.T., Sarraf, L.K.S., Nascimento, E.F., De-Brito-sousa, J.D., Sampaio, V.S., Lacerda, M.V.G., Sachett, J.A.G., Sano-Martins, I.S., Monteiro, W.M., 2019. Factors associated with systemic bleeding in bothrops envenomation in a tertiary hospital in the brazilian amazon. *Toxins (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11010022>

Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M.B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J.L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodríguez, L.M., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Gómez, L.M., Uribe, F.L., Cárdenas, S., Núñez, V., Díaz, A., 2002. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40, 1107–1114.

- Pardal, P.P. de O., Souza, S.M., Monteiro, M.R. de C. da C., Fan, H.W.,  
Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Sandra Corrallo, T., Sano-martins, I.S.,  
Maria Cristina Cirillo de Souza-e-Silva, Colombini, M., Koderá, N.F.,  
Moura-da-silva, A.M., Cardoso, D.F., Velarde, D.T., Kamiguti, A.S.,  
Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2004. Clinical trial of two antivenoms for  
the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon  
region of Brazil. *Cristina* 9203, 28–42. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00005-1)
- Phuong, N.T.N., Manh, D.H., Dumre, S.P., Mizukami, S., Weiss, L.N., Van  
Thuong, N., Ha, T.T.N., Phuc, L.H., Van An, T., Tieu, T.M., Kamel, M.G.,  
Morra, M.E., Huong, V.T.Q., Huy, N.T., Hirayama, K., 2019. Plasma cell-  
free DNA: A potential biomarker for early prediction of severe dengue. *Ann.  
Clin. Microbiol. Antimicrob.* 18, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0309-x>
- Pokrywka, A., Zembron-Lacny, A., Baldy-Chudzik, K., Orysiak, J., Sitkowski, D.,  
Banach, M., 2015. The influence of hypoxic physical activity on cfDNA as a  
new marker of vascular inflammation. *Arch. Med. Sci.* 11, 1156–1163.  
<https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56341>
- Pongpit, J., Limpawittayakul, P., Juntiang, J., Akkawat, B., Rojnuckarin, P.,  
2012. The role of prothrombin time (PT ) in evaluating green pit viper  
(*Cryptelytrops* sp ) bitten patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106,  
415–418. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.04.003>
- Queiroz, M.R., de Sousa, B.B., da Cunha Pereira, D.F., Mamede, C.C.N.,

Matias, M.S., de Moraes, N.C.G., de Oliveira Costa, J., de Oliveira, F., 2017. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* 133, 33–47.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.013>

Ren, B., Liu, F., Xu, F., He, J., Zhu, H., Zou, G., 2013. Is plasma cell-free DNA really a useful marker for diagnosis and treatment of trauma patients? *Clin. Chim. Acta* 424, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.015>

Rosa, J.G., de Albuquerque, C.Z., Mattaraia, V.G. de M., Santoro, M.L., 2019. Comparative study of platelet aggregation and secretion induced by *Bothrops jararaca* snake venom and thrombin. *Toxicon* 159, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.01.003>

Rykova, E., Sizikov, A., Roggenbuck, D., Antonenko, O., Bryzgalov, L., Morozkin, E., Skvortsova, K., Vlassov, V., Laktionov, P., Kozlov, V., 2017. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: Pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res. Ther.* 19, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1295-z>

Sachett, J.A.G., da Silva, I.M., Alves, E.C., Oliveira, S.S., Sampaio, V.S., do Vale, F.F., Romero, G.A.S., dos Santos, M.C., Marques, H.O., Colombini, M., da Silva, A.M.M., Wen, F.H., Lacerda, M.V.G., Monteiro, W.M., Ferreira, L.C.L., 2017. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005745>



- Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2008. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 51, 1440–1448.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.018>
- Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., Pantel, K., 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* 11, 426–437.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3066>
- Setubal, S.S., Pontes, A.S., Nery, N.M., Bastos, J.S.F., Castro, O.B., Pires, W.L., Zaqueo, K.D., Calderon, L.A., Stábeli, R.G., Soares, A.M., Zuliani, J.P., 2013. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. *Toxicon* 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.019>
- Silva, A.M. da, Bernarde, P.S., Abreu, L.C. de, 2015. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. *J. Hum. Growth Dev.* 25, 54–62.
- Sitprija, V., 2006. Snakebite nephropathy (review article). *Nephrology* 11, 442–448. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2006.00599.x>
- Sorber, L., Zwaenepoel, K., Deschoolmeester, V., Van Schil, P.E.Y., Van Meerbeeck, J., Lardon, F., Rolfo, C., Pauwels, P., 2017. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer* 107, 100–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.04.026>
- Sousa, L.F., Nicolau, C.A., Peixoto, P.S., Bernardoni, J.L., Oliveira, S.S., Portes-Junior, J.A., Mourão, R.H. V., Lima-dos-Santos, I., Sano-Martins, I.S., Chalkidis, H.M., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2013.

Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002442>

Sousa, L.F., Portes-Junior, J.A., Nicolau, C.A., Bernardoni, J.L., Nishiyama-Jr, M.Y., Amazonas, D.R., Freitas-de-Sousa, L.A., Mourão, R.H., Chalkidis, H.M., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2017. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. J. Proteomics 159, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>

Souza, A. da S., Sachett, J. de A.G., Alcântara, J.A., Freire, M., Alecrim, M. das G.C., Lacerda, M., Ferreira, L.C. de L., Fan, H.W., de Souza Sampaio, V., Monteiro, W.M., 2018. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. Toxicon 145, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.041>

Souza, A.R.B., 2002. Snakebite by *Bothrops atrox* (Lin. 1758) in the State of Amazonas - Brazil: Study of 212 cases with identified snake. Rev. Patol. Trop. 31, 267–268.

Sozzi, G., Conte, D., Leon, M.E., Cirincione, R., Roz, L., Ratcliffe, C., Roz, E., Cirenei, N., Bellomi, M., Pelosi, G., Pierotti, M.A., Pastorino, U., 2003. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J. Clin. Oncol. 21, 3902–3908. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.006>

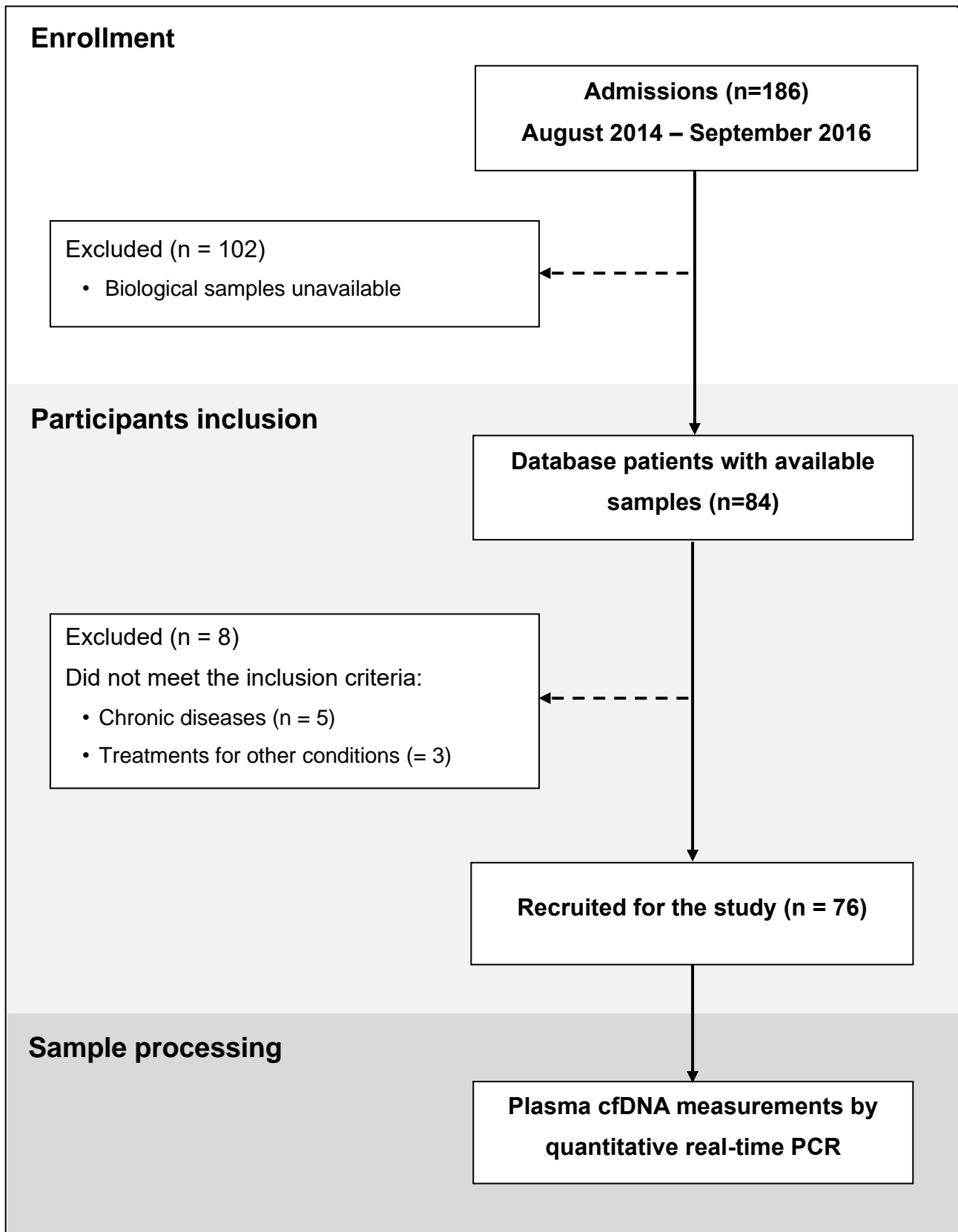
Stevens, D.L., Bisno, A.L., Chambers, H.F., Dellinger, E.P., Goldstein, E.J.C.,

- Gorbach, S.L., Hirschmann, J. V, Kaplan, S.L., Montoya, J.G., Wade, J.C., 2014. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft Tissue Infections : 2014 Update by the Infectious Diseases Society of America 59, 147–159. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu444>
- Stevens, D.L., Bisno, A.L., Chambers, H.F., Everett, E.D., Dellinger, P., Goldstein, E.J.C., Gorbach, S.L., Hirschmann, J. V, Kaplan, E.L., Montoya, J.G., Wade, J.C., 2005. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft-Tissue Infections. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1373–1406.
- Teixeira, C. de F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Zamuner, S.F., 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro* 100, 181–184.
- The Lancet, 2019. Snakebite—emerging from the shadows of neglect. *Lancet* 393, 2175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31232-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31232-2)
- Warrell, D.A., 2010. Snake bite. *Seminars* 375, 77–88. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2026.1991.tb00579.x>
- Wen, F.H., Monteiro, W.M., Silva, A.M.M. da, Tambourgi, D. V., Silva, I.M. da, Sampaio, V.S., dos Santos, M.C., Sachett, J., Ferreira, L.C.L., Kalil, J., Lacerda, M., 2015. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003701. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003701>
- Whitaker, R.M., Stallons, L.J., Kneff, J.E., Alge, J.L., Harmon, J.L., Rahn, J.J.,

Arthur, J.M., Beeson, C.C., Chan, S.L., Schnellmann, R.G., 2015. Urinary mitochondrial DNA is a biomarker of mitochondrial disruption and renal dysfunction in acute kidney injury. *Kidney Int.*

<https://doi.org/10.1038/ki.2015.240>

World Health Organization, 2019. Snakebite envenoming; A strategy for prevention and control [WWW Document]. Geneva World Heal. Organ.



**Figure 1** - Flowchart of inclusion of patients treated at FMT-HVD after *Bothrops* snakebite.

**Table 1** – Sociodemographic and clinical characteristics of patients after *Bothrops* snakebite treated at FMT-HVD.

Characteristics	Number	%
Sex		
Male	63	82.9
Female	13	17.1
Age group in years		
0 – 20	24	31.6
21 – 40	26	34.2
41 – 60	22	28.9
> 60	4	5.3
Area of occurrence		
Rural	69	90.8
Urban	7	9.2
Anatomical region of the injury		
Upper limbs	9	11.8
Lower limbs	67	88.2
Time to medical assistance (hours)		
0 – 6	64	84.2
6 – 12	5	6.6
>12	7	9.2
Previous snakebite		

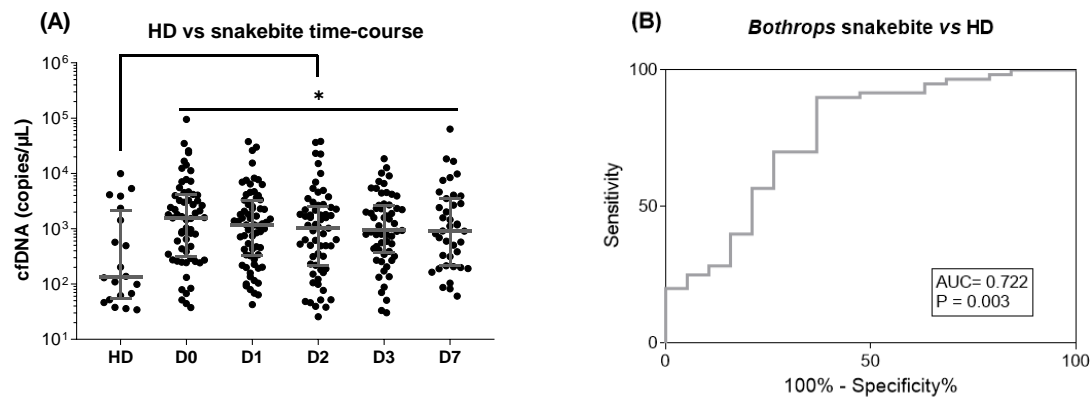
Yes	13	17.1
No	63	82.9
Used tourniquets		
Yes	17	22.4
No	59	77.6
Adverse reaction to serum		
Yes	12	16.0
No	57	76.0
Uninformed	6	8.0
Pain		
Mild	11	14.5
Moderate	19	25.0
Severe	46	60.5
Swelling		
Mild	37	48.7
Moderate	32	42.1
Severe	7	9.2
Accident classification		
Mild	22	28.9
Moderate	24	31.6
Severe	30	39.5

**Table 2** – Laboratory parameters of victims of *Bothrops* snakebites on admission.

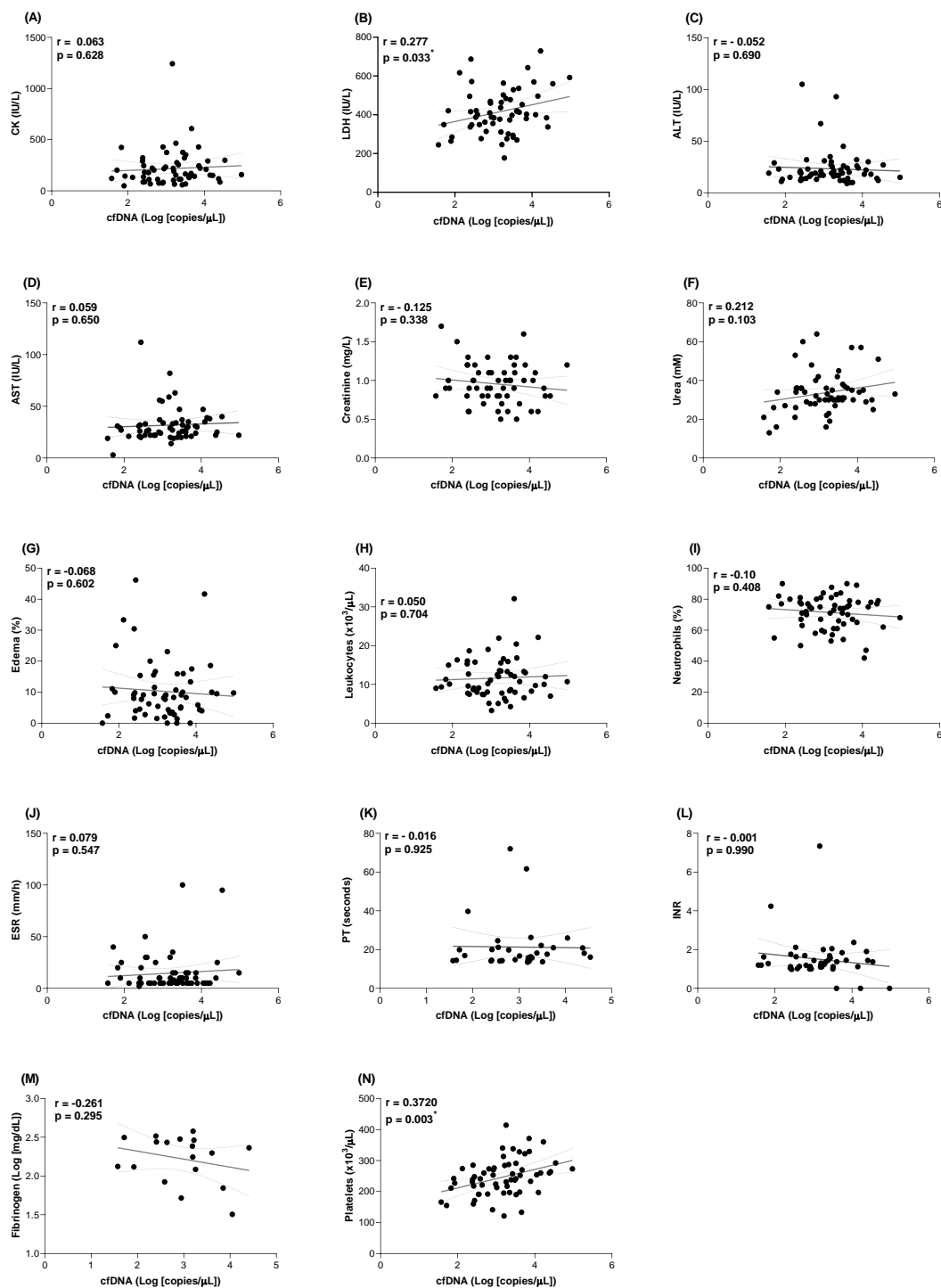
Laboratory parameter	Median (IQR)
Creatine phosphokinase (IU/L)	178.5 (122.5 - 273.0)
Lactate dehydrogenase (IU/L)	406.5 (348.8 - 495.3)
Alanine Transaminase (IU/L)	19.50 (15.0 – 26.75)
Aspartate Transaminase (IU/L)	30.0 (22.0 – 35.75)
Creatinine (mg/L)	0.9 (0.8 - 1.1)
Urea (mg/L)	33.00 (28.25 - 37.75)
Edema (%)	8.69 (4.08 - 15.51)
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> /μL)	11.18 (8.27 - 14.89)
Neutrophils (%)	73.50 (63.25 - 79.00)
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	10.00 (5.00 - 15.75)
Prothrombin time (seconds)	16.80 (14.58 - 20.23)
International normalized ratio	1.30 (1.12 - 1.62)
Fibrinogen (mg/dL)	0.00 (0.00 - 97.50)
Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	250.0 (214.0 - 284.8)

**Reference:** Creatine phosphokinase: 24–190 IU/L; Lactate dehydrogenase: 211–423 IU/L; Aspartate transaminase: 2–38 IU/L; Alanine transaminase: 2–44 IU/L; Creatinine: 0.5–1.2 mg/dL for adults and 0.3–1.0 mg/dL for children; Urea: 10–45 mg/dL; Leukocytes: 4.000–10.000/mm<sup>3</sup>; Neutrophils: 40–70%; Erythrocyte sedimentation rate: <10 mm/hour; Prothrombin time: 10–14 seconds; International normalization ratio: 0.8–1.1; Fibrinogen: 200–400 mg/dL; Platelets: 130,000–400.000/mm<sup>3</sup>



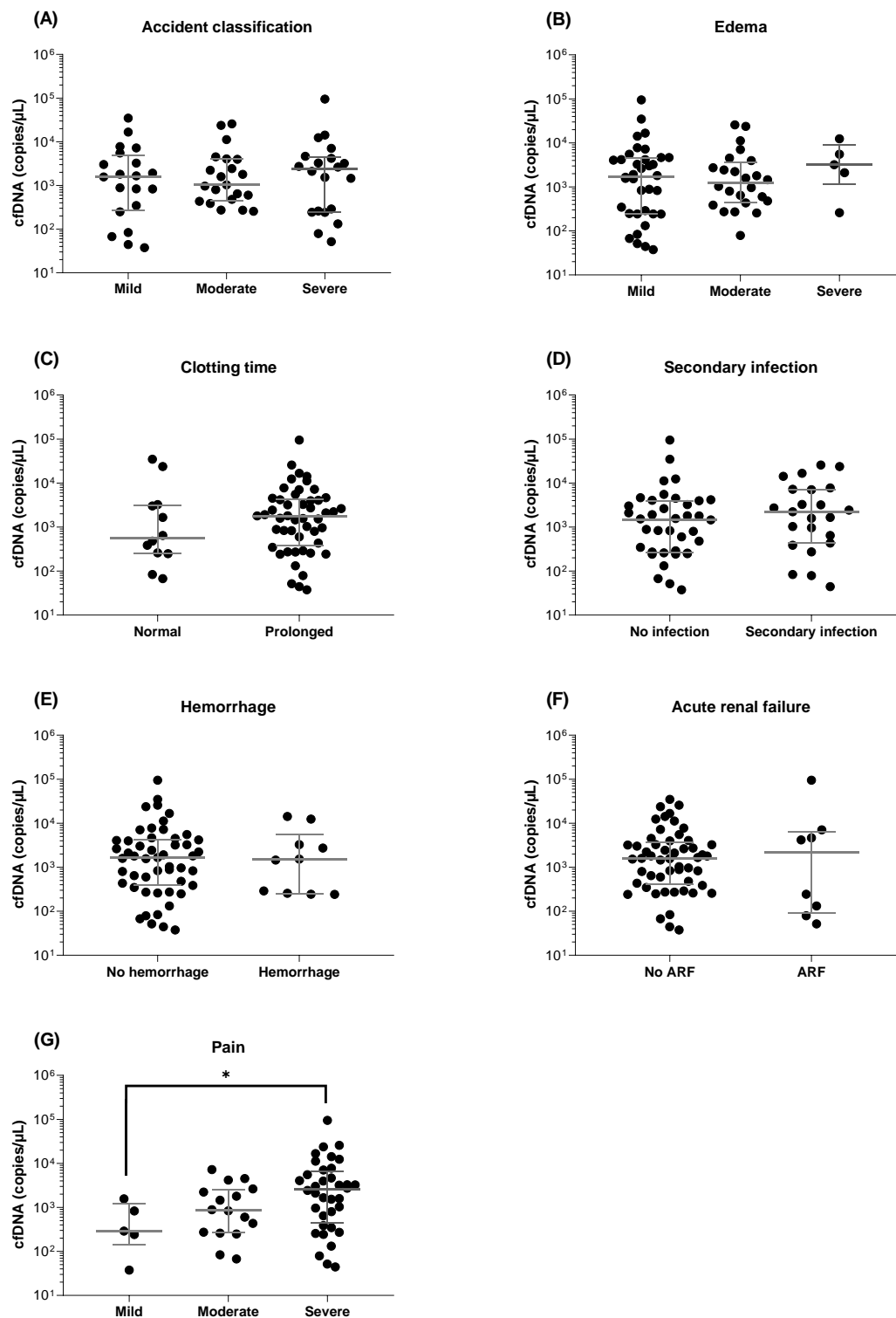


**Figure 2 - Parallel of cfDNA plasma levels from snakebite patients vs healthy donors.** A) Comparison of cfDNA levels from healthy donors (HD) and *Bothrops* patients collected at days 0 (D0 - admission), (D1), 2 (D2), 3 (D3) and 7 (D7). Results are expressed as medians and interquartile ranges, which  $*p < 0.05$  comparing patients vs HD (Mann-Whitney test). B) Receiver operating characteristics (ROC) curve depicting the discriminatory performance of the cfDNA levels obtained from patients on admission vs HD (AUROC=0.722; 95% CI= 0.630 to 0.897;  $p=0.003$ ). AUROC, area under ROC curve.



**Figure 3. Association of cfDNA and laboratory parameters.** Pearson's correlation ( $r$ ) was used to identify significant associations ( $*p < 0.05$ ) between cfDNA plasma levels and laboratory parameters obtained on D1: A) creatine phosphokinase, B) lactate dehydrogenase, C) alanine transferase, D) aspartate

transferase, E) creatinine, F) urea, G) edema, H) leukocytes, I) neutrophils, J) erythrocyte sedimentation rate, K) prothrombin time, L) international normalized ratio, M) fibrinogen and N) platelets.



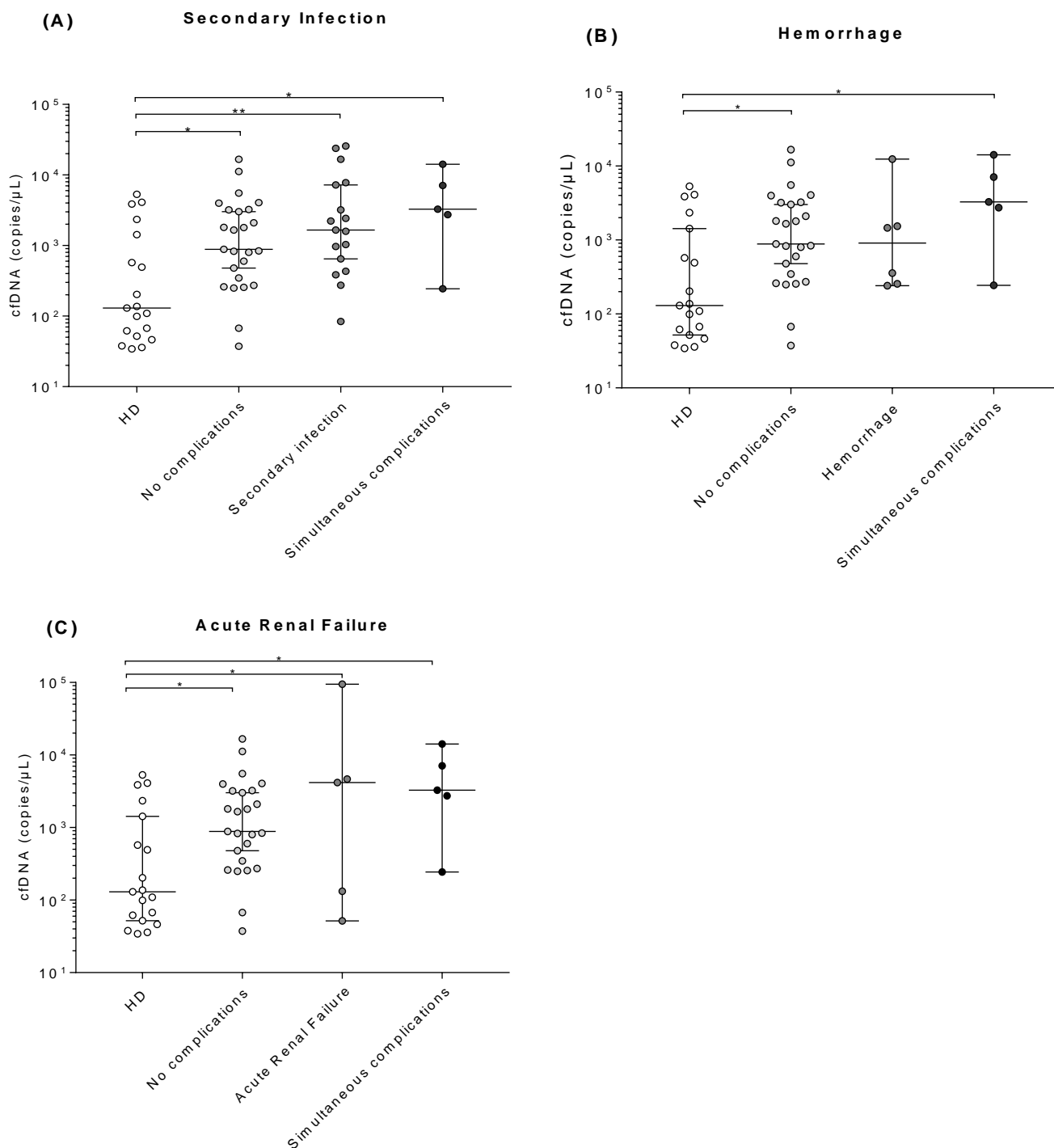
**Figure 4 – Comparison between cfDNA levels and clinical complications. *Bothrops* snakebite patients were grouped concerning clinical complications manifested and cfDNA plasma levels, obtained at admission,**

were evaluated in each manifestation and its severity: A) accident classification, B) edema, C) clotting time, D) secondary infection, E) hemorrhage, F) Acute renal failure (ARF) and G) pain. Results are expressed as medians and interquartile ranges, which  $*p < 0.05$  comparing severity (Mann-Whitney test).

#### 4 RESULTADOS COMPLEMENTARES

Nas análises realizadas anteriormente, as complicações foram consideradas separadamente, sem indivíduos com complicações simultâneas no grupo de cada complicação. Com isso os resultados demonstraram diferenças estatísticas apenas com o grupo controle, sem diferenças entre os pacientes com e sem complicações, semelhante ao que foi encontrado nas análises apresentadas anteriormente.

Na admissão, quando comparados com controles saudáveis [Median: 130,3 - cópias /  $\mu$ L (IQR: 51,9 - 1427)], e os indivíduos que desenvolveram uma infecção secundária tiveram uma mediana de cfDNA de 2431 cópias /  $\mu$ L (IQR: 353,1- 15773) ( Figura 8A) e um valor de  $p < 0,001$ , em hemorragias de 1458 cópias /  $\mu$ L (IQR: 265,4 - 6961) com  $p = 0,075$  (Figura 8B), nos casos de LRA de 4409 cópias /  $\mu$ L (IQR: 1142 - 72319) ( $p < 0,05$ ) (Figura 8C) e em indivíduos com complicações concomitantes de 3274 cópias /  $\mu$ L (IQR: 1488 - 10631) e  $p < 0,05$ .



**Figure 8** – CfDNA levels according to complications in *Bothrops* snakebite accident patients in the Brazilian Amazon. A) cfDNA levels in secondary infection due to the accident; B) In hemorrhage; C) in those who developed acute renal failure. All values of samples obtained before antivenom serotherapy. Control values represented as HD (healthy donors). Values expressed in copies /  $\mu$ L; (\*) represents a value of  $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.005$ . Values based on the Mann-Whitney test.

## **5 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS**

Uma limitação do estudo foi o pequeno número amostral nos grupos de pacientes que sofreram complicações, devido ao curto período de tempo da pesquisa para novas coletas. Além disso, nenhuma dosagem de outras substâncias, como citocinas, bem como marcadores NETosis, foi realizada para ajudar a elucidar as causas da liberação do cfDNA nesses pacientes. No entanto, como este é o primeiro estudo a avaliar os níveis plasmáticos de cfDNA em acidentes ofídicos, os dados são considerados de grande importância e espera-se que contribuam para o início de um melhor entendimento do papel do cfDNA nesses acidentes.



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que entre as características gerais dos pacientes, grande parte dos acometidos eram pertencentes ao sexo masculino, com idade média de 32,8 anos, provenientes de áreas rurais, com tempo entre a picada e atendimento, principalmente, de 0 – 6 horas e classificados, na sua maioria, em envenenamentos graves.

Na caracterização laboratorial, os pacientes apresentaram valores elevados de leucócitos, neutrófilos, razão normalizada internacional (INR) e tempo de protrombina (TP). Por outro lado, os níveis de fibrinogênio diminuíram consideravelmente e em muitos pacientes os níveis eram indetectáveis. Entre todos os parâmetros laboratoriais avaliados, foi encontrada uma correlação positiva significativa entre os níveis de cfDNA com plaquetas e LDL.

Quanto aos diferentes níveis de gravidade dos pacientes acidentados por *Bothrops*, os níveis de cfDNA não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Por outro lado, os níveis foram significativamente mais altos nas vítimas de *Bothrops* do que nos controles saudáveis. Assim, novos estudos devem ser realizados para que, no futuro, o cfDNA possa ser utilizado para detecção do envenenamento por *Bothrops*. Além disso, devido à escassez de estudos envolvendo cfDNA em envenenamentos por serpentes, são necessárias informações adicionais sobre o papel do cfDNA na patogênese dos envenenamentos por acidentes ofídicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, De Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 2008;5(11):1591–604.
2. World Health Organization. Snakebite envenoming; A strategy for prevention and control. Geneva: World Health Organization. 2019.
3. The Lancet. Snakebite—emerging from the shadows of neglect. *Lancet* [Internet]. 2019;393(10187):2175. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31232-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31232-2)
4. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;3:1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: zoonozes. Ministério da Saúde, editor. Brasília; 2009. 228 p.
6. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Funasa. 2001;120.
7. Silva AM da, Bernarde PS, Abreu LC de. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. *J Hum Growth Dev.* 2015;25(1):54–62.
8. Fan HW, Monteiro WM. History and perspectives on how to ensure antivenom accessibility in the most remote areas in Brazil. *Toxicon* [Internet]. 2018;151:15–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.070>
9. Chippaux J. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017;11(6): e00039. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>
10. Bernarde PS. Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil. São Paulo: Anolis Books; 2014. 223 p.
11. Wen FH, Monteiro WM, Silva AMM da, Tambourgi D V., Silva IM da, Sampaio VS, et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(5):e0003701.
12. Feitosa EL, Sampaio VS, Salinas JL, Queiroz AM, Rica C. Older Age and Time to Medical Assistance Are Associated with Severity and Mortality of Snakebites in the Brazilian Amazon : A Case- Control Study. 2015;1–15.
13. Alcântara JA, Bernarde PS, Sachett J, da Silva AM, Valente SF, Peixoto HM, et al. Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. *PLoS One.*

- 2018;13(12):1–15.
14. Alves EC, Gonc JDA, Sousa DDB, Oliveira S De, Nascimento F, Santos S, et al. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center , Western Brazilian Amazon. PLoS One. 2018;01:1–16.
  15. Bernal JCC, Bisneto PF, Pereira JPT, Ibiapina HN dos S, Sarraff LKS, Monteiro-Júnior C, et al. “ *Bad things come in small packages* ”: predicting venom-induced coagulopathy in *Bothrops atrox* bites using snake ontogenetic parameters. Clin Toxicol [Internet]. 2019;0(0):1–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650.2019.1648817>
  16. Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–21.
  17. Silva AM da, Sachett J, Monteiro WM, Bernarde PS. Extractivism of palm tree fruits: A risky activity because of snakebites in the state of Acre, Western Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:1–4.
  18. Waldez F, Vogt RC. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. Acta Amaz. 2009;39(3):681–92.
  19. Feitosa ES, Sampaio V, Sachett J, Castro DB De, Nogueira D, Luis J, et al. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon : highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(Suppl I):34–41.
  20. Magalhães SFV, Peixoto HM, Moura N, Monteiro WM, De Oliveira MRF. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: A descriptive study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2019;113(3):143–51.
  21. Souza A da S, Sachett J de AG, Alcântara JA, Freire M, Alecrim M das GC, Lacerda M, et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. Toxicon. 2018;145:15–24.
  22. Siva AM da, Monteiro WM, Bernarde PS. Popular names for bushmaster (*Lachesis muta*) and lancehead (*bothrops atrox*) snakes in the alto juruá region: Repercussions for clinical-epidemiological diagnosis and surveillance. Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:51–4.
  23. Bernarde PS, Turci LCB, Machado RA. Serpentes do Alto Juruá, Acre - Amazônia Brasileira. 2017. 166 p.
  24. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias. Ministério da Saúde. 2010;

25. Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9).
26. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
27. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics* [Internet]. 2011;74(4):510–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>
28. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics* [Internet]. 2017;159(March):32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>
29. Warrell DA. Snake bite. Seminar [Internet]. 2010;375:77–88. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 816 p.
31. Rosenfeld G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites, in south América. In: Press A, editor. *Venomous Animals and their Venoms*. New York. 1771;345–841.
32. Del-Rei THM, Sousa LF, Rocha MMT, Freitas-de-Sousa LA, Travaglia-Cardoso SR, Grego K, et al. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. *Toxicon* [Internet]. 2019;164:61–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.001>
33. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics* [Internet]. 2017;159:32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>
34. Teixeira C de FP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2005;100(4):181–4.
35. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM.

- Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6).
36. Escalante T, Shannon J, Moura-da-silva AM, María J, Fox JW. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases : A biochemical and immunohistochemical study. 2006;455:144–53.
  37. Escalante T, Ortiz N, Rucavado A, Sanchez EF, Richardson M, Jay W. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability : Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. 2011;6(12).
  38. Mamede CCN, De Sousa BB, Pereira DFDC, Matias MS, De Queiroz MR, De Moraes NCG, et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: Enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*. 2016;117:37–45.
  39. Dennis EA, Cao J, Hsu Y, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev*. 2011;111:6130–85.
  40. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(18):2897–912.
  41. Nascimento NG, Sampaio MC, Amaral Olivo R, Teixeira C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*. 2010;55(2–3):343–52.
  42. Bonavita AGC, da Costa AS, Pires ALA, Neves-Ferreira AGC, Perales J, Cordeiro RSB, et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon*. 2006;47(8):885–93.
  43. Chacur M, Longo I, Picolo G, Gutiérrez JM, Lomonte B, Guerra JL, et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*. 2003;41(6):667–78.
  44. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, da Silva HB, Fernandes CM, D'Império Lima MR, et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* [Internet]. 2012;60(1):12–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.004>
  45. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An immunological stairway to severe tissue complication assembly

- in bothrops atrox snakebites. *Front Immunol.* 2019;10(AUG):1–12.
46. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *J Immunol.* 2012;2688–95.
  47. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev.* 2006;6(March):173–82.
  48. Timár CI, Ákos ML, Ligeti E. Changing world of neutrophils. *Eur J Physiol.* 2013;
  49. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Review Neutrophil Extracellular Traps : The Biology of Chromatin Externalization. *Dev Cell [Internet].* 2018;44(5):542–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>
  50. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: Double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2015;13(S1):S82–91.
  51. Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, Dwivedi DJ, Xu MK, McDonald E, et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp.* 2019;7(1).
  52. Pokrywka A, Zembron-Lacny A, Baldy-Chudzik K, Orysiak J, Sitkowski D, Banach M. The influence of hypoxic physical activity on cfDNA as a new marker of vascular inflammation. *Arch Med Sci.* 2015;11(6):1156–63.
  53. Setubal SS, Pontes AS, Nery NM, Bastos JSF, Castro OB, Pires WL, et al. Effect of Bothrops bilineata snake venom on neutrophil function. *Toxicon [Internet].* 2013;(October):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.019>
  54. Pardal PP de O, Souza SM, Monteiro MR de C da C, Fan HW, Cardoso JLC, França FOS, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Cristina.* 2004;9203:28–42.
  55. Oliveira SS de, Alves EC, Santos AS dos, Nascimento EF, Pereira JPT, Silva IM da, et al. Bothrops snakebites in the Amazon: recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy. *Clin Toxicol [Internet].* 2019;0(0):1–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650.2019.1634273>
  56. Moreno E, Queiroz-Andrade M, Lira-Da-Silva RM, Tavares-Neto J. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(1):15–21.
  57. Oliveira SSi de, Sampaio VDS, Sachett J de AG, Alves EC, Silva VC da, João Arthur Alcântara de Lima, et al. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. *Clin Toxicology.* 2017;1–22.
  58. Brasil. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços.

- Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 2. ed. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Coordenação-Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 705 p.
59. Souza ARB. Snakebite by *Bothrops atrox* (Lin. 1758) in the State of Amazonas - Brazil: Study of 212 cases with identified snake. *Rev Patol Trop.* 2002;31(2):267–8.
  60. Albuquerque PLMM, Silva Junior GB, Jacinto CN, Lima JB, Lima CB, Amaral YS, et al. Acute kidney injury after snakebite accident treated in a Brazilian tertiary care centre. *Nephrology.* 2014;19(12):764–70.
  61. Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL, et al. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* [Internet]. 2002;40(8):1107–14. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&N EWS=N&AN=2002295033>
  62. Oliveira SS, Alves EC, Santos AS, Pereira JPT, Sarraff LKS, Nascimento EF, et al. Factors associated with systemic bleeding in bothrops envenomation in a tertiary hospital in the Brazilian Amazon. *Toxins (Basel).* 2019;11(1).
  63. Chippaux J-P. Reviews / Analyses Snake-bites : appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* 1998;76(5):515–24.
  64. Castro I de, Burdmann EDA, Seguro AC, Yu L. Bothrops venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon.* 2004;43(7):833–9.
  65. Júnior F, Jorge A, Marinho A, Silveira J, Alves N, Costa P, et al. Bothrops alternatus snake venom induces cytokine expression and oxidative stress on renal function. *Curr Top Med Chem.* 2019;
  66. Barbosa PSF, Havt A, Facó PEG, Sousa TM, Bezerra ISAM, Fonteles MC, et al. Renal toxicity of Bothrops moojeni snake venom and its main myotoxins. *Toxicon.* 2002;40(10):1427–35.
  67. Sitprija V. Snakebite nephropathy (review article). *Nephrology.* 2006;11(5):442–8.
  68. Albuquerque PLMM, Junior GB da S, Meneses GC, Martins AMC, Lima DB, Raubenheimer J, et al. Acute kidney injury induced by bothrops venom: Insights into the pathogenic mechanisms. *Toxins (Basel).* 2019;11(3):1–14.
  69. Kanjanabuch T, Sitprija V. Snakebite Nephrotoxicity in Asia. *Semin Nephrol.* 2008;28(4):363–72.
  70. Freitas-De-Sousa LA, Amazonas DR, Sousa LF, Sant'Anna SS,

- Nishiyama MY, Serrano SMT, et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. *Biochimie*. 2015;118:60–70.
71. Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Sundaram MS, Kemparaju K, et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. *Toxicon* [Internet]. 2015;98(February):89–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.014>
  72. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* [Internet]. 2012;60(1):70–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>
  73. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG, et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2010;496(1):9–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.01.010>
  74. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico]. [Internet]. 2019. 740 p. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf)
  75. Brasil. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância em Saúde: : [recurso eletrônico] [Internet]. 1. ed. atu. Guia de Vigilância em saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. 607–619 p. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/25/GVS-online.pdf>
  76. Barreto GNLS, Oliveira SS de, Anjos IV dos, Chalkidis H de M, Mourão RHV, Moura-da-Silva AM, et al. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):1–18.
  77. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(6):426–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3066>
  78. Watson, J. D.; Crick FHC. Molecular structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171:737–8.
  79. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. *C R Acad Sci Paris*. 1948;142:241–3.
  80. Tan EM, Carr RI, Kunkel HG, Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al.



- Deoxybonucleic acid ( DNA ) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus . Find the latest version : Deoxyribonucleic Acid ( DNA ) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus. 1966;45(11):1732–40.
81. Leon S a S, Sklaroff B, M D, Dna YMJF. in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res.* 1977;37(March):646–50.
  82. Franklin BS, Vitorino BLF, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos MLS, Campos FMF, et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of plasmodium vivax malaria. *PLoS One.* 2011;6(5).
  83. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating Cell-Free DNA An Up-Coming Molecular Marker in Exercise Physiology. 2012;42(7):565–86.
  84. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14(9):985–90.
  85. Gornik I, Wagner J, Ga V, Lauc G, Gornik O. Free serum DNA is an early predictor of severity in acute pancreatitis. *Clin Biochem.* 2009;42:38–43.
  86. Sozzi G, Conte D, Leon ME, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(21):3902–8.
  87. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev.* 2018;93(3):1649–83.
  88. Liu Z-B, Ezzedine NE, Eterovic AK, Ensor JE, Huang HJ, Albanell J, et al. Detection of breast cancer stem cell gene mutations in circulating free DNA during the evolution of metastases. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05374-x>
  89. Lin Z, Neiswender J, Fang B, Ma X, Zhang J, Hu X. Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(16):26625–36.
  90. Celec P, Vlková B, Lauková L, Bábíčková J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med.* 2018;20:1–14.
  91. Goebel G, Zitt M, Zitt M, Müller HM. Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias. *Dis Markers* [Internet]. 2005;21(3):105–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16276004> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3851114>
  92. Iliescu FS, Poenar DP, Yu F, Ni M, Chan KH, Cima I, et al. Recent

- advances in microfluidic methods in cancer liquid biopsy. *Biomicrofluidics*. 2019;13(4):041503.
93. Kumar M, Choudhury Y, Ghosh SK, Mondal R. Application and optimization of minimally invasive cell-free DNA techniques in oncogenomics. *Tumor Biol*. 2018;40(2):1–12.
  94. Mader S, Pantel K. Liquid biopsy: Current status and future perspectives. *Oncol Res Treat*. 2017;40(7–8):404–8.
  95. Imamura T, Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*. 2016;22(25):5627–41.
  96. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Van Schil PEY, Van Meerbeeck J, Lardon F, et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer [Internet]*. 2017;107:100–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.04.026>
  97. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Ohashi T, Imamura T, et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol*. 2017;23(31):5650–68.
  98. van Ginkel JH, Slieker FJB, de Bree R, van Es RJJ, Van Cann EM. Cell-free nucleic acids in body fluids as biomarkers for the prediction and early detection of recurrent head and neck cancer: A systematic review of the literature. *Oral Oncol [Internet]*. 2017;75(July):8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.10.007>
  99. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: A promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;7(30):48832–41.
  100. Wong BCK, Lo YMD. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;785–97.
  101. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Clinica Chimica Acta Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — A critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta [Internet]*. 2010;411(21–22):1611–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.032>
  102. Lim SH, Spring KJ, De Souza P, Mackenzie S, Bokey L. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur J Surg Oncol [Internet]*. 2015;41(3):309–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2014.12.005>
  103. Gögenur M, Burcharth J, Gögenur I. The role of total cell-free DNA in predicting outcomes among trauma patients in the intensive care unit : a systematic review. *Crit Care [Internet]*. 2017;1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1578-9>

104. Lam NY, Rainer TH, Chan LY, Joynt GM, Lo YM. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem*. 2003;49(0009-9147 (Print) LA-eng PT-Journal Article PT-Research Support, Non-U.S. Gov't RN-0 (Biological Markers) RN-9004-22-2 (Globins) RN-9007-49-2 (DNA) SB-IM):1286–91.
105. Ren B, Liu F, Xu F, He J, Zhu H, Zou G. Is plasma cell-free DNA really a useful marker for diagnosis and treatment of trauma patients? *Clin Chim Acta* [Internet]. 2013;424:109–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.015>
106. Regner A, Meirelles L da S, Ikuta N, Cecchini A, Simon D. Prognostic utility of circulating nucleic acids in acute brain injuries. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(11):925–38.
107. Rodrigues Filho EM, Simon D, Ikuta N, Klovan C, Dannebrock FA, Oliveira de Oliveira C, et al. Elevated Cell-Free Plasma DNA Level as an Independent Predictor of Mortality in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(19):1639–46.
108. Phuong NTN, Manh DH, Dumre SP, Mizukami S, Weiss LN, Van Thuong N, et al. Plasma cell-free DNA: A potential biomarker for early prediction of severe dengue. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2019;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0309-x>
109. Hou YQ, Liang DY, Lou XL, Zhang M, Zhang Z huan, Zhang L rong. Branched DNA-based Alu quantitative assay for cell-free plasma DNA levels in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *J Crit Care* [Internet]. 2016;31(1):90–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.10.013>
110. Clementi A, Virzì GM, Brocca A, Pastori S, De Cal M, Marcante S, et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif*. 2016;41(1–3):34–40.
111. Atamaniuk J, Hsiao YY, Mustak M, Bernhard D, Erlacher L, Fodinger M, et al. Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(6):579–83.
112. Hendy OM, Abdel T, El MA, Khalaf FA, Kotb SE, Khalil A, et al. Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus severity and monitoring of therapy. *Egypt J Med Hum Genet*. 2016;79–85.
113. Xu Y, Song Y, Chang J, Zhou X, Qi Q, Tian X, et al. High levels of circulating cell free DNA are a biomarker of active SLE. *Eur J Clin Invest*. 2018;48:e13015.
114. Yi S, Long F, Cheng J, Huang D. An optimized rapid bisulfite conversion method with high recovery of cell-free DNA. *BMC Mol Biol* [Internet]. 2017;18(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0101-4>
115. Scharfe-nugent A, Corr SC, Carpenter SB, Keogh L, Doyle B, Martin C, et

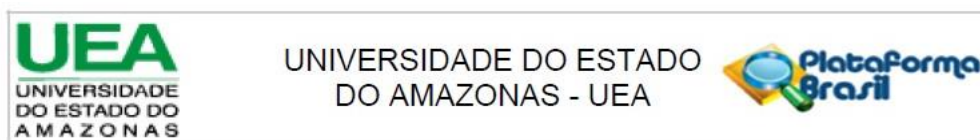
- al. TLR9 Provokes Inflammation in Response to Fetal DNA: Mechanism for Fetal Loss in Preterm Birth and Preeclampsia. 2012;
116. Michael GC, Thacher TD, Shehu MIL. The effect of pre-hospital care for venomous snake bite on outcome in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2011;105(2):95–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.005>
  117. Saborío P, González M, Cambronero M. Snakebites in children in Costa Rica: Epidemiology and risk factors related to the occurrence of abscess and necrosis in 80 cases. *Toxicon*. 1998;36(2):359–66.
  118. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma : controls for extraction efficiency , fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*. 2014;2:12–4.
  119. Cao Y, Bryan TM, Reddel RR. Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1092–9.
  120. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*. 1998;58(18):4168–72.
  121. Horikawa I, Cable PLA, Afshari C, Barrett JC. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res*. 1999;59(4):826–30.
  122. Autexier C, Greider CW. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. 1996;0004(October):387–91.
  123. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. Vol. 337, *Nature*. 1989. p. 331–7.
  124. Autexier C, Lue NF. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. *Annu Rev Biochem*. 2006;75(1):493–517.
  125. Martínez P, Blasco MA. Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem Sci*. 2015;1–12.
  126. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* (80- ). 1997;277(5328):955–9.
  127. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer Part A*. 1997;33(5):787–91.
  128. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Telomeres are specialized structures at the ends of eukaryotic chromosomes that appear to function in chromosome protection, positioning, and replication (1, 2). In vertebrates, telomeres consist of

- hundreds to thousands of tandem repeats of the se-quen.  
1992;266(December 1994):2011–6. Available from:  
<http://science.sciencemag.org/>
129. Dong CK, Masutomi K, Hahn WC. Telomerase: Regulation, function and transformation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;54(2):85–93.
  130. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9857–60.
  131. Yan S, Han B, Wu Y, Zhou D, Zhao Y. Telomerase gene mutation screening and telomere overhang detection in Chinese patients with acute myeloid leukemia. 2013;54(1):1437–41.
  132. Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010;92(3):419–24.
  133. Armanios M, Chen JL, Chang YPC, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(44):15960–4.
  134. Ballew BJ, Savage SA. Updates on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Rev Hematol*. 2013;6(3):327–37.
  135. Basel-Vanagaite L, Dokal I, Tamary H, Avigdor A, Garty BZ, Volkov A, et al. Expanding the clinical phenotype of autosomal dominant dyskeratosis congenita caused by TERT mutations. *Haematologica*. 2008;93(6):943–4.
  136. Marrone A, Walne A, Tamary H, Masunari Y, Kirwan M, Beswick R, et al. Telomerase reverse-transcriptase homozygous mutations in autosomal recessive dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Blood*. 2007;110(13):4198–205.
  137. Armanios MY, Chen JJL, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;356(13):1317–26.
  138. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552–7.
  139. Baird DM. Variation at the TERT locus and predisposition for cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12(May):1–21.
  140. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov G V., Chin L, Garraway LA. Highly Recurrent TERT Promoter Mutations in Human Melanoma. 2013;339(February):957–9.
  141. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase ( h TERT )

- regulation : clinical impacts in cancer. 2018;1–12.
142. Gornik I, Wagner J, Gašparović V, Miličić D, Degoricija V, Skorić B, et al. Prognostic value of cell-free DNA in plasma of out-of-hospital cardiac arrest survivors at ICU admission and 24h post-admission. *Resuscitation*. 2014;85(2):233–7.
  143. Gornik O, Gornik I, Wagner J, Radic D, Lauc G. Evaluation of Cell-Free DNA in Plasma and Serum as Early Predictors of Severity in Acute Pancreatitis. 2011;40(5):787–8.
  144. Chugh KS, Pal Y, Chakravarty RN, Datta BN, Mehta R, Sakhuja V, et al. Acute Renal Failure Following Poisonous Snakebite. 1984;IV(1):30–8.
  145. Albuquerque PLMM, Jacinto CN, Junior GBS, Lima JB. Acute Kidney Injury Caused By Crotalus And Bothrops Snake Venom: A Review Of Epidemiology, Clinical Manifestations And Treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(5):295–301.
  146. Sgrignolli LR, Mendes GEF, Carlos CP, Burdmann EA. Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom. *Nephron Clin Pract*. 2011;119: c131-c137.
  147. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann EA, Goldstein SL, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury [Internet] .Kidney international supplements. Vol. 2, Official Journal of The International of Nephology. 2012.

## 8 ANEXOS E APÊNDICES

### Anexo I – Parecer Comitê de Ética da Universidade do Estado do Amazonas



UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DO AMAZONAS - UEA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira

**Pesquisador:** Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19380913.6.0000.5016

**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 492.892

**Data da Relatoria:** 13/12/2013

##### Apresentação do Projeto:

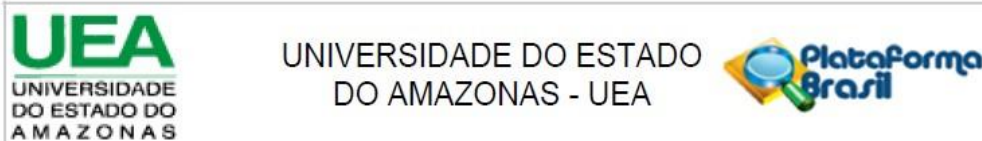
Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em o infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira. Trata-se de um ensaio clínico com pacientes envolvidos em acidentes ofídicos atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, acometidos por acidentes ofídicos no período de novembro/2013 a maio/2015. A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado está situada no município de Manaus-AM, sendo considerada centro de referência nacional e mundial para o tratamento de enfermidades tropicais, principalmente aos eventos relacionados a animais peçonhentos. A população considerada para o presente estudo corresponde aos pacientes atendidos pela instituição com acidentes ofídicos, correspondendo em média 300 pacientes/ano. Assim, será considerado para o cálculo da população para um período de nove mesmo de seleção amostral.

##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a eficácia da antibioticoterapia empírica precoce na prevenção de infecções secundários

Endereço: Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada  
Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com



Continuação do Parecer: 492.892

em pacientes vítimas de acidentes ofídicos.

Objetivo Secundário:

- Identificar o perfil sócio-demográfico dos pacientes envolvidos em acidentes ofídicos;- Utilizar antibioticoterapia empírica precoce em um grupo de pacientes pós acidente ofídico; - Verificar a evolução clínica relacionada à infecção secundária de pacientes envolvidos em acidente ofídico tratados com e sem antibioticoterapia.- Estabelecer a infectividade das serpentes na lesão decorrentes do acidente e o escore clínico para definição destas infecções.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos são mínimos por tratar de avaliação clínica sem teste de novas drogas, se trata de utilização de antibioticoterapia empírica precoce.

Benefícios:

Este estudo propiciará a participação direta dos profissionais de saúde atuantes no hospital referência em medicina tropical do estado do Amazonas, valorizando o atendimento da rede de assistência específica de ofidismo na região. Além disso, contribuirá para a diminuição da incidência de infecções secundárias pós-acidente ofídico, redução de gastos com internação hospitalar e tratamento dessas infecções, prevenção de resistência

bacteriana ao estabelecer padronização da antibioticoterapia, diminuição dos agravos decorrentes desses acidentes e devolução precoce do indivíduo às suas atividades laborais pelo fato da maioria destes eventos ocorrerem em trabalhos ativos da área rural.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo contribuirá para o tratamento mais apropriado para os acidentes ofídicos na Amazônia.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada  
 Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com



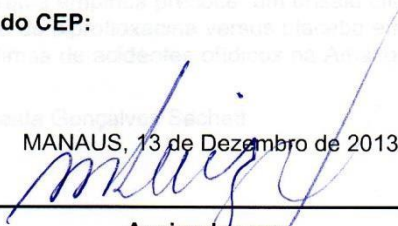
Continuação do Parecer: 492.892

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MANAUS, 13 de Dezembro de 2013



Assinador por:

**Manoel Luiz Neto**

(Coordenador)

**Prof. M.Sc. Manoel Luiz Neto**

Coordenador

**Comitê de Ética em Pesquisa**

ESA / UEA

**Endereço:** Av. Djalma Batista, nº 3578, Chapada

**Bairro:** chapada

**CEP:** 69.050-030

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3878-4368

**Fax:** (92)3878-4368

**E-mail:** cep.uea@gmail.com

## Anexo II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira

**Pesquisador:** Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19380913.6.3001.0005

**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 602.907-0

**Data da Relatoria:** 20/12/2013

**Apresentação do Projeto:**

conforme parecer # 492.892, de 13/12/2013.

**Objetivo da Pesquisa:**

conforme parecer # 492.892, de 13/12/2013.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

conforme parecer # 492.892, de 13/12/2013.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

conforme parecer # 492.892, de 13/12/2013.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

conforme parecer # 492.892, de 13/12/2013.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de projeto de pesquisa cuja instituição proponente é a Universidade do Estado do Amazonas e a FMT-HVD é a instituição coparticipante.

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25

**Bairro:** D. Pedro I

**CEP:** 69.040-000

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)2127-3572

**Fax:** (92)2127-3572

**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA  
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 602.907-0

Pelo o que está exposto no protocolo de pesquisa e seus apêndices, vota-se pela aprovação do mesmo.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando os modelos disponíveis em nossa homepage, na aba „Modelos de Documentos“. Se houver qualquer tipo de dúvida o pesquisador deve entrar em contato com o CEP/FMT-HVD, que lhe oferecerá as orientações necessárias.

MANAUS, 12 de Abril de 2014

Assinador por:

**Maria Paula Gomes Mourão**  
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 602907 gerado na data 10/04/2014 15:50:39, onde o número CAAE foi alterado de 19380913.6.0000.5016 para 19380913.6.3001.0005.

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25

**Bairro:** D. Pedro I

**CEP:** 69.040-000

**UF:** AM

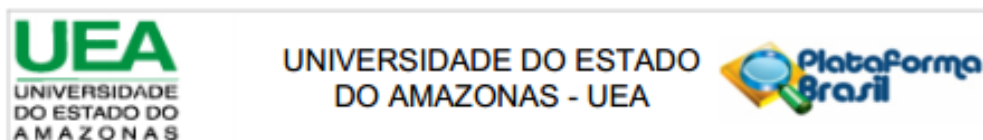
**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)2127-3572

**Fax:** (92)2127-3572

**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

## Anexo III – Notificação para utilização de dados



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira

**Pesquisador:** Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19380913.6.0000.5016

**Instituição Proponente:** Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DA NOTIFICAÇÃO**

**Tipo de Notificação:** Outros

**Detalhe:** Notificação de utilização dos dados

**Justificativa:** As notificação se refere a utilização dos dados gerados pela pesquisa original em

**Data do Envio:** 02/07/2018

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.456.147

**Apresentação da Notificação:**

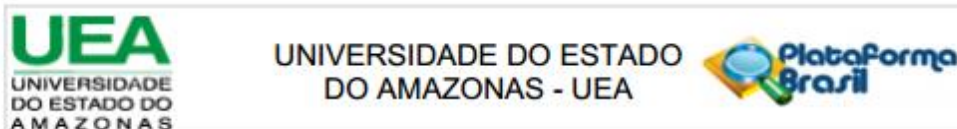
Notificação de utilização dos dados

**Justificativa:** As notificação se refere a utilização dos dados gerados pela pesquisa original em prol de dois outros subprojetos coordenados por mim e, que, "não" necessitarão de novas informações ou novas amostras dos pacientes (ANEXO).

**Objetivo da Notificação:**

utilizar dados gerados pela pesquisa original em prol de dois outros subprojetos Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira.

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777  
 Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.456.147

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Dados consolidados no banco de dados. Observar o anonimato dos dados dos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

A presente notificação justifica-se em razão da utilização de dados relevantes armazenados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentada a notificação para a utilização em outros subprojetos.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Parecer_Notificacao_2018.pdf	02/07/2018 21:40:44	Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett	Postado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 16 de Julho de 2019

---

**Assinado por:  
Manoel Luiz Neto  
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777  
 Bairro: chapada CEP: 69.050-030  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3878-4368 Fax: (92)3878-4368 E-mail: cep.uea@gmail.com

## Apêndice A – Pop de realização da extração de DNA

POP\_IPCCB\_LB\_003\_PT\_D

Página 1 de 4

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO****INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA****FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

<b>Código POP</b>	POP_IPCCB_LB_003_PT_D	<b>Versão 4</b>	
<b>Título</b>	Procedimento para extração de DNA a partir de sangue Total, plasma ou soro utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®).		
<b>Língua do Documento</b>			
<b>Elaborado por:</b> Anne C G de Almeida	<b>Revisado por:</b> Gisely C de Melo	<b>Aprovado por:</b> Monica Costa	<b>Data de aprovação:</b>

<b>Nome</b>	<b>Versão</b>	<b>Alterações realizadas</b>
Gisely C de Melo	3	Formatação
Gisely C de Melo	4	Inclusão de plasma e sangue total no procedimento

**1. OBJETIVO**

Descrever o procedimento da extração de DNA a partir de sangue total, soro ou plasma

**2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

No laboratório de biologia molecular do IPCCB.

**3. DEFINIÇÕES**

Não se aplica.

**4. RESPONSABILIDADES**

- Pessoal encarregado da coleta das amostras da pesquisa;
- Equipe do laboratório de biologia molecular.

**5. POP'S RELACIONADOS**

- Procedimento para a realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do POP\_IPCCB\_LB\_002\_PT\_D).



- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) – versão atual do POP\_PCCB\_LB\_021\_PT\_D.

## 6. PROCEDIMENTOS

### 6.1 Recursos necessários

6.1.1 Amostra: Sangue total de paciente a ser testado, armazenado em tubo ou papel de filtro.

6.1.2 Materiais:

- Pipetas automáticas de 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L e 1000  $\mu$ L
- Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
- Tubos para 1,5 e 2,0 mL

### 6.1.3 Equipamentos

- Centrífuga
- Vortex
- Banho Maria

### 6.1.4 Reagentes

Reagente	Armazenamento
1. Tampão Lise dos tecidos (Tampão ATL)	Temperatura ambiente
2. Proteinase K	Temperatura ambiente
3. Tampão de Lise (Tampão AL)	Temperatura ambiente
4. Etanol 95% PA	Temperatura ambiente
5. Tampão de Lavagem 1 (Tampão AW1)	Temperatura ambiente
6. Tampão de Lavagem 2 (Tampão AW2)	Temperatura ambiente
7. Tampão de Eluição (Tampão AE)	Temperatura ambiente

### 6.2 Obtenção de sangue total

#### 6.2.1 Em papel de filtro

1. Abrir o envelope que contém o papel de filtro.
2. Realizar a punção digital utilizando lanceta estéril descartável depois de limpar a área.



3. Limpar a primeira gota obtida após a punção e coletar no papel de filtro quantidade suficiente para saturação do papel de filtro.
4. Secar em Temperatura ambiente. Fechar o envelope. Armazenar entre 2°C a 8°C.
5. No laboratório de biologia molecular, os papéis de filtro serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas. Isto é, seguindo a numeração das caixas de lâminas: cada caixa de papéis de filtro terá no máximo 50 amostras, seguindo a ordem das lâminas.

#### 6.2.2 Por punção endovenosa

1. Obter 5 ml de sangue venoso em tubo de EDTA ou tubo de soro identificado.
2. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min.
3. Desprezar o soro e colocar a papa de hemácias em criotubo identificado.
4. Armazenar os criotubos a - 20°C em caixa de plástico ou papelão identificada e numerada.
5. No laboratório de biologia molecular, os criotubos serão armazenados seguindo a mesma ordem que as lâminas.

### 6.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA a partir de sangue total será usado o Protocolo de Extração do QIAMP® DNA Mini Kit da Qiagen.

#### 6.3.1 Procedimento para extração do DNA a partir de papel de filtro

1. Cortar 3 círculos de 3 mm de diâmetro do papel de filtro e colocá-los em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Pipetar 180 µL do Tampão ATL.
2. Incubar a 85°C no banho Maria por 10 minutos. Remover as bolhas por centrifugação.
3. Adicionar 25 µL de Proteinase K e agitar no vórtex. Incubar a 56° C por 1 hora. Remover as bolhas por centrifugação.
4. Continuar com o procedimento comum (6.3.3)

#### 6.3.2 Procedimento para extração do DNA a partir de tubo

1. Pipetar 20 µL de Proteinase K (2) num tubo eppendorf de 1,5 mL.
2. Adicionar 200 µL de amostra ao tubo. Se não houver 200 µL de amostra, adicionar o volume apropriado de PBS.
3. Adicionar 200 µL de Tampão AL (3) a amostra. Vortexar por 15 segundos.





4. Incubar por 56 por 10 minutos.
4. Continuar com o procedimento comum (6.3.3)

### 6.3.3 Procedimento comum para extração do DNA

1. Adicionar 200  $\mu$ L de Etanol absoluto (96 a 100%) e agitar no vórtex imediatamente. Remover as bolhas por centrifugação.
2. Cuidadosamente transferir o conteúdo do tubo para o tubo filtro. Tampar e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.
3. Cuidadosamente adicionar 500  $\mu$ L de tampão AW1 e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar o filtrado com o tubo. Colocar em um novo tubo coletor.
4. Cuidadosamente adicionar 500  $\mu$ L de tampão AW2 e centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
5. Descartar o tubo coletor com o filtrado. Colocar o tubo filtro em novo tubo coletor e centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
6. Colocar o tubo filtro em um tubo eppendorf de 1,5 mL novo. Descartar o filtrado e o tubo coletor. Adicionar cuidadosamente 150  $\mu$ L de tampão AE ou água destilada e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
7. Armazenar por  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 6.4 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1).

## 6 REFERÊNCIAS

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

## 7 LISTA DE ANEXOS

TÍTULO ANEXO	CÓDIGO



## Apêndice B – Pop de realização da PCR em tempo real

POP\_IPCCB\_LB\_046\_PT\_D

Página 1 de 4

## PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_046_PT_D	Versão 1	
Título	Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de Ácido nucleico circulante humano		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aprovação:
Éndlia Barbosa	Gisely C de Melo	Monica Costa	

Nome	Versão	Alterações realizadas

**1. OBJETIVO**

Descrever o procedimento realização de PCR em tempo real para detecção de Ácido nucleico circulante humano do gene hTERT.

**2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa.

**3. DEFINIÇÕES**

PCR: a reação em cadeia da polimerase é definida como uma técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo.

PCR Tempo Real (PCR TR): Variação da técnica de PCR para detecção de sinal fluorescente permitindo a quantificação de ácidos nucleicos em tempo real, assim como a detecção qualitativa de sequências de ácidos nucleicos utilizando análises de curvas de dissociação ou por meio de sondas marcadas. Não requer tratamento pós-PCR para visualização do resultado.

**4. RESPONSABILIDADES**

Equipe do projeto a ser executado.



## 5. POP'S RELACIONADOS

## 6. PROCEDIMENTOS

### 2.1 Recursos necessários

#### 2.1.1 Amostras de DNA humano

#### 2.1.2 Materiais

1. Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL;
2. Ponteiros com filtro para pipetas automáticas;
3. Tubos de 1,5 e 2,0 mL;
4. Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real;
5. Filme óptico para vedar as microplacas. Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL.

#### 2.1.3 Equipamentos

1. Vórtex;
2. Sistema de PCR em Tempo Real 7500 Fast Applied Biosystems.

#### 6.1.4 Reagentes

Reagente	Armazenamento
1. Taqman Universal PCR Master Mix	-20°C
2. Sondas (Taqman® Probe)	-20°C
3. Iniciadores (primers) da reação	-20°C
4. Água MilliQ	Temperatura ambiente

Iniciadores:

Primer Forward:  
5 -GGC ACA CGT GGC TTT TCG-3;

Primer reverse:  
5 -GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA-3;

Sonda:  
(VIC) 5 -TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG - 3 TAMRA



## 6.2 PCR em tempo real

### 6.2.1 Preparação

Mix	Quantidade/amostra
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	6 µl
Probe	0,5
Primers Iniciadores F + R	0,72
H2O para PCR	0,78
Plasma sanguíneo (50 a 100ng)	4 µl

### 6.2.2 Condições para amplificação

- 1: 50°C/2 minutos
- 2: 95°C/10 minutos
- 3: 95°C/15 segundos- total de 45 ciclos
4. 60 °C/ 1 minuto

### 6.2.3 Informações adicionais

- o Modulo de corrida: Standard 7500;
- o Em cada reação de PCR, é realizado um controle negativo (água miliQ);
- o As amostras foram feitas em triplicatas em cada experimento;
- o As análises são realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – Applied Biosystems "7500 Fast System SDS Software";

## 7. REFERÊNCIAS

1. Franklin BS, Vitorino BLF, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos MLS, Campos FMF, et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. PLoS One.
2. Sozzi G, Conte D, Leon ME, Cirincione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J Clin Oncol. 2003;21(21):3902–8.

