



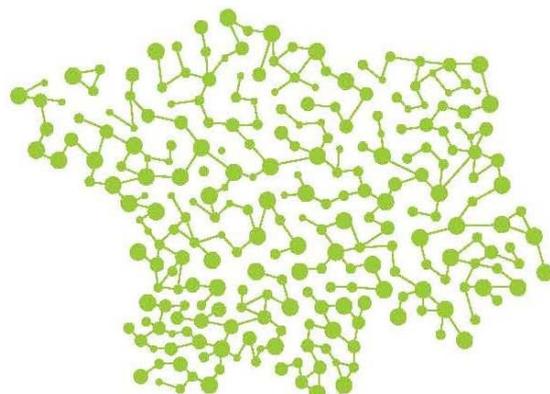
**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E PERFIL DE CITOCINAS E
QUIMIOCINAS NAS REAÇÕES ADVERSAS AO SORO ANTIBOTRÓPICO
EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: UM ESTUDO
DE FARMACOVIGILÂNCIA**

FRANDISON GEAN SOUZA SOARES

**MANAUS
2020**



FRANDISON GEAN SOUZA SOARES

**PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E PERFIL DE CITOCINAS E
QUIMIOCIAS NAS REAÇÕES ADVERSAS AO SORO ANTIBOTRÓPICO
EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: UM ESTUDO
DE FARMACOVIGILÂNCIA**

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, como requisito parcial para obtenção grau de Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas

Orientador (a): **Profª Draª** Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett
Co-orientador (a): **Profº Dr.** Wuelton Marcelo Monteiro

**MANAUS
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

S676c Soares, Frandison Gean Souza
Prevalência, fatores associados e perfil de quimiocinas e citocinas nas reações adversas ao soro antioftrópico em uma unidade terciária na Amazônia brasileira: um estudo de farmacovigilância. / Frandison Gean Souza Soares. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical, 2020.
109 f. : il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – UEA e FMT Fundação de Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Profª Drª Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett.
Co-orientador: Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro.

1. Antivenenos 2. Farmacovigilância I. Título.
CDU: 615.9

FOLHA DE JULGAMENTO**PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E PERFIL DE
CITOCINAS E QUIMIOCIAS NAS REAÇÕES ADVERSAS AO
SORO ANTIBOTRÓPICO EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA: UM ESTUDO DE
FARMACOVIGILÂNCIA****FRANDISON GEAN SOUZA SOARES**

“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 aos meus pais Francisco e Maria, e aos meus irmãos France, Gilvana, Geane, Flávio, Fátima, Fábio, Flávia e Fábria pelo incentivo e apoio que sempre me deram em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dra. Jacqueline Sachett, pela oportunidade dada, pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos durante estes anos. Agradeço pelo ensinamento compartilhado e pelo exemplo a ser seguido, não somente como pesquisadora e professora, mas como ser um ser ético e correto.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wuelton Monteiro, por sempre orientar a poder conduzir a pesquisa da melhor forma e a guiar para um bom trabalho. Obrigado por ser um pesquisador de referência.

À Elizandra Freitas, que me ajudou a organizar todo o material. Obrigado pela disposição constante e presteza tanto na disposição de boa parte dos dados utilizados neste trabalho, bem como na solução das algumas dúvidas por mais fáceis que fossem.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) que contribui para desenvolvimento da pesquisa no estado, pelo incentivo dado através da disposição de uma bolsa de estudos, na qual pude investir em fins voltados a minha formação, como cursos e congressos.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela parceria a qual permitiu o ingresso nesse curso e a realização deste trabalho na melhor forma possível.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical (PPGMT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Wuelton Monteiro e às funcionárias Conceição Tufic, Altariza Freitas e Jordania Dantas.

Aos professores do PPGMT-UEA/FMT-HVD: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Guerra, Prof. Dr. Marcelo Cordeiro, Prof.^a Dr.^a Gisely Melo, Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira, Prof. Dr. Jorge Guerra, Prof. Dr.^a Camila Bôtto, Prof. Dr. Vanderson Sampaio. Obrigado pelo conhecimento e experiências compartilhadas durante minha formação.

Aos amigos e colegas do Centro de Pesquisa em Envenenamento por Animais (CEPCLAM) que sempre pude contar com a ajuda de vocês. Muito obrigado!

Aos colegas da turma de Mestrado 2018/1 do PPGMT-UEA/FMT-HVD, em especial a Moyara Lima, Brenda Karoline, Sara Fernandes, Bernardo Maia, Lucíola Peixoto. Obrigado por sempre ajudarem mesmo nas pequenas coisas quando eu precisei e por sempre estarem levantando o ânimo da turma.

À minha família. Meus pais Francisco e Maria, e aos meus irmãos France, Gilvana, Geane, Flávio, Fátima, Fábio, Flávia e Fábria que sempre não me deixaram desanimar e continuar buscando conhecimento.

Aos meus melhores amigos Ananda Motta, Ananda Vieira, Endila Barbosa, EweLyn Oliveira, Gécica Santos, Graciane Fábio, Jacimara Gomes, Lucas dos Santos, Mylena Farias, Paula Tavares, Rangeles Valente, Raí Ferreira e Viviane Kici que sempre estiveram presentes me apoiando e incentivando. Obrigado por serem meu suporte, principalmente nos momentos mais difíceis na minha vida. Vocês são como irmãos para mim.

Obrigado a todos as demais pessoas, que por mais que não estejam listadas aqui, permanecem presentes na minha vida.

DECLARAÇÃO DAS AGENÇAS FINANCIADORAS

Este trabalho contou com auxílio de uma bolsa de estudos ofertada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Somado a isso, este trabalho foi realizado com a utilização de dados já utilizados em um estudo anterior, sendo necessário somente organização dos materiais. Assim, não foi necessário a utilização de recursos a mais, oriundos de outras agências financiadoras. Quando necessários, os recursos utilizados foram do Centro de Pesquisa em Envenenamento por Animais (CEPCLAM).

EPÍGRAFE

“Sai e busca.”

Buda

RESUMO

Envenenamentos por acidente ofídico são um problema de saúde global. O tratamento desses envenenamentos é realizado pela administração de antivenenos heterólogos com anticorpos que se ligam e neutralizam as toxinas do veneno. Os antivenenos têm sido usados efetivamente há mais de um século. No entanto, sua administração pode resultar em reações adversas precoces e/ou tardias que podem ser graves. O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de reações adversas à soroterapia antitoxínica em uma unidade terciária da Amazônia brasileira. Trata-se de uma coorte retrospectiva, realizada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), de 2014 a 2016. Os pacientes foram tratados com soro antitoxínico, de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde. Moléculas imunológicas como CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-17^a, foram dosadas de amostras de plasma dos pacientes. Foram avaliados 186 pacientes, a maioria do sexo masculino (82,3%), provenientes de áreas rurais (87,1%), com idade média de 35 anos. A maioria dos pacientes (83,8%) foi admitida no hospital dentro de 6 horas após a picada. Dos 186 pacientes, 26 (14%) relataram ter sofrido acidente ofídico anterior. A maioria dos pacientes (52,1%) recebeu entre 7 e 9 ampolas de antiveneno. A frequência de reações adversas precoces foi de 16,1% (30), principalmente reações leves e não foi observada nenhuma reação tardia. A urticária foi a principal reação adversa observada (46,4%). O risco de reação adversa não foi relacionado à demografia, condições clínicas, variáveis hematológicas ou dosagem do antiveneno. Os níveis de CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, IL-6, TNF, IL-2, IL-10 e IL-17A na admissão foram significativamente elevados nos grupos sem reação adversa e com reação adversa em comparação com controles saudáveis e CXCL-8, IL-2, IL-10 mostraram níveis significativamente mais baixos nos pacientes que evoluíram para reação adversa. Na admissão, poucas correlações fracas entre citocinas foram observadas em pacientes evoluindo com reação adversa. As reações adversas foram em sua maioria, de intensidade leve após a soroterapia antitoxínica. Níveis mais baixos de CXCL-8, IL-2, IL-10 previram o aparecimento de reação adversa neste estudo.

Palavras chave: Mordeduras de serpentes, *Bothrops*, Antivenenos, Farmacovigilância.

ABSTRACT

Envenomation by snakebites is a global health problem. Treatment of these envenomations is performed by administering heterologous antivenoms with antibodies that bind to and neutralize the venom toxins. Antivenoms have been used effectively for more than a century. However, their administration may result in early and/or late adverse reactions that can be severe. The aims of this study were to estimate the prevalence of early adverse reactions (EARs) of Bothrops antivenom therapy in a tertiary unit in the Brazilian Amazon, and to determine whether EARs can be predicted by a characteristic cytokine and chemokine profile in plasma samples. A cohort of patients bitten by *Bothrops atrox* was followed-up at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), from 2014 to 2016. Patients were treated with Bothrops antivenom (BAV; Butantan Institute), according Brazilian Ministry of Health protocols. Cytokines and chemokines (CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-4 and IL-17A) were measured in patients' plasma samples by CBA (Cytometric Bead Array) flow cytometry using a FACS Canto II Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). A total of 186 patients was evaluated, mostly male individuals (82.3%), who come from rural areas (87.1%), with an average age of 35 years. Most patients (83.8%) were admitted to the hospital within 6 hours of the bite occurring. Of the 186 patients, 26 (14%) patients reported having suffered a previous snakebite. Most of the patients (52.1%) received between 7 and 9 antivenom ampoules. The frequency of EARs was 16.1% (30), and were mostly mild reactions. Urticaria was the major EAR observed (46.4%). The risk of EARs was not related to demographics, clinical conditions, hematological variables or antivenom dosage. Levels of CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, IL-6, TNF, IL-2, IL-10 and IL-17A at admission were significantly elevated in groups without EARs and with EARs compared to healthy controls and CXCL-8, IL-2, IL-10 showed significantly lower levels in patients who progressed to EARs. On admission, few weak correlations between cytokines were observed in patients evolving with EARs. Adverse reactions were generally of mild intensity after Bothrops antivenom therapy. Lower levels of CXCL-8, IL-2, IL-10 predicted the onset of EARs in this study.

Keywords: Snake bites, *Bothrops*, Antivenom, Pharmacovigilance.

RESUMO LEIGO

Os acidentes com serpentes venenosas representam um problema mundial de saúde pública, principalmente em áreas rurais de países com regiões florestais. No Brasil, as serpentes que estão envolvidas na maioria dos acidentes, são: jararaca, surucucu, cascavél e a coral verdadeira. Particularmente, as serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) estão envolvidas na maioria dos acidentes, isso por estarem distribuídas nas diversas regiões do país e serem capazes de atacar quando se sentem ameaçadas. O soro utilizado para tratar os pacientes acidentados é retirado do sangue de cavalos, por isso sua administração em seres humanos pode resultar em reações inesperadas. Assim, percebe-se a necessidade de avaliar o surgimento dessas reações, já que essa avaliação ainda não é realizada nas unidades de saúde que aplicam o soro. O objetivo desse estudo foi avaliar o surgimento de reações em pacientes que recebem o soro em uma unidade terciária de Manaus, AM. No estudo foram avaliados 186 pacientes picados por jararaca, atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, 30 pacientes apresentaram reações ao soro e dessas reações, a maioria foi coceira/vermelhidão na pele e vômito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução histórica do número de acidentes ofídicos registrados na Fundação de Medicina Tropical de Heitor Vieira Dourado, em Manaus (1974-2012).	2
Figura 2: Incidência média anual de acidente ofídico por município no estado do Amazonas de 2007 a 2012.....	3
Figura 3: Algumas espécies de Bothrops envolvidas em acidentes na Amazônia brasileira e regiões de cerrado.	6
Figura 4: Distribuição da família de proteínas dos venenos usando uma abordagem de proteômica de espingarda.	11
Figura 5: Complicações locais, resultantes de acidentes botrópicos.	15
Figura 6: Complicações sistêmicas resultantes de acidente ofídico botrópico.	16
Figura 7: Processamento do Plasma.	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais componentes do veneno e seus efeitos fisiológicos.	12
Quadro 2: Classificação quanto à gravidade e número de ampolas recomendado.	17
Quadro 3: Fases do processo de produção e controle de soros.	23
Quadro 4: Tipos de reações adversas causadas por antivenenos.	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ACTINA	Actina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CK	Creatinoquinases
CLEC	Lectina do tipo C
CLECL	Lectina do tipo C
CNCZAP	Coord. Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CRISP	Proteína secretora rica em cisteína
DHL	Desidrogenases
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECTONT	Ecto-5'-nucleotidase
FLA ₂	Fosfolipase A2
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GLUTCYC	Glutaminil ciclase
HYALU	Hialuronidase
IB	Instituto Butantan
IBEx	Instituto Butantan, Instituto de Biologia do Exército
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17 ^a
IL-1 β	Interleucinas 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
IVB	Instituto Vital Brazil
LA AO	L-aminoácido oxidase

LPS	Lipopolissacarídeos
NGF	Fator de crescimento nervoso
OMA	Organização Mundial de Alergia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDIEST	Fosfodiesterase 1
PLB	Fosfolipase B
RNA	Ácido Ribonucleico
SAB	Soro antibotrópico
SABC	Soro antibotrópico-crotálico
SABL	Soro antibotrópico-laquéutico
SIH-SUS	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNABS/MS	Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde
SVMP-I	Metaloproteinase de veneno de serpente, classe PI
SVMP-II	Metaloproteinase de veneno de serpente, classe PII
SVMP-III	Metaloproteinase de veneno de serpente, classe PIII
SVSP	Serina proteinase de veneno de serpente
TFN	Fator de Necrose Tumoral
TLR4	Toll-like 4
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos	1
1.2 Mecanismo de Ação do Veneno botrópico	7
1.2.1 Atividade Proteolítica (Inflamatória Aguda)	8
1.2.2 Atividade Coagulante	9
1.2.3 Atividade Hemorrágica	9
1.2.4 Componentes do veneno botrópico	10
1.2.4 Gravidade do Acidente	14
1.2.4.1 Complicações locais	14
1.2.4.2. Complicações sistêmicas	15
1.2.4 Tratamento	16
1.3 História e Produção do Soro	17
1.3.1 Etapas de Produção	21
1.3.2 Mecanismo de Ação do Soro	23
1.4 Reação do Organismo ao Soro Heterólogo	25
1.4.1 Reações Adversas	26
1.4.1.1 Reações anafiláticas mediadas por IgE	27
1.4.1.2 Reações anafiláticas não mediadas por IgE	27
1.4.1.3 Reações Pirogênicas	28
1.4.1.4 Reações Adversas Tardias	29
1.4.2 Liberação de Citocinas e Quimiocinas	30
1.4.3 Prevenção das Reações Adversas	33
1.5 Justificativa	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 Geral:	37
2.2 Específicos:	37
3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	38

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	65
5 CONCLUSÃO	66
6 REFERÊNCIAS.....	67
7 ANEXOS E APÊNDICES	83
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética da Universidade do Estado do Amazonas	83
Anexo II – Parecer do Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical .	86
Anexo III – Notificação para utilização de dados	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

O envenenamento por acidente ofídico resulta da injeção do veneno, uma secreção tóxica altamente especializada, por uma serpente venenosa em seres humanos, geralmente em circunstâncias acidentais. O veneno é injetado através das presas da serpente, que são dentes modificados conectados por um duto a uma glândula produtora de veneno (1).

Esses acidentes caracterizam como um importante problema de saúde pública, principalmente em países em regiões tropicais e subtropicais (2). A severidade dos acidentes está relacionada à alta frequência com que ocorrem e com o índice de morbidade e mortalidade que causam, especialmente em zonas rurais onde há maior exposição da população a áreas de risco e dificuldade do acesso aos serviços de saúde para o fornecimento da soroterapia (3) e ainda que a produção do soro antiveneno seja realizada em grande escala em todos os continentes, esse problema ainda representa um impacto nos sistemas de saúde, particularmente na Ásia, América Latina, África e Oceania (2).

A nível mundial, estima-se que ocorram cerca 1.200.000 a 5.500.000 casos de acidente ofídico, com 421.000 a 1.841.000 envenenamentos (4) desses, 81.000 a 138.000 pessoas vão a óbito e cerca de 400.000 indivíduos ficam com incapacidades permanentes (5). As taxas mais altas de envenenamentos são estimadas para o Sul da Ásia, com cerca de 121.000, seguida pelo Sudeste Asiático alcançando 111.000 e pela África Subsaariana Oriental com aproximados 43.000 casos. Os números mais baixos são estimados para a Europa Central e Ásia Central (4). O Brasil se encontra entre os 6 países com maiores números estimados de envenenamento, ficando apenas atrás da Índia, Sri Lanka e Vietnã (4).

No Brasil, entre 2008 e 2017 foram notificados no Sistema de Informação de Agravos e Notificação, 111.932 casos de acidente ofídico em todo o país, em que as serpentes foram identificadas, desses, 86,7% (97.097) foram acidentes botrópicos, 9,1% (10.238) acidentes crotálicos, 1,0% (1.171) acidentes elapídicos e 3,1% (3.426) acidentes laquéuticos (6). Desses acidentes, 453 casos evoluíram para óbito pelo agravo notificado, a maior taxa se concentrou também nos acidentes botrópicos com 74,4% (337), seguidos dos acidentes crotálicos com 18,3% (83), laquéuticos com 7,1% (32) e apenas 0,2% (1) caso de morte por acidente elapídico. A taxa de letalidade identificada no país, de acordo com as notificações foi de 4,0% nesse período (6).

Somente entre as décadas de 1974 a 1984, 514 vítimas de acidente ofídico foram hospitalizadas no Instituto de Medicina Tropical de Manaus (atual Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado) (7). E uma série de casos de acidentes ofídicos registrados entre 1974 a 2012 levantada por Feitosa et al.(8), mostra um padrão crescente de número de casos após a segunda metade da década de 80 (Figura 1). Imediatamente após o início das atividades do Centro de Animais Venenosos, onde iniciaram os registros sobre o atendimento total. Assim, o padrão de aumento dos casos de acidente ofídico é o resultado de uma mudança nos protocolos institucionais, que levaram a uma melhoria do sistema de vigilância epidemiológica para o Estado do Amazonas (8).

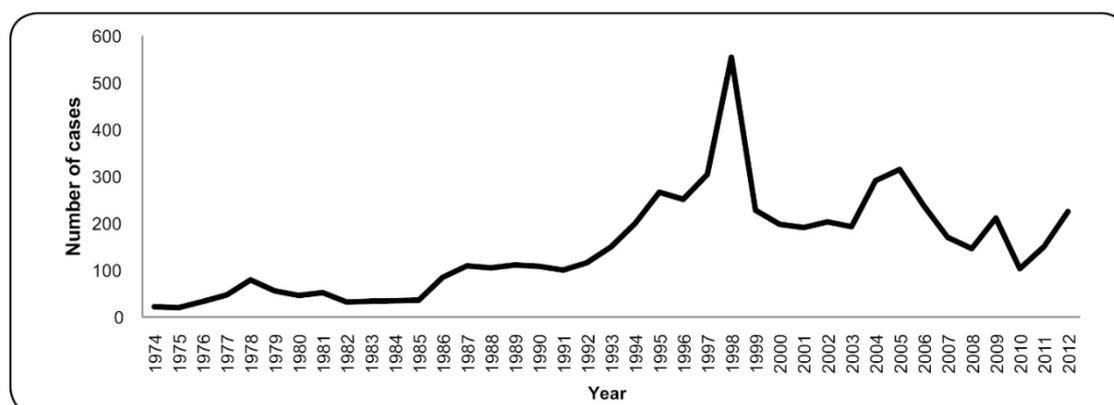


Figura 1: Evolução histórica do número de acidentes ofídicos registrados na Fundação de Medicina Tropical de Heitor Vieira Dourado, em Manaus (1974-2012). Feitosa et al.(8)

Entre 2007 e 2012, foram registrados 9.174 casos de ofidismo no Estado do Amazonas. A distribuição dos casos por município mostra maiores taxas de incidência ocorrendo em Anamá, Novo Airão, Rio Preto da Eva, Borba, Alvarães, São Gabriel da Cachoeira, Japurá e Uarini (Figura 2). Durante estes seis anos, houve pouca variação na incidência anual de acidente ofídico, com os maiores números relatados em 2009 (1.969 casos) e o menor em 2011 (1.435). Nesse período, a incidência média anual no estado foi estimada em 45,1 casos/100.000 habitantes. O elevado número de acidentes ofídicos registados durante este período demonstra o elevado peso deste problema de saúde para a região (8).

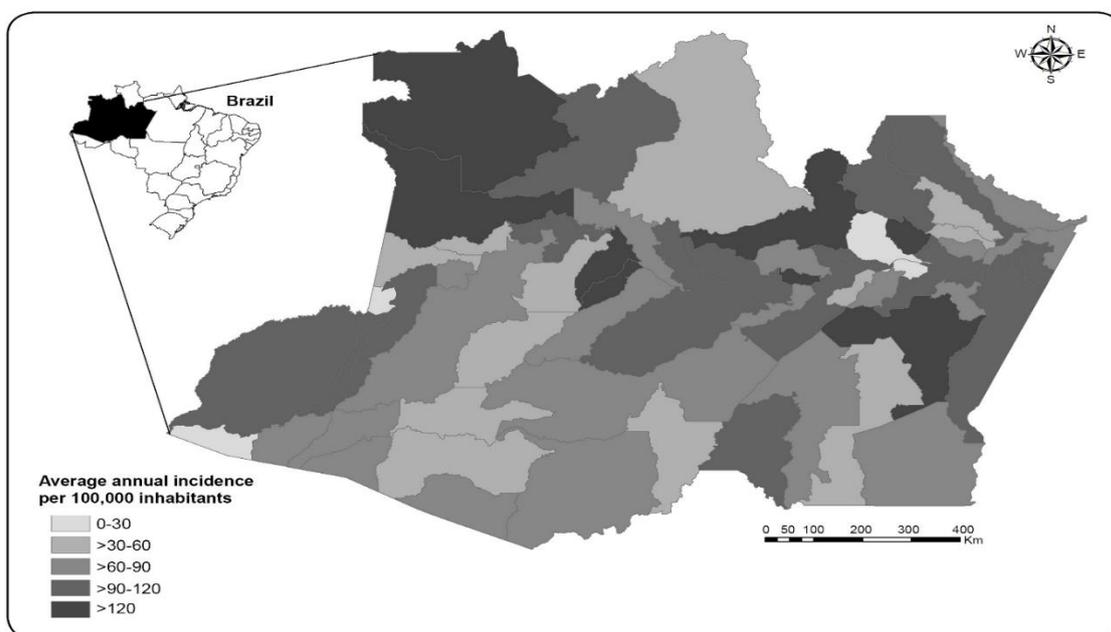


Figura 2: Incidência média anual de acidente ofídico por município no estado do Amazonas de 2007 a 2012.

Fonte: Feitosa et al.(8)

Em 2017, o ofidismo foi classificado pela Organização Mundial de Saúde – OMS como uma doença tropical negligenciada de alta prioridade, e em maio de 2018, a OMS resolveu formalmente combater os casos de ofidismo. Em 23 de maio de 2019, na Assembleia Mundial da Saúde, a OMS lançou seu roteiro, que visa reduzir pela metade a morte e a inutilidade causada por acidentes ofídicos até 2030. A estratégia se concentra na prevenção do ofidismo, fornecimento de tratamento seguro e eficaz, fortalecimento dos sistemas de saúde e aumento de parcerias, coordenação e recursos. A OMS afirma que a

educação da comunidade é fundamental para prevenir os acidentes e encorajar a busca precoce e apropriada do tratamento. Acelerar o desenvolvimento de antiveneno, estocagem de antivenenos e estabilização do mercado para tratamentos de ofidismo também são importantes (5).

Apesar da longa prática do ofidismo no Brasil, somente no ano de 1986 foi implantado pela antiga Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde do Ministério da Saúde (SNABS/MS), o Programa Nacional de Ofidismo, possibilitando uma nova era para o controle dos acidentes, pois a partir desse momento este agravo passou a ser de notificação obrigatória no país(9). Atualmente, o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), criado em 1995, pela Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP), é o sistema responsável pela notificação dos casos no Brasil (10).

A adoção do SINAN, como sistema de notificação obrigatória dos acidentes por animais peçonhentos acabou gerando uma reação negativa por parte dos estados e municípios, uma vez que passaram a não enviar seus dados para a CNCZAP, resultando em uma visível descontinuidade na notificação desses dados, baixando de 34.218 casos registrados em 1995, para 19.624 casos em 1996, com contínuo decréscimo em 1997 e 1998, para 5.744 e 7.119, respectivamente(10). Atualmente, a notificação é realizada de forma fragmentada, por consequência da subnotificação, gerando assim, baixa confiabilidade de estudos epidemiológicos por meio desses dados (11). Dessa forma, é difícil descrever a real magnitude desses acidentes, principalmente nas áreas remotas (12).

A deficiência nas informações coletadas pela CNCZAP através do SINAN, que é o único sistema a nível nacional que possui módulos específicos para a coleta e armazenamento de informações pertinentes aos acidentes por animais peçonhentos, permite análise de outros sistemas de informação como o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o Sistema de

Informações sobre Mortalidade (SIM) e o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS), com o objetivo de cruzamento de dados na tentativa de avaliar a dimensão desse agravo no país (11). No entanto, ainda assim, percebe-se a discordância desses dados entre os sistemas (13).

Além dos sistemas de informação supracitados, em 2018 foi lançado o VigiMed, um sistema baseado em uma solução tecnológica da Organização Mundial da Saúde (OMS), originalmente chamada VigiFlow. O VigiMed foi criado com o intuito de melhorar o processo de notificação de eventos adversos a medicamentos incluindo reações adversas, inefetividade terapêutica e erros de medicação. O sistema foi concebido para ser operado de forma intuitiva, com navegação fácil e com o auxílio de orientações sobre o preenchimento de campos obrigatórios (14).

Atualmente, existem cerca de 3,6 mil espécies conhecidas de serpentes em todo o mundo, onde 20% delas são consideradas peçonhentas, ou seja, têm capacidade de injetar toxinas através de suas presas (15). Na América Latina, há quatro gêneros de serpentes peçonhentas de maior importância médica: *Bothrops*, *Lachesis*, *Micrurus* e *Crotalus*. Particularmente, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes, devido sua ampla distribuição geográfica e seu comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas (16).

As serpentes do gênero *Bothrops* são pertencentes à família *Viperidae* e compreende a aproximadamente 30 espécies e estão distribuídas em todo o território nacional. As serpentes desse gênero totalizam uma morbidade maior se comparadas com qualquer outro grupo de serpentes peçonhentas no Novo Mundo. Dentre as espécies clinicamente mais importantes se destacam a *Bothrops asper* na América Central e *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* na América do Sul. No Brasil, as espécies de *Bothrops* são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos notificados. Este gênero habita principalmente zonas rurais e as adjacências periféricas de grandes centros urbanos, têm

preferência por locais úmidos como matas e áreas cultivadas e regiões com maior proliferação de roedores (depósitos de lenha, paióis e celeiros). Costumam ter hábitos noturnos ou crepusculares e desferem botes sem produzir ruídos (17).

Na Amazônia brasileira e nas áreas de cerrado, existem 12 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* e *Bothrocophias*. Cinco delas (*Bothrops lutzi*, *B. marmoratus*, *B. mottogrossensis*, *B. moojeni* e *B. pauloensis*) estão apenas nas áreas de cerrado, enquanto as demais, são comumente encontradas em ambientes da floresta Amazônica (*Bothrops atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. marajoensis*, *B. taeniatus*, *Bothrocophias hyoprora* e *B. microphthalmus*) (18,19) conhecidas popularmente como jararaca, ou mesmo como surucucu, como é utilizado na região do Alto Juruá para as serpentes da espécie *B. atrox*, principalmente para espécimes adultos (20) (Figura 3). Os acidentes botrópicos totalizam 73,9% dos casos no estado do Amazonas (21), e apresentam maior proporção em outros estados na região Norte do Brasil (22–25). Mesmo sendo de diferentes espécies os componentes do veneno apresentam similaridades nos efeitos clínicos (26).

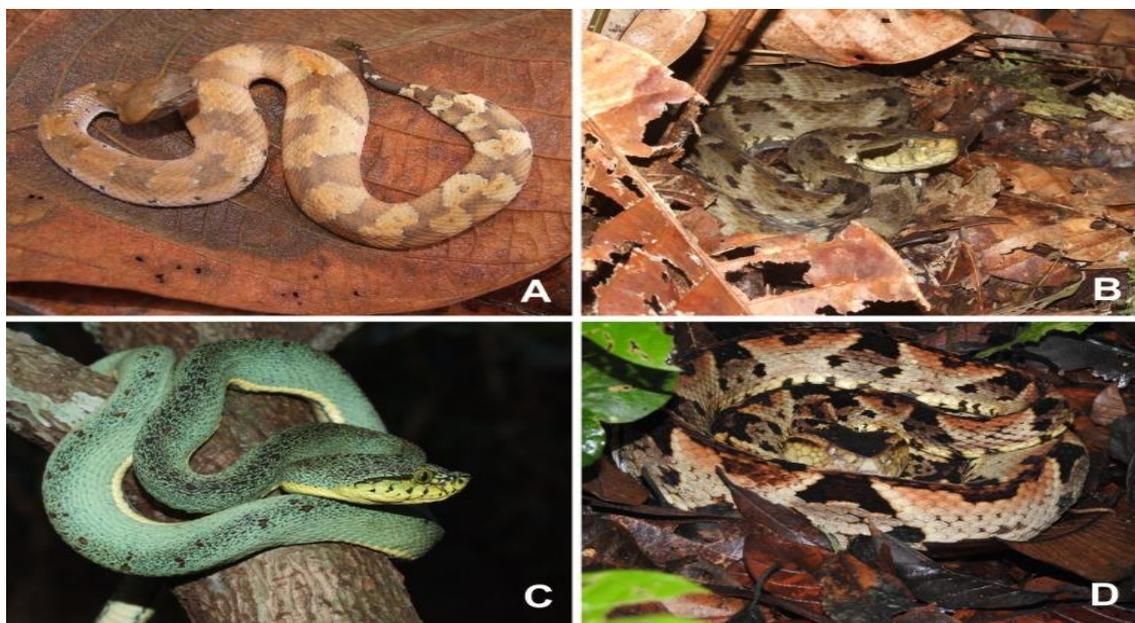


Figura 3: Algumas espécies de *Bothrops* envolvidas em acidentes na Amazônia brasileira e regiões de cerrado.

a) *Bothrocophias hyoprora*; b) *Bothrops atrox*; c) *Bothrops bilineatus bilineatus*; d) *Bothrops brazili*.

Fonte: Alcântara et al.(27)

1.2 Mecanismo de Ação do Veneno botrópico

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é o mais investigado entre os estudos. A maioria do peso seco do veneno (mais de 90%) é constituído de uma mistura de proteínas farmacologicamente ativas e peptídeos que induzem uma variedade de sinais e sintomas em suas vítimas. A parte proteica do veneno é constituída por proteínas tóxicas e proteínas não tóxicas. A porção não proteica é composta por lipídeos, carboidratos, amins biogênicas, metais, que são frequentemente associados à metaloproteinases e glicoproteínas, aminoácidos livres e nucleotídeos (28)(9)(29).

A parte proteica tóxica da composição do veneno de muitas espécies do complexo *Bothrops* já é conhecida por avaliação direta dos venenos(30–37) ou indiretamente pela transcriptômica (38–42) . A partir desses estudos, ficou claro que um número limitado de famílias de proteínas compõe os venenos das serpentes *Bothrops*, como as metaloproteinases, sendo as proteinases e as fosfolipases A₂ as mais abundantes e mais frequentemente correlacionadas com a sintomatologia clínica do envenenamento. As proteinases são geralmente enzimas semelhantes à trombina que estão envolvidas nos distúrbios de coagulação observados na maioria dos pacientes (43). As fosfolipase A₂ estão envolvidos em efeitos locais e a miotoxicidade observada em picadas com algumas espécies (44), já as metaloproteinases são enzimas multifuncionais envolvidas nos sintomas locais e sistêmicos vistos nos envenenamentos, como a indução de hemorragia local, reação inflamatória, ativação de fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária (45).

A variabilidade apresentada na composição do veneno é notável e pode ser correlacionada com a filogenia (46,47), idade (48,49), sexo (50), distribuição geográfica (37,50,51) e a dieta (52–54) da serpente.

Estudar o mecanismo de ação dos venenos é de extrema importância científica, pois vários mecanismos farmacológicos ainda podem ser conhecidos,

dentre eles, destacam-se a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, a fibrinólise, a neurotransmissão na junção neuromuscular, a cascata de coagulação, o mecanismo do processo inflamatório agudo, sistema complemento e atividades miotóxica e hemorrágica (55).

Além disso, a ação do veneno botrópico se caracteriza por induzir importantes lesões teciduais locais, como edema e necrose, assim como alterações a nível sistêmico como desregulação na coagulação sanguínea. Os fenômenos fisiopatológicos apresentados são resultado dos efeitos sinérgicos dessas proteínas e enzimas ativas presentes nos venenos (55–57).

As atividades fisiopatológicas do veneno botrópico são: proteolítica (definida como atividade inflamatória aguda), hemorrágica e coagulante. Essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes proteínas podem atuar sinergicamente para induzir um efeito e uma determinada proteína pode ter várias atividades (58).

1.2.1 Atividade Proteolítica (Inflamatória Aguda)

É causada por um conjunto de componentes do veneno botrópico, responsáveis pelos efeitos locais. Estão envolvidos nesta ação, peptídeos de baixo peso molecular, aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina e proteínas como as proteases, esterases, fosfolipase A, enzimas liberadoras de cininas como a cininogenases e calicreínas e as lectinas. Várias proteínas desse componente têm ação indireta, liberando ou induzindo potentes autacóides, como as prostaglandinas, prostaciclina, bradicinina e leucotrienos que atuam de modo complexo e interdependente. Frequentemente, uma única proteína do veneno é capaz de induzir a liberação de várias substâncias com atividade inflamatória.

As proteínas com ação procoagulante também participam na indução do processo inflamatório agudo formando trombos a nível microcirculatório,

resultando em hipóxia, agravamento do edema e, conseqüentemente, necrose tecidual. O Fator de Necrose Tumoral (TNF) pode ser ativado pelos fenômenos hemorrágicos, determinados pelas hemorragias, agravando ainda mais o quadro inflamatório (45).

A atividade inflamatória aguda ocorre muito provavelmente devido à interação da ação de diversas proteínas, o que pode ser a explicação para a grande variedade dos sintomas observados, tanto naqueles estudos experimentais quanto em relatos clínicos (59–63).

1.2.2 Atividade Coagulante

O veneno botrópico também possui capacidade de ativação de fatores envolvidos na coagulação sanguínea, resultando no consumo de fibrinogênio e conseqüente, formação de fibrina intravascular, induzindo frequentemente a incoagulabilidade sanguínea. A grande maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui proteínas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X(64). São também descritos fatores com atividade inibitória sobre a agregação plaquetária e pode ocorrer trombocitopenia nas primeiras horas, persistindo por até alguns dias (63).

Oliveira et al (65) demonstraram que entre 100 pacientes de acidente botrópico, o sangramento sistêmico foi observado em 14% dos pacientes, trombocitopenia em 10% e 54% apresentaram sangue incoagulável com baixos níveis de fibrinogênio e alfa 2-antiplasmina, além de altos níveis de produto de degradação de fibrina/fibrinogênio (FDP) e D-dímeros.

1.2.3 Atividade Hemorrágica

A hemorragia sistêmica é uma das manifestações mais sérias dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* em humanos, ocorre em

vários órgãos e é responsável por hipovolemia, hipotensão, hipoperfusão tissular, choque cardiovascular e severos acidentes cerebrovasculares (66).

Oliveira et al. (67) observaram uma taxa de 15,3% de hemorragia sistêmica entre 412 acidentes causados por *Bothrops atrox* na Amazônia brasileira. Os autores afirmam que o sangue não coagulável e a trombocitopenia no momento da admissão são distúrbios hemostáticos que aumentam as chances de sangramento sistêmico durante a hospitalização. No entanto, sugerem estudos prospectivos a fim de esclarecer a fisiopatologia do sangramento sistêmico em serpentes do gênero *Bothrops* na Amazônia.

1.2.4 Componentes do veneno botrópico

Os sinais e sintomas apresentados pelos envenenamentos por acidentes botrópicos dependem das proteínas e polipeptídeos envolvidos. As serpentes *Bothrops* são muito diversas em relação à sua composição do veneno.

Uma análise realizada por Sousa et al. (68) com algumas espécies desse complexo, demonstrou apenas variação quantitativa em relação à essa composição. A análise dos dados revelou 15 grupos de proteínas diferentes em diferentes proporções: metaloproteinase de veneno de serpente, classes PI, P-II e P-III (SVMP-I, -II e -III), fosfolipase A2 (PLA2), serina proteinase de veneno de serpente (SVSP), lectina do tipo C (CLEC), lectina do tipo C (CLECL), L-aminoácido oxidase (LAAO), fator de crescimento nervoso (NGF), hialuronidase (HYALU), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína secretora rica em cisteína (CRISP), fosfodiesterase 1 (PDIEST); ecto-5'-nucleotidase (ECTONT, fosfolipase B (PLB), glutaminil ciclase (GLUTCYC) e actina (ACTINA) (Figura 4).

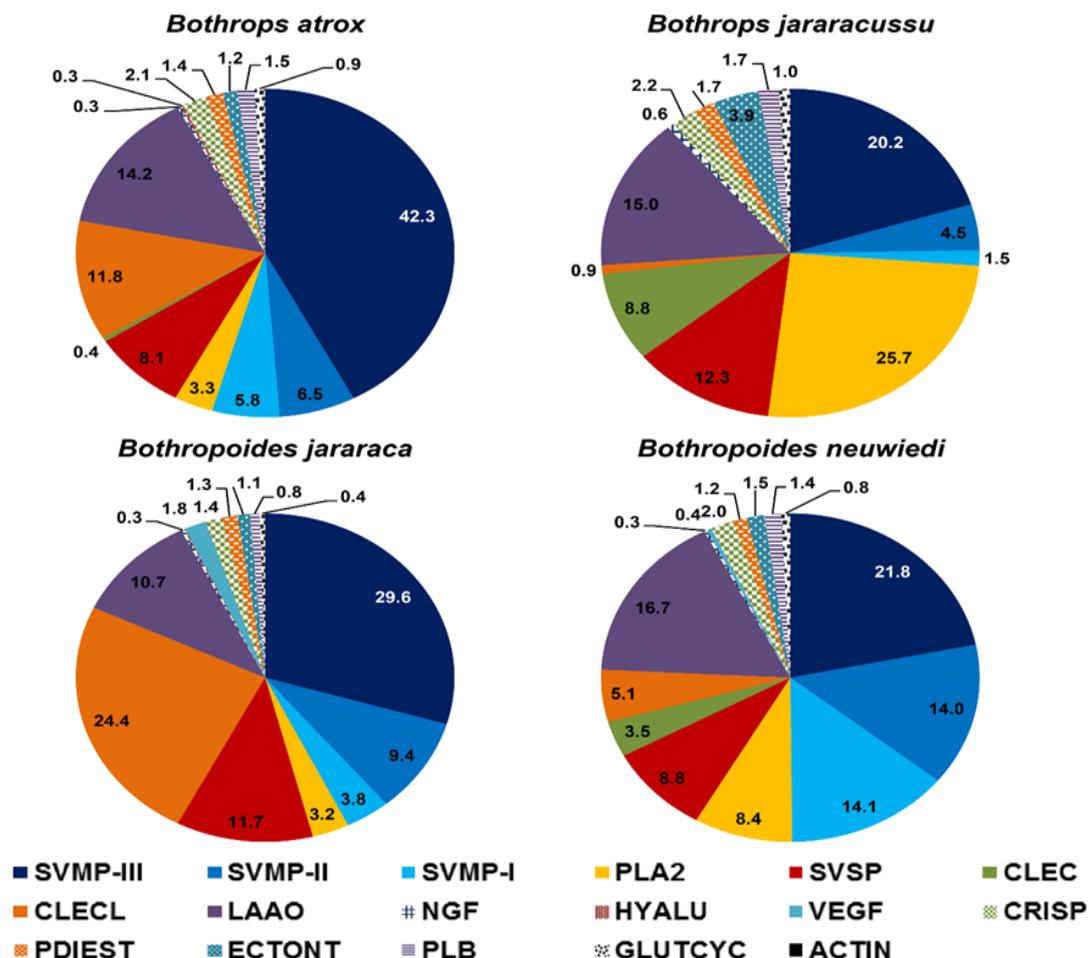


Figura 4: Distribuição da família de proteínas dos venenos usando uma abordagem de proteômica de espingarda. SVMP-I, -II e -III: Metaloproteinase de veneno de serpente, classes PI, P-II e P-III, PLA2: fosfolipase A2, SVSP: serina proteinase de veneno de serpente, CLEC: lectina do tipo C, CLECL: lectina do tipo C, LAO: L-aminoácido oxidase, NGF: fator de crescimento nervoso, HYALU: hialuronidase, VEGF: fator de crescimento endotelial vascular, CRISP: proteína secretora rica em cisteína, PDIEST: fosfodiesterase 1, ECTONT: ecto-5'-nucleotidase, PLB: fosfolipase B, GLUTCYC: glutaminil ciclase, ACTINA: actina.
Fonte: Sousa et al.(68)

Os principais componentes do veneno estão descritos no Quadro 1 de acordo com seus efeitos no organismo.

Família de toxina	Efeitos fisiológicos
Metaloproteinase	Hemorragias Formação de flictemas Edema Ativação do fator X ou de protrombina Desfibrilação Hipoagregação plaquetária
Serina proteinase	Coagulação de fibrinogênio Desfibrilação Hipoagregação plaquetária

	Hipotensão
Fosfolipase A2 (Lys-49 ou Asp-49)	Mionecrose Edema Dor
Lectinas tipo C	Inibição da agregação plaquetária Inibição dos fatores IX e X Efeito anticoagulante
Desintegrina	Inibição da agregação plaquetária
Peptídeos	Hipotensão
Hialuronidades	Favorece a disfunção e distribuição de proteínas

Quadro 1: Principais componentes do veneno e seus efeitos fisiológicos.

Fonte: Adaptado de Gutiérrez et al.(69)

As metaloproteinases são a classe mais abundante dentre os componentes do veneno e possuem ação proteolíticas que causam a degradação de estruturas proteicas, como as membranas basais de vasos sanguíneos e componentes importantes presentes na matriz extracelular (70,71). O domínio semelhante à desintegrina da metaloprotease também pode contribuir para os efeitos hemorrágicos (71). Isso pode induzir sangramento local e sistêmico e interromper a hemostase através de suas propriedades pró/anticoagulantes causando extravasamento de sangue, inflamação e necrose tecidual (70,71).

Teixeira et al. (72) afirmam que a administração exógena de metaloproteinases do veneno de serpentes em animais experimentais desencadeia uma cascata de eventos inflamatórios, caracterizados pela formação de edema, recrutamento de leucócitos nos tecidos e liberação de mediadores inflamatórios, que mimetizam uma série de distúrbios inflamatórios locais e sistêmicos em humanos.

As serina proteinases atuam em ligações peptídicas hidrolíticas, principalmente em pró-enzimas na cascata de coagulação, causando atividades pró-coagulantes, fibrinolíticas e/ou fibrinogenolíticas. Alguns têm uma atividade caliceína causando a liberação de bradiquinina (43,73), isso causa interrupção da hemostase e hipotensão (43). As l-aminoácidos oxidases atuam catalisando

a desaminação oxidativa estereoespecífica do aminoácido I, resultando na produção de α -cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio (74) causando efeitos na agregação plaquetária, induzindo a apoptose celular e atividades antimicrobianas (75).

A enzima fosfolipase A₂, atua causando a hidrólise da ligação éster na posição SN₂ dos fosfolipídios da membrana celular, aumentando a concentração de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Isso causa a perda do controle da permeabilidade para íons e macromoléculas causando o influxo de cálcio para o interior da célula e conseqüente liberação de marcadores citoplasmáticos como as enzimas desidrogenases (DHL) e as creatinoquinases (CK). Como resultado do incremento de cálcio citosólico, vários processos degenerativos se iniciam, tais como hipercontração de miofilamentos, alterações mitocondriais, ativação de calpaínas e das fosfolipases A₂ intracelulares (69) Uma das conseqüências dessa ação são efeitos tóxicos, no entanto, esses efeitos também podem ser resultados de atividade não enzimática (76) isso resulta em miotoxicidade, formação de edema, efeitos anticoagulantes, hipotensão, neurotoxicidade pré-sináptica (77,78), vistos em famílias Viperidae (79).

As enzimas 5'-nucleotidases atuam no monoéster de fosfato com hidrólise ligada à posição 5' do ácidos nucleicos (DNA e RNA)(80), causando a inibição da agregação plaquetária, podendo causar hemorragia (81,82). As hialuronidases atuam na hidrólise de oligossacarídeos e N-acetilglucosamina e alteram as propriedades estruturais, reológicas e químicas da matriz extracelular (74).

As proteínas secretoras ricas em cisteína atuam bloqueando o canal tipo L de cálcio e de nucleotídeo cíclico causando assim a inibição da contração do músculo liso (83).

Já as lectinas do tipo C atuam vinculando, inibindo ou ativando receptores específicos da membrana de plaquetas ou fatores de coagulação do sangue isso

promove ou inibe a agregação plaquetária(84), essa atividade é mais abundante em serpente da família Viperidae (79). As desintegrinas por sua vez, se ligam a glicoproteína IIb/IIIa (α IIb β 3 da integrina) expressa em plaquetas ativadas para evitar a interação com o fibrinogênio, inibir a agregação plaquetária também podendo causar hemorragia (85).

1.2.4 Gravidade do Acidente

Os acidentes botrópicos podem ser são classificados como leve, moderado e grave e as principais complicações locais são: abscesso, necrose e síndrome compartimental (86,87) (Figura 5) e as sistêmicas incluem insuficiência renal aguda (IRA) (88) e choque (17).

1.2.4.1 Complicações locais

Complicações como o abscesso, celulite e erisipela podem ser observadas no local da picada. Essas infecções são frequentes, devido às condições propícias ao crescimento bacteriano provocado pela reação inflamatória aguda, assim como pela presença abundante de bactérias patogênicas na flora bucal das serpentes (89).

A incidência de infecções pode variar entre os casos. No entanto, um estudo conduzido por Sachett et al. (90) na Amazônia brasileira, demonstrou que entre 186 pacientes internados no período de dois anos, cerca de 40% evoluiu para infecção secundária. Nesse caso, o edema, o eritema, a dor e o calor local podem tanto ser provocados pela ação do veneno, quanto pela infecção local.

A incidência de necrose é bastante variável (1% a 20,6%) geralmente limitada ao tecido subcutâneo, podendo comprometer estruturas mais profundas como tendões, músculos e ossos. A intensidade e a extensão da necrose estão intimamente ligadas à utilização de torniquetes e à demora entre o acidente e a

administração da soroterapia. Em casos extremos pode ser necessária a amputação de parte do membro acometido (63).



Figura 5: Complicações locais, resultantes de acidentes botrópicos.

A) Envenenamento na mão com edema e bolhas sero-hemorrágicas no membro superior esquerdo e sangue incoagulável. B) Envenenamento grave na mão esquerda com síndrome compartimental no membro superior esquerdo, exigindo fasciotomia. C) Envenenamento na mão esquerda com uma extensa área de edema e necrose no membro superior esquerdo e gangrena do quarto dedo. D) O mesmo paciente mostrado em C, após amputação do quarto dedo (na fase de cura)

Fonte: Hui et al.(91).

1.2.4.2. Complicações sistêmicas

Além do quadro de envenenamento local, o quadro sistêmico é extremamente importante. Pequenos sangramentos como gengivorragias (90,92) microhematúria (93), púrpuras e sangramentos em feridas recentes podem ocorrer nos casos leves e moderados (94)(Figura 6). Com menor frequência pode ocorrer hematúria macroscópica, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival e hematêmese (94). Em casos graves são observadas hemorragias intensas podendo acometer órgãos vitais, choque e insuficiência

renal como já citado. São relatadas como causas de óbito, acidente vascular cerebral(95) e hemorragia digestiva.

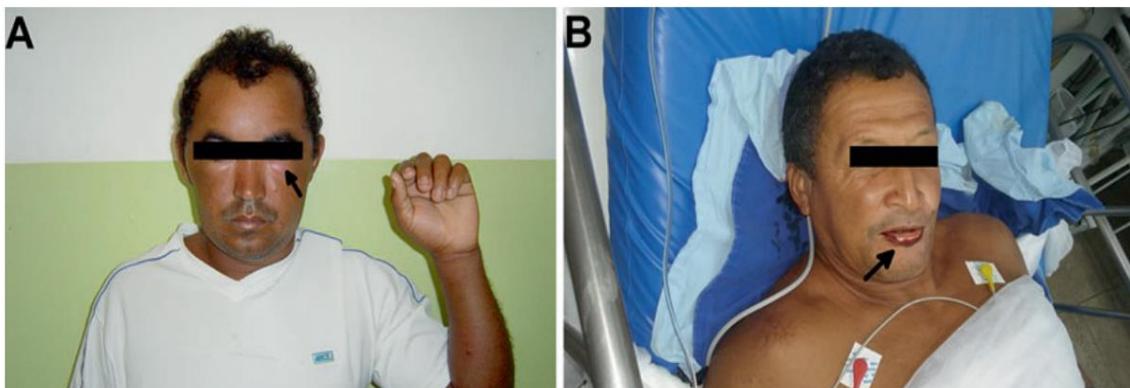


Figura 6: Complicações sistêmicas resultantes de acidente ofídico botrópico.

(A) Paciente mordido na parte dorsal do antebraço esquerdo mostrando face urêmica por causa de insuficiência renal aguda, 72 horas após o envenenamento. (b) Paciente com hemorragia sistêmica, evidenciada no quadro por sangramento no lábio inferior 24 horas após a mordida.

Fonte: Oliveira et al.(96).

1.2.4 Tratamento

O tratamento dos casos de envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é realizada de acordo com a classificação dos acidentes e consiste na administração do soro antibotrópico (SAB) por via intravenosa (Quadro 2). Nos casos em que há a falta desse tipo de soro, existe as associações antibotrópico-crotálica (SABC) ou antibotrópico-laquéica (SABL) que podem ser também utilizadas. O membro do paciente acometido pelo acidente deve ser elevado e estendido, o uso de analgésico deve ser empregado para o alívio da dor, a hidratação com diurese entre 30 a 40 ml/hora para indivíduos adultos 1 a 2 ml/kg/hora para criança deve ser estabelecida, além da antibioticoterapia para aqueles casos com evidência de infecção (17).

Barreto et al. (97) demonstraram em um estudo com camundongos que o soro antibotrópico é eficaz para o tratamento de envenenamento causado por *Bothrops atrox* e que o uso de dexametasona como adjuvante da terapia antivenômica poderia ser útil para melhorar o tratamento dos sintomas locais desses envenenamentos.

Manifestações e Tratamento	Classificação		
	Leve	Moderada	Grave
Locais • dor • edema • equimose	ausentes ou discretas	evidentes	intensas**
Sistêmicas • hemorragia grave • choque • anúria	ausentes	ausentes	presentes
Tempo de Coagulação (TC)*	normal ou alterado	normal ou alterado	normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAB/SABC/SABL***	2-4	4-8	12
Via de administração	intravenosa		

* TC normal: até 10 min; TC prolongado: de 10 a 30 min; TC incoagulável: > 30 min.

** Manifestações locais intensas podem ser o único critério para classificação de gravidade.

*** SAB = Soro antiofídico/SABC = Soro antiofídico-crotálico/SABL = Soro antiofídico-laquéico.

Quadro 2: Classificação quanto à gravidade e número de ampolas recomendado.
Fonte: Ministério da Saúde(17)

1.3 História e Produção do Soro

João Batista Lacerda foi um dos pioneiros em relação aos estudos sobre ofidismo na América Latina. Com ingresso em 1870, no Museu Nacional do Rio de Janeiro - RJ, onde produziu extensa obra, fundou o primeiro laboratório de fisiologia do Brasil. Realizou diversos trabalhos sobre toxicologia dos venenos ofídicos e identificou novas espécies de serpentes, como a *B. jararacussu* e *B. urutu* (98).

Em 1890, Emil Behring, trabalhando com toxina diftérica em Berlim e Shibasaburo Kitasato em Tóquio, trabalhando com toxina tetânica, concluíram que coelhos e camundongos poderiam ser imunizados contra difteria e tétano e que animais infectados poderiam ser curados com a utilização do soro imune, bem como utilizar essas toxinas para prevenção da infecção, no caso daqueles animais saudáveis (99).

No ano de 1894, Albert Calmette, após vários testes, conseguiu imunizar coelhos contra o veneno de serpentes (*Naja*) por meio da aplicação subcutânea

com doses crescentes de veneno misturando-as com doses decrescentes de hipoclorito de sódio ou cálcio. Alguns coelhos, conseguiam sobreviver a doses maiores de 30 a 35 mg de veneno. Ademais, o soro daqueles animais imunizados poderia neutralizar a atividade tóxica do mesmo veneno *in vitro*, além de ter efeito terapêutico e preventivo contra a intoxicação *in vivo*. Ao utilizar o dobro de uma dose letal para a inoculação em coelhos (o que os mataria em cerca de 3 horas) e administrar o soro imune por via subcutânea ou intraperitoneal após surgirem os sintomas como paresia dos membros, dispneia, regurgitações e taquicardia, os coelhos ficaram envenenados em estado grave por um certo período, relativamente longo, no entanto retornaram ao normal, gradualmente (100).

Em 1901, o médico Vital Brazil, imunologista e pesquisador, sabendo do elevado número de acidentes ofídicos em São Paulo, começou a realizar experimentos com os venenos dessas serpentes. Com base nos primeiros trabalhos com soroterapia realizados por Albert Calmette em 1894, Vital Brazil, desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, podendo descobrir sua especificidade, em que cada de tipo de veneno requer um soro específico, preparado por meio do mesmo gênero de serpente causadora do acidente (101).

Já entre 1950 e 1980, as informações sobre ofidismo eram originárias de estudos pontuais, conduzidos principalmente no Sudeste, com publicações em São Paulo e sobre escorpionismo no Estado de Minas Gerais (9).

No ano de 1983, a Syntex, uma indústria farmacêutica privada no Brasil, desativou a produção de imunobiológicos. A partir desse momento, a produção de antivenenos entrou em crise no país, restringindo o atendimento, apenas aos três laboratórios oficiais: Fundação Ezequiel Dias - FUNED em Minas Gerais, Instituto Butantan - IB em São Paulo e Instituto Vital Brazil - IVB no Rio de Janeiro e que naquele momento, não apresentavam condições técnico-operacionais para atender à demanda de soros antipeçonhentos a nível nacional. A falta da

disponibilidade desses produtos originou uma situação grave. As evidências começaram a surgir em 1985, quando a imprensa começou a acompanhar a situação devido ao desaparecimento desses produtos dos serviços de saúde, relatando amputação de membros como braços e pernas de trabalhadores rurais e a ocorrência de óbitos de indivíduos acidentados com serpentes não tratados com soros por inexistência nos centros de saúde(63).

Em 1986, o Ministério da Saúde criou o Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos para atender à demanda nacional desse produto e dos outros imunobiológicos necessários no país, visando diminuir, a importação, sendo assim, relevante a participação dos laboratórios oficiais (9).

Atualmente os soros antiofídicos são disponibilizados de forma gratuita à população por meio do Sistema Único de Saúde - SUS, não sendo comercializados nem disponíveis na rede privada. Os soros em questão são produzidos por quatro institutos estaduais, Instituto Butantan - SP, Instituto Vital Brasil - RJ, Fundação Ezequiel Dias – MG -FUNED e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – PR - CPPI(102)(103) através da imunização de cavalos com venenos provenientes de cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* com 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* com 12,5% cada(104), e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Todos seguem o mesmo processo de produção.

Antigamente, os métodos de dosagem da potência do soro antiofídico eram realizados sem uma padronização. Somente com a avaliação da atividade do veneno sobre a coagulação sanguínea (105). Essa avaliação era realizada com a incubação da mistura soro-veneno a 37 °C, com a duração de 30 minutos e administração endovenosa em pombos. O período de observação que era de 20-30 minutos, impossibilitava a quantificação da atividade dos vários anticorpos antitóxicos. Já que o número de resposta para cada nível de diluição era baixo, a análise estatística não era confiável, o que influenciava a precisão das

estimativas de potência. Depois de várias avaliações experimentais, finalmente foi padronizada a metodologia de titulação da potência do soro antiofídico, por meio da inoculação de camundongos por via intraperitoneal (106). Apesar de ser a metodologia oficial vigente, a qual é preconizada pela 4ª Edição da Farmacopeia Brasileira de 2004, esta ainda não foi formalmente validada.

Ainda que a metodologia analítica para a determinação da potência do soro antiofídico tenha trilhado esse longo caminho, ressalta-se a necessidade de aperfeiçoamento dessa metodologia para o estabelecimento de um antiveneno de referência essencial para a padronização dos ensaios permitindo assim, a comparação lote a lote, bem como a comparação entre diferentes laboratórios, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde – OMS (107).

Em maio de 2002, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS achou necessário realizar uma reunião de trabalho, intitulada “Situação atual perspectivas para a produção e controle de soros antiofídicos utilizados no Brasil”. Nessa reunião, entre vários temas abordados, destacou-se a discussão sobre a melhoria do controle da qualidade dos soros antiofídicos, com uma atenção maior à metodologia analítica para a determinação da potência. O encontro contou com todas as entidades envolvidas na produção, distribuição e controle dos soros antiofídicos no Brasil, sendo eles: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ, Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI, a Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO, a Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Instituto Butantan, Instituto de Biologia do Exército – IBEx e Instituto Vital Brazil.

As imunoglobulinas antiveneno são consideradas o único tratamento específico para o envenenamento por picada de serpentes peçonhentas(4). A OMS estimou que 10 milhões de frascos de soro são necessários a cada ano

para controlar os efeitos de envenenamentos por acidente ofídico (108). Ainda que haja, 46 laboratórios distribuídos no mundo dedicados à produção de antivenenos, estes não conseguem atender à grande demanda (108,109).

Devido ao status negligenciado do ofidismo, os governos e os formuladores de políticas geralmente ignoram os antivenenos, mantendo-os em baixa nas agendas de saúde pública e longe dos orçamentos nacionais (108,109). Para melhorar a disponibilidade global, laboratórios maiores exigem descrições mais claras dos tamanhos e necessidades do mercado, a fim de planejar estratégias de manufatura de longo prazo (108,110).

1.3.1 Etapas de Produção

As etapas de produção dos soros seguem critérios rigorosos e consistem em: extração do veneno; liofilização; diluição e injeção em cavalos; hiperimunização (cerca de 40 dias); realização de uma sangria exploratória, retirando uma amostra de sangue para medir o teor de anticorpos produzidos em resposta às injeções do antígeno. Dosagem do teor de anticorpos; ao atingir o nível desejado, é então realizada a sangria final retirando-se cerca de quinze litros de sangue de um cavalo de 500 kg em três etapas, com um intervalo de 48 horas. O soro é obtido a partir da purificação e concentração do plasma, onde são encontrados os anticorpos. Observação: As hemácias são devolvidas ao animal, em um processo chamado plasmaferese (111).

Esta técnica de reposição minimiza os efeitos colaterais provocados pela sangria do animal. O soro purificado é concentrado através de ultrafiltração molecular, submetido à filtração clarificante e esterilizante (Figura 6). O soro é estocado em temperatura de 2 a 8 °C e após isso é submetido aos testes específicos de controle da qualidade. Após esses testes, o soro é formulado: diluído para alcançar o título desejado (> 5,0 mg/mL), adicionando o conservante fenol (< 0,35%), isotonicado (NaCl – 0,7 a 0,9%), tendo o pH ajustado na faixa entre 6 e 7. No final do processo, o soro terminado a granel (“bulk”) é novamente

submetido a testes de controle da qualidade citados abaixo, para liberação do lote, conforme o preconizado na Farmacopeia Brasileira 4^o edição, parte II, 5^o fascículo (111).

A demonstração ilustrada das etapas de produção do soro pode ser visualizada na Figura 7.

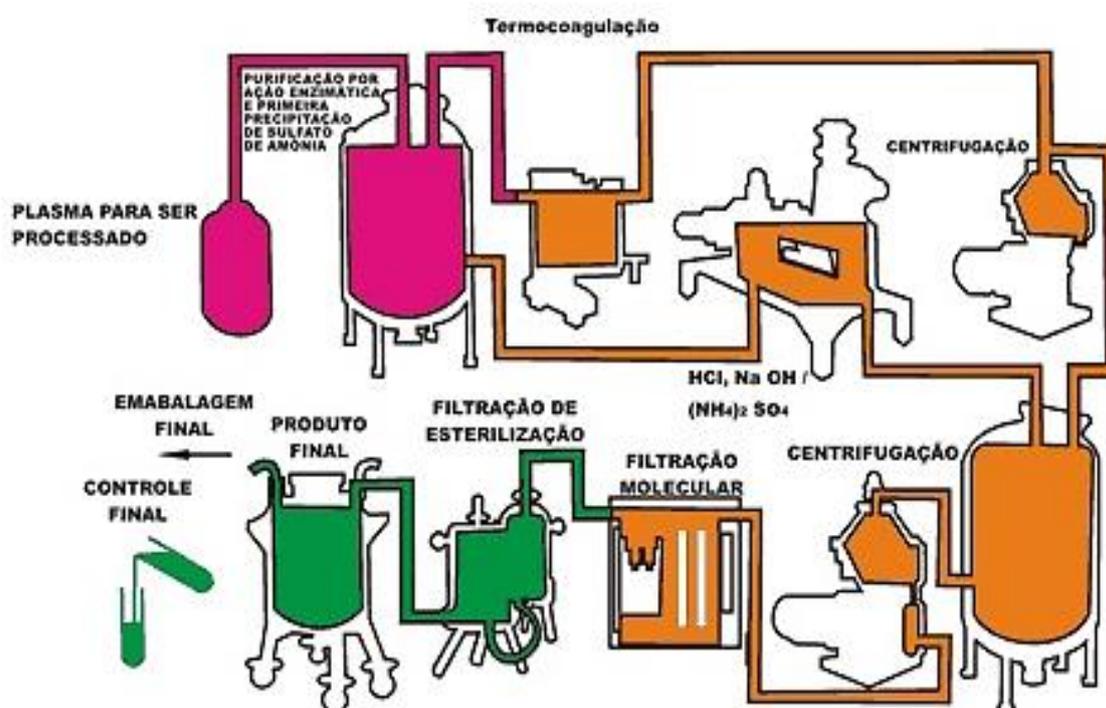


Figura 7: Processamento do Plasma(112).

O processo de produção conta com fases específicas, cada fase possui um objetivo, um mecanismo pelo qual será desenvolvido e para todas as fases são realizados testes para o controle de qualidade, afim de avaliar a eficácia e a possível presença de impurezas, inclusive no bulk final.

As etapas da produção são detalhadas no Quadro 3.

Nº	FASE	OBJETIVO	MECANISMO	CONTROLE DA QUALIDADE
1	Tamponamento do plasma	Melhorar a qualidade	Adicionar tampão ácido cítrico pH 4,8	Verificar o pH
2	Purificação do plasma	Conservar e manter estável	Adicionar fenol e centrifugar	Analisar teor de fenol
3	Desnaturação das proteínas	Precipitar e eliminar a albumina e pigmentos	Adicionar sulfato de amônia e centrifugar	Analisar teor de sulfato de amônia
4	Tamponamento e salinização da suspensão de proteínas	Otimizar a digestão	Adicionar ácido clorídrico ou fosfato de cálcio pH 3,2 e cloreto de sódio e centrifugar	Verificar o pH
5	Filtração molecular	Eliminar imunoglobulinas	Purificar por cromatografia	Verificar a turbidez
6	Diálise	Eliminar resíduos de sulfato de amônia	Filtrar em tubos de hemodiálise	Analisar teor de sulfato de amônia
7	Clarificação	Eliminar a turbidez	Adicionar hidróxido de alumínio gel	Analisar teor de hidróxido de alumínio
8	Esterilização	Purificar o produto	Adicionar etanol	Analisar teor de etanol
9	Estabilização e preservação	Estabelecer a validade	Adicionar timerosal do produto	Analisar teor de timerosal
10	Padronização do produto final	Verificar parâmetros de qualidade	Coletar amostras do "bulk" final	Analisar o "bulk" final

Quadro 3: Fases do processo de produção e controle de soros.

Fonte: Instituto Butantan(101)

1.3.2 Mecanismo de Ação do Soro

A capacidade dos antígenos para induzir uma resposta imune é chamada de imunogenicidade. Assim, os venenos de serpentes têm dois tipos de componentes: A) Componentes imunogênicos, que são proteínas que constituem mais de 98% do peso seco do veneno e incluem proteínas capazes de induzir efeitos tóxicos relevantes, bem como proteínas não tóxicas, e B) componentes não imunogênicos, como aminoácidos, nucleotídeos,

carboidratos, lipídeos e aminas biogênicas, que constituem menos de 2% do peso seco do veneno e, em termos gerais, são desprovidos de toxicidade (113).

Dependendo de como as proteínas do veneno das serpentes são apresentadas ao sistema imunológico, diferentes respostas de anticorpos podem ser obtidas. A geração de uma resposta de anticorpos eficaz para reconhecer e neutralizar as proteínas tóxicas dos venenos é o elemento chave na produção de antivenenos eficazes em animais (114).

Existem vários tipos de anticorpos e antígenos e a especificidade da ligação é devida à constituição química específica de cada anticorpo. O determinante antigênico ou epítopo é reconhecido pelo paratopo do anticorpo situado na região variável da cadeia polipeptídica. Antígenos podem permanecer ligados a anticorpos por semanas por meio de interação não covalente, como interação eletrostática, ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals e interação hidrofóbica (115).

Os venenos de serpentes são compostos por proteínas cuja antigenicidade e abundância mudam de uma espécie para outra. No entanto, algumas semelhanças antigênicas são conservadas entre espécies filogeneticamente relacionadas. Portanto, os anticorpos aumentam por imunização com veneno particular de serpente, além de reagirem com suas toxinas homólogas, podem reagir de forma cruzada com algumas toxinas presentes em venenos heterólogos e podem neutralizar seus efeitos tóxicos (116). A especificidade dos anticorpos dos antivenenos para um grupo restrito de venenos é uma limitação da imunoterapia do envenenamento por acidente ofídico (113).

A interação veneno-antiveneno é uma reação antígeno-anticorpo, e essa é a reação fundamental para neutralizar os componentes do veneno presentes no veneno da serpente. No sangue, as proteínas do veneno são especificamente com alta afinidade ligadas por anticorpos (antiveneno) para formar o complexo

antígeno-anticorpo. Estes complexos são então transportados para o sistema celular, onde podem ser destruídos ou desativados (117).

Os anticorpos possuem pelo menos dois locais de ligação ao antígeno e a maioria dos antígenos do veneno tem pelo menos dois epítomos (determinantes antigênicos). Os anticorpos reticulam os antígenos formando grandes agregados de anticorpo e antígeno referidos como complexos imunes que são mais prontamente fagocitados do que os antígenos livres. No entanto, o veneno de serpentes reage com antígenos de superfície das células e forma o complexo imune. Este processo de aglutinação do veneno no receptor aplica-se à maioria das proteínas do veneno de serpentes (118).

Uma vez neutralizado, o complexo toxina-anticorpo é incapaz de se ligar aos locais receptores nas células alvo do hospedeiro, incapaz de entrar na célula e é ingerido pelos fagócitos. O processo de eliminação dos complexos de veneno na presença de antiveneno é muito mais lento do que o do veneno livre na ausência de antiveneno, ou seja, a maioria desses complexos é eliminada mais por fagocitose do que pela via renal (118).

1.4 Reação do Organismo ao Soro Heterólogo

Devido a composição do soro antiveneno ser oriunda de equinos, sua administração pode resultar em reações adversas precoces e/ou tardias, porém, não é indicado o teste de sensibilidade cutâneo, pois, além de apresentar valor preditivo baixo, ainda retarda o início da terapia. Sendo assim, recomenda-se que todos os pacientes submetidos a soroterapia sejam hospitalizados para monitoramento da evolução e possível aparecimento dessas reações adversas ao antiveneno, avaliação da eficácia da soroterapia e verificação da ocorrência de complicações locais e/ou sistêmicas (119).

1.4.1 Reações Adversas

Mundialmente, a frequência das reações adversas ao soro antiofídico ocorre em uma taxa variada entre os pacientes, podendo surgir entre 3% a 84% dos casos (120–123). Uma pesquisa feita no Sri Lanka, mostrou que cerca de 75% dos pacientes tratados com soro antiofídico desenvolvem reações adversas precoces, sendo que mais de a metade dessas reações foram considerações reações graves (120).

Estudos feitos na Austrália, demonstraram uma taxa de 3% de reações adversas imediatas, considerada relativamente baixa (121,124). Se essas análises forem realizadas com a população brasileira, percebemos que essas reações adversas ocorrem em aproximadamente 54% dos pacientes tratados com soroterapia antiofídica, e destas, menos de 3% são reações anafiláticas graves (120). Essa grande variação nas taxas de incidência de reações adversas ao soro antiofídico se deve às diferentes formas de produção do soro, velocidade e quantidade de soro infundido e à características específicas da serpente e da população de estudo (125).

Devido a essas variações, há menos de dois anos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou a resolução RDC nº 187 em 8 de novembro de 2017 (126) que dispõe sobre o registro de Soros Hiperimunes. O objetivo da resolução é estabelecer os requisitos mínimos para o registro de antivenenos, a fim de garantir a qualidade, segurança e eficácia desses produtos. Dois pontos são relevantes: a) estudos não clínicos elaborados com o objetivo de determinar pelo menos a Dose Efetiva 50% (DE50) e a potência do material de origem e, b) ensaios clínicos cobrindo aspectos de segurança e eficácia.

As reações adversas são classificadas como reações precoces que envolvem reações anafiláticas e reações pirogênicas e as reações tardias que se referem à doença do soro (Quadro 4). Além disso, o termo reação anafilática

é utilizada para se referir tanto a reações mediadas por IgE quanto a reações não mediadas por IgE, esta última substitui o termo reações anafilactóides (127).

1.4.1.1 Reações anafiláticas mediadas por IgE

As reações mediadas por IgE também são conhecidas como reações de hipersensibilidade do tipo I e hipersensibilidade imediata(128) e podem ocorrer contra qualquer componente do antiveneno. As IgE são anticorpos encontrados ligados a basófilos ou receptores de mastócitos Fc. Quando antígenos específicos são reconhecidos pela IgE, eles podem produzir reticulação dos anticorpos ligados às células e, no primeiro estágio, induzir a degranulação e liberação de compostos ativos, principalmente histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores farmacológicos. Esses compostos levam a várias ações, incluindo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, contração brônquica e visceral do músculo liso, secreção mucosa e inflamação local (129). A presença sistêmica de antígenos, como os existentes em soros heterólogos, pode provocar choque anafilático, que se caracteriza por edema em vários tecidos e diminuição da pressão arterial secundária à vasodilatação (128,130). Essa resposta geralmente ocorre em pacientes previamente sensibilizados para algum componente do antiveneno. Essa resposta é a reação adversa mais grave e potencialmente fatal, mas ocorre com pouca frequência (131).

1.4.1.2 Reações anafiláticas não mediadas por IgE

A grande quantidade de proteínas presentes nos soros heterólogos pode contribuir para a formação agregados ou de imunocomplexos resultando na ativação do sistema complemento e à formação de anafilotoxinas (17). As reações não mediadas por IgE, também são conhecidas como reações anafilactóides (131) ou reações não imunológicas (terminologia atual) (132). As anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a) são peptídeos ativos de baixo peso molecular que são produzidos pela ativação do sistema complemento. Essas anafilotoxinas são provenientes das proteínas do complemento séricas C3, C4 e C5 e são

criadas pela clivagem dessas proteínas durante a fixação do complemento por complexos antígeno-anticorpo, agregados de imunoglobulinas e outros compostos (133).

No caso do antiveneno, a ativação da via clássica dos agregados de imunoglobulina mediada pelo complemento é provavelmente o principal mecanismo envolvido na geração de anafilotoxinas (127,134). Além disso, a presença de anticorpos heterofílicos no antiveneno contra eritrócitos humanos, neutrófilos e outros tipos de células também poderia contribuir para gerar anafilotoxinas (127). Os fragmentos C5a, C3a e C4a estimulam a quimiotaxia, a ativação de neutrófilos e a degranulação de basófilos e mastócitos, que liberam mediadores farmacologicamente ativos de hipersensibilidade imediata(128). Os efeitos líquidos dessas atividades incluem a contração do músculo liso vascular, aumento da permeabilidade vascular e a migração de neutrófilos e monócitos dos vasos sanguíneos (128).

As reações não mediadas por IgE constituem a maioria das reações adversas precoces induzidas por antiveneno. Estas reações ocorrem em pacientes que não tiveram contato prévio com algum dos componentes do soro (127). Vários antivenenos de diferentes produtores são capazes de ativar a via clássica do sistema do complemento e gerar anafilotoxinas, sugerindo que fatores como composição, proteínas contaminantes e agregados, podem influenciar a atividade anticomplementar dos antivenenos (135). Além disso, uma ativação independente de mastócitos desencadeada pela ativação de não-complemento também foi proposta (136).

1.4.1.3 Reações Pirogênicas

A contaminação por endotoxina é a principal causa de reações pirogênicas provocadas por antivenenos. Felizmente, a maioria dos laboratórios de produção implementa ou está começando a implementar requisitos rigorosos de qualidade para suas instalações, matérias-primas, sistemas de processamento e equipamentos para evitar contaminação por endotoxina, o que

resultou em uma diminuição importante desse tipo de reação adversa nos últimos anos. As endotoxinas bacterianas consistem em lipopolissacarídeos (LPS), que são os principais componentes das membranas celulares externas das bactérias gram-negativas (137).

O mecanismo molecular de toxicidade está relacionado à interação com receptores Toll-like 4 (TLR4) e/ou LPS-proteína de ligação (LPB) localizados em monócitos e outros componentes celulares do sistema imune que produzem TNF- α , IL-6, interleucinas 1 β (IL-1 β) e outras citocinas (133). Níveis mais altos de endotoxinas estão relacionados à infecção bacteriana ou lesões do trato digestivo, mas a contaminação em baixas concentrações pode ser encontrada em produtos farmacêuticos. A presença de baixos níveis de endotoxinas em soros antivenenos gera um aumento importante na frequência de reações leves (principalmente febre) em pacientes (138).

A avaliação pré-clínica de antivenenos quanto ao conceito dos 3Rs (replacement, reduction and refinement, em português: substituição, redução e refinamento) é necessária para evitar reações adversas nos pacientes, especialmente contaminação por microrganismos (139).

1.4.1.4 Reações Adversas Tardias

As reações adversas tardias são também conhecidas como reações de hipersensibilidade do tipo III ou doença do soro(128). Este tipo de reação adversa foi relatada pela primeira vez por Pirquet e Schick em 1905(140). Esses autores estudaram os efeitos colaterais causados pela administração de grandes quantidades de antitoxinas e descobriram que muitos dias após a administração da antitoxina, alguns pacientes apresentavam febre e erupções cutâneas, e alguns relataram dano renal com proteinúria e linfadenopatia. Tais autores também descobriram que os sintomas apareceram mais rapidamente após uma segunda exposição ao soro do que após a primeira administração (140).

A hipersensibilidade do tipo III é mediada por complexos antígeno-anticorpo. Como consequência da administração do soro, o sistema imunológico do paciente reage produzindo anticorpos que se ligam ao antiveneno, o que resulta na formação de complexos imunes (133,141). Esses complexos levam a ativação e a infiltração de leucócitos, ou seja, a chamada síndrome da “doença do soro”. A reação clássica ocorre de 5 a 24 dias após a injeção desencadeante (17,131), mas as manifestações podem aparecer alguns dias após a injeção na forma acelerada da doença do soro, que pode ocorrer em indivíduos que já estão sensibilizados (131). A incidência desse tipo de reação não foi claramente quantificada, pois os sintomas geralmente são leves e ocorrem quando o paciente já recebeu alta; portanto, nenhum registro médico é gerado.

1.4.2 Liberação de Citocinas e Quimiocinas

Anteriormente, análises demonstraram que o processo inflamatório causado pela ação dos componentes do veneno e pela liberação de mediadores inflamatórios em acidentes ofídicos botrópicos, pode ser intensificado pela atuação de citocinas e quimiocinas como CXCL-8 (IL-8), CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, TNF- α e IFN- γ (142–150).

Estudos com camundongos injetados com vários venenos de serpentes demonstraram liberação de IL-6, óxido nítrico (NO), IL-5, TNF- α , IL-4, IL-10, prostaglandinas e leucotrienos, com cursos de tempo distintos na produção pós exposição ao veneno para mediadores individuais (151–153).

Outros estudos experimentais mostraram que a presença de alterações imunológicas em resposta ao veneno de serpentes do gênero *Bothrops* aumentou as citocinas locais IL-6, IL-12 e IL-10 (154,155). Um pequeno número de estudos que investigaram as concentrações plasmáticas de citocinas pró e anti-inflamatórias em seres humanos envenenados por acidente ofídico mostrou concentrações elevadas de IL-6, IL-10, TNF- α , CXCL-8 e MIP-1 α e MIP-1 β (CCL-

3 e CCL-4), CCL5 (145,156,157). Esse processo está relacionado à indução resposta imune, febre, migração celular e regulação do perfil (145).

Poucos estudos avaliaram a liberação desses mediadores em resposta ao antiveneno em casos de reações adversas. No entanto, sugere-se que tais moléculas também possam atuar, pois estudos já mostraram aumento de citocinas em anafilaxia não causada por antiveneno (136,158). Uma análise da resposta imune ao envenenamento e os mecanismos de reações adversas ao antiveneno no Sri Lanka (136) mostrou que os níveis de IL-6 e IL-10 aumentaram em pacientes com anafilaxia em comparação à pacientes sem reação adversa e a pacientes somente com reações na pele, sugerindo que somente pacientes com reações adversas graves possam ter aumento de citocinas inflamatórias.

Reação adversa	Tipo	Causa	Mecanismo	Efeito fisiológico
Mediada por IgE	Precoce	Presença de IgE do paciente contra qualquer componente do antiveneno	Degranulação de basófilos e mastócitos por IgE. Liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores farmacológicos	Vasodilatação vascular aumentada da permeabilidade Contração brônquica e visceral do músculo liso Choque anafilático.
Não mediada por IgE	Precoce	Presença de agregados, fragmentos Fc ou anticorpos heterofílicos contra células sanguíneas em antiveneno	Ativação complementar por agregados de Ig e outros. Degranulação de basófilos e mastócitos por complemento. Liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores farmacológicos	Vasodilatação vascular aumentada da permeabilidade Contração brônquica e visceral do músculo liso Prurido Urticária Dor.
Pirogênica	Precoce	Presença de endotoxinas em antiveneno	Macrófago e outra ativação celular por endotoxinas. Produção de TNF- α , IL-1, IL-6	Febre.
Doença do soro	Tardia	Resposta imune humoral ao antiveneno	Ativação do complemento por imunocomplexos. Degranulação de basófilos e mastócitos por complemento. Liberação de histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores farmacológicos	Erupção cutânea Glomerulonefrite

Quadro 4: Tipos de reações adversas causadas por antivenenos.
Fonte: Adaptado de Morais(131)

1.4.3 Prevenção das Reações Adversas

Um estudo clínico (159) observacional com análise do tipo e da frequência de reações adversas em 24 crianças que receberam pré-tratamento com anti-histamínicos e glicocorticoides H1 e H2 encontrou uma taxa geral de reação adversa inicial de 33% e sugeriu que os pré-tratamentos não exibiam nenhum efeito protetor (159).

Fan et al.(160) investigaram, em um ensaio randomizado, duplo-cego e placebo controlado, a eficácia da prometazina na prevenção de reações precoces à administração do soro no Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan. Os autores recrutam 101 pacientes entre 1994 e 1995 e não encontraram diferenças significativas entre pacientes que receberam prometazina e aqueles que não receberam, em termos de ocorrência de reações precoces. As reações foram leves a moderadas e ocorreram em 24% dos pacientes tratados com prometazina e 25% daqueles que receberam placebo.

Em um estudo clínico observacional retrospectivo de 1994 a 2004, Williams et al. (161) examinaram o uso de antiveneno, pré-medicação e reações adversas precoces em pacientes após acidente ofídico em 11 unidades de saúde rurais em Papua Nova Guiné (136 casos). Esses autores encontraram taxas de reações adversas de 28% em pacientes não-medicados, 28% em pacientes pré-medicados sem adrenalina e 8% em pacientes pré-medicados com adrenalina. Eles concluíram que a pré-medicação com prometazina e/ou hidrocloridato sem adrenalina não reduziu as reações adversas precoces (161).

Da mesma forma, Premawardhena et al. (122), em um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, encontraram efeitos benéficos da adrenalina administrada por via subcutânea imediatamente antes da administração do antiveneno. O ensaio foi realizado entre 1998 e 1999 e analisou 105 casos e os pacientes que receberam adrenalina exibiram uma diminuição nas reações adversas a uma taxa de 11%, em comparação com a taxa de 43% observada em pacientes do grupo controle (122).

Por outro lado, em um estudo de coorte prospectivo aninhado na Austrália realizado de 2002 a 2007, os autores encontraram apenas uma diminuição marginal nas reações adversas com medicamentos pré-tratamento. Eles estudaram 195 pacientes e encontraram uma redução de 23% para 18% das reações de hipersensibilidade, com o uso de adrenalina e sem reduções com qualquer outra droga. Esses autores concluíram que o uso de pré-medicação não estava associado a qualquer redução nas reações adversas (124).

Entre 2005 e 2008, em um estudo com 1007 pacientes, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo no Sri Lanka, De Silva et al. (120) investigaram a eficácia da prometazina, hidrocortisona e adrenalina. Eles não encontraram diminuição nas reações adversas com o uso de prometazina ou hidrocortisona. No entanto, esses autores descobriram que o pré-tratamento com baixa dose de adrenalina reduziu o risco de reações graves agudas ao antiveneno de cobra em 43%. Adicionalmente, a administração simultânea de hidrocortisona neutralizou o benefício observado apenas com adrenalina. Recentemente, esses autores publicaram uma revisão sobre a prevenção e tratamento de reações adversas e descobriram que apenas a adrenalina tinha relatos confiáveis de diminuição do número de reações adversas (130). Um artigo de revisão chegou à mesma conclusão (162).

No Sri Lanka alguns autores (163) testaram a eficácia da hidrocortisona intravenosa na redução de reações adversas ao antiveneno em 236 pacientes. Os pacientes receberam aleatoriamente hidrocortisona intravenosa pelo menos 2 horas antes da administração do antídoto ou receberam a mesma dose ao mesmo tempo que a administração do soro. Os resultados revelaram que a hidrocortisona não reduziu a taxa de reações adversas quando administrada simultaneamente (35%) ou até 4 horas antes do antídoto (39%). Embora os autores não tenham um grupo não tratado para determinar a eficácia da hidrocortisona, chegaram à conclusão de que o tratamento com hidrocortisona não justificava um atraso na administração do antiveneno.

Ao contrário de outros dois estudos que mostraram a eficácia da hidrocortisona em associação com um anti-histamínico. O primeiro estudo (121) investigou a eficácia da infusão de hidrocortisona com ou sem clorfeniramina em um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo no Sri Lanka. O estudo recrutou 52 pacientes e os autores encontraram um alto nível geral de reações adversas (81% no grupo placebo). A infusão de hidrocortisona sozinha foi ineficaz na redução da ocorrência de reações adversas agudas, mas em combinação com a clorfeniramina, a hidrocortisona provocou uma diminuição leve, mas significativa nas reações adversas (52%).

Em outro estudo realizado em um hospital de missão rural no Equador de 2002 a 2006, vítimas de acidentes ofídicos receberam um novo regime de antiveneno que incluiu drogas profiláticas (hidrocortisona e difenidramina) com uma infusão intravenosa lenta de soro diluído. Os autores compararam suas observações a um controle histórico sem drogas profiláticas e à injeção intravenosa rápida de antiveneno não diluído. Eles descobriram que pré-medicação com hidrocortisona intravenosa e difenidramina, juntamente com a administração intravenosa de soro diluído ao longo de 60 min reduziu a frequência de reações adversas de 47% para 2% e reduziu a gravidade das reações anafiláticas (164).

1.5 Justificativa

O uso de antiveneno ainda é único tratamento eficaz para neutralizar os envenenamentos por serpentes (17) e a taxa de reações adversas decorrentes dessa terapia pode variar entre as diferentes regiões, no entanto, essas reações podem significar um problema de saúde importante para os indivíduos que recebem a soroterapia.

Devido à ocorrência de reações adversas, a prática do uso de pré-medicação foi aceita ou é obrigatória em muitos países. As drogas mais

utilizadas são corticoides, anti-histamínicos e, mais raramente, adrenalina (120). Atualmente, esta prática está sendo questionada devido à baixa ou controversa eficácia (130) como comprovado por outros estudos.

Contudo, existem protocolos de países da América Latina que as espécies de serpentes são semelhantes e que a produção do soro também é feita por meio da imunização de animais e não existe preconização para uso de pré-medicação.

Sabendo disso, percebe-se a necessidade da realização da farmacovigilância afim de avaliar a incidência das reações adversas contribuindo para o conhecimento dos profissionais da saúde em relação à avaliação, compreensão, identificação e prevenção das possíveis reações adversas, podendo servir de subsídio para a implementação de estratégias de prevenção dessas reações, uma vez que a farmacovigilância ainda não é implementada nas unidades que administram a soroterapia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Estimar a prevalência de reações adversas da soroterapia antibiótica em pacientes de uma unidade terciária na Amazônia brasileira.

2.2 Específicos:

- Identificar os sinais e sintomas mais comuns com o uso do soro antibiótico.

- Avaliar a frequência das reações adversas mais comuns ao soro antibiótico.

- Avaliar o perfil de moléculas citocinas e quimiocinas em pacientes com o uso da soroterapia antibiótica.

- Identificar fatores clínico epidemiológicos e laboratoriais associados à ocorrência de reações adversas na soroterapia antibiótica.

3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

O artigo intitulado “Early reactions to *Bothrops* antivenom in the Brazilian Amazon: frequency and predictive value of cytokine and chemokine profile on admission” a ser submetido na Revista Cytokine (fator de impacto 3.078), como artigo original, compõe os resultados principais desta dissertação.

Early reactions to *Bothrops* antivenom in the Brazilian Amazon: frequency and predictive value of cytokine and chemokine profile on admission

Franson Gean Souza Soares^{1,2}, Iran Mendonça-da-Silva^{1,2}, Wuelton Marcelo Monteiro^{1,2}, Elizandra Freitas do Nascimento^{1,2}, Luiz Carlos de Lima Ferreira^{1,2}, Hiochelson Najibe Ibiapina^{1,2}, Fan Hui Wen³, Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5}, Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett^{1,6*}

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

2 Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazil.

3 Instituto Butantan, São Paulo, 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 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Alfredo da Matta (FUAM), Manaus, Brazil.

*Corresponding author: Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett
Diretor de Ensino e Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor
Vieira Dourado, Avenida Pedro Teixeira 25, Manaus, Amazonas, Brazil, 60.037-
000; Phone: 92 9165 2486.

ABSTRACT

Envenomation by snakebites is a global health problem. Treatment of these envenomations is performed by administering heterologous antivenoms with antibodies that bind to and neutralize the venom toxins. Antivenoms have been used effectively for more than a century. However, their administration may result in early and/or late adverse reactions that can be severe. The aims of this study were to estimate the prevalence of early adverse reactions (EARs) of *Bothrops* antivenom therapy in a tertiary unit in the Brazilian Amazon, and to determine whether EARs can be predicted by a characteristic cytokine and chemokine profile in plasma samples. A cohort of patients bitten by *Bothrops atrox* was followed-up at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), from 2014 to 2016. Patients were treated with *Bothrops* antivenom (BAv; Butantan Institute), according Brazilian Ministry of Health protocols. Cytokines and chemokines CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-4 and IL-17A were measured in patients' plasma samples by CBA (Cytometric Bead Array). A total of 186 patients was evaluated, mostly male individuals (82.3%), who come from rural areas (87.1%), with an average age of 35 years. Most patients (83.8%) were admitted to the hospital within 6 hours of the bite occurring, 26 (14%) patients reported having suffered a previous snakebite and 97 (52.1%) received between 7 and 9 antivenom ampoules. The frequency of EARs was 16.1% (30), and were mostly mild reactions. Urticaria was the major EAR observed (46.4%). The risk of EARs was not related to demographics, clinical conditions, hematological variables or antivenom dosage. Levels of CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, IL-6, TNF, IL-2, IL-10 and IL-17A at admission were significantly elevated in groups without EARs and with EARs compared to healthy controls and CXCL-8, IL-2, IL-10 showed significantly

lower levels in patients who progressed to EARs. On admission, few weak correlations between cytokines were observed in patients evolving with EARs. Adverse reactions were generally of mild intensity after *Bothrops* antivenom therapy. Lower levels of CXCL-8, IL-2, IL-10 predicted the onset of EARs in this study.

Keywords: Snakebite; *Bothrops*; Antivenom; Adverse reaction; Interleukin 10; Cytokine.

1. INTRODUCTION

Snakebites are a neglected public health problem in countries with tropical and subtropical regions and cause high rates of morbidity and mortality (1–3). Globally, it is estimated that occur up to 5,500,000 cases of snakebites, 1,841,000 poisonings (2), 138,000 deaths and leave about 400,000 individuals are permanently disabled annually (4). In Brazil, in 2019 alone, 30,703 cases of snakebite were reported to The National Disease Information Notification System, and in the state of Amazonas 2,053 cases were notified in the same period (5). In the Brazilian Amazon, snakes of the genus *Bothrops*, especially *B. atrox*, are involved in about 90% of cases of snakebite (6–9).

The venom from snakes of the genus *Bothrops* consists of a mixture of toxins that induce a variety of signs and symptoms in patients (10–12). Among the most important components of the venom are the metalloproteinases (MPs) classes P-I, P-II and P-III, phospholipases A2 (PLA2), serine proteases (SPs), type C lectin (CLEC) and L-amino acid oxidases (LAAO) (13–20). Local and systemic manifestations occur due à ação dessas toxinas and the release of inflammatory mediators (21–26). Envenomations caused by *B. atrox* normally trigger an intense acute inflammatory response (27) with pain, edema, flushing, bleeding, bruising and the formation of flictenas at the site of the bite (27,28). Systemic manifestations include headache, nausea, vomiting, spontaneous bleeding and more rarely disseminated intravascular shock (29,30).

For more than a century, antivenoms obtained by hyperimmunization of animals (mainly horses) have been used effectively for the treatment of envenomations (31,32). However, because it is a heterologous serum, early and late adverse reactions may be triggered. Early reactions involve anaphylactic reactions and late reactions refer to serum sickness (21,33–38). Worldwide, the incidence of early anaphylactic reactions to antivenom occurs at a varying rate, depending on the antivenom used and the characteristics of the patients. In Brazil, more recent studies report a rate of incidence of early adverse reactions of between 18 and 25% (39,40).

Previously, analyzes have shown that the inflammatory process in *Bothrops* snakebite can be intensified by the action of cytokines and chemokines such as CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, TNF- α and IFN- γ (41–49). Few studies have evaluated the release of these mediators in cases of adverse reactions in response to antivenom, although an increase in cytokines has been observed in anaphylaxis not caused by antivenom (35,50–52). A study showed that levels of IL-6 and IL-10 decreased in mild EARs and increased in severe EARs in patients after exposure to antivenom in Sri Lanka (53).

Due to the occurrence of adverse reactions, the use of premedication is carried out in several countries. The commonly used drugs are antihistamines H1-blockers, corticosteroids and, more rarely, adrenaline (54). Currently, the use of premedication in clinical practice is under question due to low or controversial efficacy (55). For the treatment of these reactions, adrenaline, corticosteroids and antihistamines H1-blockers are the medications used (21,56).

The use of pharmacovigilance to assess the incidence of adverse readings is essential so that the incidence of the readings and their risk factors can be considered. The objectives of this study are to estimate the prevalence of early adverse reactions (EARs) of *Bothrops* antivenom therapy in a tertiary unit in the

Brazilian Amazon, and determine whether the EARs can be predicted by a characteristic profile of cytokine and chemokine in plasma samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study site and patients

This is the follow-up of a cohort of patients treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), between August 2014 and August 2016. The FMT-HVD is a reference Center for the management of snakebites in the Brazilian Amazon.

The patients included in the study had been diagnosed with a snakebite caused by a *Bothrops* snake. As a non-inclusion criterion, patients who received antivenom therapy in another hospital unit were not included. The clinical criterion for envenomation complied with the protocol of the Brazilian Ministry of Health (21) and the accidents were classified as mild, moderate and severe. Mild accidents are the most common, and are characterized by pain and local edema, though not intense or otherwise absent, mild or absent hemorrhagic manifestations, with or without change in coagulation time (CT) and use of 2 to 4 ampoules of antivenom; moderate accidents are characterized by pain and edema evident beyond the anatomical segment of the bite, accompanied or not by local or systemic hemorrhagic changes such as gingivorrhagia, epistaxis and hematuria with use of 4 to 8 ampoules of antivenom; severe accidents are characterized by intense and extensive local edema, which can reach the entire limb with severe pain, and may present blisters with the recommendation of administration of 12 ampoules of antivenom.

The administration of the antivenom occurred 30 min after the use of the following premedication in all study patients: hydrocortisone (500mg) IV, cimetidine (300mg) IV and Dexchlorfeniramine (5mg) VO. Patients received the same type of liquid antivenom, which was given according to the number of ampoules

recommended in the established clinical classification and diluted to 100ml of 0.9% IV saline for 30 to 45 minutes. The antivenom is presented in solution for injection and diluted directly in the saline bottle.

In each ampoule, the antivenom used contains 10 mL of injectable solution of fraction F(ab')₂ of purified specific immunoglobulins obtained from plasma of hyperimmunized equines with a mixture of snake venoms from the following *Bothrops* genera: 50% *B. jararaca*, 12.5% *B. alternatus*, 12.5% *B. jararacuçu*, 12.5% *B. moojeni* and 12.5% *B. neuwedi* (57).

2.2 Sample size calculation

The sample was calculated by means of an expected frequency of adverse reaction identified in a study in the Amazon region with the same antivenom of 23.5% (58), at an 80% power and 5% of significance level. The minimum of 186 individuals was necessary.

2.3 Safety endpoints

Primary safety outcome was defined as the presence of signs and symptoms of EARs of antivenom therapy represented by urticaria, asthma-like crisis, laryngeal edema and shock, shortly after infusion up until the first 24 hours after treatment. Early reactions were treated with intramuscular or subcutaneous adrenaline (1:1000, 0.3–0.5 mL), which was repeated after 10 minutes, if necessary. After the reaction symptoms had subsided, AV therapy was restarted.

The secondary safety outcome was defined as the presence of late adverse events, namely fever, urticarial, arthralgia, adenomegaly, neurological and renal complications, until D24 (day 24). After D24, patients were advised to return to the hospital or to contact the study physician by phone in case of any signs of complications appeared. In case of late reactions, treatment consisted of analgesics, anti-histamines and corticotherapy.

2.4 Definition of Adverse Reaction

Adverse reactions are defined as symptoms or signs initiated by exposure to a drug at a dose normally tolerated by non-hypersensitive people which may be immunoglobulin E-mediated (IgE) or non-IgE-mediated hypersensitivity reactions (59).

For this study, EARs were considered those that arose from the moment the *Bothrops* antivenom was administered and up to two hours after administration, and late reactions were those that arose between 5 to 24 days after administration of antivenom, according to guidelines of the Brazilian Ministry of Health (21).

Adverse reactions were classified according to the degree severity of immediate hypersensitivity of World Allergy Organization (WAO) in Grade I) skin signs: generalized erythema, urticaria, angioedema; Grade II) measurable symptoms, but not life-threatening; skin signs, hypotension, tachycardia; respiratory disorders: cough, difficulty breathing; Grade III) life-threatening symptoms: collapse, tachycardia, bradycardia, arrhythmias, bronchospasm; Grade IV) cardiac and/or respiratory arrest and Grade III) (V) death (60).

All participants were followed up by the health team in the first two hours after the administration of the antivenom. In cases in which subjects had any sign or symptom suggestive of adverse reactions at any grade of classification, antivenom therapy was discontinued and treatment with glucocorticoids and adrenaline was employed. After cessation of signs and symptoms, antivenom was reintroduced until complete administration. All patients who had any adverse reaction were able to complete the full administration of the antivenom without other early or late complications.

2.5 Clinical and Laboratory Parameters

Data collection included socio-epidemiological variables (gender, age, area of origin, occupation, zone of occurrence, work-related or non-occupational accident, date and time of the accident, member affected by the accident, time elapsed between the bite and care, history of previous accident and identification of the gender of the snake causing the accident); clinical data (classification and their number of ampoules of *Bothrops* antivenom, presence of adverse reactions, local and systemic manifestations) and laboratory data (whole blood count, biochemistry and inflammatory cytokines and chemokine). The collection of material for laboratory tests was performed before the antivenom therapy (T0) and 24 hours after the antivenom therapy (T1) and processed immediately after the collection. Patients were constantly monitored for signs and symptoms of adverse reactions within the first hour and every hour up to 2 hours after administration of the antivenom was completed, and evaluated after the end of the first 24 hours. The evaluation consisted of checking blood pressure and temperature, as well as investigating skin signs such as pruritus and respiratory signs such as any kind of respiratory difficulty.

At the time of hospital discharge, patients were instructed to return to FMT-HVD if they presented characteristic signs of late adverse reactions during the following 24 days.

2.6 Dosage of Cytokines and Chemokines

The dosage of cytokines and chemokines in the plasma samples of the patients was performed by the flow cytometry technique CBA (Cytometric bead Array) with the BDTM Kit CBA Human Chemokine (Cat. No. 552990, Lot: 7198865, brand BD ® Biosciences, San Diego, CA, USA) and Kit BDTM CBA human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Cat. 560484, Lot: 6078753, brand BD ® Biosciences, San Diego, CA, USA) following the guidelines described by the manufacturer. The quantified molecules were CXCL-8 (IL-8), CCL-5 (RANTES), CXCL-9 (MIG), CCL-2 (MCP-1), CXCL-10 (IP-10), IL-6, AND TNF - (Tumor Necrosis Factor), IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-4 and IL-17A. The acquisition of the samples was carried out

with the Cytometry-Flow FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA), at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). The data were obtained in Mean Fluorescence Intensity (MFI) of each molecule with the FCAP-Array™ software (v3).

2.7 Statistical Analysis

Quantitative variables were calculated for frequency and proportions, and qualitative variables were categorized into groups without EARs and with EARs. For the sociodemographic information, the two groups were considered and univariate regression analysis per block was performed individually, considering the value of $p < 0.05$. Gross Odds Ratio (OR) with the respective confidence intervals (CIs) were calculated for all categories. For the laboratory parameters, the continuous values, analyzed with the aid of the T test, were considered and the mean and standard deviation was calculated for both groups. Data normality was performed with the Shapiro-Wilk test and showed a nonparametric distribution. The comparison of the values of cytokine and chemokine levels in plasma at T0 and T1 was made using the Kruskal-Wallis test, with the Dunn post-test for multiple comparisons. Correlations between circulating cytokine and chemokine levels were made with Spearman's correlation test, and molecule networks were built with Cytoscape Consortium software San Diego, CA, USA (v3.7.2). The correlation coefficient was interpreted according to previous studies (47,61,62) as being strong ($R \geq 0.68$), moderate ($0.36 \leq R < 0.68$) and weak correlation ($R \leq 0.35$). The analysis was performed with the STATA statistical package (V15. 1) and the GraphPad Prism Software (v6.0).

2.8 Ethical approval

This study was approved by the Research Ethics Committee of the University of the state of Amazonas (Approval 492.892/2014). The adult patients signed the Informed Consent Form (ICF) after the study was explained to them. Parents or guardians signed the consent of patients under the age of 18.

3. RESULTS

3.1 Patient characteristics

We evaluated 186 patients with a diagnosis of *B. atrox* snakebite. Diagnostic confirmation was performed by enzyme immunoassay in all patients. The majority of patients were male (82.3%), from rural areas (87.1%) and aged between 16 and 60 years (75.3%) and an average of 35.0 years. The lower limbs were more often affected (84.4%), more than half (83.8%) of the patients were treated between 0 and 6 hours after the accident, 14.0% (26) reported having suffered a previous snakebite, 47.3% (88) were classified as moderate cases and the majority (52.1%) received between 7 and 9 ampoules of *Bothrops* antivenom (Table 1).

3.2 EAR incidence and risk factors

Table 1: Sociodemographic characteristics of patients without EARs and with EARs after *Bothrops* snakebite.

Characteristics	Total	Without EARs n (%)	With EARs n (%)	Gross OR	<i>p</i>
Gender					
Female	33 (17.7)	30 (19.2)	3 (10.0)	1	...
Male	153 (82.3)	126 (80.8)	27 (90.0)	2.14 (0.60-7.53)	0.235
Zone of Occurrence					
Urban	24 (12.9)	23 (14.7)	1 (3.3)	1	...
Rural	162 (87.1)	133 (85.3)	29 (96.7)	5.01 (0.65-38.64)	0.122
Age Group					
1-15	27 (15.5)	24 (15.4)	03 (10.0)	1	...
16-60	140 (75.3)	118 (75.6)	22 (73.3)	1.4 (0.41-5.38)	0.542
> 60	19 (10.2)	14 (9.0)	05 (16.7)	2.85 (0.59-13.81)	0.192
Location of bite					
Upper limbs	29 (15.6)	25 (16.0)	04 (13.3)	1	...
Lower limbs	157 (84.4)	131 (84.0)	26 (86.7)	1.24 (0.39-3.86)	0.710
Time until care received					
≤ 6	156 (83.8)	131 (84.0)	25 (83.3)	1	...

> 6	30 (16.2)	25 (16.0)	5 (16.7)	1.04 (0.36-2.99)	0.930
Previous bite					
Yes	26 (14.0)	20 (12.8)	6 (20.0)	1.70 (0.61-4.66)	0.303
No	160 (86.0)	136 (87.2)	24 (80.0)	1	...
Classification of the accident					
Mild	80 (43.0)	68 (43.6)	12 (40.0)	1	...
Moderate	88 (47.3)	73 (46.8)	15 (50.0)	1.16 (0.50-2.66)	0.719
Severe	18 (9.7)	15 (9.6)	3 (10.0)	1.13 (0.28-4.51)	0.859
Number of ampoules administered					
4-6	57 (30.7)	47 (30.1)	11 (36.7)	1	...
7-9	97 (52.1)	81 (51.9)	16 (53.3)	0.92 (0.38-2.21)	0.867
> 9	32 (17.2)	28 (18.0)	03 (10.0)	0.67 (0.19-2.34)	0.532

Of the 186 patients evaluated in the study, 30 (16.1%) developed EARs to *Bothrops* antivenom and no patients had late reactions. Among the clinical symptoms presented by the reactions, pruritus/urticaria was highlighted with 46.4% (Table 2). In addition, among the 30 patients, 10.0% (03) and 13.3% (04) had nausea and vomiting, respectively.

Table 2: Frequency of EARs in patients admitted to the hospital after *Bothrops* snakebite.

Signs and symptoms	n	%
Grade I		
Facial flushing	01	3.6
Pruritus / urticaria	13	46.4
Angioedema	01	3.6
Grade II		
Dyspnea	03	10.7
Tachycardia	02	7.1
Hoarseness	03	10.7
Laryngeal irritation	03	10.7
Grade III		
Anaphylactic reaction	01	3.6
Bronchospasm	01	3.6

Laboratory tests performed 24 hours after administration of antivenom therapy (T1) showed values within normal parameters, with the exception of leukocytes

in both groups and none of them revealed an association with the presence of EARs (Table 3).

Table 3: Laboratory results of patients without EARs and with EARs admitted to the hospital after *Bothrops* snakebite.

Laboratory tests	Without EARs	With EARs	Total	p
	(n = 156)	(n = 30)		
Mean (\pm DP)				
Eosinophils (%)	1.99 (\pm 1.81)	2.36 (\pm 1.84)	2.05 (\pm 1.82)	0.341
Lymphocytes (%)	19.2 (\pm 6.93)	20.08 (\pm 7.14)	19.27 (\pm 6.95)	0.511
Leukocytes (mil/mm ³)	11.47 (\pm 3.78)	11.93 (\pm 3.50)	11.54 (\pm 3,73)	0.535
Basophils (%)	0.05 (\pm 0.22)	0.03 (\pm 0.18)	0.05 (\pm 0.21)	0.642
Monocytes (%)	5.17 (\pm 2.64)	5.57 (\pm 2.85)	5.24 (\pm 2.67)	0.477
Neutrophils (%)	71.52 (\pm 12.8)	71.02 (\pm 7.7)	71.4 (\pm 12.1)	0.846
Band cells (%)	0.51 (\pm 1.59)	0.75 (\pm 1.91)	0.55 (\pm 1.64)	0.496
INR	1.29 (\pm 0.20)	1.22 (\pm 0.30)	1.28 (\pm 0.22)	0.125
Venenemia	54.78 (\pm 50.74)	27.90 (\pm 40.32)	50.87 (\pm 49.95)	0.161

Reference values: eosinophils: 0.0 to 3.0%; lymphocytes: 20.0 to 51.1%; leukocytes: 4,000 to 10,800/mm³; basophil: 0.0 to 3.0%; monocytes: 1.70 to 9.30%; neutrophils: 40.0 to 70.0%; Band cells: 1 to 5%. INR (International Standardized Ratio): 0.8 to 1.0.

All reactions occurred within 60 minutes after antivenom administration, the earliest with 1 minute and mean time of 17.7 minutes. In the analysis, none of the sociodemographic and clinical variables showed a significant association with the presence of EARs in these patients.

3.3 Cytokine and chemokine levels on admission and EARs

The levels of the CXCL-9, IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IL-4 and IL-17 immune molecules were higher in the groups without EARs and with EARs when compared to the control group at T0 (Figure 1). The levels of CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, IL-6, TNF, IL-2, IL-10 and IL-17A were significantly elevated in both groups (EAR - and EAR +). In the comparison between groups, only the chemokine CXCL-8 and the cytokines IL-2 and IL-10 showed significantly decreased values in the group with EARs. Decreased concentrations of

chemokines CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2 and CXCL-10 were observed in the group with EARs, although without significance.

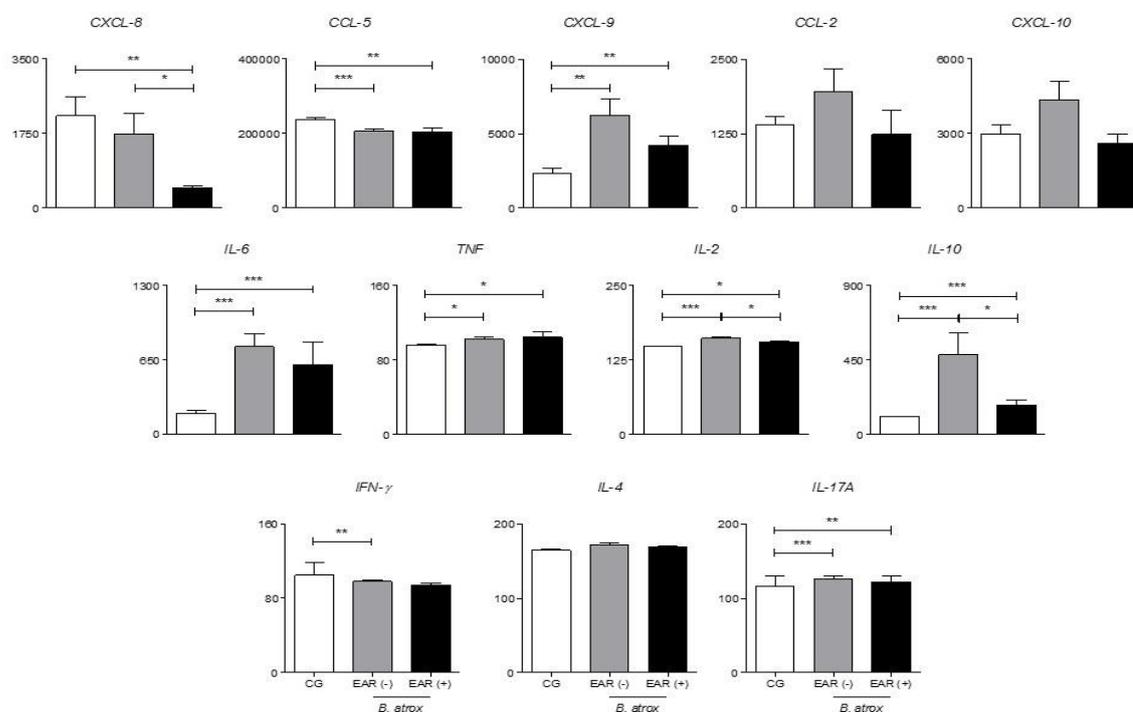


Figure 8: Patients with EARs to *Bothrops* antivenom had different levels of immune molecules compared to those without EARs and the control group at T0. Significant differences were presented in $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.0001$ (***). Quantification of the levels of molecules performed by CBA. The graphs show the mean and standard deviation of each molecule in the two groups, expressed in MFI. Values based on the Kruskal-Willis test.

3.3 Biomarker networks in patients at admission and EARs

The analysis of the data showed that patients without EARs and with EARs have an interaction of immune molecules different from the control group (Figure 2). Correlations in T0 in the group without EARs show an acute inflammatory response occurring with weak, moderate and strong interactions between inflammatory chemokines and cytokines, regulated by IL-10. In addition, correlations in this group demonstrate a high chemotactic process, with many weak, moderate and strong interactions occurring between chemokines. In the group with EARs, a different interaction of immune molecules was observed, with a range of negative correlations occurring between chemokines and cytokines, in

addition to the actuation of a mixed profile of molecules, with the response of Th1, Th2 and Th17 profiles. In addition, in this group, there was little interaction of IL-10, possibly due to a major inflammatory event.

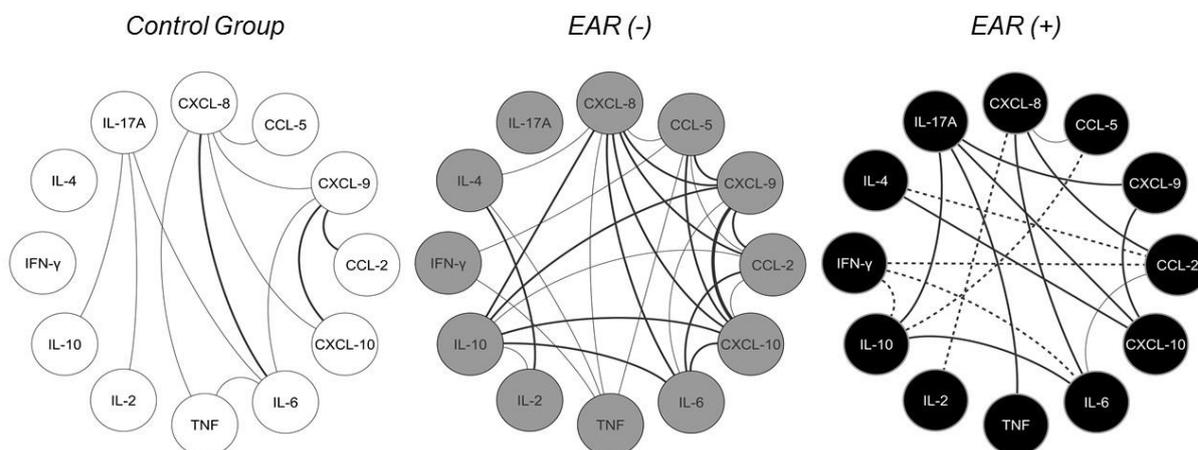


Figure 9: The networks show interaction of molecules occurring in patients without adverse reactions and with adverse reactions at T0. The correlation index (r) was used to divide the correlations by category according to strength into strong ($R \geq 0.68$), moderate ($R \geq 0.36$ to $R \leq 0.67$) and weak ($R \leq 0.35$). Dashed lines show negative correlations and continuous lines, indicate positive correlations, while line thickness shows the strength of the correlation. Thin lines indicate weak correlation, medium lines show moderate correlation and thick lines, strong correlation.

3.4 Cytokine and chemokine changes after antivenom therapy

Analysis of patients' molecule levels showed decreased chemokines CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10 and IL-17A and cytokines IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ and IL-4 in the group with EARs, when compared with the group without EARs in T0 and T1 (Figure 3). Significant decreases were observed in circulating levels of chemokines and cytokines CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, IL-17A and IL-10 between the two times in the group without EAR. In addition, only the chemokines CXCL-9 and CXCL-10 showed a significant decrease in T1 in the group with EAR compared to T0. In T1, there was a decrease in the levels of CCL-5, CXCL-9, CXCL-10, TNF and IL-10 in the group with EARs, when compared to T0.

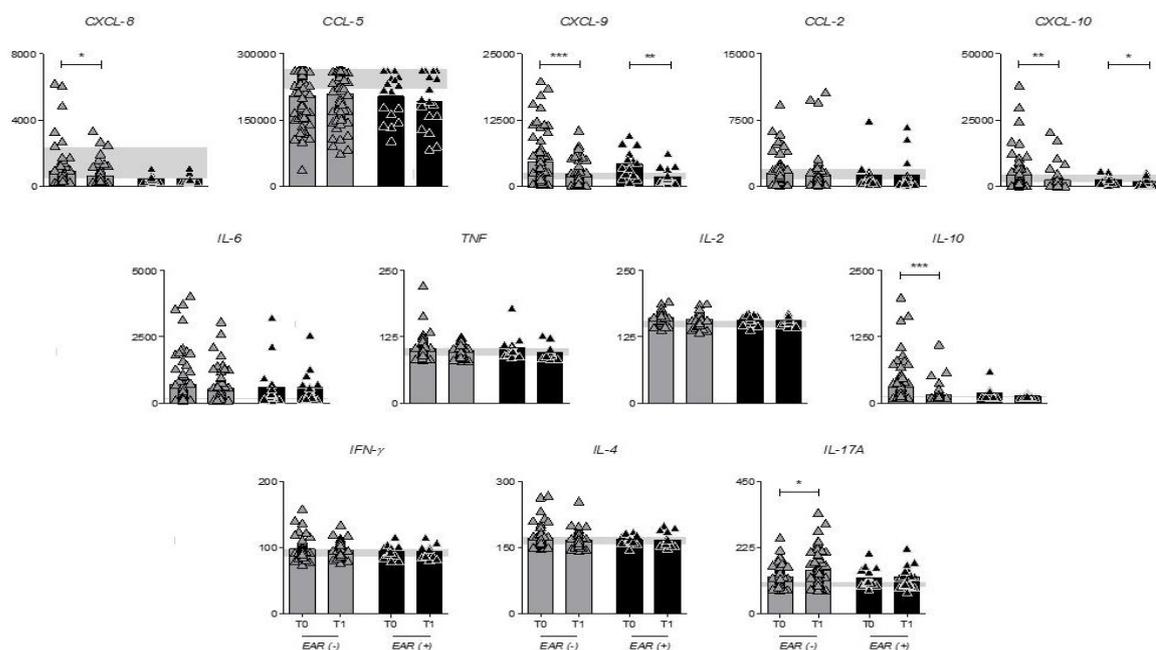


Figure 10: The levels of immune molecules were different in patients with EARs to *Bothrops* antivenom compared to patients without EARs at T0 and T1. Significant differences were presented in $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.0001$ (***). Quantification of the levels of molecules performed by CBA. The graphs show the mean and standard deviation of each molecule in the groups without EARs and with EARs at T0 and T1, expressed in MFI. Values based on the Kruskal-Willis test.

4. DISCUSSION

The occurrence of adverse reactions to the use of antivenoms is common in clinical practice and has a rate ranging from 3% to 88% in clinical studies (63,64). This large variation in the prevalence rates of adverse reactions to antivenom is due to the different forms of antivenom production, speed and amount of antivenom administered and the specific characteristics of snake venom and the study population (36).

In this study, we observed a rate of 16.1% of early adverse reactions to antivenom. Clinical trials have shown values of approximately 18% and 25% (39,40). IgE-mediated anaphylactic reactions occur by prior contact of the individual with any component of the antivenom, where mast cells are sensitized

and in the second contact, IgEs induce their degranulation, releasing pharmacological mediators (65–67). Anaphylactic reactions not mediated by IgE, occur due to the production of anaphylotoxins (C3a, C4a and C5a), derived from the cleavage of serum proteins of the C3, C4 and C5 complement system (68). Activation of the classical complement system pathway is possibly the main mechanism for the production of anaphylotoxins in cases of the use of antivenom (65,67). These make up the majority of EARs caused by antivenoms (67).

Contrary to this knowledge, it was shown that plasma levels of anaphylotoxins remained stable or decreased in patients stung by *Daboia russelii* after the use of antivenom therapy (53). It was not possible to quantify the IgEs and anaphylotoxins present in patients' plasma, which was one limitation of this study.

Pruritus/urticaria and vomiting were the most observed EARs in this study with 46.4% and 13.3%, respectively, similar to previous studies with *Bothrops* antivenom (39,58,69). All patients were treated with corticosteroids or adrenaline as recommended by the Brazilian Ministry of Health guidelines (21). For the prevention of reactions, in this study, the drugs used in premedication were antihistamines and corticosteroids. Clinical studies have been conducted in order to evaluate the effectiveness of premedication in the prevention of adverse reactions to antivenoms of heterologous origin and have not found any protective effect in the use of antihistamines and glucocorticoids (35,40,70,71). However, other studies have demonstrated the effectiveness of adrenaline when applied subcutaneously, immediately prior to antivenom therapy, and indicated that this method significantly reduces the incidence of early reactions (35,55,72,73). Studies have not yet been conducted to test adrenaline in the prevention of adverse reactions to *Bothrops* antivenom, however this evidence shows that this drug could be a good tool for preventing EARs to antivenom in those patients with no history of heart disease.

There was no significant association between sociodemographic variables and the presence of EARs in our study. In these variables, the majority of males from

rural areas with economically active age predominated, the lower limbs being the most affected by the bite, similar to previous studies conducted in the Brazilian Amazon (8,47,58). This finding may be related to the greater exposure of these individuals to work and leisure activities (8).

Laboratory tests performed at T1 showed normal values, with only a slight increase in the levels of leukocytes in both groups. This may be associated with both the inflammatory effect caused by the action of the venom (74) and the classical inflammatory action triggered in hypersensitivity reactions (65). An analysis of the action of metalloproteinases and phospholipases of *B. atrox*, showed that within 24 hours after inoculation of the venom, inflammatory infiltration is mediated mainly by neutrophils and monocytes/macrophages.

An early increase in IL-6 and TNF- α after intraperitoneal injection of venoms from *B. asper* and *B. jararaca* has already been demonstrated in a mouse study (75), which corroborates our findings. This increase may be linked to acute phase protein synthesis, mediated by IL-6.

Plasma levels of cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased significantly after administration of antivenin in patients without adverse reactions in envenomations caused by *Echis carinatus sochureki* in Iran (76). However, we showed that the levels of these cytokines remained stable after administration of *Bothrops* antivenom even in those patients with EARs.

Our results show high levels of molecules such as CXCL-9, TNF and IL-6. We suggest that due to this increase, there is the induction of a polarization of macrophages to the M1 profile by these molecules to act on the inflammatory process, since the EARs occurred immediately after the administration of antivenom. It is known that cytokines and chemokines such as CXCL-9, TNF and IL-6, among others, are inducers of macrophage polarization for the M1 profile (77–80).

Our study shows high levels of IL-10 in both groups compared to control and significantly decreased levels in the group with EARs compared to the group without EARs. It is known that IL-10 plays an important role, regulating several aspects in immunological and inflammatory responses (81–83) and possibly also performs this function in *Bothrops* envenomations. IL-10 via Th1 cells inhibits the production of IL – 1 and CXCL-8 (84) and their increased levels were correlated to decreased levels of IFN- γ (75) in envenomations by *B. asper*. In addition, IL-10 demonstrated a protective effect in experimental studies (85,86). Thus, we suggest that by playing the modulating role, IL-10 can exert a protective effect on the acute reaction induced by the venom, however, its low concentrations juntamente com níveis diminuídos de IL-2 e CXCL-8 in patients who evolved to EARs, decreased this effect, contributing to the appearance of EARs in our study.

Given that we suggest that increased levels of IL-10, IL-2 and CXCL-8 could have a protective effect against the absence of EAR in these patients, perhaps these cytokines / chemokines help directly by inhibiting mast cell and basophil degranulation, or by acting indirectly modulating the immune response. Since IL-10 inhibited the release of histamine by activated human mast cells (87). In addition, low doses of IL-2 have been shown to modify the local balance by modulating Th1/Th2 responses and decreasing the degranulation of basophils and mast cells in an experimental model (88).

Although it is suggested that the predominant profile of immunological molecules in *Bothrops* envenomations is Th1 type (44,45), network analysis demonstrated a plurality in the immune response in both groups and mixed performance of Th1, Th2 and Th17 profile molecules in the group with EARs. A mouse study showed that the inflammatory effect caused by the venom of *B. erythromelas* expressed a variety of cytokines including TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 (46), which also corroborates with an analysis that showed that the venom of this genus induces a response of types Th1/Th2 (89). Notably, this explains the interaction of molecules in the two groups.

In an *in vitro* model, increased production of CCL-2, CCL-5 and CXCL-8 was observed in cells exposed to the venom of *B. lanceolatus* (48). This would explain the acute inflammatory reaction by migration of neutrophils, monocytes and leukocytes induced by these chemokines. However, our study showed that there was a decrease in CCL-5, CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 and CXCL-10 in the group with EARs. On the other hand, the increase in IL-6 and TNF, could explain the signs of hypersensitivity even though this increase was in both groups, since IL-6 is able to increase the production of glucocorticoid and adrenocorticotrophic hormones (45).

This study presents some limitations such as the lack of Immunoglobulin E (IgE) and/or anaphylotoxins dosage, which could confirm the presence of IgE-mediated adverse reactions. In addition, the second collection for laboratory analysis occurred 24 after the administration of antivenom, which may have influenced the decrease in the levels of some molecules, taking into account the half-life of these cells.

5. CONCLUSION

Adverse reactions have been observed in a considerable number of patients suffering from *Bothrops* snakebites at approximately the rate reported in previous studies with *Bothrops* antivenom. The most common symptoms among the reactions were pruritus/urticaria and vomiting. The immune response was different between the groups of patients with interaction of Th2 and Th1 profile molecules in those without EARs, and Th1, Th2 and Th17 profile molecules in those with EARs. There was no significant association of clinical, epidemiological and laboratory factors with the presence of EARs. Finally, although the EARs did not present an association with demographics, clinical condition, hematological variables and dosage of antivenom, lower levels of CXCL-8, IL-2, IL-10 predicted the appearance of EARs in this study and we believe that the immune response profile assumed in cases of EARs to antivenom is different from snakebites without EARs and this may be a tool for clinical prognosis.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM; PAPAC and Pró-Estado) for their grants. ML and WMM are grateful to the Brazilian CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for productivity grants.

7. REFERENCES

1. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* 1998;76(5):515–24.
2. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. Winkel K, editor. *PLoS Med.* 2008 Nov 4;5(11):e218.
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim [Internet].* 2017;3:17063. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28905944>
4. Lancet T. Snakebite — emerging from the shadows of neglect. *Lancet.* 2019;393:2175.
5. Brasil. Ministério da Saúde. SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acidente por Animais Peçonhentos [Internet]. 2019. 2020 [cited 2020 Feb 24]. p. 1. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animais>
6. Hui Wen F, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, 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.
7. Nascimento SP. Epidemiological characteristics of snake bites in the state of Roraima, Brazil, 1992-1998. *Cad saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc Nac Saúde Pública.* 2000;16(1):271–6.
8. 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.
9. Feitosa EL, Sampaio VS, Salinas JL, Queiroz AM, Silva IM, Gomes AA, et al. Older age and time to medical assistance are associated with

- severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. *PLoS One*. 2015;10(7):1–15.
10. Cardoso JLC. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes. Savier, editor. São Paulo; 2003. 456–457 p.
 11. Bourguignon S, Paes F, Calheiros E, Juliano M, Aguiar A, Melgarejo A, et al. Bothrops Moojeni Venom Peptides Containing Bradykinin Potentiating Peptides Sequences. *Protein Pept Lett*. 2005;8(1):21–6.
 12. Pierini S V, Warrell DA, de Paulo A, Theakston RDG. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. *Toxicon*. 1996;34(2):225–36.
 13. 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).
 14. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2012;1824(1):164–76.
 15. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82(9–10):841–50.
 16. Gutiérrez JM, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América bioquímica y fisiopatología. In: *Emergências Médicas por Animales Ponzonosos em las Américas*. México, Dicresa; 2011. p. 461–87.
 17. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1–2):146–56.
 18. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45(8):1115–32.
 19. Ogawa T, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ohno M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon*. 2005;45(1):1–14.
 20. Fox JW. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon*. 2013;62(1):75–82.
 21. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de

- diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 1ª. Ministério da Saúde, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2001. 120 p.
22. Francischetti IMB, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimarães JA. Bothrops sp. snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998;119(1):21–9.
 23. Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998;36(11):1529–38.
 24. Castro HC, Fernandes M, Zingali RB. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon*. 1999;37(10):1403–16.
 25. Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*. 2002;40(5):501–9.
 26. França FOS, Malaque CMS. Acidente Botrópico. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes*. 2003. p. 73–86.
 27. 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>
 28. Cardoso JLC, Fan HW, Franca FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. 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*. 1993;315–25.
 29. Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6):475–80.
 30. Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, 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*. 2002;40(8):1107–14.
 31. Bochner R. Paths to the discovery of antivenom serotherapy in France. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2016;22(1):1–7.
 32. Morais V. The most elegant immunological experiment of the XIX century. *Nat Immunol*. 2000;1(2):93–4.
 33. Morais V. Antivenom therapy : efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. 2018;1–7.

34. Heard K, O'Malley GF, Dart RC. Antivenom therapy in the Americas. *Drugs*. 1999;58(1):5–15.
35. Williams DJ, Jensen SD, Nimorakiotakis B, Mu R, Winkel KD. Antivenom use , premedication and early adverse reactions in the management of snake bites in rural Papua New Guinea. *Toxin*. 2007;49(1):780–92.
36. Almeida JSCB, Souza DP de, Rocha CL, Silva SLC. Soroterapia antiveneno : tratamento das reações adversas. *Rev Med Minas Gerais* 2012. 2012;22(Supl 8):40–4.
37. Deshmukh VS, Motghare VM, Gajbhiye D, Sv B, Deshpande R, Pise H, et al. Study on acute adverse drug reactions of antisnake venom in a rural tertiary care hospital. *Asian J Pharm Clin Res*. 2014;7(5):13–5.
38. Sani I, Faruq U. Antisnake Venoms and their Mechanisms of Action: A Review. 2018;4929(May).
39. 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(1):28–42.
40. Fan HW, Marcopito LF, Cardoso JLC, França FOS, Malaque CMS, Ferrari RA, et al. Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for bothrops snake bites. *BMJ*. 1999;318(1):1451–3.
41. Motta YP, Sakate M, Nogueira RMB, Peraçoli MTS, Sangiorgio F, Floriano RS, et al. Quantificação de citocinas no soro e homogenato da pata na intoxicação experimental com veneno de Bothropoides jararaca em ratos Wistar tratados com soroterapia e Mikania glomerata. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2014;66(5):1413–8.
42. Da Silva RJ, Da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm*. 2002;11(4):197–201.
43. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CFP, Fernández CM, Díaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake Bothrops asper. *Mediators Inflamm*. 2002;11(2):121–8.
44. Ávila-Agüero ML, París MM, Hu S, Peterson PK, Gutiérrez JM, Lomonte B, et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr Emerg Care*. 2001;17(6):425–9.
45. Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA, Meira DA. Acute-Phase Reactions, Including Cytokines, in Patients Bitten By Bothrops and Crotalus Snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins*. 1995;1(1):11–22.

46. Luna KPO, Melo CML, Pascoal VPM, Martins-Filho OA, Pereira VRA. Bothrops erythromelas snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. *Int J Interf Cytokine Mediat Res*. 2011;3(1):9–18.
47. 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;10:1–12.
48. Delafontaine M, Villas-Boas IM, Mathieu L, Josset P, Blomet J, Tambourgi D V. Enzymatic and pro-inflammatory activities of Bothrops lanceolatus venom: Relevance for envenomation. *Toxins (Basel)*. 2017;9(8):1–19.
49. Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with Bothrops atrox venom. *Mediators Inflamm*. 1998;7(5):339–46.
50. Zeng F, Chen C, Liu M. Allergic reactions to antivenom in a patient bitten twice by the same snake within a month : A rare case report and literature review. *Chinese J Traumatol [Internet]*. 2017;20(5):299–302. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2016.12.004>
51. Zeng FJ, Chen C, Liu MH. Allergic reactions to antivenom in a patient bitten twice by the same snake within a month: A rare case report and literature review. *Chinese J Traumatol - English Ed [Internet]*. 2017;20(5):299–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjtee.2016.12.004>
52. Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, Holdgate A, Brown SGA. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2009;124(4):786-792.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.055>
53. Stone SF, Isbister GK, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, Karunathilake H, et al. Immune Response to Snake Envenoming and Treatment with Antivenom ; Complement Activation , Cytokine Production and Mast Cell Degranulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):1–9.
54. de Silva HA, Pathmeswaran A, Ranasinha CD, Jayamanne S, Samarakoon SB, Hittharage A, et al. Low-dose adrenaline, promethazine, and hydrocortisone in the prevention of acute adverse reactions to antivenom following snakebite: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med*. 2011;8(5).
55. Silva HA De, Ryan NM, Silva HJ De. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;81(3):446–452 /.
56. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4th ed. Ministério da Saúde, editor.

- Brasília – DF; 2001. 316 p.
57. Instituto Butantan. Soro antiofídico. São Paulo; 0–6 p.
 58. Mendonça-da-Silva I, Magela Tavares A, Sachett J, Sardinha JF, Zapparoli L, Gomes Santos MF, et al. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):1–21.
 59. World Allergy Organization. Drug Allergies [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 27]. Available from: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/drug-allergies>
 60. World Allergy Organization. Perioperative Allergic Reactions [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 27]. Available from: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/allergy-to-anesthetic-agents>
 61. De Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, Da Costa AG, Pimentel JPD, Pires EF, et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: A proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10 Microbe-host interactions and microbial pathogenicity. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0610-6>
 62. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr*. 1990;6(1):35–9.
 63. Thiansookon A, Rojnuckarin P. Low incidence of early reactions to horse-derived F(ab')₂ antivenom for snakebites in Thailand. *Acta Trop*. 2008;105(2):203–5.
 64. Amin M, Mamun S, Rashid R, Rahman M, Ghose A, Sharmin S, et al. Anti-snake venom: use and adverse reaction in a snake bite study clinic in Bangladesh. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008;14(4):660–72.
 65. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8th ed. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2015. 1262 p.
 66. Cruce JM, Lewis RE. Types I, II, III, and IV Hypersensitivity. In: *Atlas of Immunology*. 2nd ed. 1999. p. 225–6.
 67. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon* [Internet]. 2013;76:63–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010>

68. Morais VM, Massaldi H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2009;15(1):2–18.
69. Silva IM da, Tavares AM. Comparative evaluation of adverse effects in the use of powder trivalent antivenom and liquid antivenoms in *Bothrops* snake bites. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(4):523–5.
70. Bucarechi F, Douglas JL, Fonseca MRCC, Zambrone FAD, Vieira RJ. Envenenamento ofídico em crianças: frequência de reações precoces ao antiveneno em pacientes que receberam pré-tratamento com antagonistas H1 e H2 da histamina e hidrocortisona. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994;36(5):451–7.
71. Kularatne SAM, Weerakoon K, Silva A, Maduwage K, Walathara C, Rathnayake I, et al. Efficacy of intravenous hydrocortisone administered 2–4 h prior to antivenom as prophylaxis against adverse drug reactions to snake antivenom in Sri Lanka: An open labelled randomized controlled trial. *Toxicon.* 2016;120:159–65.
72. Premawardhena AP, De Silva CE, Fonseka MMD, Gunatilake SB, De Silva HJ. Low dose subcutaneous adrenaline to prevent acute adverse reactions to antivenom serum in people bitten by snakes: Randomised, placebo controlled trial. *Br Med J.* 1999;318(7190):1041–3.
73. Isbister GK, Brown SG, Macdonald E, White J, Currie BJ. Current use of Australian snake antivenoms and frequency of immediate-type hypersensitivity reactions and anaphylaxis. *MJA.* 2008;188(8):473–6.
74. Oliveira SS de, Sampaio V de S, Sachett J de AG, Alves EC, Silva VC da, Lima JAA de, et al. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. In: *Clinical Toxicology.* 2017. p. 1–22.
75. Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi D V., Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon.* 2000;38(9):1253–66.
76. Monzavi SM, Afshari R, Khoshdel AR, Mahmoudi M, Salarian AA, Samieimanesh F, et al. Analysis of effectiveness of Iranian snake antivenom on *Viper* venom induced effects including analysis of immunologic biomarkers in the *Echis carinatus sochureki* envenomed victims. *Toxicon* [Internet]. 2019;158:38–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.293>
77. Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: In vivo veritas. *Blood.* 2006;108(2):408–9.
78. Hume DA. The many alternative faces of macrophage activation. *Front Immunol.* 2015;6(JUL):1–10.

79. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin V V., Orekhov AN, Bobryshev Y V. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology* [Internet]. 2018;223(1):101–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.005>
80. Saha S, Shalova IN, Biswas SK. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol Rev*. 2017;280(1):102–11.
81. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147(1):3815–22.
82. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991;146(10):3444–51.
83. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*. 1991;174(6):1549–55.
84. Moore KW, O'Garra A, Malefyt RDW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11(1):165–90.
85. Van der Pool T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh C V, Lazarus DD, et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*. 1995;155(11):5397–401.
86. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med*. 1993;177(4):1205–8.
87. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(5):694–704.
88. Bonnet B, Vigneron J, Levacher B, Vazquez T, Pitoiset F, Brimaud F, et al. Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Food Allergy. *J Immunol*. 2016;197(1):188–98.
89. Farsky SHP, Gonçalves LRC, Gutiérrez JM, Correa AP, Rucavado A, Gasque P, et al. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. *Mediators Inflamm*. 2000;9(5):213–21.

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Este estudo apresenta algumas limitações como a falta de dosagem de Imunoglobulina E (IgE) e/ou de anafilotoxinas, o que poderia confirmar a presença de reações adversas mediados por IgE. Além disso, a segunda coleta para análise laboratorial ocorreu 24 após a administração do antiveneno, o que pode ter influenciado na diminuição dos níveis de algumas moléculas, levando em consideração a meia vida dessas células.

Como perspectivas futuras, podem ser destacados a melhoria no refinamento das formas de produção do soro, o uso do ácido caprílico tem sido uma boa estratégia e de baixo custo para a diminuição dessas reações (165–170). O uso de anticorpos monoclonais para a neutralização de algumas proteínas também tem se mostrado eficaz (171,172). No entanto, um desafio a ser vencido nesse âmbito é o desenvolvimento de anticorpos capazes de neutralizar pelo menos a maioria das proteínas presentes no veneno.

Além disso, a adrenalina subcutânea (epinefrina) reduziu significativamente a incidência de reações adversas precoces em estudos clínicos (124,130,161,173). Ainda não foram realizados estudos para testar a adrenalina na prevenção de reações adversas ao soro antitóxico, no entanto essas evidências mostram que esta droga poderia ser uma boa ferramenta para prevenir reações precoces ao antiveneno naqueles pacientes sem histórico de cardiopatias.

5 CONCLUSÃO

Apesar do longo tempo de uso do antiveneno de origem heteróloga, este ainda se constitui como o único tratamento eficaz para envenenamentos causados por serpentes. A taxa de reações adversas resultantes da aplicação desse tratamento é variada nas regiões, isso possivelmente devido a fatores diversos, incluindo também a qualidade no processo de fabricação.

Os sintomas mais comuns entre as reações foram prurido/urticária e vômito. A prevalência de reações adversas ao soro antitropical foi de 16,1% em nosso estudo. A resposta imunológica foi diferente entre os grupos de pacientes com interação de moléculas do perfil Th1 e Th2 nos sem reação adversa, e moléculas do perfil Th1, Th2 e Th7 naqueles com reação adversa.

Não houve associação significativa dos fatores clínico, epidemiológico e laboratorial com a presença de reações adversas. Por fim, apesar de as reações adversas não apresentarem associação com a demografia, condição clínica, variáveis hematológicas e dosagem de antiveneno, níveis mais baixos de CXCL-8, IL-2, IL-10 previram o aparecimento de reações adversas neste estudo e acreditamos que o perfil de resposta imunológica assumidos nos casos de reação adversa ao antiveneno é diferente dos outros acidentes e isso pode ser uma ferramenta para prognóstico clínico

Assim, sugerimos que mais estudos clínicos sejam conduzidos a fim de encontrar novas estratégias para a prevenção dessas reações em pacientes que recebem a soroterapia.

6 REFERÊNCIAS

1. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:17063. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28905944>
2. Oliveira HFA, Barros RM, Pasquino JA, Peixoto LR, Sousa JA, Leite RS. Snakebite cases in the municipalities of the State of Paraíba, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(5):617–24.
3. Oliveira NR, Sousa ACR, Belmino JFB, Furtado SS, Leite RS. The epidemiology of envenomation via snakebite in the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(1):99–104.
4. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. Winkel K, editor. *PLoS Med*. 2008 Nov 4;5(11):e218.
5. Lancet T. Snakebite — emerging from the shadows of neglect. *Lancet*. 2019;393:2175.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Acidentes com Animais Peçonhentos [Internet]. [cited 2019 Apr 21]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>
7. Dourado H V, Burnheim PF, Souza IS, Fonseca-da-Rocha AJ, Santos S. Ofidismo no Amazonas. Poster session presented at: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Manaus; 1988. Fev 28-mar 03.
8. Feitosa ES, Sampaio V, Sachett J, Castro DB, Noronha M das DN, Lozano JLL, 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.
9. Cardoso JLC. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier, editor. São Paulo; 2003. 456–457 p.
10. Carvalho DM. Grandes sistemas nacionais de informação em saúde: Revisão e discussão da situação atual. *Inf epidemiol SUS*. 1997;6(4):7–46.
11. Bochner R, Struchiner CJ. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cad Saude Publica*. 2002;18(3):735–46.

12. Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell DA. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Med.* 2006;3(6):727–31.
13. 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.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VigiMed [Internet]. 2020 [cited 2020 Mar 8]. p. 1. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/>
15. Sinimbú VP. Acidentes ofídicos ocorridos no município de Santarém (PA) no período de 2000-2009. [dissertação]: Universidade Federal do Pará. Santarém (PA). 2012.
16. Albuquerque PLMM, Jacinto CN, Silva Junior GB, Lima JB, Veras MDSB, Daher EF. Lesão renal aguda causada pelo veneno das cobras *Crotalus* e *Bothrops*: Revisão da epidemiologia, das manifestações clínicas e do tratamento. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55(5):295–301.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 1ª. Ministério da Saúde, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2001. 120 p.
18. Campbell JJ, Lamar WW. *The Venomous Reptiles of Latin America.* University CP, editor. New York; 1989. 425 p.
19. Bernarde PS. *Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil.* 1ª. Books A, editor. 2014. 223 p.
20. da Siva AM, 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(esp):51–4.
21. Feitosa EL, Sampaio VS, Salinas JL, Queiroz AM, Da Silva IM, Gomes AA, et al. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. *PLoS One.* 2015;10(7).
22. BORGES CC et al. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(6):637–46.
23. Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, 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.* 2002;40(8):1107–14.

24. Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;30(6):475–80.
25. Oliveira FN, Brito MT, Cristina I, Moraes O De, Maria S, Fook L, et al. Acidente botrópico na Paraíba. 2010;43(6):662–7.
26. Valle LA, Silva D da FR, Magalhães PH, Mattos PA, Leal JA. Bilateral amputation of inferior extremities due to serious *Bothrops* accident: a case report. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med St Casa São Paulo*. 2008;53(2):81–4.
27. Se P, Sachett J, Mota A, Valente SF, Peixoto HM, Lacerda M, et al. Stepping into a dangerous quagmire : Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings , Brazilian Amazon. 2018;0065:1–15.
28. Pierini S V, Warrell DA, de Paulo A, Theakston RDG. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. *Toxicon*. 1996;34(2):225–36.
29. Bourguignon S, Paes F, Calheiros E, Juliano M, Aguiar A, Melgarejo A, et al. *Bothrops* Moojeni Venom Peptides Containing Bradykinin Potentiating Peptides Sequences. *Protein Pept Lett*. 2005;8(1):21–6.
30. Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE, Serrano SMT. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*. 2006;47(6):700–14.
31. Tashima AK, Sanz L, Camargo ACM, Serrano SMT, Calvete JJ. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *J Proteomics*. 2008;71(4):473–85.
32. Rodrigues RS, Boldrini-França J, Fonseca FPP, de la Torre P, Henrique-Silva F, Sanz L, et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *J Proteomics* [Internet]. 2012;75(9):2707–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.028>
33. Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Angulo Y, et al. Snake venomomics of the lesser antillean pit vipers *bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res*. 2008;7(10):4396–408.
34. 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>
35. Calvete JJ, Borges A, Segura Á, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics* [Internet]. 2009;72(2):227–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.005>
 36. Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, et al. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: Perspectives and applications. *Toxicon*. 2009;54(7):938–48.
 37. Alape-Girón A, Sanz L, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ, et al. Snake Venomomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper* : Geographic , Individual , and Ontogenetic Variations research articles. *J Proteome Res*. 2008;7:3556–71.
 38. Durban J, Juárez P, Angulo Y, Lomonte B, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, et al. Profiling the venom gland transcriptomes of costa rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*. 2011;12.
 39. Cidade DAP, Simão TA, Dávila AMR, Wagner G, de L.M. Junqueira-de-Azevedo I, Lee Ho P, et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*. 2006;48(4):437–61.
 40. Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie*. 2004;86(3):211–9.
 41. Neiva M, Arraes FBM, de Souza JV, Rádis-Baptista G, Prieto da Silva ÁRB, Walter MEMT, et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon*. 2009;53(4):427–36.
 42. Cardoso KC, Da Silva MJ, Costa GGL, Torres TT, Del Bem LEV, Vidal RO, et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics* [Internet]. 2010;11(1):605. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/605>
 43. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45(8):1115–32.
 44. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a

- functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* [Internet]. 2013;62:27–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
45. Moura-da-Silva A, Butera D, Tanjoni I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. *Curr Pharm Des*. 2007;13(28):2893–905.
 46. Tu AT. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. Wiley J, editor. New York, USA; 1977.
 47. Tu AT. *Reptile Venoms and Toxins. Handbook of Natural Toxins*. Marcel Dekker, editor. New York; 1991.
 48. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*. 2003;42(4):405–11.
 49. Guércio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa M V., et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci*. 2006;4:1–14.
 50. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo ACM, Serrano SMT. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 2006;47(3):304–12.
 51. Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ. Snake population venomomics: Proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. *J Mol Evol*. 2009;68(2):113–25.
 52. Daltry JC, Wüster W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 1996;379(1):537–540.
 53. Gibbs HL, Mackessy SP. Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. *Toxicon*. 2009;53(6):672–9.
 54. Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wüster W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2009;276(1666):2443–9.
 55. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 Myotoxins from *Bothrops asper* venoms. *Toxicon*. 1995;33(11):1405–24.
 56. Ownby CL. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: *Handbook of Toxicology*. 1990. p. 601–54.
 57. Bragi JON, William JAY. Hemorrhagic metalloproteinases from snake

- venoms.pdf.crdownload. 1994;62:325–72.
58. Rosenfeld G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites, in south América. In: Press A, editor. *Venomous Animals and their Venoms*. New York; 1771. p. 345–841.
 59. Francischetti IMB, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimarães JA. Bothrops sp. snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998;119(1):21–9.
 60. Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998;36(11):1529–38.
 61. Castro HC, Fernandes M, Zingali RB. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon*. 1999;37(10):1403–16.
 62. Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon*. 2002;40(5):501–9.
 63. França FOS, Malaque CMS. Acidente botrópico. In: Sarvier, editor. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo; 2003. p. 73–86.
 64. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MAR. Thrombin-like and factor X-activador components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb and Haemost*. 1979;41(2):314–28.
 65. Silva de Oliveira S, Campos Alves E, dos Santos Santos A, Freitas Nascimento E, Tavares Pereira JP, Mendonça da Silva I, 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://doi.org/10.1080/15563650.2019.1634273>
 66. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. 2009;54(7):976–87.
 67. 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).
 68. 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).
69. Gutiérrez JM, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América bioquímica y fisiopatología. In: Emergências Médicas por Animales Ponzonosos em las Américas. México, Dicresa; 2011. p. 461–87.
 70. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2012;1824(1):164–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>
 71. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82(9–10):841–50.
 72. Minkov P, Georgiev D, Palagacheva N, Dzhuvinov V. Monitoring of spotted wing drosophila in raspberries and blackberries in troyan region, Bulgaria. *Bulg J Agric Sci*. 2018;24(4):670–3.
 73. Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2000;1477(1–2):146–56.
 74. Fox JW. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon* [Internet]. 2013;62:75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.009>
 75. Guo C, Liu S, Yao Y, Zhang Q, Sun MZ. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. *Toxicon* [Internet]. 2012;60(3):302–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.001>
 76. Manley G. Phospholipase A2 Biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23(1):233–6.
 77. Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A2 - A structural review. *Toxicon*. 1996;34(8):827–41.
 78. Kini RM. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003;42(8):827–40.
 79. Chippaux JP. Review Article Snake Venom Variability: Methods of Study. *North*. 1991;(11):1279–303.
 80. Iwanaga S, Suzuki T. Enzymes in snake venom. In: Springer, editor. *Snake Venoms*. Berlin/Heidelberg, Germany; 1979. p. 61–158.

81. Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*. 2002;40(4):143–56.
82. Ouyang C, Huang T. Inhibition of platelet aggregation by 5' - nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon*. 1983;21(4):491–501.
83. Yamazaki Y, Morita T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*. 2004;44(3):227–31.
84. Ogawa T, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ohno M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon*. 2005;45(1):1–14.
85. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RDG. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: Interactions with cells. *Brazilian J Med Biol Res*. 1998;31(7):853–62.
86. Andrade J o G s de. Estudo Bacteriológico De a B S C E S S O S Causados Por Picada De Serpentes Do. 1989;31(6):363–7.
87. Martins BF, Campos APS, Seleglim MR, Ballani TSL, Tavares EO, Oliveira MLF. Accidents Caused by Snakes (*Bothrops* Spp. and *Crotalus* Spp.) in children: Report of Two Cases. *Rev Rene*. 2012;13(3):693–703.
88. Alves EC, De Almeida Gonçalves Sachett J, Sampaio VS, De Brito Sousa JD, De Oliveira SS, Do Nascimento EF, et al. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2018;13(8):1–16.
89. Résière D, Olive C, Kallel H, Cabié A, Névière R, Mégarbane B, et al. Oral Microbiota of the Snake *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10):2122.
90. 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.
91. Hui Wen F, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, 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.
92. Mendonça-da-Silva I, Magela Tavares A, Sachett J, Sardinha JF, Zapparoli L, Gomes Santos MF, et al. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*.

- 2017;11(11):1–21.
93. de Brito Sousa JD, de Oliveira SS, Sachett J, Fan HW, Monteiro WM. Low accuracy of microscopic hematuria in detecting coagulopathy from Bothrops pit viper bites, Brazilian Amazon. *Clin Toxicol*. 2019;0(0):1–3.
 94. Kamiguti AS, Sano-Martins IS. South american snake venoms affecting haemostasis. *Toxin Rev*. 1995;14(3):359–74.
 95. Silva de Oliveira S, Freitas-de-Sousa LA, Alves EC, de Lima Ferreira LC, da Silva IM, de Lacerda MVG, et al. Fatal stroke after Bothrops snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report. *Toxicon*. 2017;138:102–6.
 96. Oliveira SS de, Sampaio V de S, Sachett J de AG, Alves EC, Silva VC da, Lima JAA de, et al. Clinical Toxicology. In: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2017. p. 1–22.
 97. Santos Barreto GNL, de Oliveira SS, dos Anjos IV, 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.
 98. Dias M V. Lacerda Fisiologista. Comemoração do Centenário de Nascimento de João Batista de Lacerda, 1846 – 1915. Museu Nacional, Rio de Janeiro, *Primordia Pharmacologiae in Brasília, Sancti Pauli*, MCMLXVI; 89-123.
 99. Wen FH. Soroterapia. In: Sarvier, editor. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo; 2003. p. 381–93.
 100. Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863-1933: Founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon*. 1999;37(9):1241–58.
 101. INSTITUTO BUTANTAN. Soros e vacinas. In: *Série didática [Internet]*. 2006 [cited 2019 May 27]. p. 44. Available from: <http://butantan.gov.br/soros-e-vacinas>
 102. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Desabastecimento de soros antiofídicos [Internet]. [cited 2019 Jun 30]. Available from: http://s.busca.pr.gov.br/search?q=cache:iOna_N-_6BsJ:www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Nota_Soros_Antivenenos.doc+CPPI&site=saude_collection&client=saude_frontend&output=xml_no_dtd&proxystylesheet=saude_frontend&ie=UTF-8&access=p&oe=UTF-8
 103. Scheske L, Ruitenbergh J, Bissumbhar B. Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. *Int J Heal Policy Manag [Internet]*. 2015;4(7):447–57. Available from:

<http://dx.doi.org/10.15171/ijhpm.2015.75>

104. BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília – DF; 1996. 23491 p.
105. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos.
106. Dosagem biológica do antiveneno botrópico.
107. Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41(5):541–57.
108. World Health Organization. Rabies and envenomings : a neglected public health issue : report of a Consultative Meeting. Who [Internet]. 2007;(January):32. Available from: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf
109. Gutiérrez JM, Burnouf T, Harrison RA, Calvete JJ, Kuch U, Warrell DA, et al. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bull World Health Organ*. 2014;92(7):526–32.
110. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 2010;56(7):1223–35.
111. Farmacopéia ANDVS. Farmacopeia Brasileira. Vol. 1, Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. 2010. 1–523 p.
112. Canter HM, Perez Junior JA, Higashi HG, Guidolin RR. Soros e Vacinas [Internet]. Infobibos. 2008 [cited 2020 May 24]. p. 1. Available from: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/SorosVacinas/Index.htm
113. Leon G, Sanchez L, Hernandez A, Villalta M, Herrera M, Segura A, et al. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2011;10(5):381–98.
114. Hati RN, Mandal M, Hati AK. Active immunization of rabbit with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. *Toxicon*. 1990;28(8):895–902.
115. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. The immune system in health and disease. *Immunobiology*. Gerald Publishing, New York Jerne NK (1955) The natural selection theory of antibody formation. In: *Proc Natl Acad Sci. USA*; 2001. p. 849–57.

116. Minton SA. Neutralization of old world viper venoms by American pit viper antivenin. *Toxicon*. 1976;14(2):146–8.
117. Goldberg RJ. A Theory of Antibody-Antigen Reactions. I. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody2. *J Am Chem Soc*. 1952;74(20):5715–25.
118. Alape A, León G, Gutiérrez JM, Stiles B, Rojas G. Comparative study on the ability of IgG and F(ab')₂ antivenoms to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus nigrocinctus* (coral snake) venom. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;61(2):266–71.
119. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. 2016. 607–619 p.
120. de Silva HA, Pathmeswaran A, Ranasinha CD, Jayamanne S, Samarakoon SB, Hittharage A, et al. Low-dose adrenaline, promethazine, and hydrocortisone in the prevention of acute adverse reactions to antivenom following snakebite: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS Med*. 2011;8(5).
121. Gawarammana IB, Kularatne SA, Dissanayake WP, Kumarasiri RPV, Senanayake N, Ariyasena H. Parallel infusion of hydrocortisone ± chlorpheniramine bolus injection to prevent acute adverse reactions to antivenom for snakebites: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Med J Aust*. 2004;180(1):20–3.
122. Premawardhena AP, de Silva CE, Fonseka MMD, Gunatilake SB, de Silva HJ. Low dose subcutaneous adrenaline to prevent acute adverse reactions to antivenom serum in people bitten by snakes: randomised, placebo controlled trial. *Bmj*. 2011;318(7190):1041–3.
123. Malasit P, Warrell DA, Chanthavanich P, Viravan C, Mongkolsapaya J, Singthong B, et al. Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;292(6512):17–20.
124. Isbister GK, Brown SG, Macdonald E, White J, Currie BJ. Current use of Australian snake antivenoms and frequency of immediate-type hypersensitivity reactions and anaphylaxis. *MJA*. 2008;188(8):473–6.
125. Almeida JSCB, Souza DP de, Rocha CL, Silva SLC. Soroterapia antiveneno : tratamento das reações adversas. *Rev Med Minas Gerais* 2012. 2012;22(Supl 8):40–4.
126. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 187, de novembro de 2017 [Internet]. Diário Oficial - Imprensa Nacional. 2017 [cited 2019 Jun 27]. p. 1–17. Available from:

file:///C:/Users/Frandson/Downloads/U_RS-MS-ANVISA-RDC-187_081117.pdf

127. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon* [Internet]. 2013;76:63–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010>
128. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2015. 1–536 p.
129. Cruce J, Lewis R. Types I, II, III, and IV hypersensitivity. *Atlas Immunol*. 2ª. Press C, editor. 2004.
130. Silva HA De, Ryan NM, Silva HJ De. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;81(3):446–452 /.
131. Morais V. Antivenom therapy : efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. 2018;1–7.
132. World Allergy Organization. Anaphylaxis vs. Anaphylactoid Reactions [Internet]. WAO Ask the Expert. 2018 [cited 2019 Jun 28]. Available from: <https://www.worldallergy.org/ask-the-expert/questions/anaphylaxis-vs-anaphylactoid-reactions>
133. Morais VM, Massaldi H. SNAKE ANTIVENOMS: ADVERSE REACTIONS AND PRODUCTION TECHNOLOGY. 2008;
134. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8th ed. Elsevier, editor. Rio de Janeiro; 2015. 1262 p.
135. Squaiella-Baptistaõ CC, Marcelino JR, Ribeiro Da Cunha LE, Gutiérrez JM, Tambourgi D V. Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab') 2 antivenoms. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(3):574–84.
136. Stone SF, Isbister GK, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, Karunathilake H, et al. Immune Response to Snake Envenoming and Treatment with Antivenom ; Complement Activation , Cytokine Production and Mast Cell Degranulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):1–9.
137. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* [Internet]. 2002;4(8):837–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270731>
138. Diaz A, Higashi HG, Cardoso JL, Murcia M, Garcia LF, Silva-Diaz JF, et al. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for Bothrops snake bites in Uraba, Colombia.

- The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). *Am J Trop Med Hyg.* 2017;58(2):183–9.
139. Villalta M, Sanz L, Lomonte B. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming : State-of-the-Art and. :1–22.
 140. Silverstein AM. Clemens Freiherr von Pirquet: Explaining immune complex disease in 1906. *Nat Am Inc.* 2000;1(6):453–5.
 141. Morais V, Berasain P, Ifrán S, Carreira S, Tortorella MN, Negrín A, et al. Humoral immune responses to venom and antivenom of patients bitten by Bothrops snakes. *Toxicon* [Internet]. 2012;59(2):315–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.12.006>
 142. Motta YP, Sakate M, Nogueira RMB, Peraçoli MTS, Sangiorgio F, Floriano RS, et al. Quantificação de citocinas no soro e homogenato da pata na intoxicação experimental com veneno de Bothropoides jararaca em ratos Wistar tratados com soroterapia e Mikania glomerata. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2014;66(5):1413–8.
 143. Da Silva RJ, Da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm.* 2002;11(4):197–201.
 144. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CFP, Fernández CM, Díaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake Bothrops asper. *Mediators Inflamm.* 2002;11(2):121–8.
 145. Ávila-Agüero ML, París MM, Hu S, Peterson PK, Gutiérrez JM, Lomonte B, et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr Emerg Care.* 2001;17(6):425–9.
 146. Barraviera B, Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA, Meira DA. Acute-Phase Reactions, Including Cytokines, in Patients Bitten By Bothrops and Crotalus Snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins.* 1995;1(1):11–22.
 147. Luna KPO, Melo CML, Pascoal VPM, Martins-Filho OA, Pereira VRA. Bothrops erythromelas snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. *Int J Interf Cytokine Mediat Res.* 2011;3(1):9–18.
 148. 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;10:1–12.
 149. Delafontaine M, Villas-Boas IM, Mathieu L, Josset P, Blomet J, Tambourgi D V. Enzymatic and pro-inflammatory activities of Bothrops lanceolatus venom: Relevance for envenomation. *Toxins (Basel).* 2017;9(8):1–19.

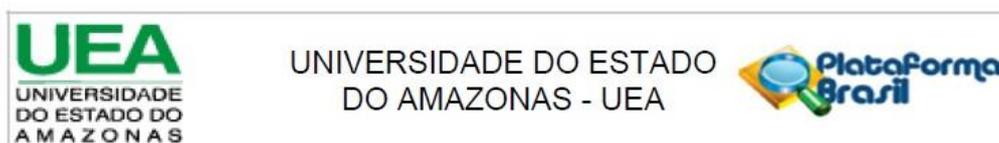
150. Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm*. 1998;7(5):339–46.
151. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, da Silva HB, Fernandes CM, D'Império Lima MR, et al. Local 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>
152. Moreira V, Zamuner SR, Wallace JL, Teixeira C de FP. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. *Toxicon*. 2007;49(5):615–24.
153. 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.
154. Menaldo DL, Bernardes CP, Zoccal KF, Jacob-Ferreira AL, Costa TR, Del Lama MPFM, et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. *Mol Immunol* [Internet]. 2017;85:238–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.008>
155. Moreira V, Teixeira C, Borges da Silva H, D'Império Lima MR, Dos-Santos MC. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. *Toxicon* [Internet]. 2013;67:37–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.010>
156. Açikalin A, Gökel Y. Serum IL-6, TNF α levels in snakebite cases occurring in Southern Turkey. *Emerg Med J*. 2011;28(3):208–11.
157. Crocker P, Zad O, Milling T, Maxson T, King B, Whorton E. Human cytokine response to Texas crotaline envenomation before and after antivenom administration. *Am J Emerg Med*. 2010;28(8):871–9.
158. Stone SF, Cotterell C, Isbister GK, Holdgate A, Brown SGA. Elevated serum cytokines during human anaphylaxis: Identification of potential mediators of acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2009;124(4):786-792.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.055>
159. Bucarechi F, Douglas JL, Fonseca MRCC, Zambrone FAD, Vieira RJ. Envenenamento ofídico em crianças: frequência de reações precoces ao antiveneno em pacientes que receberam pré-tratamento com

- antagonistas H1 e H2 da histamina e hidrocortisona. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994;36(5):451–7.
160. Fan HW, Marcopito LF, Cardoso JLC, França FOS, Malaque CMS, Ferrari RA, et al. Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for bothrops snake bites. *BMJ*. 1999;318(1):1451–3.
 161. Williams DJ, Jensen SD, Nimorakiotakis B, Mu R, Winkel KD. Antivenom use , premedication and early adverse reactions in the management of snake bites in rural Papua New Guinea. *Toxin*. 2007;49(1):780–92.
 162. Habib AG. Effect of Pre-Medication on Early Adverse Reactions Following Antivenom Use in Snakebite. *Drug Saf*. 2011;34(10):869–80.
 163. Kularatne SAM, Weerakoon K, Silva A, Maduwage K, Walathara C, Rathnayake I, et al. Efficacy of intravenous hydrocortisone administered 2–4 h prior to antivenom as prophylaxis against adverse drug reactions to snake antivenom in Sri Lanka: An open labelled randomized controlled trial. *Toxicon* [Internet]. 2016;120:159–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.011>
 164. Caron EJ, Manock SR, Maudlin J, Koleski J, Theakston RDG, Warrell DA, et al. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? *Toxicon* [Internet]. 2009;54(6):779–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.001>
 165. Morais V, Massaldi H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2006;12(3):497–511.
 166. Rojas G, Jimenez JM, Gutiérrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. 1994;32(3):351–63.
 167. Vargas M, Segura A, Herrera M, Villalta M, Estrada R, Cerdas M, et al. Preclinical Evaluation of Caprylic Acid-Fractionated IgG Antivenom for the Treatment of Taipan (*Oxyuranus scutellatus*) Envenoming in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):1–8.
 168. Steinbuch M, Audran R. The Isolation of IgG From Mammalian Acid with the Aid of Caprylic. *Arch Biochem Biophys*. 1969;134(1):279–84.
 169. Otero-patiño R, Segura Á, Herrera M, Angulo Y, León G, María J, et al. Toxicon Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent , caprylic acid fractionated [IgG and F (ab 0) 2] antivenoms , in Bothrops asper bites in Colombia. *Toxicon*. 2012;59(1):344–55.

170. Nudel BC, Perdoménico C, Iácono R, Cascone O. Toxicon Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon*. 2012;59(1):68–73.
171. Laustsen AH, María Gutiérrez J, Knudsen C, Johansen KH, Bermúdez-Méndez E, Cerni FA, et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon* [Internet]. 2018;146:151–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>
172. Bahraoui E, Pichon J, Muller JM, Darbon H, Elayeb M, Granier C, et al. Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J Immunol Balt Md*. 1988;141(1):214–20.
173. Premawardhena AP, De Silva CE, Fonseka MMD, Gunatilake SB, De Silva HJ. Low dose subcutaneous adrenaline to prevent acute adverse reactions to antivenom serum in people bitten by snakes: Randomised, placebo controlled trial. *Br Med J*. 1999;318(7190):1041–3.

7 ANEXOS E APÊNDICES

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



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:

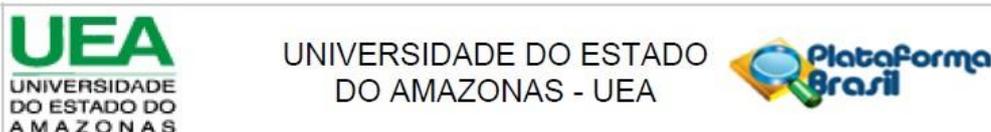
Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em o infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazonia Brasileira. Trata-se de um ensaio clínico com pacientes envolvidos em acidentes 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

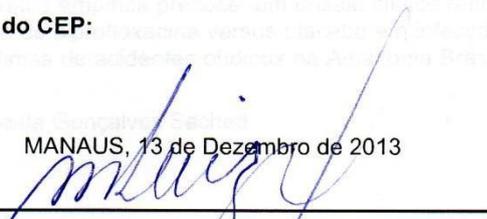
Continuação do Parecer: 492.892

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 13 de Dezembro de 2013



Assinado 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 da Fundação de Medicina Tropical

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 CAEE 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



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 Amazônia 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: solicitação de alteração o medicamento utilizado

Justificativa: Venho por meio desta solicitar alteração no projeto intitulado "Antibioticoterapia

Data do Envio: 14/05/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 677.472

Data da Relatoria: 26/05/2014

Apresentação da Notificação:

Venho por meio desta solicitar alteração no projeto intitulado 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 Amazônia Brasileira e aprovado sob o nº CAAE:19380913.6.0000.5016. Após intensas reuniões com um painel de especialistas das áreas de dermatologia, infectologia, patologia, farmacologia, hematologia e clínica médica, houve a constatação de que a antibioticoterapia empírica precoce com a utilização do medicamento Ciprofloxacino possui espectro de ação um pouco restrito, necessitando associação de outras drogas para uma atuação mais satisfatória. Com isso, optou-se

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: 677.472

para a utilização de inibidor da betalactamase Clavulin BD, por se tratar de maior espectro de ação contra bactérias aeróbias e aneróbias, gram positivas e negativas.

Objetivo da Notificação:

Alterar a terapia medicamentosa com ciprofloxacina para Clavulin inibidor da betalactamase por se tratar de maior espectro de ação contra bactérias aeróbias e aneróbias, gram positivas e negativas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer aprovado de acordo com a resolução 466 de 12 de Dezembro de 2012 do CONEP

MANAUS, 06 de Junho de 2014

Assinado 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

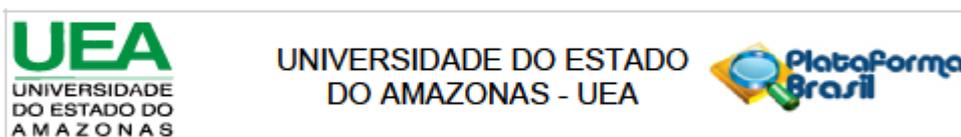
Município: MANAUS

Telefone: (92)3878-4368

Fax: (92)3878-4368

E-mail: cep.uea@gmail.com

Anexo 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: 19380913.8.0000.5016

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 Amazônia 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



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DO AMAZONAS - UEA



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: (02)3878-4368

Fax: (02)3878-4368

E-mail: cep.uea@gmail.com