

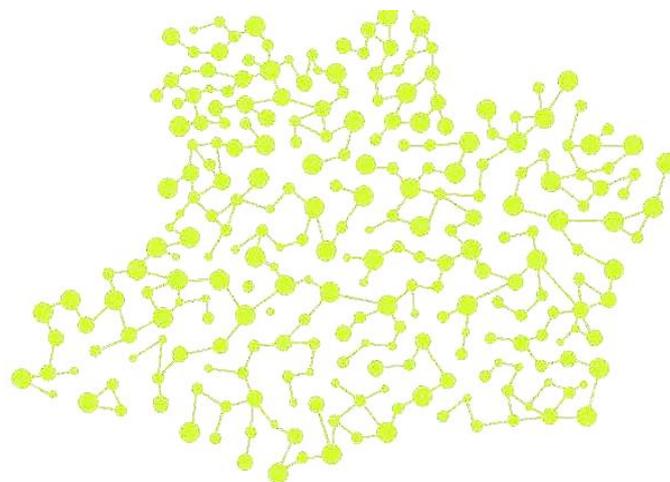


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**  
**MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**PERFIL CELULAR ENVOLVIDO NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES**  
**VÍTIMAS DE ACIDENTE OFÍDICO BOTRÓPICO NA AMAZÔNIA**  
**BRASILEIRA**

**KEROLAINE FONSECA COELHO**



**MANAUS**

**2021**

**KEROLAINE FONSECA COELHO**

**PERFIL CELULAR ENVOLVIDO NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES  
VÍTIMAS DE ACIDENTE OFÍDICO BOTRÓPICO NA AMAZÔNIA  
BRASILEIRA**

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para Qualificação no curso de *Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas*

**Orientador (a):** Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro

Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

**MANAUS**

**2021**

**FOLHA DE JULGAMENTO****PERFIL CELULAR ENVOLVIDO NA RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES  
VÍTIMAS DE ACIDENTE OFÍDICO BOTRÓPICOS NA AMAZÔNIA  
BRASILEIRA****KEROLAINE FONSECA COELHO**

**“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:**

---

**Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa (UFAM)**  
**Presidente**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett (UEA/FUAM)**  
**Membro Interno**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Monteiro Tarragô (HEMOAM)**  
**Membro Externo**

## DEDICATÓRIA

Dedico à **Deus**.

Aos meus pais **Rozinete e Raimundo**.

Ao **Weverton**, por todo amor e apoio.

Dedico também a todas as pessoas  
que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, pelo amor incondicional, força e por me conceder a sabedoria necessária para enfrentar os desafios e me possibilitar realizar meus sonhos.

Aos **meus pais** e toda **minha família**, pelo apoio e compreensão.

Ao **Weverton Wylar**, obrigada pela cumplicidade, por toda ajuda, força, amizade e amor em todos os momentos, meu companheiro de vida.

Ao meu orientador, **Dr. Allyson Guimarães da Costa**, pela oportunidade, por me aceitar no grupo de pesquisa e acreditar no meu potencial, pela paciência em ensinar, muito obrigada.

Aos meus coorientadores e professores: **Dr. Wuelton Marcelo Monteiro** e **Dra. Adriana Malheiro Alle Marie** pela coorientação e por todo apoio necessário para realização do projeto.

A todos do grupo **Amazon InterScience**, em especial ao **Hiochelson Najibe**, pelo tempo dedicado em instruir e ensinar todas as etapas necessárias durante a realização deste trabalho, ao **Flávio Sousa** e **Fabiane Bianca** por todo auxílio nas coletas das amostras e atividades laboratoriais.

A **Juliana Neves**, que foi companheira em todos os momentos durante essa trajetória no mestrado, muito obrigada pela ajuda no recrutamento dos pacientes, no processamento das amostras e análises. Juntas compartilhamos momentos bons e ruins, muito obrigada de coração.

Ao **Fábio Magalhães**, pelo apoio nas análises e escrita, minha sincera gratidão por cada contribuição para a realização deste trabalho.

A **Daniela Brito**, pelo companheirismo e por segurar minha mão nos momentos que precisei.

A todos os pacientes atendidos na **Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)** pela simpatia e doação das amostras, pela colaboração com a pesquisa e ciência, sem eles nada seria realizado.

À **Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)**, ao **Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical**, a **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**, ao **Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB)**, e a **Secretaria e Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT)** pelos valorosos ensinamentos e pela oportunidade de qualificação profissional em curso o mestrado em *doenças tropicais e infecciosas*.

Aos **enfermeiros e laboratorista** da FMT-HVD pela colaboração e auxílios durante o recrutamento de pacientes.

Ao **Centro de Pesquisa Clínica em Envenenamento por Animais Peçonhentos (CEPCLAM)** pela oportunidade e conhecimentos partilhados.

À **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

E a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigada.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), responsáveis pelo pagamento da bolsa e financiamento indireto desta pesquisa.

**EPÍGRAFE**

*“Nem sempre são os corredores mais velozes que ganham as corridas; nem sempre são os soldados mais valentes que ganham as batalhas. Notei ainda que as pessoas mais sábias nem sempre têm o que comer e que as mais inteligentes nem sempre ficam ricas. Notei também que as pessoas mais capazes nem sempre alcançam altas posições. Tudo depende da sorte e da ocasião”.*

**(Eclesiastes: 9.11)**

## RESUMO

O ofidismo é um problema de saúde pública negligenciado, e na Amazônia são comuns os casos ocasionados pela serpente *Bothrops atrox*. O veneno da *B. atrox* (BaV) causa importantes alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas, promovendo intensa reação inflamatória. A exacerbação da resposta inflamatória local conjuntamente com a ação do BaV, pode resultar em complicação tecidual grave e formação de flictenas, conhecidas como “bolhas”. Entretanto, os mecanismos imunes envolvidos ainda são pouco elucidados. Diante disso, caracterizamos o perfil de células imunes locais e circulantes e mediadores envolvidos no processo inflamatório em vítimas de acidentes causados por *B. atrox*. Para isso, foi coletado o sangue periférico em três momentos: antes da soroterapia (T0), 24 horas (T1) e 48 horas (T2) após a soroterapia. O conteúdo exsudativo das bolhas foi coletado por aspiração ao T2. A população foi composta por 48 pacientes, 29 participantes do grupo leve e 19 do grupo grave, e destes, 09 desenvolveram flictenas. Além disso, foram incluídas 48 amostras de participantes sem histórico de acidente ofídico, compondo o grupo controle. As contagens das células e dosagem de citocinas foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo. Nossos achados demonstram que os grupos de caso apresentaram ao T0 um padrão de resposta similar, com aumento nos percentuais dos monócitos inflamatórios, linfócitos T, NKT e células B. Concomitantemente as quimiocinas CCL-2, CXCL9, CCL-5, CXCL-10 e citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 elevaram. Ao longo do tempo, os grupos apresentaram mudanças no perfil de resposta, como aumento dos monócitos patrulhadores no grupo leve e da IL-6 no grupo grave. Após 48 horas do tratamento, o grupo leve novamente é observado o aumento da resposta inflamatória. Contrariamente no grupo grave o repertório de resposta ainda é escasso, com possível atuação de monócitos patrulhadores, linfócitos B e das moléculas CCL-2 e IL-6. A nível local, o dano tecidual induziu uma resposta de perfil inflamatório, com aumento dos monócitos inflamatórios e patrulhadores, assim como de CCL-2, IL1 $\beta$ , IL-6 e TNF. Também foi observado aumento de NKT, TCD4<sup>+</sup> e IL-10, que atuam em respostas imunorregulatórias, exibindo assim um perfil de resposta regulada no local da picada. Acreditamos que o aumento de CCL-2 e IL-6 conjuntamente com linfócitos B, apresentam potencial para um marcador de prognóstico clínico em pacientes com complicação grave.

**Palavras-chave:** *Bothrops atrox*, imunidade celular, interleucinas, quimiocinas, inflamação, flictena.

## ABSTRACT

Snake accident is a neglected public health problem, and cases caused by the snake *Bothrops atrox* are common in the Amazon. The *B. atrox* venom (BaV) causes important local and systemic pathophysiological changes, promoting an intense inflammatory reaction. The exacerbation of the local inflammatory response, together with the action of BaV, can result in severe tissue complications and the formation of blisters. However, the immune mechanisms involved are still poorly understood. Therefore, we characterized the profile of local and circulating immune cells and mediators involved in the inflammatory process in victims of accidents caused by *B. atrox*. For this, peripheral blood was collected at three times: before serum therapy (T0), 24 hours (T1) and 48 hours (T2) after serum therapy. The exudative content of the bubbles was collected by aspiration at T2. The population consisted of 48 patients, 29 participants in the mild group and 19 in the severe group, and of these, 09 developed blisters. In addition, 48 samples from participants without a history of snakebite accidents were included, making up the control group. Cell counts and cytokine dosage were performed using the flow cytometry technique. Our findings demonstrate that the case groups presented a similar response pattern to T0, with an increase in the percentage of inflammatory monocytes, T lymphocytes, NKT and B cells. Concomitantly, the chemokines CCL-2, CXCL9, CCL-5, CXCL-10 and IL-1 $\beta$  and IL-10 cytokines were elevated. Over time, the groups showed changes in the response profile, such as an increase in patrolling monocytes in the mild group and IL-6 in the severe group. After 48 hours of treatment, the mild group is again observed to increase the inflammatory response. In contrast, in the severe group, the response repertoire is still scarce, with the possible role of patrolling monocytes, B lymphocytes and CCL-2 and IL-6 molecules. At the local level, tissue damage induced a response with an inflammatory profile, with an increase in inflammatory and patrolling monocytes, as well as in CCL-2, IL1 $\beta$ , IL-6 and TNF. It was also observed an increase in NKT, TCD4+ and IL-10, which act on immunoregulatory responses, thus exhibiting a regulated response profile at the bite site. We believe that the increase in CCL-2 and IL-6 together with B lymphocytes, have potential as a clinical prognostic marker in patients with severe complications.

**Keywords:** *Bothrops atrox*, cellular immunity, interleukins, chemokines, inflammation, blister.

## RESUMO LEIGO

Na Amazônia, a Jararaca é a principal serpente responsável pelos acidentes. Essa serpente pode causar uma reação inflamatória devido a ação das células de defesa do corpo contra o veneno, e isso pode levar ao desenvolvimento de bolhas na pele, dificultando a recuperação da vítima. No entanto, a forma como isso ocorre ainda não é muito conhecido em humanos. Logo, este estudo teve por objetivo trazer informações sobre o envolvimento de células e moléculas imunes através de exames laboratoriais. Realizamos exames de sangue dos pacientes picados em três momentos, antes de receber o soro (T0), 24h após (T1) e 48h após o tratamento (T2). Também foi coletado no tempo de 48h o conteúdo da bolha. Avaliamos também o sangue de 48 participantes saudáveis que nunca foram picados por cobras. Os pacientes foram divididos de acordo com a gravidade do acidente, com um total de 29 participantes com acidente leve e 19 graves, sendo que dos graves, 09 tiveram bolhas. Acreditamos que o aumento de CCL-2 e IL-6 conjuntamente com linfócitos B, apresentam potencial para um marcador de prognóstico clínico em pacientes com complicação grave.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Notificação dos acidentes botrópicos segundo regiões.....	20
<b>Figura 2.</b> Distribuição espacial de envenenamentos causados por picadas de serpente no estado do Amazonas, de 2007 a 2012 .....	21
<b>Figura 3.</b> Níveis das toxinas de Viperídeos .....	22
<b>Figura 4.</b> Proteômica do BaV de serpentes com habitat da floresta Amazônica .....	23
<b>Figura 5.</b> Resumo da ação das toxinas do veneno em diferentes sistemas ....	26
<b>Figura 6.</b> Hidrólise provocada por SVMPS.....	27
<b>Figura 7.</b> Alterações histológicas induzida por SVMPS.....	28
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática das diferentes fontes de proteínas presentes no exsudato .....	29
<b>Figura 9.</b> Resumo hipotético dos eventos que levam ao dano do tecido injetado a peçonha botrópica .....	30
<b>Figura 10.</b> Desenvolvimento de bolha no membro acometido.....	31
<b>Figura 11.</b> Ilustração dos eventos inflamatórios .....	39
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática dos eventos inflamatórios locais e mecanismos hipotéticos da ação inflamatória induzida por PLA2 e SVMPS do veneno de <i>B. asper</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> Ilustração do processo inflamatório local induzido pelo acidente por <i>B. atrox</i> .....	42
<b>Figura 14.</b> Relação dos pacientes recrutados e análise temporal .....	47
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática da técnica de citometria de fluxo.....	51
<b>Figura 16.</b> Etapas de realização da técnica de CBA (Cytometric Bead Array) - Multiplexed Bead-Based Immunoassays .....	52

<b>Figura 17.</b> Fluxograma do estudo.....	59
<b>Figura 18.</b> Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis em pacientes com picado por <i>B. atrox</i> .....	66
<b>Figura 19.</b> Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis em grupos leves e graves durante o acompanhamento.....	67
<b>Figura 20.</b> Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis no compartimento da bolha de pacientes graves acidentados por <i>B. atrox</i> .....	68
<b>Figura 21.</b> Rede de moléculas solúveis e células imunes mostra interações ocorrendo entre grupos durante o acompanhamento do estudo.....	71
<b>Figura 22.</b> Resumo esquemático da resposta inflamatória temporal local e sistêmica de pacientes acidentados por <i>B. atrox</i> com e sem complicação tecidual grave .....	76

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Quimiocinas e funções biológicas .....	33
<b>Tabela 2.</b> Citocinas e funções biológicas .....	33
<b>Tabela 3.</b> Painel de marcação de superfície das células do sangue periférico..	49
<b>Tabela 4.</b> Painel de marcação de superfície de células do conteúdo exsudativo das bolhas .....	50
<b>Tabela 5.</b> Características clínicas e sociodemográficas dos pacientes e indivíduos incluídos no estudo .....	62
<b>Tabela 6.</b> Dados do hemograma e imunofenotipagem dos pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópico, estratificados em grupos leve e grave, antes e após a soroterapia .....	64

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada em acidentes botrópicos: .....	32
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

<b>3FTx</b>	“Toxina de três dedos” – <i>Three-finger toxin</i>
<b>µL</b>	Microlitros
<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>Asp49</b>	Ácido aspártico 49
<b><i>B. atrox</i></b>	<i>Bothrops atrox</i>
<b>BaV</b>	Veneno de <i>Bothrops atrox</i>
<b>CA<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CCDA</b>	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CEPCLAM</b>	Centro de Pesquisa Clínica em Envenenamento por Animais Peçonhentos
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>CRD</b>	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
<b>CRISP</b>	Proteína secretora rica em cisteína
<b>CTL</b>	Proteína lectina do tipo C
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DTN</b>	Doença tropical negligenciada
<b>DTX</b>	<i>Dendrotoxina</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>GC</b>	Grupo controle
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio

<b>HEMOAM</b>	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>HYAL</b>	Hialuronidase
<b>IBU</b>	Instituto Butantan
<b>ICAM – 1</b>	Molécula de adesão intercelular – 1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>LAAO</b>	L-aminoácido oxidase
<b>LTB4</b>	Leucotrieno B4
<b>Lys49</b>	Lisina 49
<b>MB</b>	Membrana basal
<b>MEC</b>	Componentes da matriz extracelular
<b>MHC</b>	Complexo principal de Histocompatibilidade
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>MYO</b>	Miotoxina
<b>NGF</b>	Fator de crescimento neural
<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>NKT</b>	Células T <i>natural killer</i>
<b>NOS</b>	Óxido nítrico
<b>NUC</b>	Nucleotidase
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao patógeno
<b>PDE</b>	Fosfodiesterase
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2
<b>PRRS</b>	Receptores de reconhecimento padrão
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SAB</b>	Soro antibotrópico

<b>SABC</b>	Soro antibotrópico-crotálico
<b>SABL</b>	Soro antibotrópico-laquélico
<b>SINAN</b>	Sistema de informação de agravos de notificação
<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SVMPs</b>	Metaloproteases do veneno de serpentes
<b>SVSPs</b>	Serino proteases do veneno de serpentes
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TLES</b>	<i>Thrombin like enzymes</i>
<b>TLR</b>	Receptores do tipo <i>toll-like</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TXA2</b>	Tromboxano A2
<b>VAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao veneno
<b>VCAM – 1</b>	Molécula de adesão de células vasculares
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>Zn</b>	Zinco

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Epidemiologia.....	20
1.2 Peçonha botrópica e aspectos clínicos .....	22
1.3 Formação de flictenas .....	26
1.4 Tratamento .....	31
1.5 Células imunes e resposta local e sistêmica aos envenenamentos .....	32
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Geral .....	43
3.2 Específicos.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Aspectos éticos .....	43
4.2 Modelo de estudo.....	44
4.3 Área de estudo.....	44
4.4 Critérios de elegibilidade .....	45
4.5 Plano amostral .....	45
4.6 Coleta das amostras .....	45
4.7 Caracterização dos grupos de estudo.....	46
4.8 Caracterização do grupo controle .....	47
4.9 Obtenção de dados clínicos e epidemiológicos .....	47
4.11 Aquisição dos parâmetros hematológicos.....	48
4.12 Caracterização morfométrica e imunofenotípica através da técnica de citometria de fluxo .....	48
4.13 Quantificação das moléculas solúveis circulantes por CBA .....	52

4.14 Plano analítico.....	53
5. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO .....	54
8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS .....	95
9. CONCLUSÃO .....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO .....	96
9. ANEXOS .....	114
9.1 Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) 114	
9.2 Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	119
9.3 Anexo III – Questionário Clínico Epidemiológico.....	125
9.4 Anexo IV – Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de Imunofenotipagem Celular .....	127
9.5 Anexo V – Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de Cytometric Bead Array – CBA.....	131

## 1. INTRODUÇÃO

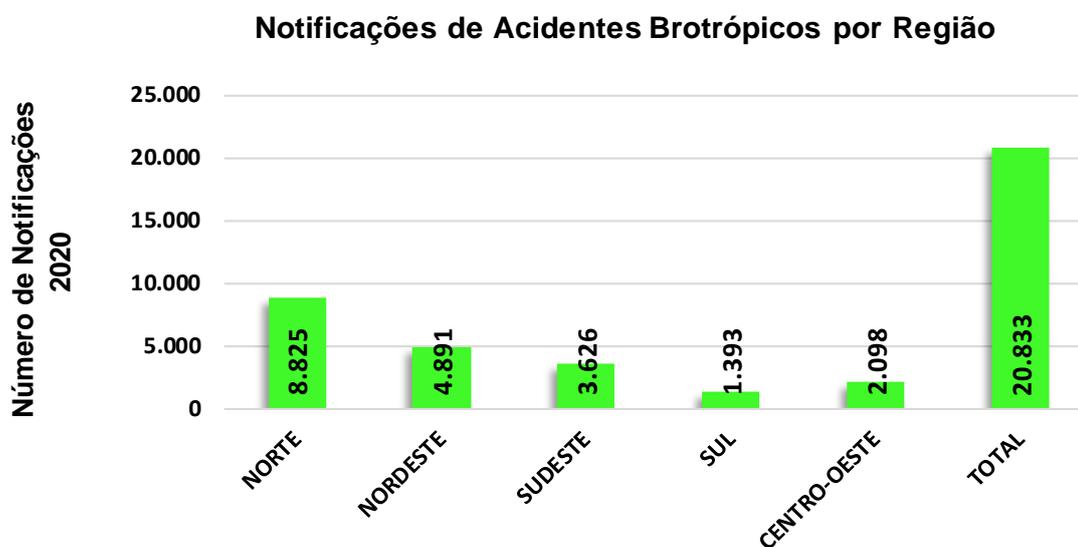
### 1.1 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o acidente ofídico é uma doença tropical negligenciada (DTN) e potencialmente fatal (1). Representa um sério agravo na saúde pública e ocorrem a nível global, predominante em regiões tropicais e subtropicais (2,3).

No ano de (2019) cerca de 5.4 milhões de pessoas foram picadas por serpentes, ocasionando 2.7 milhões de envenenamentos e aproximadamente 81.000 a 138.000 óbitos, além de 400.000 casos de amputação e outras sequelas permanentes (4,5).

No Brasil, a maioria dos acidentes é atribuído ao gênero *Bothrops*, que é amplamente distribuído em todo o território e possui aproximadamente 30 espécies, encontradas em ambientes diversos como áreas litorâneas, úmidas, agrícolas, periurbanas, cerrados, e áreas abertas (6).

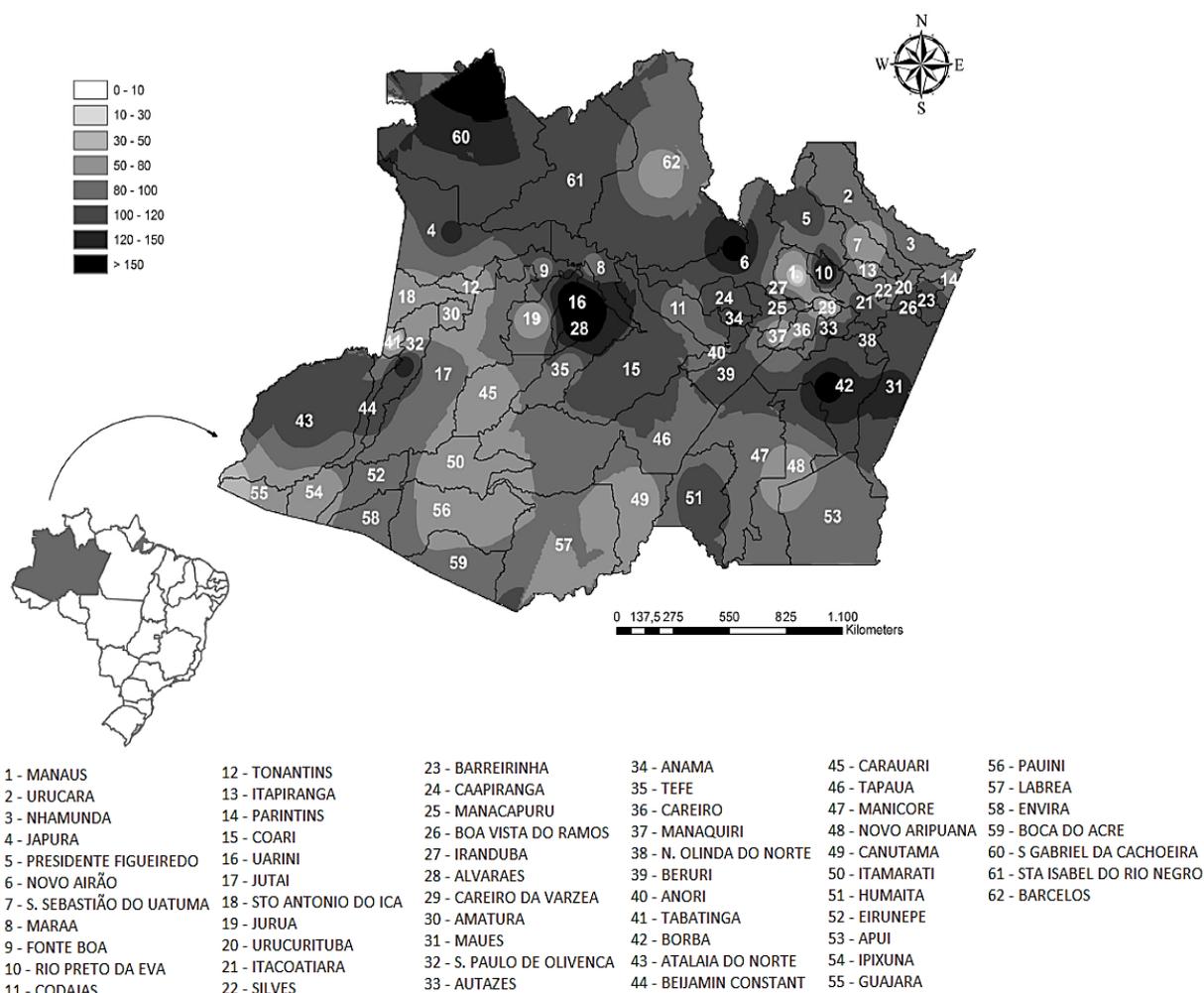
O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou no ano de (2020), cerca de 20.833 casos de acidentes botrópicos em todo o país, dos quais grande parte ocorreram na região Norte, correspondendo a 8.825 acidentes (**Figura 1**) (7).



**Figura 1.** Notificação dos acidentes botrópicos segundo regiões (7).

Na Amazônia Brasileira, a espécie *B. atrox* é responsável por aproximadamente 90-95% dos acidentes ofídicos, e as notificações dos acidentes se distribuem por todos os estados. A população mais afetada são homens, moradores de áreas rurais, na faixa etária entre 16 e 45 anos e sobretudo nos membros inferiores (8–11).

Um mapeamento realizado no estado do Amazonas por Feitosa et al., (2015), demonstrou que os municípios de Uarini, Novo Airão, Rio Preto da Eva, Borba, Alvarães e São Gabriel da Cachoeira, representam as maiores taxas de incidência, correspondendo a 150 casos por 100.000 habitantes / ano, (**Figura 2**) (10). E no ano de (2020), segundo dados do SINAN, foram notificados cerca de 1.713 casos de acidentes botrópicos no estado (7).



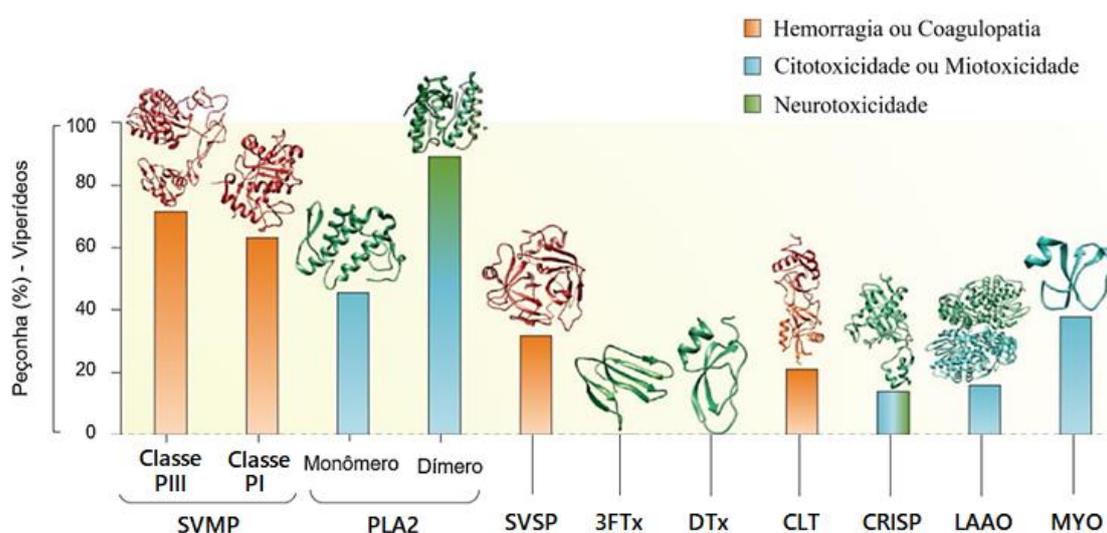
**Figura 2.** Distribuição espacial de envenenamentos causados por picadas de serpente no estado do Amazonas, de 2007 a 2012 (10).

## 1.2 Peçonha botrópica e aspectos clínicos

As serpentes peçonhentas possuem capacidade de inocular sua peçonha por meio do aparelho bucal modificado chamado de presas, os músculos compressores agem sobre as glândulas, que liberam misturas complexas de diferentes moléculas ativas que passam pelos ductos até as presas que são inoculadas em suas vítimas (12,13).

O peso seco das distintas porções do veneno de serpentes é constituído por cerca de 90 a 95% de proteínas, enzimas digestivas e peptídios de amplo perfil bioquímico e toxicológico (14,15). A classificação qualitativa e quantitativa dos distintos grupos de toxinas da peçonha de viperídeos, possibilitou compreender que a ação conjunta destes constituintes afetam diferentes alvos fisiológicos, promovendo alterações hemorrágicas e/ou coagulopatias, citotoxicidade e/ou miotoxicidade, além de neurotoxicidade (3,16).

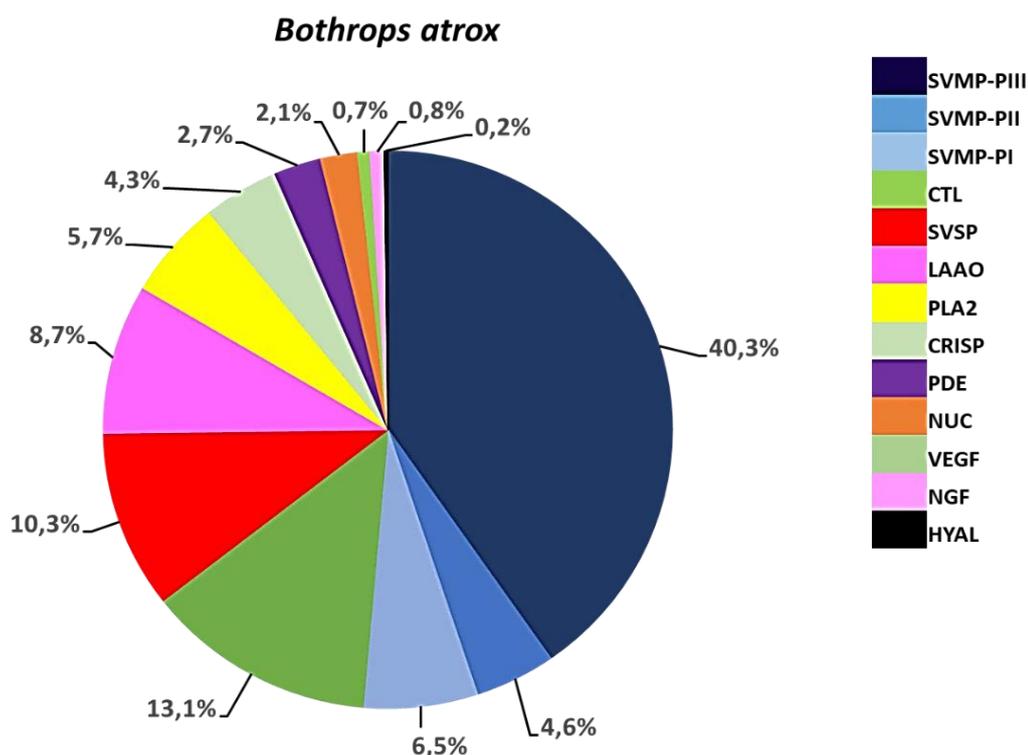
A distribuição básica dos componentes tóxicos mais abundantes da peçonha de viperídeos encontram-se resumidos na **(Figura 3)**. Os níveis proteicos do veneno total estão representados em porcentagens (%), e as barras correspondem as atividades biológicas. Também sendo possível evidenciar estruturas tridimensionais de ressonância magnética cristalográfica das proteínas presente na peçonha (3).



**Figura 3.** Níveis das toxinas de Viperídeos. Metaloproteinase do veneno de serpentes (SVMP); fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); serino proteinase do veneno de serpentes (SVSP); *Three finger toxin* - “toxina de

três dedos” (3FTx); dendrotoxina (DTX); proteína lectina do tipo C (CTL); proteína secretora rica em cisteína (CRISP); L-aminoácido oxidase (LAAO) e miotoxina (MYO). Adaptado por Sousa, 2020 (3).

O BaV possui distintas proteínas que garantem sua versatilidade funcional, entretanto, algumas porções são encontradas em maiores concentrações, como as SVMP-PIII (40.3%), SVMP-PI (6.5%), SVMP-PII (4.6%), CTL (13.1%), SVSP (10.30%), LAAO (8.7%) e PLA<sub>2</sub> (5.7%) evidenciados na **(Figura 4)** (17).



**Figura 4.** Proteômica do BaV de serpentes com habitat da floresta Amazônica. Metaloproteinase do veneno de serpentes (SVMP); proteína lectina do tipo C (CTL); serino protease do veneno de serpentes (SVSP); L-aminoácido oxidase (LAAO); proteína rica em cisteína (CRISP); fosfodiesterase (PDE); nucleotidase (NUC); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento neural (NGF) e hialuronidase (HYAL). Adaptado de Sousa *et al.*, 2017 (17).

Os acidentes causados por serpentes deste gênero são de grande importância médica na Amazônia, pois resultam em significativas manifestações locais e sistêmicas decorrentes principalmente das atividades coagulotóxica, proteolítica e inflamatória aguda (13,18).

As SVMPs são enzimas proteolíticas dependentes de zinco (Zn) e pertencentes à família das proteases (13,19). Abundantes no BaV e expressas e classificadas com base em seu tamanho e estrutura de domínio nas classes P-I, II e III (**Figura 4**) (17). Apresentam atividade catalítica em diversos substratos, mas o principal alvo está nas proteínas da matriz extracelular e na membrana basal, o que caracteriza sua ação hemorrágica (20,21). Além disso, degradam fibrinogênio e fibrina, fatores de coagulação, inibe a agregação plaquetária, induz apoptose, leva a quadros de mionecrose local, dermonecrose e intensa reação inflamatória (22,23).

As proteínas CTL são moléculas diméricas dependentes de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e estão envolvidas em alterações hemostáticas. São proteínas que se dividem entre lectinas tipo-C verdadeiras e lectinas tipo-C-like “falsas”. As CTL verdadeiras possuem capacidade de liga-se à carboidratos de superfície celular devido ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, do inglês, *carbohydrate recognition domain*), e essa ligação promove hemaglutinação, além de inibir ou ativar receptores específicos da membrana das plaquetas e de proteínas da cascata da coagulação (24,25).

Lectinas tipo C-like “falsas” não possuem o domínio de ligação aos carboidratos, e com isso, não apresentam atividade aglutinante, porém, são pró e anticoagulantes devido sua capacidade de ligação e inibição da trombina e da agregação plaquetária (25). Todavia, alterações provocadas pelas CTL não se limitam apenas as hemostáticas, atuam também em eventos inflamatórios, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, modulando a resposta imune aos envenenamentos botrópicos (26).

As SVSPs, também conhecidas como endopeptidase de serina são enzimas tóxicas que atingem o sistema de fibrinólise (27), ativam o plasminogênio convertendo-o em plasmina, e com isso, são frequentemente referidas como enzimas semelhantes à trombina (TLEs, do inglês *Thrombin-like enzymes*) (28,29). Além disso, possuem função anticoagulante atuando como agente desfibrinogenante, gerando diversos fibrinopeptídeos pela clivagem de fibrina (29).

As LAAOs são flavoenzimas com especificidade catalítica para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos de cadeia longa. A desaminação oxidativa dos aminoácidos dar origem a alfa-cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um composto altamente reativa ao oxigênio, capaz de induzir apoptose de diversos tipos

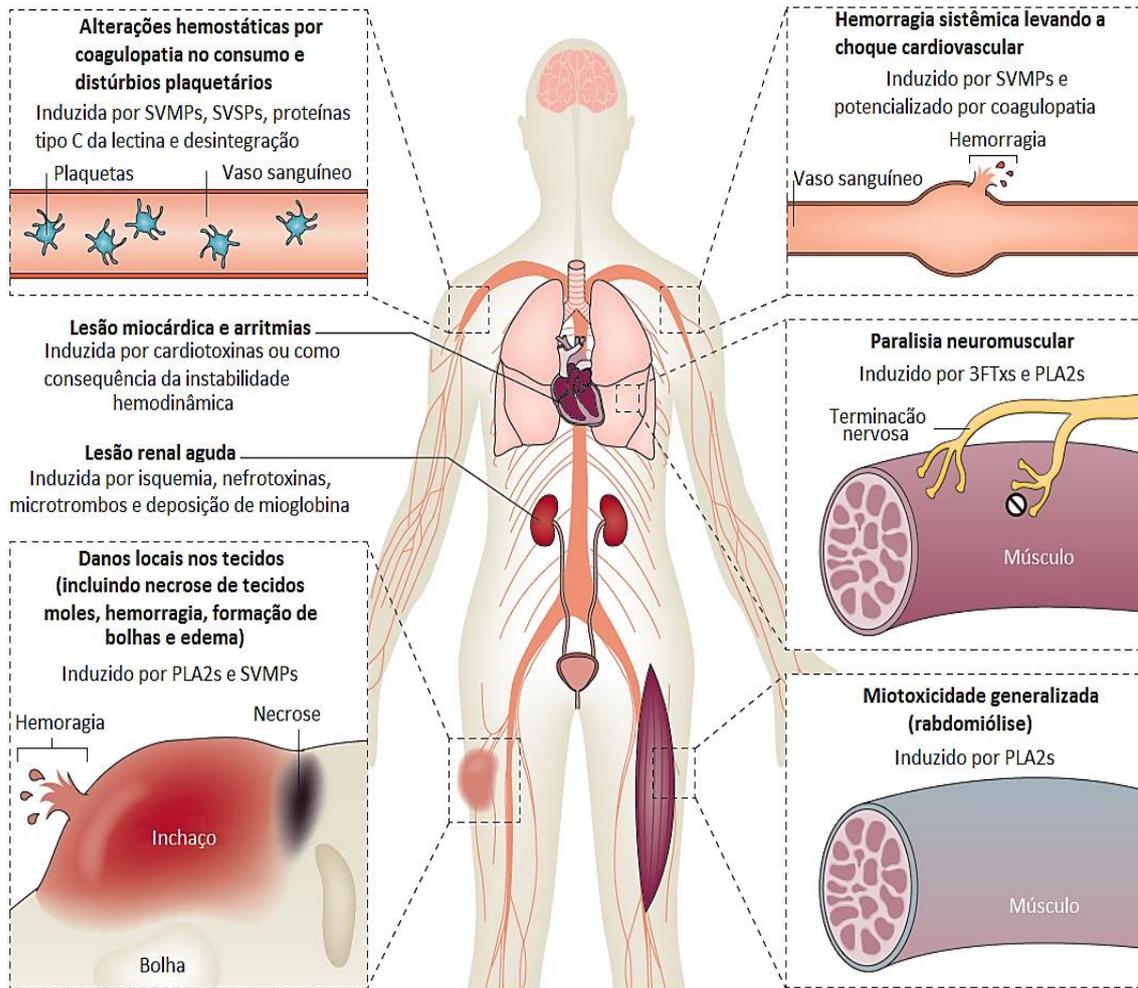
celulares (30,31). Também atua em quadros hemorrágicos, na indução e/ou inibição da agregação plaquetária, na ativação de leucócitos e na formação de edema (32).

A PLA<sub>2</sub> também representa um dos principais componentes do veneno botrópico (**Figura 4**), podendo ser classificada por um ácido aspártico 49 (Asp49) que têm a capacidade de catalisar a hidrólise de fosfolipídios, resultando na liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos, e lisina 49 (Lys49), que não apresenta essa atividade catalítica, entretanto, assim como Asp49 induzem a mionecrose e aumento da permeabilidade celular, por meio da ancoragem nas membranas celulares (17,33–35).

A mionecrose é uma das ações mais importantes desta toxina, devido a ação miotóxica que leva a lesões das fibras musculares, rompendo a integridade da membrana plasmática (36). Os eventos inflamatórios acarretados pela ação das PLA<sub>2</sub> são decorrentes da hidrólise dos fosfolipídios e hemólise celular que induzem a síntese de mediadores lipídicos (leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas) e, simultaneamente ativam células do sistema imune (37–39).

De modo geral, a maioria das complicações locais são decorrentes da proteólise e mionecrose no tecido acometido, o que gera inflamação, dor, edema, bolhas, síndrome compartimental e em alguns casos, infecções secundárias (40,41). A presença da peçonha de viperídeos no musculo também pode provocar uma miotoxicidade generalizada, desencadeando quadros de rabdomiólise (3).

Enquanto as manifestações sistêmicas podem culminar em distúrbios plaquetários e hemorrágicos, provocando gengivorragia, equimoses, hematúria, hematêmese, hipotensão ou hipovolemia, além de lesões miocárdica, arritmias, cefaleia, vômitos, insuficiência renal e neurotoxicidade (pré e pós-sináptica) (40–42). Na (**Figura 5**) observamos um resumo dos efeitos fisiopatológicos decorrente da ação das toxinas do peçonha em diferentes sistemas (3).



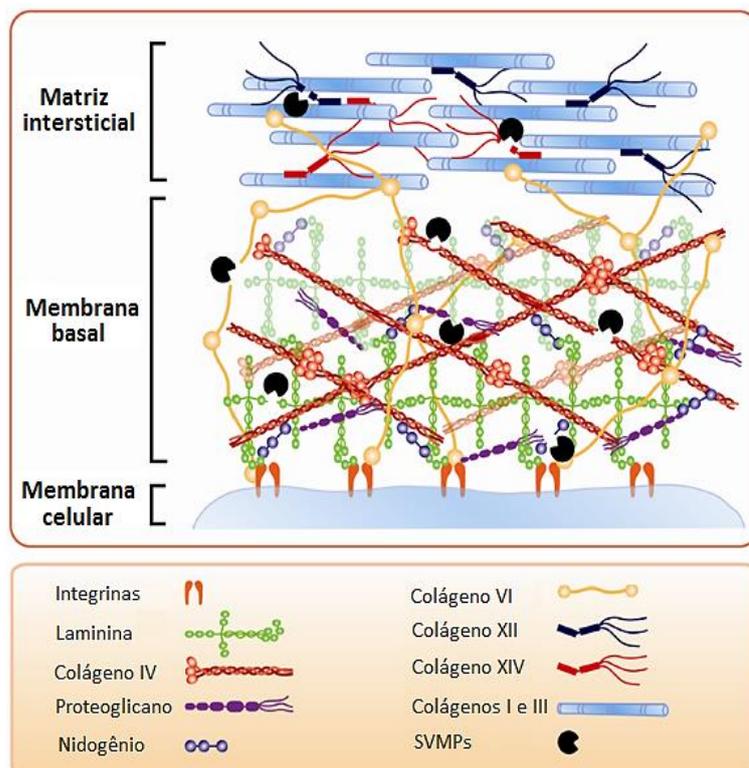
**Figura 5.** Resumo da ação das toxinas do veneno em diferentes sistemas (3).

### 1.3 Formação de flictenas

Os eventos fisiopatológicos envolvidos na formação de flictenas “bolhas”, tem grande cooperação das SVMPs, pois acarretam danos à membrana basal (MB) dos capilares e separação da junção dérmico-epidérmica, com ações proteolítica sobre componentes da matriz extracelular (MEC) (43).

As moléculas estruturais mais abundantes da MEC são colágenos, lamininas e proteoglicanos, e na membrana basal temos sobretudo lamininas e colágeno do tipo IV, que formam uma rede estrutural aderida as células endoteliais por meio das integrinas, que são receptores de membrana responsáveis por interações intercelulares (44,45). As SVMPs atuam sobre a matriz intersticial fibrilar que está subjacente a BM e interconectar o endotélio com o tecido vizinho (46).

SVMPs hemorrágicas das classes I, II e III agem na microvasculatura e hidrolisam proteínas adicionais da MEC, tendo como principal alvo o colágeno do tipo VI, laminina, nidogênio e proteoglicanos que conectam as proteínas estromais da matriz a MB. Também há hidrólise de componentes da membrana plasmática, como os receptores de integrina (**Figura 6**) (46).

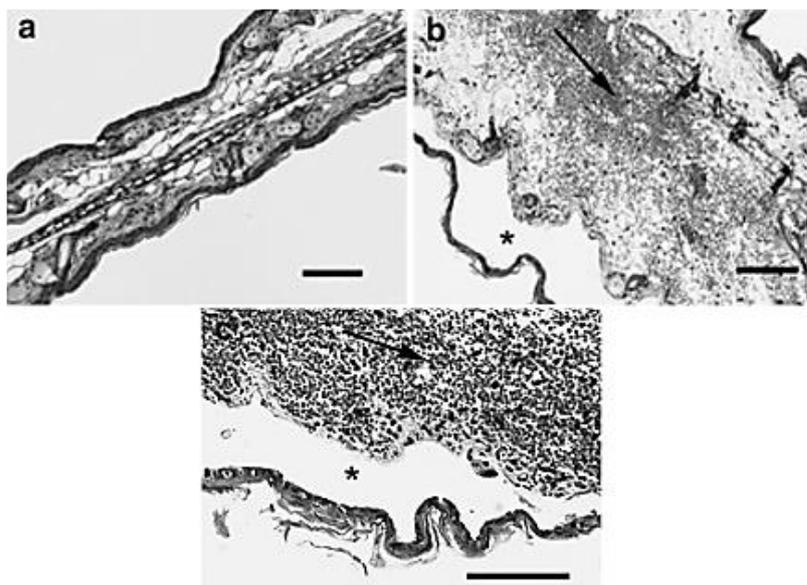


**Figura 6.** Hidrólise provocada por SVMPs (46).

As classes P-I e P-II hidrolisam preferencialmente componentes da microvasculatura, enquanto as P-I encontram-se mais disseminadas nos tecidos (46,47). As alterações proeminentes da hidrose na microvasculatura resulta no enfraquecimento e distensão dos microvasos, seguido do comprometimento das forças hemodinâmicas que se estendem as células endoteliais, fazendo com que haja o rompimento da parede celular e extravasamentos, com acúmulo de líquidos nos espaços intersticiais (48).

A ação catalítica sobre a BM dos tecidos é determinada pela presença da subunidade  $\alpha 3$  da laminina, proveniente da pele, assim como do colágeno estrutural

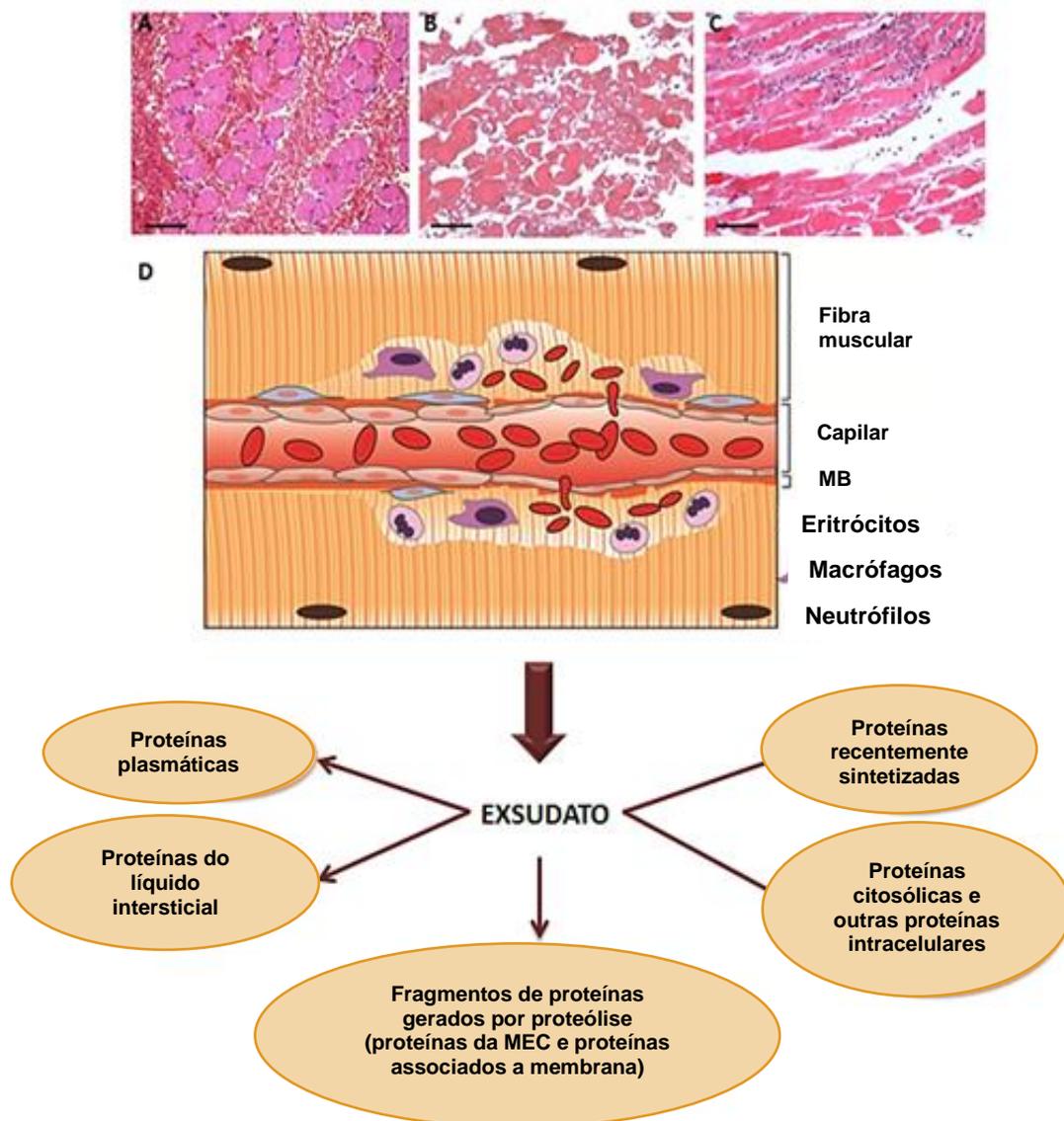
do tipo IV e outros componentes da interface dérmico-epidérmica, que juntamente com a ação hemorrágica é a base para formação das bolhas (**Figura 7**) (46,49,50).



**Figura 7.** Alterações histológicas induzida por SVMPS. (a) padrão histológico normal; (b) Após 1 hora da injeção da peçonha; (c) Após 6 horas, presença de inchaço proeminente, hemorragia (setas) e bolha em formação (\*), (43).

Neste cenário, há a liberação de peptídeos biologicamente ativos o que induz ao processo inflamatório, ativando a síntese de proteinases endógenas, tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam as proteínas que ligam e estruturam os colágenos fibrilares, promovendo uma cascata de desestabilização dos feixes de colágeno (46).

Gutiérrez et al., 2016 (46) exemplifica diferentes fontes de origem das proteínas exsudativas, sendo estas: (A) por citotoxicidade celular, como nas fibras musculares; (B) hidrólise de componentes da MEC, que leva ao dano direto nos tecidos e células residentes, como mastócitos e fibroblastos, que induz a liberação de mediadores, a formação de um infiltrado celular e edema; (C) infiltrado inflamatório composto predominantemente de células fagocíticas contribuindo na liberação de mediadores e proteinases e; (D) visão geral do dano induzido (**Figura 8**) (46).



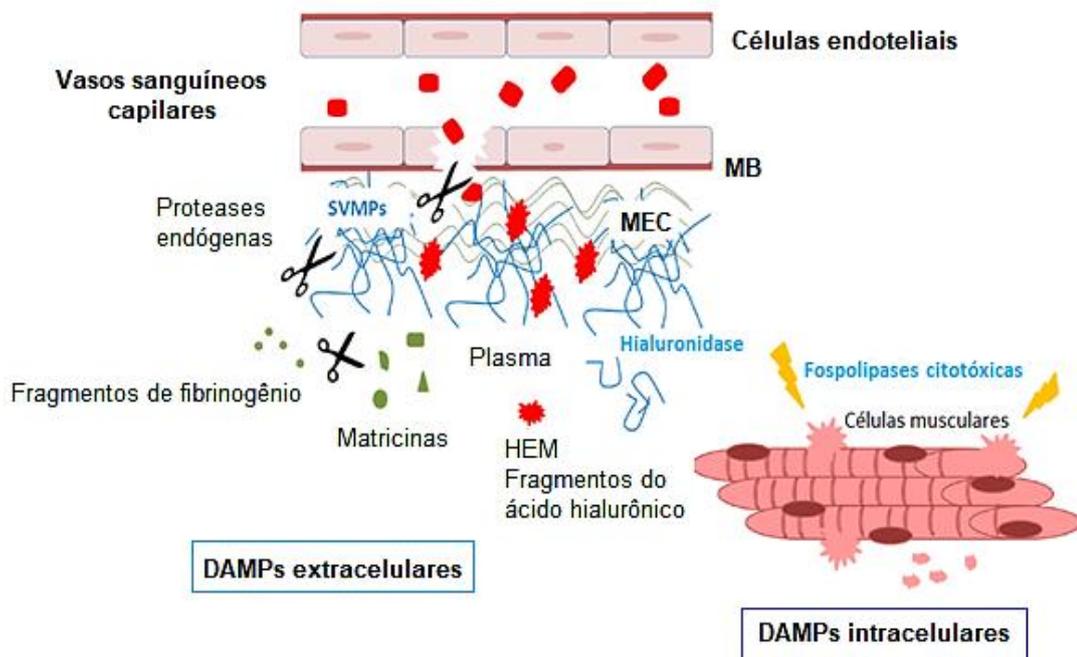
**Figura 8.** Representação esquemática das diferentes fontes de proteínas presentes no exsudato (46).

Outro componente que também atuam nesse processo e merecem destaque são as PLA<sub>2</sub>, que contribuem para lesão tecidual em virtude de sua atividade miotóxica (51). A integridade da membrana plasmática é rompida, e pode ser secundária à hidrólise dos fosfolípidios de membrana, ou por meio de interações hidrofóbicas causadas por homólogos cataliticamente inativos (36).

As miotoxinas provocam lise celular pelo aumento da permeabilidade da membrana ao íon Ca<sup>2+</sup>, o influxo de cálcio no citosol provoca hipercontração dos miofilamentos, além da ativação de proteinases e alterações mitocondriais, com lesões miotóxica permanentes (52).

Além disso, a participação das LAAO é atribuída a indução de apoptose, necrose e autofagia em queratinócitos, o que provoca alterações morfológicas e consecutiva morte celular (53). Os eventos catalíticos descritos anteriormente por todas as moléculas citadas sucedem ao extravasamento de exsudato para os tecidos, resultado do processo inflamatório decorrente da ação do veneno e levando a formação de edema e bolhas próximo ou a distância do local da picada (46).

O dano direto aos tecidos, particularmente decorrentes da necrose das fibras musculares e degradação da MEC, MB dos capilares, ácido hialurônico e outras moléculas da matriz, induz ao reconhecimento intracelular e extracelular de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que promove a ativação da resposta imune e liberação de inúmeros mediadores inflamatórios (**Figura 9**) (54).



**Figura 9.** Resumo hipotético dos eventos que levam ao dano do tecido injetado a peçonha botrópica (54).

Como descrito anteriormente, muitas porções do veneno resultam em danos locais, com alterações estruturais e conformacionais com subsequente formação de bolhas e recrutamento leucocitário (55). As bolhas podem desenvolver-se em proporções variáveis, com conteúdo claro, seroso, hemorrágico ou necrótico (**Figura 10**), observadas após as primeiras 24 horas do acidente (56), e em torno de 7 a 14 dias, ocorre o processo regenerativo na derme e epiderme (57).



**Figura 10.** Desenvolvimento de bolha no membro acometido. **Fonte:** acervo do Centro de Pesquisa Clínica em Envenenamentos por Animais Peçonhentos (CEPCLAM).

A presença de bolhas próximo ou a distância do local picado pode facilitar a entrada e proliferação de microrganismos, causando infecções secundárias, presente em 8,3% das complicações que são decorrentes de 6,6% dos casos de pacientes que apresentam esta complicação, conforme os dados clínico-epidemiológicos registrados na Amazônia (9,43,46).

#### 1.4 Tratamento

O tratamento indicado para neutralizar os efeitos do BaV consiste na administração da soroterapia. A solução contém imunoglobulinas específicas e purificadas, constituídas pela fração F(ab')<sub>2</sub> do plasma de equinos hiperimunizados (58,59).

No Brasil, o soro antitoxinotrópico (SAB) é constituído por imunoglobulinas produzidas com *pool* de peçonha botrópica, sendo 50% de veneno da *B. jararaca* e 12,5% de *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* (60,61). A produção é realizada principalmente pelo Instituto Butantan (IBU), Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Vital Brasil, sendo este um produto imunobiológico disponibilizado gratuitamente pela rede pública do Sistema Único de Saúde (SUS) (60).

O tratamento pode ser ajustado de acordo com a gravidade do acidente, baseado nos sinais e sintomas apresentados pelo paciente, ou seja, o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde recomenda um número de ampolas para cada caso, tal como pode ser visto no **quadro 01** (41).

**Quadro 1.** Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada em acidentes botrópicos:

Acidente	Antiveneno	Gravidade	Nº de ampolas
<b>Botrópico</b>	<sup>a</sup> SAB <sup>b</sup> SABL <sup>c</sup> SABC	<b>Leve:</b> Quadro local discreto; sangramento discreto na pele ou mucosas; pode haver distúrbio da coagulação.	2 - 4
		<b>Moderado:</b> Edema e equimosa evidentes; sangramento sem comprometimento do estado geral; distúrbio da coagulação.	4 - 8
		<b>Grave:</b> Alterações locais intensas; hemorragia grave; hipotensão ou choque; insuficiência renal; anúria e distúrbio da coagulação.	12

<sup>a</sup>SAB= Soro antibotrópico (pentavalente);

<sup>b</sup>SABL= Soro antibotrópico-laquéico (pentavalente);

<sup>c</sup>SABC= Soro antibotrópico-crotálico (pentavalente).

**Fonte:** Ministério da Saúde do Brasil. Guia de vigilância em saúde, 3ª edição (41).

### 1.5 Células imunes e resposta local e sistêmica aos envenenamentos

A inflamação é um processo de resposta imune gerado para restaurar a homeostase e estabelecer uma reconstituição tecidual após uma lesão, infecção ou irritação. No processo de defesa, há a participação de um conjunto de células e moléculas, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células *natural killer* (NK), proteínas do sistema complemento, quimiocinas, citocinas e eicosanoides (62,63).

As quimiocinas são capazes de induzir quimiotaxia de todas as células imunes, além disso, apresentam funções semelhantes as citocinas no que diz respeito ao

crescimento, diferenciação e ativação celular. Existem duas grandes principais famílias: CC e CXC, classificadas de acordo com os resíduos de cisteína N-terminal. As quimiocinas CC medeiam o recrutamento de neutrófilos e linfócitos, enquanto as CXC recrutam monócitos e subtipos de linfócitos. Na **(Tabela 1)**, encontram-se resumidos os principais alvos e efeitos biológicos das quimiocinas quantificadas no presente estudo (63).

As citocinas são proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa com funções das quais regulam e coordenam as células imunes para uma resposta regulatória ou inflamatória, sendo um dos principais mediadores de comunicação celular. Na **(Tabela 2)**, encontram-se resumidas as principais fontes, alvos e efeitos biológicos das citocinas avaliadas no estudo (63).

**Tabela 1.** Quimiocinas e funções biológicas:

<b>Quimiocina</b>	<b>Alvo / Efeito biológico</b>
<b>CXCL-8</b>	Ativação e atração de neutrófilos, além de basófilos e subpopulação de células endoteliais.
<b>CCL-5</b>	Recrutamento de diversos leucócitos como monócitos, macrófago, células dendríticas imaturas, células T e NK; além de aumentar a interação célula T/DC.
<b>CXCL-9</b>	Recrutamento de células T efetoras. Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK.
<b>CCL-2</b>	Tráfego de monócito.
<b>CXCL-10</b>	Recrutamento de células T efetoras; Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK.

**Tabela 2.** Citocinas e funções biológicas:

<b>Citocina</b>	<b>Fontes principais</b>	<b>Alvo / Efeito biológico</b>
-----------------	--------------------------	--------------------------------

**IL-1 $\beta$** 

Macrófagos,  
células  
dendríticas,  
fibroblastos,  
células  
endoteliais,  
queratinócitos e  
hepatócitos

**Células endoteliais:** ativação da inflamação e coagulação;

**Hipotálamo:** Febre;

**Fígado:** síntese de proteínas de fase aguda;

**Células T:** diferenciação Th17.

**IL-6**

Macrófagos,  
fibroblastos,  
células  
endoteliais,  
queratinócitos,  
hepatócitos e  
célula T e B

**Fígado:** Síntese de proteínas de fase aguda;

**Célula B:** Proliferação de células produtoras de anticorpos;

**Células T:** diferenciação Th17.

**IL-10**

Macrófagos e  
células T  
(principalmente  
T reguladoras)

**Macrófagos e células dendríticas:** Inibição da expressão de IL-2, coestimuladores e MHC de classe II.

**TNF**

Macrófagos,  
monócitos,  
neutrófilos,  
células NK e  
célula T

**Células endoteliais:** Ativação da inflamação e coagulação;

**Neutrófilo:** Ativação;

**Hipotálamo:** Febre;

**Fígado:** Síntese de proteínas de fase aguda.

**IL-12p70**

Macrófagos e células dendríticas	<b>Células T:</b> diferenciação Th1; <b>Células NK e células T:</b> Síntese de IFN- $\gamma$ , ativação de citotóxica aumentada.
----------------------------------	---

**Fonte:** (63–65).

Os mediadores inflamatórios são essenciais no processos de ativação e recrutamento celular, produzidos e liberados na circulação ou em áreas adjacentes da lesão por células residentes (macrófagos, DCs e células endoteliais) (66,67). Os componentes do BaV atuam no papel de mediadores e estão envolvidos no processo inflamatório, desencadeando mecanismos imunes pela combinação com as toxinas (68,69).

Após o dano, a resposta inflamatória aguda é induzida e envolve diversas modificações funcionais, representadas por três principais alterações: 1 - modificações variadas no calibre dos vasos e no fluxo sanguíneo, por ação de substâncias vasoativas, como a histamina; 2 - modificações estruturais na microvasculatura, possibilitando que proteínas e células deixem a circulação pelo extravasamento extravascular de fluídos plasmáticos; 3 - migração dos leucócitos, com passagem coordenada de células para o local com dano (65,70,71).

Todo este processo é classicamente representado por cinco sinais cardinais: Dor, Calor, Rubor, Edema e Perda de Função (71). Tais sinais são induzidos inicialmente pelo dano ou qualquer estímulo que gere resposta do hospedeiro, seguido de sucessivas ativações celulares (62,72).

O processo quimiotático decorrente da ativação de células residentes leva a migração de leucócitos circulantes, primeiramente de neutrófilos sendo posteriormente substituído por monócitos e macrófagos que sintetizam mediadores quimiotáticos. Essas células, por sua vez, recrutam outros perfis celulares ao mesmo tempo que estimulam a produção de mais mediadores inflamatórios, gerando um processo de retroalimentação da resposta inflamatória (63,73).

As DCs são células fagocíticas da imunidade inata presente nos tecidos linfoides, no epitélio das mucosas e nos parênquimas dos órgãos e, em virtude disso, atuam como sentinela nos tecidos. Apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, unicamente capazes de ativar os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> virgens, e uma vez ativados, se diferenciam em células efetoras, iniciando a resposta adaptativa. Graça aos diversos receptores de superfície celular, como os receptores do tipo *toll-like* (TLR), as DCs reconhecem DAMPs e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (63,74).

No processo da apresentação, as DCs podem expressar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, necessários para o reconhecimento dos antígenos (Ag) pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente. As DC residentes da epiderme também são chamadas de células de *Langerhans*, e tem como principal função a captura antigênica, enquanto as DCs maduras apresentam altos níveis do complexo peptídeo-MHC, receptores para quimiocinas (CCR1, CCR5 e CCR6) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) dentre outras moléculas necessárias para ativação linfocitária (63,75).

Durante o processo de maturação essas células podem se diferenciar em subpopulações de DCs convencionais, DCs plasmocitóides e em alguns casos, no tecido inflamado, a partir de monócitos, em DCs inflamatórias. Isso é possível devido ao precursor comum mielóide, e todas as subpopulações atuam como fonte de citocinas inflamatórias. A resposta das DCs plasmocitóides se diferem das demais por sua capacidade de produzir interferon (IFN) do tipo I em respostas antivirais, no entanto, também são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de Ag do sangue transportados para o baço (63,76,77).

Monócitos são fagócitos mononucleares que quando recrutados aos tecidos, se diferenciam em macrófagos. As subpopulações se diferenciam de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16 em: monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), não-clássicos/patrolhadores (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) e intermediários/inflamatórios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). Cada um desses subconjuntos atua em uma resposta diferencial e todos quando ativados podem se diferenciar em macrófagos (78–80).

De modo geral, os monócitos clássicos e inflamatórios são recrutados para o sítio da lesão e secretam citocinas pró-inflamatórias, intensificando o recrutamento de mais monócitos e outras populações celulares para o local de infecção ou inflamação.

Enquanto os patrulhadores atuam no processo de reparação tecidual, estimulando a angiogênese, além de percorrer ao longo das superfícies endoteliais em patrulha, e por isso, também são chamados de monócitos patrulhadores (63,81).

Os linfócitos T e B são células que expressam receptores a Ags específicos distribuídos clonalmente e induzem a resposta adaptativa celular e humoral, respetivamente. A resposta imune celular é mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, o reconhecimento e ativação requer a estimulação do receptor de células T (TCR), além de sinais co-estimulatórios. A eliminação do Ag corresponde a fase efetora, onde há um aumento dos clones específicos (expansão clonal) e, após a resposta, uma porção dessas células entram em apoptose e outra sobrevive para garantir a memória imunológica (82,83).

Os linfócitos CD4<sup>+</sup> ou T regulatórios atuam principalmente na secreção de citocinas que recrutam, estimulam ou regulam os leucócitos e, de acordo com as citocinas que são liberadas no início da resposta, se diferenciam em th1, th2 e th17. Já os CD8<sup>+</sup>, são linfócitos citolíticos ou citotóxicos que reconhecem Ags intracelulares via MHC de classe I, o que promove liberação de seus grânulos (perforina e granzimas), morte da célula alvo, ativação de macrófagos e inflamação (63,84,85).

Células *natural killer* (NK) e T *natural killer* (NKT) são um subconjunto de linfócitos que podem ativar ou suprimir as respostas imunes. NKT reconhece lipídeos e glicolipídeos ligados a molécula CD1, liberando IL-4 e IFN- $\gamma$ , o que ativa mais NKT, DCs, macrófagos, linfócitos B e aumenta a ação das NK. Matadoras profissionais, ambas apresentam função citotóxica semelhante aos T CD8<sup>+</sup>, liberando granzimas e perforinas que destroem células opsonizadas, infectadas e/ou lesadas, além disso, as NK atuam na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) (63,86–88).

A imunidade humoral é mediada por linfócitos B que reconhecem Ags extracelulares, proliferam e se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos (Ac) de diferentes classes e funções. Proteínas, polissacarídeos, lipídeos e pequenas moléculas ativam plasmócitos que liberam Acs dos quais opsonizam microrganismos, ativam fagócitos, sistema complemento, promovem lise celular e inflamação, além de atuar como APC ativando células T (63,89,90).

A resposta humoral pode ser dependente ou independente dos linfócitos T auxiliares. O reconhecimento de Ags proteicos requer sinais de ativação dos linfócitos

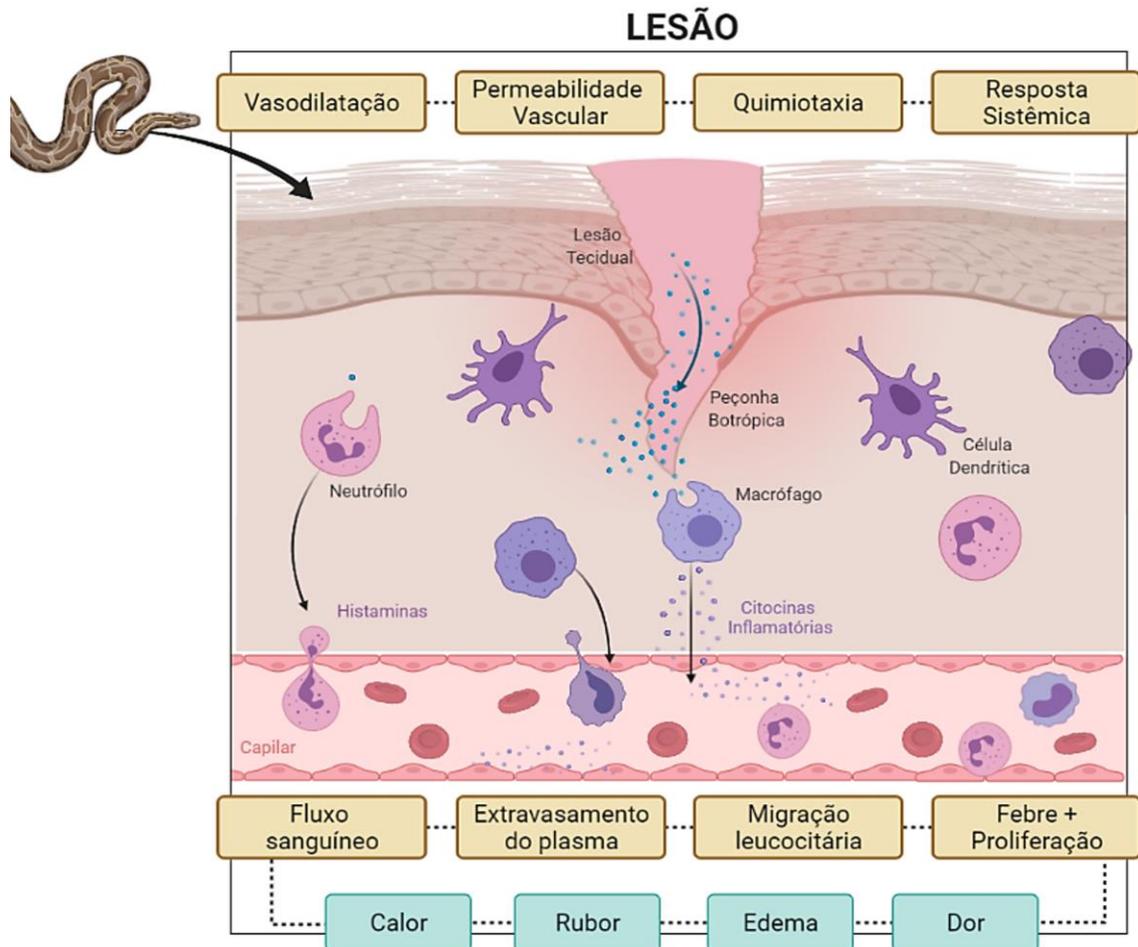
T CD4<sup>+</sup>, que aumenta a afinidade dos Acs aos Ags proteicos. Contrariamente, o reconhecimento de Ags não proteicos é realizado de forma independente de T CD4<sup>+</sup>. Os Acs sintetizados podem ser encontrados na superfície das células B, atuando como receptores, bem como nas secreções mucosas e fluídas (63,91).

Devido às várias classes de toxinas encontradas no veneno e seus mecanismos citotóxicos, miotóxicos, coagulantes e/ou hemorrágicos, a geração de um processo inflamatório agudo é inevitável (40,41,92). A inflamação aguda induzida pelo veneno gera uma resposta com acúmulos de leucócitos e liberação de mediadores endógenos, levando o endotélio a expressar moléculas de adesão, liberar citocinas e eicosanoides no local da picada, amplificando a reação inflamatória **(Figura 11)** (68,93).

A resposta celular induzida pelo envenenamento botrópico foi descrita pela primeira vez em um estudo realizado em modelo animal, após injeção da peçonha de *B. asper* em camundongos. Ao avaliar o tempo e a composição do infiltrado inflamatório, foi evidenciado um perfil celular com predominância de componentes polimorfonucleares nos tempos de 6 a 24 horas, e aumento da população de macrófagos em 48 a 72 horas (94).

A presença de DAMPs no material intramuscular exsudativo foi identificado no envenenamento botrópico com diferenças significativas nas concentrações, assim como a liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas nos tempos de 1 a 24 horas após envenenamento, o que pode expandir as alterações teciduais e exacerbar as reações inflamatória (54,95).

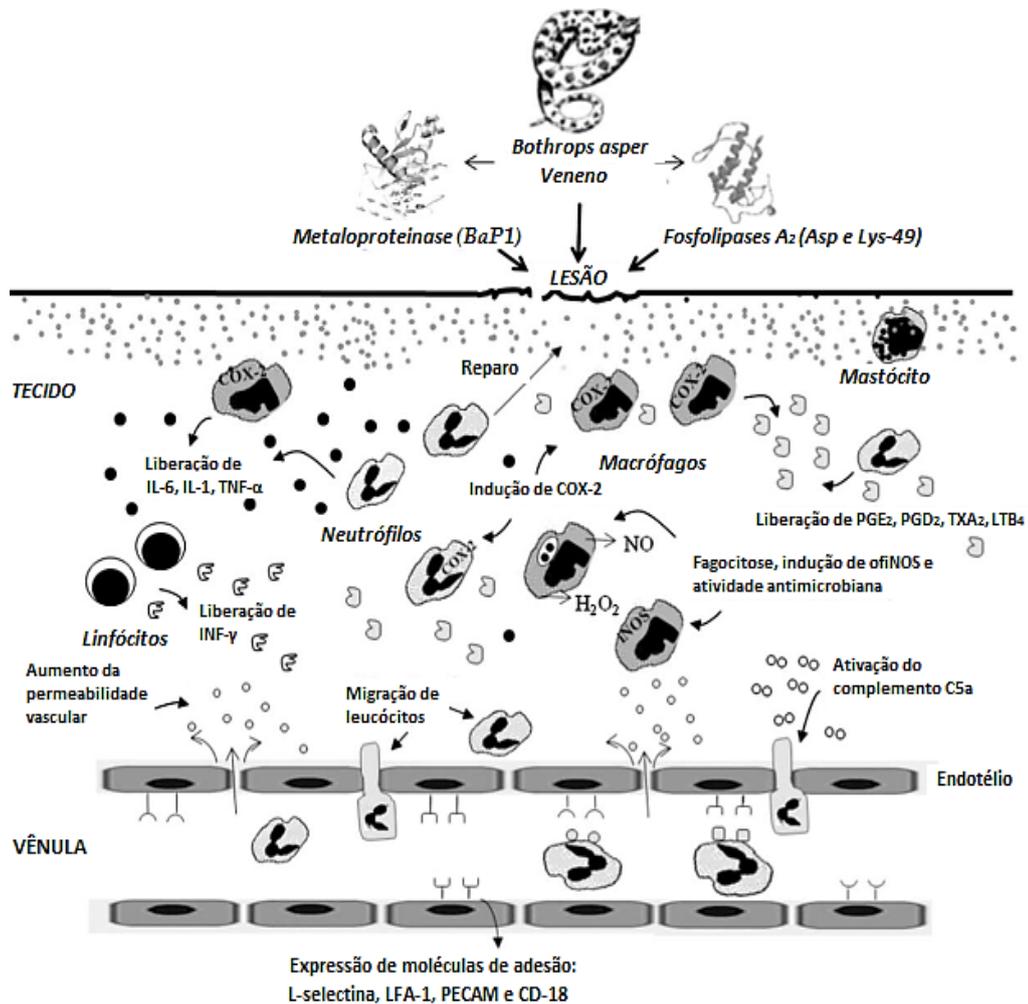
PAMPs e DAMPs gerados durante o processo de resposta aos envenenamentos ocasionados por animais peçonhentos, atualmente, são associados a teoria de padrões moleculares associados ao veneno (VAMPs), e dá suporte do reconhecimento por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como TLR, com participação de TLR-2, TLR-4 e CD14 na resposta ao veneno (96,97).



**Figura 11.** Ilustração dos eventos inflamatórios (63). **Fonte:** <https://biorender.com>; Neves, 2021.

Há expressão e liberação de citocinas pró-inflamatória de fase aguda, do mesmo modo, há atuação de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), provocando um aumento do calibre dos vasos pela dinâmica de atuação dos eicosanóides e citocinas, como as prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, que participam dos efeitos patológicos locais e promove infiltrado leucocitário (93,98,99).

O BaV também induz a fagocitose e funções microbicidas de leucócitos peritoneais *in vivo*, com conseqüente produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NOS) por células mononucleares, como macrófagos, o que aumenta a capacidade inflamatória. Além disso, o aumento da expressão de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) influencia a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), em resposta aos acidentes (**Figura 12**) (100–102).



**Figura 12.** Representação esquemática dos eventos inflamatórios locais e mecanismos hipotéticos da ação inflamatória induzida por PLA<sub>2</sub> e SVMPs do veneno de *B. asper* (103).

Os níveis de expressão de PGE<sub>2</sub> e da Ciclooxygenase-2 (COX-2) em tecidos de camundongos indicam a presença dos metabólitos do ácido araquidônico (AA) via COX-2 e, produção de eicosanóides locais, o que induz a formação de edemas (102–104). Adicionalmente, observa-se aumento na expressão das moléculas de adesão no endotélio e em leucócitos, como L-lectina, E-selectina, molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) que promovem um processo sequencial de rolamento, adesão e transmigração das células para o local afetado pelo veneno (**Figura 12**) (103).

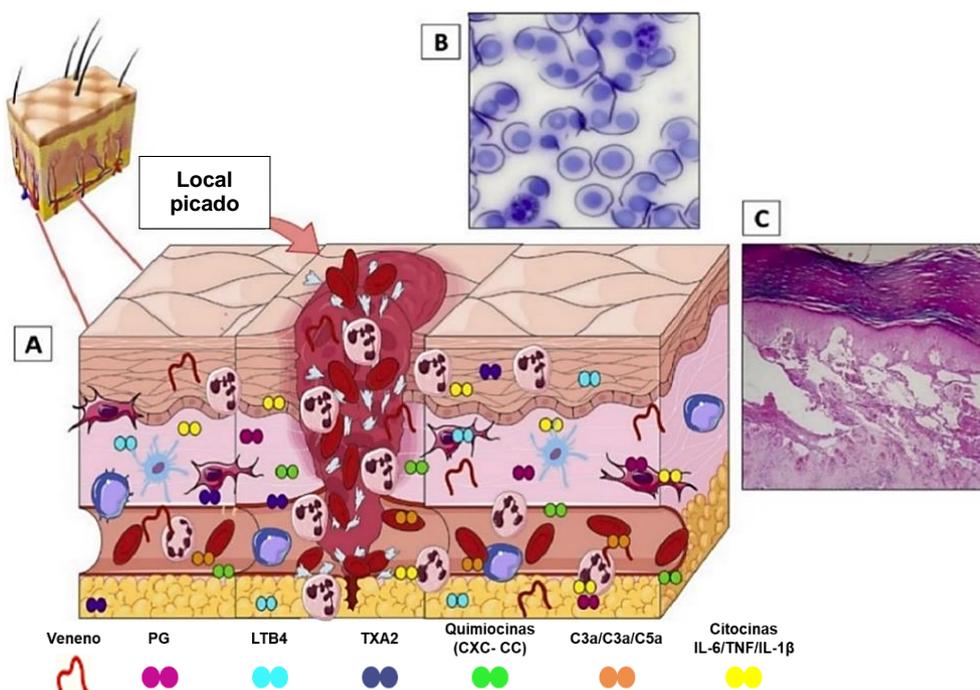
Na resposta humoral, a produção de Abs é desencadeada pelo reconhecimento das toxinas do veneno e tem por finalidade a neutralização destes componentes. No entanto, esse processo envolve várias etapas essenciais, como a captura e apresentação das partículas antigênicas, interação com as células que expressam

peptídeos via MHC de classe I ou II, além do processamento e apresentação na superfície das células para produção e liberação dos Acs (105).

Como mencionado acima, as citocinas exercem um importante papel na modulação da resposta imune, atuando na ativação e recrutamento de diversas populações celulares, como monócitos, macrófagos, DCs, células B, NK, TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (63). A lectina de *B. jararacuçu* induz a interação dos fenótipos de célula B, monócitos (CD14<sup>+</sup>), NK (CD16<sup>+</sup>), e subpopulações de células T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) do sangue periférico humano. Este padrão de resposta foi avaliado pelo acoplamento da peçonha botrópica a molécula de fluorescência FITC, que possibilitou observar um direcionado inflamatório de NK e monócitos pela liberação de TNF- $\alpha$ , e regulatório pela liberação de IL-10 por células TCD4<sup>+</sup> (26).

O sistema complemento também está envolvido na inflamação aguda induzida pelo BaV em resposta à geração de fragmentos proteolíticos (106,107). Nesse contexto, observa-se a participação das anafilatoxinas C3a, C4a, e C5a e quimiocinas CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2 e CXCL-10 em diferentes concentrações de forma local e sistêmica, onde CCL-2 e CXCL-10 demonstram ser potenciais biomarcadores da complicação tecidual grave, consequente da formação de bolhas no local picado. E isso, aponta possíveis biomarcadores de moléculas, ressaltando assim, a importância de estudos sobre um possível biomarcador celular (108).

O intenso processo inflamatório resultante dos danos locais exemplificados, estão representados na **(Figura 13)**. No quadrante (A) observamos a participação esquemática de diversas populações celulares e componentes do veneno; a ação das células fagocíticas no (B), com presença de vacúolos citoplasmáticos na resposta local e intensa migração dos leucócitos, além do descolamento da camada superior da pele acometida com bolha (C) (40).



**Figura 13.** Ilustração do processo inflamatório local induzido pelo acidente por *B. atrox* (40).

Apesar da importância da resposta celular na inflamação, ainda são escassos os estudos que denotem perfis de resposta a acidentes ofídicos (93). Com isso, compreender os mecanismos é altamente relevante para se obter uma visão mais abrangente do ambiente inflamatório e da participação das distintas populações celulares e seus perfis de ativação, o que corroboraria com a produção de novos tratamentos (109,110).

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os processos inflamatórios decorrentes da ação da peçonha de *B. atrox*, a principal causadora de acidentes na região Norte, é pouco descrito na literatura, assim como a influência da resposta mediada por células e perfis envolvidos, e isso ressalta um problema de saúde pública amplamente negligenciado, com poucos estudos na literatura envolvendo seres humanos, sobretudo com biomarcadores de prognóstico.

Diante destas informações, avaliar o perfil de células imunes locais e sistêmicas envolvidas na resposta dos pacientes acidentados por *B. atrox* torna-se importante,

visto que tais análises podem subsidiar informações sobre o envolvimento de células e moléculas imunes com a evolução clínica destes pacientes.

Tais resultados podem demonstrar a atuação dos perfis celulares em diferentes quadros clínicos antes e após o tratamento, podendo gerar dados de base para estudos futuros, com proposta de um possível biomarcador celular de prognóstico clínico, além da implantação de possíveis alvos terapêuticos, reduzindo o tempo de internação e os custos para o Sistema Único de Saúde (SUS).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Avaliar o perfil celular envolvido na resposta imune local e sistêmica em pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos na Amazônia brasileira.

#### **3.2 Específicos**

- I. Descrever o perfil morfométrico e imunofenotípico das células envolvidas na resposta imune local e sistêmica em pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos da Amazônia brasileira;
- II. Correlacionar os perfis celulares e moléculas dosadas com a evolução clínica de pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos oriundos da Amazônia brasileira.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Aspectos éticos**

Este trabalho faz parte de um projeto que tem como título **“Avaliação das Manifestações Locais e Perfil Celular Envolvido na Resposta Imune em Pacientes de Acidentes Ofídicos Botrópicos na Amazônia brasileira”** e foi aprovado pelo Comitê de Ética (Parecer: 2.831.006, CAEE: 92017118.3.0000.0005) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), (Anexo I).

Todos os procedimentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa seguem as diretrizes presentes na “Resolução 466/12” do Conselho Nacional de Saúde e Pesquisas envolvendo seres humanos e encontram-se descritos com clareza no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (**Anexo II**). Além disso, os pacientes foram tratados e acompanhados conforme as normas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil (111).

#### **4.2 Modelo de estudo**

Trata-se de um estudo do tipo analítico, longitudinal e prospectivo do centro de pesquisa clínica em envenenamento por animais peçonhentos (CEPCLAM) da FMT-HVD. Neste estudo, buscamos avaliar o perfil de células e moléculas locais/sistêmicas envolvidas na resposta imunológica em vítimas de acidentes ofídicos causados por *B. atrox* para subsidiar informações sobre o envolvimento dessas células na evolução clínica dos pacientes acometidos.

#### **4.3 Área de estudo**

O estudo foi realizado na FMT-HVD instituição vinculada à Secretaria de Saúde do Governo do Estado do Amazonas, responsável pelo diagnóstico e tratamento de doenças tropicais e infecciosas. Fundação considerada uma unidade de referência na região Norte em atendimentos de acidentes ofídicos, recebendo pacientes oriundos tanto da capital do estado (Manaus), quanto dos municípios do interior do Amazonas e de outros estados.

A caracterização morfometria e imunofenotípica das células e a dosagem das moléculas, assim como a obtenção do grupo controle foi realizada em parceria com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), no período de março de 2019 a março de 2021.

#### 4.4 Critérios de elegibilidade

Para análise do perfil morfológico e imunofenotípico das populações celulares estudadas, foi estipulado os seguintes critérios de elegibilidade:

- **Incluídos no estudo:** Pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópico; na faixa etária de 18 a 70 anos e que não realizaram soroterapia prévia;
- **Não incluídos no estudo:** Gestantes, indígenas e indivíduos com doenças inflamatórias previamente informadas, como doenças autoimunes ou imunodeficiência;
- **Excluídos do estudo:** Pacientes com amostra insuficientes ou malconservadas e os que retirarem seu consentimento de participação do estudo.

#### 4.5 Plano amostral

A população do estudo consiste em 48 indivíduos vítimas de acidente ofídico com características botrópica que procuraram atendimento na FMT-HVD. A identificação das serpentes foi realizada por um zoólogo do grupo de pesquisa e os pacientes foram recrutados por demanda espontânea. O acompanhamento dos pacientes ocorreu em três momentos: antes da soroterapia (T0); 24 horas após o início da soroterapia (T1) e a partir de 48 horas do início da soroterapia (T2).

#### 4.6 Coleta das amostras

Após adesão ao estudo, foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue periférico (T0, T1 e T2) por punção venosa em tubos com sistema a vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, *BD Vacutainer® EDTA K2*). Além disso, o material exsudativo das bolhas de pacientes com complicação local grave foi coletado no (T2) por aspiração, obtendo um volume amostral variado de 200 a 300 µL.

Após as coletas, as amostras foram centrifugadas (3.500 RPM por 10 minutos) para a aquisição de uma alíquota de plasma para realizar as análises

imunofenotípicas, e outra alíquota de aproximadamente 900 µL foi armazenada no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Fundação HEMOAM em *freezer* a -80°C, onde posteriormente foram realizadas dosagem das moléculas imunes.

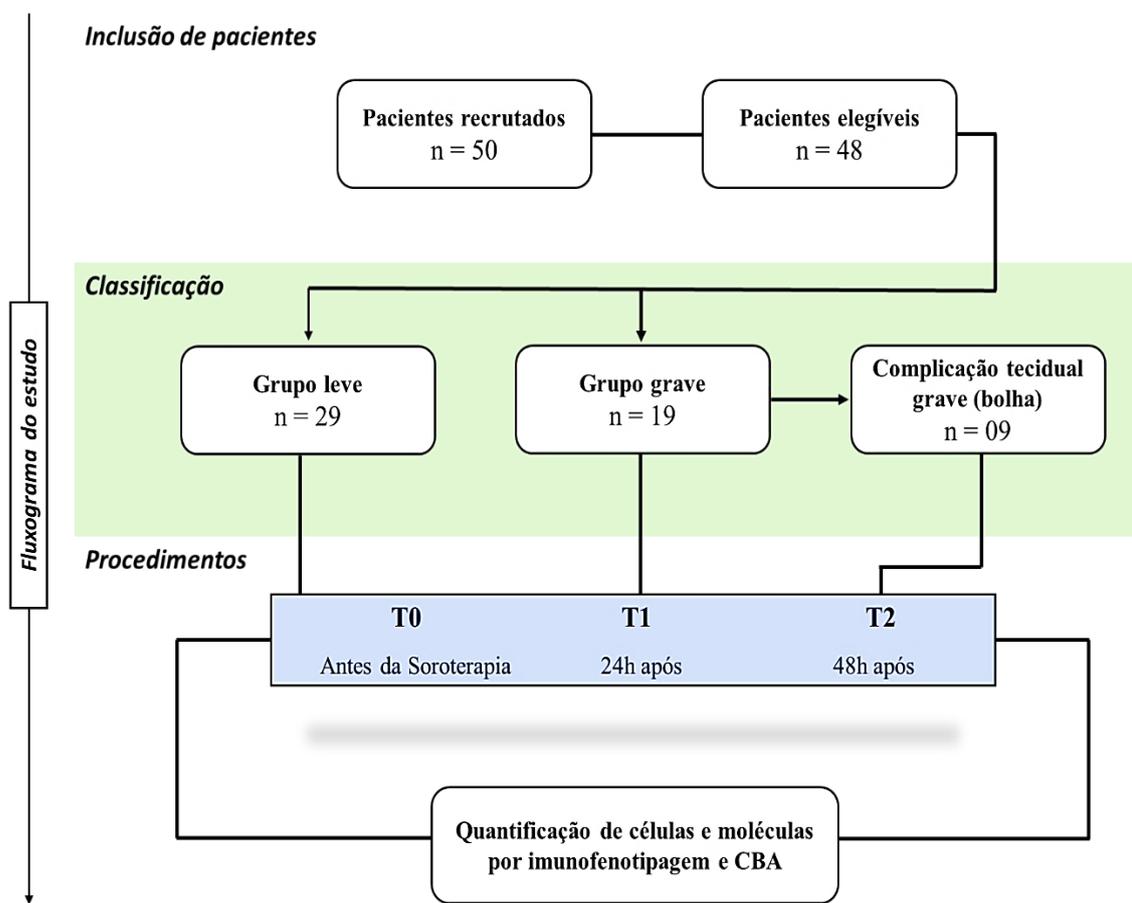
#### 4.7 Caracterização dos grupos de estudo

A classificação dos acidentes foi realizada de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde. Pacientes que não apresentaram manifestações locais/sistêmicas graves nas primeiras 48 horas após o acidente e administração do antiveneno, demonstrando apenas um quadro clínico discreto ou ausente de dor, edema e sangramentos, e sem complicação tecidual grave, foram enquadrados no grupo leve (41).

Enquanto aos pacientes que manifestaram desfechos de alterações locais/sistêmicas intensas, como hemorragias graves na pele ou mucosas, distúrbios na coagulação, equimoses ou púrpuras no local ou a distância do membro acometido, com complicação tecidual grave e formação de bolhas, foram enquadrados no grupo grave (41).

Participantes com acidente de classificação moderada, com presença de edema, equimose e sangramentos evidentes, mas sem comprometimento do estado geral, foram agrupados ao grupo leve, pois não evidenciamos diferenças estatisticamente significativas entre as manifestações clínicas apresentadas quando comparados com o grupo leve.

No presente estudo foram recrutados 50 pacientes, dos quais obtivemos 48 pacientes elegíveis, divididos em dois grupos de acordo com a classificação do acidente, sendo 29 leves e 19 graves, e dos pacientes graves, 09 apresentaram complicação tecidual grave e formação de bolhas (**Figura 14**).



**Figura 14.** Relação dos pacientes recrutados e análise temporal. **Fonte:** elaborado pelo autor, 2021.

#### 4.8 Caracterização do grupo controle

O Grupo Controle (GC), incluído no estudo, consiste em uma população amostral composta por 48 indivíduos candidatos a doação de sangue, que se apresentaram na Fundação HEMOAM, de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos, sem reatividade para os testes de triagem sorológica realizadas pelos hemocentros brasileiros ou doença inflamatória prévia informada e sem histórico de acidentes ofídicos.

#### 4.9 Obtenção de dados clínicos e epidemiológicos

Os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes foram obtidos por intermédio de um questionário semiestruturado pré-definido contendo variáveis básicas, a citar

sexo, idade, acidente anterior, zona de ocorrência, classificação do acidente e região anatômica acometida (**Anexo III**). Os demais dados foram obtidos por meio de consulta aos prontuários eletrônicos (sistema iDoctor) da FMT-HVD visando alcançar uma maior confiabilidade das informações adquiridas.

#### **4.11 Aquisição dos parâmetros hematológicos**

Foram efetuadas análises quantitativas e qualitativas das amostras de sangue periférico no T0, T1 e T2 para avaliação dos percentuais presentes no eritrograma, leucograma e plaquetograma. O hemograma foi realizado no setor de Hematologia da Fundação HEMOAM por meio do equipamento *ADVIA® 2120i, Hematology System (Siemens Healthcare Diagnosis)*.

#### **4.12 Caracterização morfométrica e imunofenotípica através da técnica de citometria de fluxo**

A caracterização imunofenotípica das amostras foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. O princípio da técnica está na incidência de uma fonte de luz que intercepta cada partícula em suspensão, gerando espectros de onda em diferentes comprimentos (**Figura 15**) (112).

Utilizamos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos pelas ligações a epítopos específicos de alta afinidade a grupamentos de diferenciação ou *cluster* de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*, geralmente abreviado como CD) (113–115). Além disso, a análise morfométrica possibilita obtenção de dados de dispersão frontal da luz (*Forward scatter - FSC*), que geram informações sobre o tamanho celular e dados de dispersão lateral (*Side scatter - SSC*) que estimam a granulosidade (115).

A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo FACS Canto II (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação HEMOAM. Para a identificação das populações celulares utilizado o programa *FlowJo* (v9.4), onde foram elaboradas “*gates*” para a seleção das populações de interesse em gráficos que

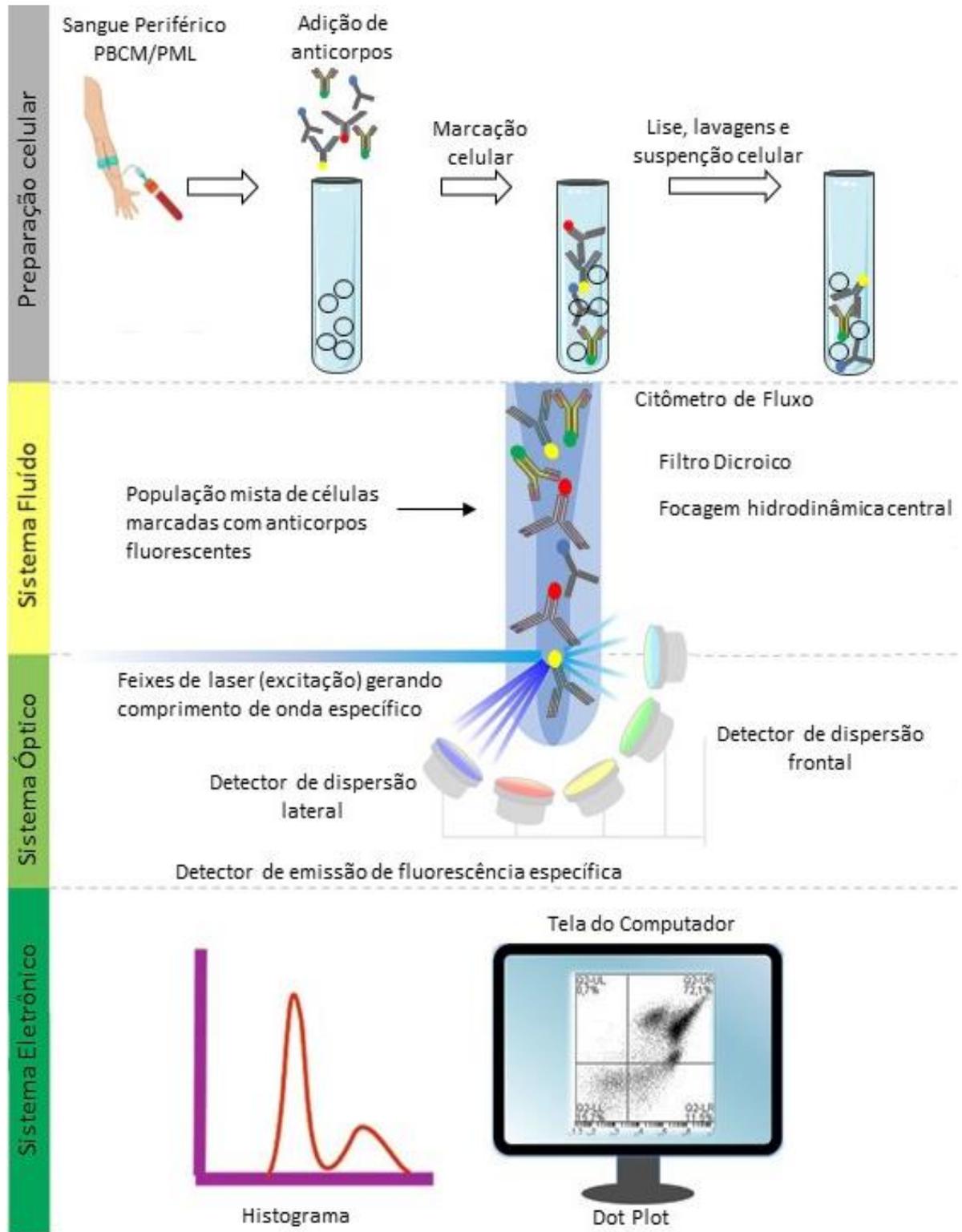
combinaram características morfológicas e imunofenotípicas das células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “dot plot” e histograma, para melhor visualização das estratégias de análises. O painel de anticorpos marcados utilizados nas células do sangue periférico encontram-se descritos na **(tabela 03)**, enquanto o painel de anticorpos marcados utilizados nas análises do conteúdo exsudativo das bolhas encontram-se descritos na **(tabela 04)**, e todo protocolo descrito no **(Anexo IV)**.

**Tabela 3.** Painel de marcação de superfície das células do sangue periférico:

<b>Tubos</b>	<b>Perfil fenotípico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Volume</b>
<b>1</b>	<i>Controle Negativo</i>	-	-	10µL (PBS-W)
<b>2</b>	<i>Monócitos e Ativação Celular</i>	<i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-HLADR</i>	FITC APC PE	2 µL 1 µL 2 µL
<b>3</b>	<i>Células NK e NKT</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD56</i>	PE-Cy7 FITC PE	1 µL 1 µL 5 µL
<b>4</b>	<i>Células Dendríticas</i>	<i>Human Anti-CD123</i> <i>Human Anti- CD11c</i> <i>Human Anti-CD14</i>	FITC PE APC	2 µL 5 µL 1 µL
<b>5</b>	<i>Células B e B1</i>	<i>Human Anti-CD5</i> <i>Human Anti-CD19</i>	PE FITC	1 µL 1 µL
<b>6</b>	<i>Células T T CD4+ e T CD8+</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD4</i> <i>Human Anti-CD8</i>	FITC PE-Cy7 PE	1 µL 1 µL 1 µL

**Tabela 4.** Painel de marcação de superfície de células do conteúdo exsudativo das bolhas:

<b>Tubos</b>	<b>Perfil fenotípico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Volume</b>
<b>1</b>	<i>Controle Negativo</i>	-	-	10µL (PBS-W)
<b>2</b>	<i>Monócitos e Ativação Celular</i>	<i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-HLADR</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC APC PE PERCEP	2 µL 1 µL 2 µL 2 µL
<b>3</b>	<i>Células NK e NKT</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD56</i> <i>Human Anti-CD45</i>	PE-Cy7 FITC PE PERCEP	1 µL 1 µL 5 µL 2 µL
<b>4</b>	<i>Células Dendríticas</i>	<i>Human Anti-CD123</i> <i>Human Anti-CD11c</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC PE APC PERCEP	2 µL 1 µL 1 µL 2 µL
<b>5</b>	<i>Células B e B1</i>	<i>Human Anti-CD5</i> <i>Human Anti-CD19</i> <i>Human Anti-CD45</i>	PE FITC PERCEP	1 µL 1 µL 2 µL
<b>6</b>	<i>Células T TCD4+ e TCD8+</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD4</i> <i>Human Anti-CD8</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC PE-Cy7 PE PERCEP	1 µL 1 µL 1 µL 2 µL



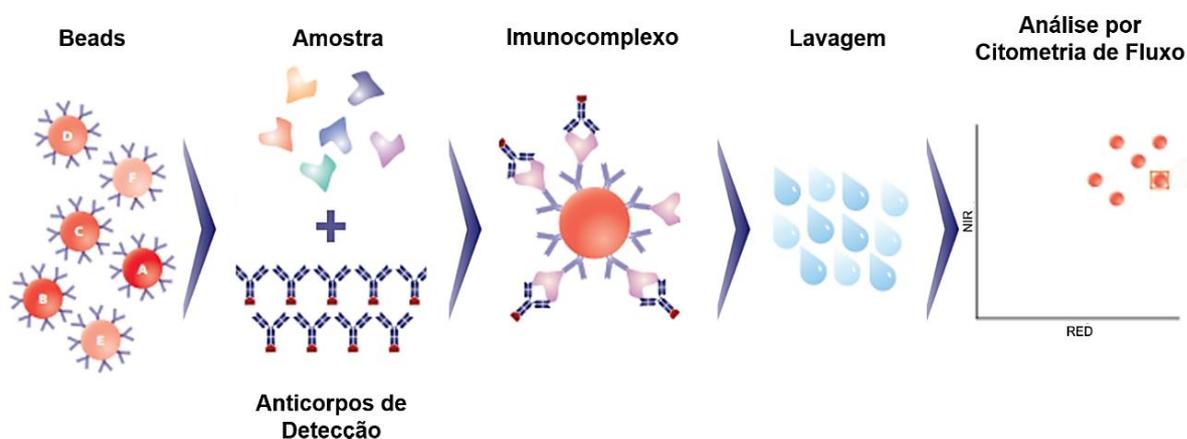
**Figura 15.** Representação esquemática da técnica de citometria de fluxo. Adaptado de Menon *et al.*, 2014 (116).

#### 4.13 Quantificação das moléculas solúveis circulantes por CBA

As moléculas solúveis foram quantificadas utilizando a técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*). Esta técnica possibilita a quantificação de moléculas através do uso de *beads*, que são esferas sintéticas recobertas por anticorpos específicos para a captura das moléculas escolhidas. Adiciona-se a amostra do paciente e anticorpos de detecção, marcados com fluorocromos que fornecem sinais fluorescência. As etapas do método encontram-se explanados no **(Anexo V)**.

Utilizamos o kit BD *Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine* (Code N<sup>o</sup> 552990, Catalog 92121, Biosciences, San Diego, CA, USA) para medir quantitativamente as quimiocinas CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10. Enquanto para as medições quantitativas das citocinas/interleucinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF empregamos o kit BD™ *CBA Human Inflammatory Cytokines* (Catalog No. 551811, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descrita pelo fabricante de cada kit.

O reagente de detecção é uma mistura de ficoeritrina (PE) conjugada a anticorpos, que fornecem um sinal fluorescente em proporção com a quantidade de analito ligado. Quando os grânulos de captura e o reagente detector são incubado com uma amostra contendo analitos reconhecidos, há formação dos imunocomplexos. Realizam-se etapas de lavagem para a retirada de componentes que não se ligaram, posteriormente análise de detecção **(Figura 16)**.



**Figura 16.** Etapas de realização da técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*) - Multiplexed Bead-Based Immunoassays (117).

A aquisição das amostras, foi realizada no Citômetro de Fluxo FACS Canto II (BD® Biosciences, San Jose, CA, EUA) fornecido pela fundação HEMOAM, em conjunto com o *software* FCAP-Array™ (v3.01) para calcular os níveis de citocinas e quimiocinas (MFI).

#### 4.14 Plano analítico

A organização e tabulação dos dados clínicos-epidemiológicos obtidos durante o estudo por meio de questionários, prontuários físicos/eletrônicos e resultados da contagem celular, foram inseridos em um banco de dados no Microsoft Excel® 2016. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPadPrism v8.0 (San Diego, CA, EUA).

A princípio foi avaliada a normalidade de distribuição dos dados através do teste de *Shapiro-Wilk*, que apontaram resultados de distribuição não-paramétrica. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPadPrism (v8.0), onde foram formulados testes de *Shapiro-Wilk* para averiguar a normalidade dos dados, mostrando resultados de distribuição não-paramétrica. As comparações dos valores obtidos entre os grupos de amostras independentes locais e séricas foram realizadas por meio do teste *t Student* e *Mann-Whitney*. Enquanto para análises de amostras pareadas foi aplicado o de *Wilcoxon*. Os níveis de significância estatística foram estabelecidos quando  $p < 0,05$ .

A elaboração de *networks* (redes) e demonstração das interações complexas entre as células avaliadas, foram realizadas a partir da associação das mesmas dentro de cada grupo clínico, formuladas no *software* Cytoscape 3.0.3 (Cytoscape Consortium San Diego, CA, USA), seguindo as recomendações e instruções presentes no programa que determina o teste de correlação de *Spearman*, sendo assim, realizado para avaliar a associação entre cada célula testada.

O índice de correlação ( $r$ ) foi usado para categorizar a força de correlação em fraca ( $r \leq 0,35$ ), moderada ( $r \geq 0,36$  a  $r \leq 0,67$ ) ou forte ( $r \geq 0,68$ ), conforme descrito anteriormente (118,119). E o modelo final das análises foi realizado apenas para as variáveis com resultados que apresentaram nível de significância ( $p < 0,05$ ), no qual: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

## 5. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

**Artigo a ser submetido na revista:** *Frontiers in Immunology*, tópico especial: Immune responses and immune mechanisms triggered by snake and scorpion venoms

***Células e moléculas envolvidas na resposta imune local e sistêmica de pacientes vítimas de acidente botrópico na Amazônia Brasileira***

Kerolaine Fonseca Coelho<sup>1,2</sup>; Juliana Costa Ferreira Neves<sup>1,2</sup>; Hiochelson Najibe Santos Ibiapina<sup>1,2</sup>; Fábio Magalhães Gama<sup>7</sup>; Fabiane Bianca Albuquerque Barbosa<sup>1,2</sup>; Irmgardt Alicia María Wellmann Castellanos<sup>1,2</sup>; Flavio Souza Silva<sup>3,4</sup>; Marcus Vinícius Guimarães Lacerda<sup>1,2,6</sup>; Adriana Malheiro Alle Marie<sup>1,2,3,4,5</sup>; Wuelton Marcelo Monteiro<sup>1,2</sup>; Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,4,5,8\*</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
2. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;
4. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;
5. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
6. Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, AM, Brazil;
7. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil
8. Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.

**\*Corresponding author:** Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), avenida Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas, CEP: 69040-000, Brasil. Fone: + 55 (92) 98153-5233. E-mail: Allyson.gui.costa@gmail.com

## RESUMO

O ofidismo é um problema de saúde pública negligenciado, e na Amazônia são comuns os casos ocasionados pela serpente *Bothrops atrox*. O veneno da *B. atrox* (BaV) causa importantes mudanças fisiopatológicas locais e sistêmicas, promovendo intensa reação inflamatória. A exacerbação da resposta inflamatória local conjuntamente com a ação do BaV, pode resultar em complicação tecidual grave e formação de flictenas. Entretanto, os mecanismos imunes ainda são pouco elucidados na literatura. Diante disso, caracterizamos o perfil de células imunes locais e circulantes e de mediadores envolvidos no processo inflamatório em acidentes causados por *B. atrox*. Foi coletado o sangue periférico em três momentos: antes da soroterapia (T0), 24 horas após (T1) e 48 horas após (T2). Para pacientes com flictenas, o material foi coletado por aspiração ao (T2). A população foi composta por 48 pacientes, 29 participantes do grupo leve e 19 do grupo grave, e destes, 09 desenvolveram flictenas. Além disso, foi incluído 48 participantes sem histórico de acidente ofídicos, compondo o grupo controle. A contagem das células e dosagens das moléculas imunes foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Nossos achados demonstram que os grupos de caso apresentaram ao T0 um padrão de resposta similar, com aumento nos percentuais dos monócitos inflamatórios, linfócitos T, NKT e células B. Concomitantemente as quimiocinas CCL-2, CXCL9, CCL-5, CXCL-10 e citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 elevaram. Ao longo do tempo, os grupos apresentaram mudanças no perfil de resposta, como aumento dos monócitos patrulhadores no grupo leve e da IL-6 no grupo grave. Após 48 horas do tratamento, o grupo leve novamente é observado o aumento da resposta inflamatória. Contrariamente no grupo grave o repertório de resposta ainda é escasso, com possível atuação de monócitos patrulhadores, linfócitos B e das moléculas CCL-2 e IL-6. A nível local, o dano tecidual induziu uma resposta de perfil inflamatório, com aumento dos monócitos inflamatórios e patrulhadores, assim como de CCL-2, IL1 $\beta$ , IL-6 e TNF. Também foi observado aumento de NKT, TCD4<sup>+</sup> e IL-10, que atuam em respostas imunorregulatórias, exibindo assim um perfil de resposta regulada no local da picada. Acreditamos que o aumento de CCL-2 e IL-6 conjuntamente com linfócitos B, apresentam potencial para um marcador de prognóstico clínico em pacientes com complicação grave.

**Palavras-chave:** *Bothrops atrox*, imunidade celular, interleucinas, quimiocinas, inflamação, flictena.

## INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbimortalidade que ocasionam (1,2,4). No ano de 2019, cerca de 5.4 milhões de pessoas foram picadas por serpentes, o que resultou em 2.7 milhões de envenenamentos e aproximadamente 81.000 a 138.000 óbitos (5). No Brasil, a maioria destes acidentes deve-se ao gênero *Bothrops*, e a espécie *atrox* (*B. atrox*) é responsável por 90% dos casos relatados na Amazônia Brasileira (6,8).

O BaV é constituído principalmente por Metaloproteases (MPs), Serinoproteases (SPs) e Fosfolipase A<sup>2</sup> (PLA)<sup>2</sup>, enzimas que promovem alterações locais e sistêmicas decorrentes da ação coagulotóxica, proteolítica e inflamatória aguda. E a exacerbação da resposta inflamatória, conjunta com os danos do BaV resultam em complicação tecidual grave (3,17,120).

As MPs acarretam danos à membrana basal dos capilares e na epiderme, ocasionando a separação da junção dérmico-epidérmica pela degradação colágeno do tipo IV, laminina, entre outros componentes da matriz extracelular e membrana plasmática, o que culmina na desestabilização estrutural do tecido, enfraquecimento e distensão dos microvasos e rompimento da parede celular (43,46,47,57,121,122). As PLA<sup>2</sup> contribuem para lesão tecidual em virtude de sua atividade miotóxica nas fibras musculares (36,51,52). Estes eventos levam à extravasamentos e formação de bolhas, o que pode ser um fator agravante por facilitar a entrada de microrganismos, e assim levar a infecções secundárias, presente em 8,3% dos 6,6% casos de bolhas registrados na Amazônia (9).

Neste cenário, há a liberação de peptídeos biologicamente ativos, o que induzem o processo inflamatório, ativando vias de sinalização endógena, recrutamento leucocitário e liberação de inúmeros mediadores inflamatórios (99,123). Estudos experimentais descrevem que inicialmente há um aumento de polimorfonucleares e posterior aumento da população de mononucleares, com possível atuação de monócitos/macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e células B, que desempenham um importante papel na patogênese. Entretanto, com um repertório de resposta complexo, que até o presente

momento é pouco elucidado em humanos (26,94,124). Assim, torna-se importante avaliar o perfil morfométrico e imunofenotípico das células circulantes e exsudadas em bolhas, bem como quantificar mediadores imunes envolvidos no processo inflamatório de vítimas de acidentes causados por *B. atrox*, associando os perfis de resposta com a evolução clínica. Nossos achados demonstram a presença de uma resposta inflamatória aguda após o acidente, e uma possível resposta regulatória a nível local (flictena). Acreditamos que o aumento de CCL-2 e IL-6 conjuntamente com linfócitos B, apresentam potencial para um marcador de prognóstico clínico em pacientes com complicação grave.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Aspectos éticos***

Este estudo faz parte de um projeto maior que tem por título “*Avaliação das Manifestações Locais e Perfil Celular Envolvido na Resposta Imune em Pacientes de Acidentes Ofídicos Botrópicos na Amazônia brasileira*” com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), dispondo do seguinte número de **CAAE: 92017118.3.0000.0005** e **parecer: 2.831.006** foram incluídos participantes que leram e assinalaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de acordo com a Declaração de *Helsinki* e a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e Pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os pacientes foram tratados e acompanhados conforme as normas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil (41).

### ***Area de estudo***

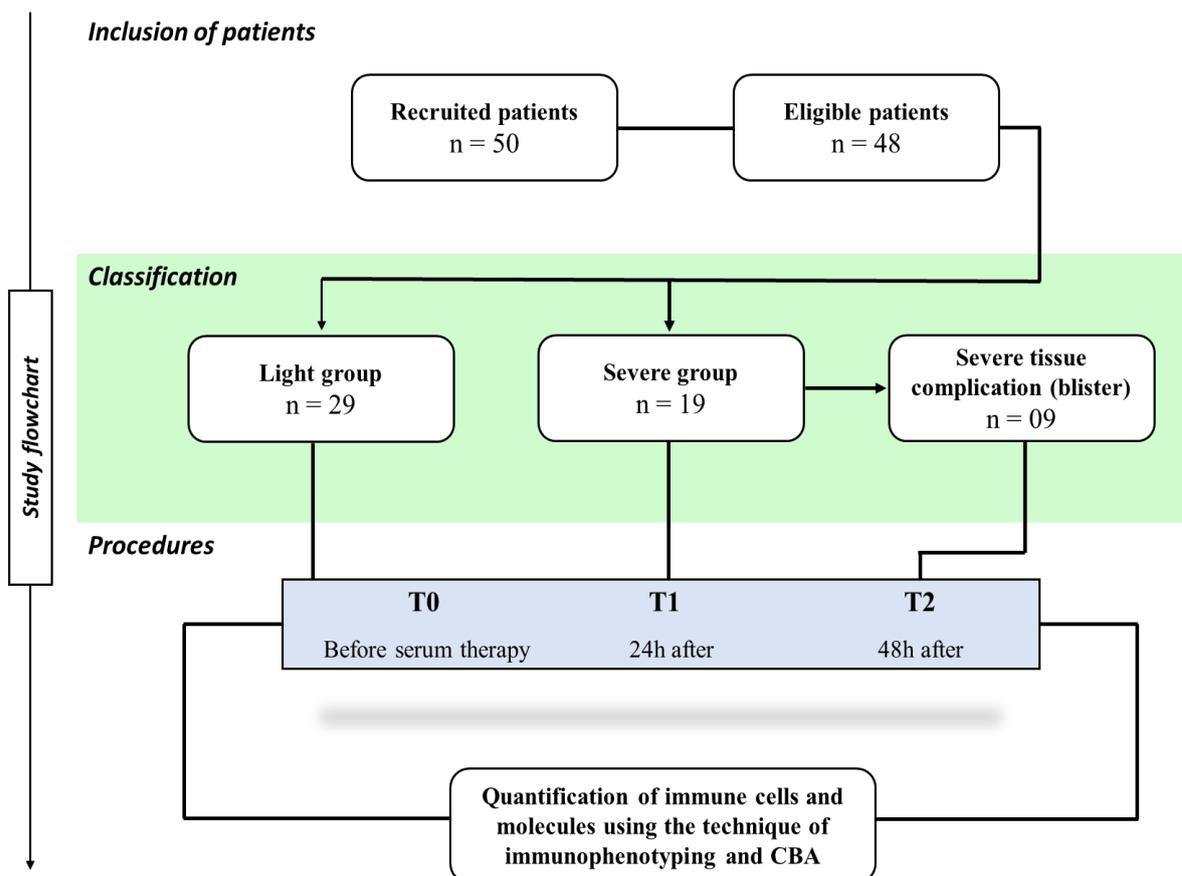
O estudo foi realizado na *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), situada no município de Manaus, instituição responsável pelo diagnóstico e tratamento de doenças tropicais e infecciosas, considerada centro de referência nacional e mundial no tratamento e acompanhamento dos casos de

acidentes ofídicos. Unidade hospitalar que atualmente realiza o tratamento de pacientes oriundos tanto da capital do estado (Manaus), quanto para os municípios do interior do Amazonas. A caracterização morfométrica e imunofenotípica das células e a dosagem das moléculas, assim como a obtenção do grupo controle foi realizada em parceria com a *Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas* (HEMOAM), no período de março de 2019 a março de 2021.

### ***Pacientes e amostragem***

A população do estudo compreende 48 indivíduos que sofreram acidentes ofídicos ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* e que procuraram atendimento na FMT-HVD. A identificação das serpentes foi realizada por um zoólogo do grupo de pesquisa e os pacientes foram recrutados por demanda espontânea. Não foram incluídos no estudo grávidas, indígenas, indivíduos com idade inferior a 18 anos ou que relataram possuir um histórico de doença inflamatória prévia, como doenças autoimunes ou imunodeficiência. Os participantes foram classificados de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde e estratificados em dois grupos, leve e grave **(Figura 17)**.

O grupo leve é composto por pacientes que não desenvolveram manifestações locais e sistêmicas graves nas primeiras 48 horas após o tratamento e, no grupo grave estão enquadrado aqueles com alterações locais e sistêmicas intensas, com complicação tecidual grave e formação de bolhas (41). Além disso, foram incluídos 48 indivíduos, doadores de sangue de ambos os sexos, saudáveis, sem histórico de acidente ofídico para integrar o grupo controle.



**Figura 17.** Fluxograma do estudo. Foram considerados elegíveis 48 pacientes, divididos em 2 grupos de acordo com a evolução clínica em leve e grave. O grupo leve é composto por 29 participantes e o grave por 19, sendo que dos pacientes com acidente grave, 09 obtiveram complicações teciduais e formação de bolhas, com transudato coletado 48 horas após a administração do antiveneno. O perfil celular foi determinado por imunofenotipagem celular e as moléculas imunológicas foram quantificadas através da técnica de CBA, ambos antes da soroterapia (T0) e após a soroterapia (T1) e (T2). **Fonte:** elaborado pelo autor, 2021.

### **Coleta de dados e amostras biológicas**

Para realizar a quantificação das células e moléculas imunes foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue periférico (T0, T1 e T2) por punção venosa em tubos com sistema a vácuo (*BD Vacutainer® EDTA K2*). Além disso, o material exsudativo da bolha de pacientes com complicação tecidual grave foi coletado no (T2) por aspiração, obtendo um volume amostral variado de 200 a 300  $\mu$ L. Após processamento, amostras de plasma foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para a detecção do veneno e posterior dosagem das quimiocinas e citocinas. Os dados

clínico-epidemiológicos dos pacientes foram obtidos por intermédio de um questionário semiestruturado pré-definido contendo variáveis sociodemográficas básicas (sexo, idade, acidente anterior, zona de ocorrência, classificação do acidente, região anatômica acometida) por meio de prontuários físicos e eletrônicos (sistema *iDoctor*) da FMT-HVD.

### ***Aquisição dos parâmetros hematológicos***

Foram realizadas análises quantitativas e qualitativas das amostras de sangue periférico em T0, T1 e T2 para avaliação dos percentuais presentes no eritrograma, leucograma e plaquetograma. O hemograma foi realizado no setor de Hematologia da Fundação HEMOAM por meio do equipamento *ADVIA® 2120i, Hematology System (Siemens Healthcare Diagnosis)*.

### ***Caracterização morfométrica e imunofenotípica pela imunofenotipagem celular por citometria de fluxo***

A caracterização morfométrica e imunofenotípica das amostras de cada paciente foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Para marcação celular, foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos através da ligação a epítomos específicos. Neste estudo o painel de anticorpos monoclonais marcados foram divididos em 06 tubos, contendo anticorpos *anti-cluster* de diferenciação (*anti-CD*) para a quantificação e caracterização das seguintes populações celulares: população e subpopulação de monócitos / ativação celular [anti-CD14-APC, anti-CD16-FITC, HLADR-PE]; células dendríticas clássicas e plasmocitóides [anti-CD11c-PE, anti-CD14-APC, anti-CD123-FITC]; linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> [anti-CD3-FITC, anti-CD4-PECy7, anti-CD8-PE]; linfócitos B e B1 [anti-CD5-PE, anti-CD19-FICT]; células NK e NKT [anti-CD3-PECy7, anti-CD16-FITC, anti-CD56-PE].

Para marcação das células do exsudato das bolhas utilizamos o mesmo painel de marcação, entretanto, com implemento do anticorpo pan-leucocitário [anti-CD45-perCP] para averiguar se as células marcadas correspondem a população leucocitária

de interesse. A aquisição das amostras foi realizada com Citômetro de Fluxo FACS Canto II (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação HEMOAM.

### **Quantificação das moléculas imunes solúveis circulantes e exsudadas nas bolhas por CBA**

As quimiocinas CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10 e citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF foram quantificados utilizando a técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA). Utilizamos o kit BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human Chemokine* (Code N $^{\circ}$  552990, Catalog 92121, Biosciences, San Diego, CA, USA) e o kit BD<sup>TM</sup> CBA *Human Inflammatory Cytokines* (Catalog No. 551811, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA) para as dosagens respectivas moléculas, de acordo com as diretrizes e protocolos técnicos do fabricante. Para a aquisição das amostras, foi usado o citômetro de fluxo FACS Canto II (BD<sup>®</sup> Biosciences, San Jose, CA, EUA) da Fundação HEMOAM. O software FCAP-Array<sup>TM</sup> (v3.01, Soft Flow Inc., EUA) foi usado para calcular as concentrações das quimiocinas e citocinas em pg/mL.

### **Análise de dados**

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPadPrism (v8.0)*, onde foram formulados testes de *Shapiro-Wilk* para averiguar a normalidade dos dados, mostrando resultados de distribuição não-paramétrica. As comparações dos valores obtidos entre os grupos de amostras independentes locais e séricas foram realizadas por meio do *teste t Student* e *Mann-Whitney*. Enquanto para análises de amostras pareadas foi aplicado o de *Wilcoxon*. Os níveis de significância estatística foram estabelecidos quando  $p < 0,05$ .

Para a confecção das redes, foi aplicado o teste de correlação de *Spearman*. As correlações positivas e negativas são consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Em seguida utilizou-se o *software Cytoscape 3.0.3* (Cytoscape Consorce San Diego, CA, EUA), seguindo as recomendações e instruções do *software*. O índice de

correlação ( $r$ ) foi utilizado para categorizar a força de correlação como fraca ( $r \leq 0.35$ ), moderada ( $r \geq 0.36$  para  $r \leq 0.67$ ) ou forte ( $r \geq 0.68$ ), conforme descrito anteriormente (118,119).

## RESULTADOS

### *Caracterização da população de estudo e dados clínicos*

A (Tabela 5) resume as principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes. O sexo masculino foi o mais acometido em ambos os grupos, com mediana de idade superior no grupo grave. A maioria dos pacientes não sofreram acidentes prévios, e a procedência dos acidentados foi sobretudo de áreas rurais. O sítio anatômico inferior foi mais acometido e os acidentes em sua maioria não foram associados ao trabalho, e as reações adversas ao soro foram mais observadas no grupo grave, mesmo grupo que demonstrou uma mediana em horas superior entre o momento do acidente e a chegada ao centro médico. A idade, o sítio anatômico acometido e as reações adversas ao soro, apresentaram valores estatisticamente significativos entre os grupos de caso

**Tabela 5.** Características clínicas e sociodemográficas dos pacientes e indivíduos incluídos no estudo:

Demographic and Clinical Characteristics	<i>B. atrox</i> patients			<i>p</i> -value
	HD n=48	Mild n=29	Severe n=19	
<b>Gender</b> (n, Male/Female)	34/14	26/3	15/4	0,248
<b>Age</b> (median and [IQR])	33 [23-44]	46 [28-60]	53 [30-63]	<b>0,0067</b>
<b>Previous snakebite</b> (n, Yes/No)	-	3/26	5/14	0,146
<b>Occurrence zone</b> (n, Rural/Urban)	-	26/3	15/4	0,304
<b>Anatomical site of the Snakebite</b> (n, Upper/Lower limb)	-	4/25	9/10	<b>0,010</b>
<b>Anatomical side of the Snakebite</b> (n, Right/Left)	-	11/18	12/7	0,087
<b>Work-related accident</b> (n, Yes/No)	-	10/19	7/12	0,867
<b>Adverse Reaction to Antivenom</b> (n, Yes/No)	-	8/21	11/8	<b>0,035</b>
<b>Time Snakebite/Antivenom</b> (hours, median [IQR])	-	3 [2-6]	6 [3-9]	0,129

[IQR], intervalo interquartil. As diferenças significativas em  $p < 0,05$  estão representadas em **negrito**.

***Hemograma e imunofenotipagem celular dos grupos leve e grave antes e após a soroterapia, comparados ao GC***

Na **(Tabela 6)**, estão representados os dados do hemograma e imunofenotipagem celular dos pacientes estratificados em grupos leve e grave antes e após o tratamento. Observamos que nas análises intragrupo, correspondente apenas as diferenças avaliadas ao longo do tempo, os pacientes com classificação leve, apresentaram um aumento estatisticamente significativo nas contagens dos linfócitos e monócitos no T1, frente ao T0. Além disso, os eosinófilos também demonstram aumento temporal. Entretanto, houve uma redução da população de eritrócitos, hemoglobina, plaquetas, neutrófilos e basófilos ao longo do tempo avaliado. Os monócitos, que eventualmente ao T1 elevaram, apresentaram um padrão de declínio, conjuntamente com os leucócitos totais, que reduziram ao T2.

O grupo grave, apresentou parâmetros bem semelhantes ao do leve, com exceção do aumento dos leucócitos totais e neutrófilos, que apesar de também apresentarem padrão de declínio, demonstrou maiores contagens, além disso, a redução das plaquetas e basófilos que foram mais proeminentes.

Nas análises imunofenotípicas intragrupo e intergrupo, ambos os grupos de caso apresentarem um padrão similar nas contagens celulares, exceto pelo aumento dos monócitos clássicos, que ao T0 apresentaram menor percentual e elevaram ao longo do tempo, assim como dos monócitos inflamatórios, patrulhadores, células NKT, linfócitos T e TCD8<sup>+</sup> que foram maiores no grupo leve, havendo um aumento dos linfócitos B no grupo grave em 48h após a soroterapia.

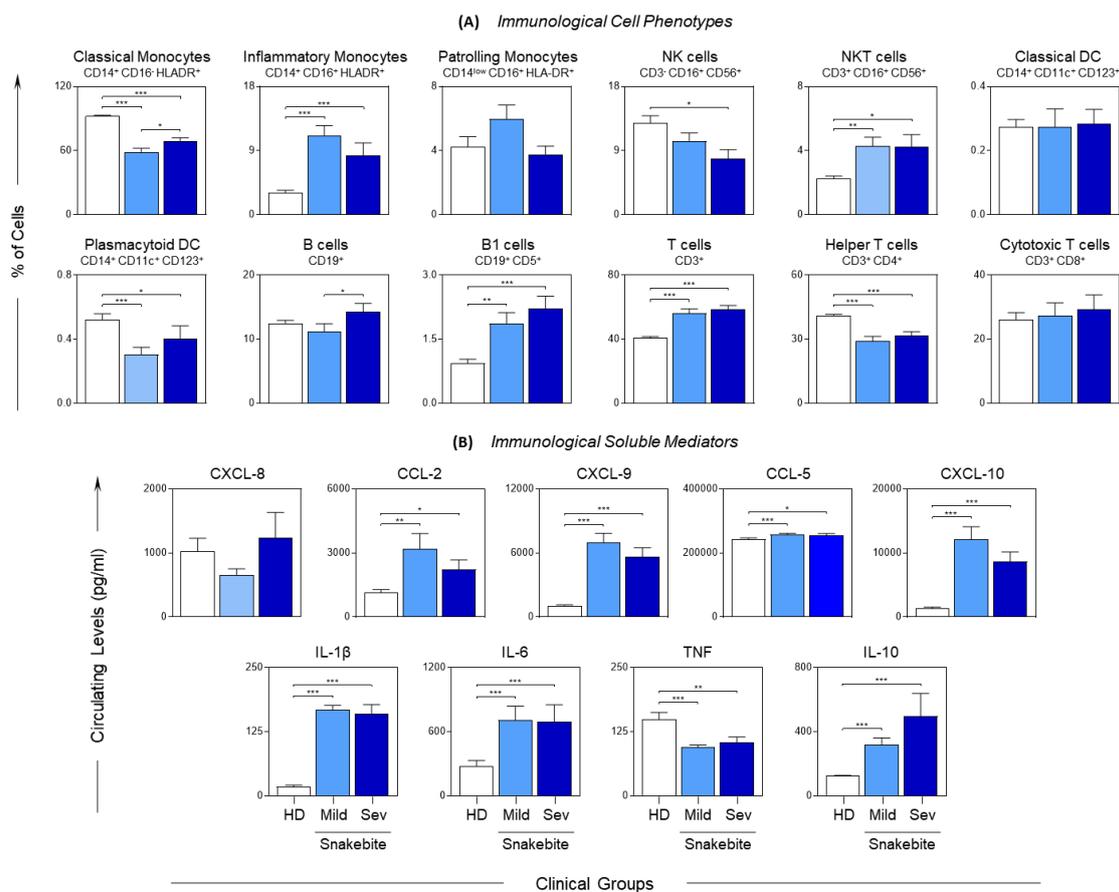
**Tabela 6.** Dados do hemograma e imunofenotipagem dos pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópico, estratificados em grupos leve e grave, antes e após a soroterapia:

Parameters	Mild (n=29)			Severe (n=19)			HD (n=48)
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0
Red blood cells	5,2 (4,8 - 5,3)	<b>4,6</b> (4,4 - 4,9) <sup>a</sup>	<b>3,2</b> (2,5 - 4,5) <sup>a,b</sup>	5,2 (4,9 - 5,4)	<b>4,8</b> (4,6 - 5,1) <sup>a</sup>	<b>3,7</b> (0,7 - 4,7) <sup>a,b</sup>	5,0 (4,6 - 5,4)
Hemoglobin	15,0 (14,3 - 15,4)	<b>13,6</b> (12,1 - 14,2) <sup>a</sup>	<b>8,8</b> (6,8 - 13,0) <sup>a,b</sup>	15,2 (14,5 - 15,6)	<b>13,9</b> (13,2 - 15,4) <sup>a</sup>	<b>11,4</b> (1,9 - 13,5) <sup>a,b</sup>	14,9 (13,6 - 16,0)
Platelets	<b>221</b> (167 - 259) <sup>§</sup>	191 (182 - 232)	<b>117</b> (97 - 171) <sup>a,b,#</sup>	<b>185</b> (149 - 231) <sup>§</sup>	202 (151 - 243)	<b>61</b> (31 - 193) <sup>a,b</sup>	243 (211 - 282)
Total Leukocytes	<b>10,9</b> (8,4 - 14,6) <sup>§</sup>	11,6 (8,7 - 15,0)	<b>4,8</b> (3,8 - 7,6) <sup>a,b</sup>	<b>13,3</b> (9,7 - 15,6) <sup>§</sup>	12,3 (9,1 - 15,0)	<b>8,3</b> (1,3 - 11,5) <sup>a,b</sup>	14,9 (13,6 - 16,0)
Neutrophils	<b>77,0</b> (67,7 - 88,9) <sup>§</sup>	<b>67,8</b> (62,9 - 77,8) <sup>a</sup>	<b>47,4</b> (36,8 - 62,3) <sup>a,b</sup>	<b>80,3</b> (69,0 - 89,0) <sup>§</sup>	71,0 (64,4 - 82,9)	<b>60,2</b> (10,0 - 77,7) <sup>a,b</sup>	56,1 (50,0 - 61,5)
Lymphocytes	<b>13,0</b> (5,0 - 21,3) <sup>§</sup>	<b>16,9</b> (13,3 - 25,5) <sup>a</sup>	<b>13,6</b> (11,3 - 20,5) <sup>#</sup>	<b>12,1</b> (5,3 - 20,3) <sup>§</sup>	<b>15,5</b> (10,0 - 22,0) <sup>a</sup>	<b>8,5</b> (1,3 - 10,7) <sup>b</sup>	29,7 (26,4 - 34,6)
Monocytes	<b>4,0</b> (3,5 - 5,7) <sup>§</sup>	<b>5,6</b> (4,5 - 6,7) <sup>a</sup>	<b>4,1</b> (3,3 - 5,7) <sup>b</sup>	<b>4,1</b> (3,1 - 5,1) <sup>§</sup>	5,4 (4,0 - 6,6)	<b>4,4</b> (0,7 - 5,3) <sup>b</sup>	6,0 (5,1 - 6,6)
Eosinophils	<b>2,0</b> (0,9 - 4,7) <sup>§</sup>	1,8 (1,0 - 2,6)	<b>2,8</b> (2,2 - 3,2) <sup>b</sup>	<b>1,8</b> (0,4 - 5,8) <sup>§</sup>	2,3 (1,2 - 3,5)	1,8 (1,0 - 4,9)	3,3 (2,3 - 6,1)
Basophils	0,4 (0,2 - 0,8)	<b>0,3</b> (0,2 - 0,4) <sup>a</sup>	<b>0,3</b> (0,2 - 0,3) <sup>#</sup>	<b>0,3</b> (0,2 - 0,4) <sup>§</sup>	0,3 (0,2 - 0,4)	<b>0,1</b> (0,0 - 0,3) <sup>a,b</sup>	0,5 (0,3 - 0,9)
Classical MON	<b>62,8</b> (48,4 - 74,2) <sup>§,#</sup>	<b>71,1</b> (61,1 - 87,4) <sup>a</sup>	<b>77,2</b> (77,2 - 79,2) <sup>a,#</sup>	<b>69,6</b> (56,9 - 76,7) <sup>§</sup>	76,5 (65,8 - 87,6)	69,3 (69,3 - 77,1)	93,4 (88,7 - 98,0)
Inflammatory MON	<b>10,5</b> (5,1 - 14,7) <sup>§</sup>	10,8 (5,1 - 17,9)	<b>9,3</b> (9,3 - 9,3) <sup>#</sup>	<b>6,0</b> (3,8 - 10,9) <sup>§</sup>	8,7 (3,8 - 13,3)	7,9 (5,4 - 7,9)	2,1 (1,0 - 4,8)
Patrolling MON	4,8 (1,7 - 9,6)	<b>3,3</b> (1,0 - 6,4) <sup>a,#</sup>	<b>2,4</b> (2,4 - 2,4) <sup>a,#</sup>	3,2 (2,2 - 5,6)	<b>1,1</b> (0,9 - 2,2) <sup>a</sup>	<b>2,9</b> (1,8 - 3,3) <sup>b</sup>	2,8 (0,7 - 6,7)
NK cells	9,1 (6,0 - 14,0)	<b>7,3</b> (4,6 - 8,8) <sup>a</sup>	<b>7,0</b> (6,8 - 7,0) <sup>a</sup>	<b>7,7</b> (3,0 - 8,6) <sup>§</sup>	<b>4,2</b> (2,8 - 6,7) <sup>a</sup>	6,9 (4,4 - 7,3)	11,8 (7,2 - 16,2)
NKT cells	<b>4,3</b> (1,9 - 6,2) <sup>§</sup>	4,3 (2,6 - 5,4)	<b>3,6</b> (3,6 - 3,6) <sup>#</sup>	<b>3,6</b> (1,9 - 5,8) <sup>§</sup>	3,1 (2,0 - 3,8)	3,0 (1,9 - 3,4)	2,1 (1,5 - 2,7)
Classical DC	0,2 (0,1 - 0,3)	0,2 (0,1 - 0,3)	0,3 (0,2 - 0,3)	0,2 (0,2 - 0,3)	0,3 (0,2 - 0,4)	<b>0,2</b> (0,2 - 0,2) <sup>b</sup>	0,2 (0,1 - 0,3)
Plasmacytoid DC	<b>0,2</b> (0,2 - 0,4) <sup>§</sup>	0,3 (0,2 - 0,3)	0,3 (0,2 - 0,3)	<b>0,3</b> (0,2 - 0,6) <sup>§</sup>	<b>0,2</b> (0,1 - 0,3) <sup>a</sup>	0,3 (0,2 - 0,3)	0,5 (0,4 - 0,6)
B cells	<b>9,9</b> (5,1 - 14,8) <sup>#</sup>	<b>15,1</b> (11,1 - 17,9) <sup>a</sup>	<b>13,7</b> (12,7 - 13,7) <sup>a,#</sup>	15,1 (9,3 - 19,3)	13,6 (10,2 - 21,9)	14,3 (14,1 - 14,3)	12,4 (9,1 - 14,2)
B1 cells	<b>1,6</b> (0,6 - 2,8) <sup>§</sup>	<b>2,7</b> (1,5 - 2,7) <sup>a</sup>	2,1 (2,1 - 2,1)	<b>2,0</b> (1,3 - 3,8) <sup>§</sup>	2,0 (1,0 - 3,6)	2,2 (1,7 - 2,4)	0,8 (0,6 - 1,1)
T cells	<b>55,4</b> (47,4 - 67,9) <sup>§</sup>	<b>65,7</b> (59,7 - 68,5) <sup>a</sup>	<b>67,0</b> (67,0 - 67,0) <sup>a,#</sup>	<b>62,6</b> (55,1 - 64,6) <sup>§</sup>	<b>66,8</b> (59,9 - 75,7) <sup>a</sup>	<b>58,1</b> (58,1 - 68,5) <sup>b</sup>	64,7 (56,6 - 68,6)
Helper T cells	<b>29,5</b> (20,5 - 34,0) <sup>§</sup>	<b>35,7</b> (26,2 - 42,4) <sup>a</sup>	<b>39,6</b> (37,4 - 39,6) <sup>a</sup>	<b>33,9</b> (22,1 - 39,1) <sup>§</sup>	<b>37,4</b> (31,3 - 48,8) <sup>a</sup>	<b>38,3</b> (36,7 - 41,9) <sup>a</sup>	41,3 (37,8 - 44,4)
Cytotoxic T cells	18,8 (14,7 - 28,5)	22,6 (17,5 - 29,6)	<b>23,9</b> (21,7 - 23,9) <sup>#</sup>	20,5 (16,1 - 28,5)	23,0 (18,9 - 26,7)	<b>18,9</b> (17,4 - 23,0) <sup>b</sup>	23,2 (18,7 - 27,5)

T0, antes da soroterapia; T1, 24h após a soroterapia; T2, 48h após a soroterapia; GC, grupo controle; IQR, intervalo interquartil. Valores de referência: Hemácias: 4,2 – 5,4 x10<sup>6</sup>/μL; Hemoglobina: 12 - 16 g/dL; Plaqueta: 130 - 400 x10<sup>9</sup>/μL; Leucócitos Totais: 5,2 - 12,4 x10<sup>3</sup>/μL; Neutrófilos: 1,9 - 8,0 x10<sup>3</sup>/μL; Linfócitos: 0,9 - 5,2 x10<sup>3</sup>/μL; Monócitos: 0,16 - 1 x10<sup>3</sup>/μL; Eosinófilos: 0,0 – 0,8 x10<sup>3</sup>/μL; Basófilos: 0,0 - 2,0 x10<sup>3</sup>/μL. Para análise intragrupo são representadas em negrito com as seguintes letras sobrescritas: "a" e "b", referindo-se as comparações com T0 e T1, respectivamente. Para análise intergrupo são representadas em negrito com os seguintes símbolos sob rescritos: # e §, referindo-se as comparações com o Grupo Grave e Grupo Controle, respectivamente. Diferenças significativas em  $p < 0,05$ .

### ***Pacientes acidentados por B. atrox apresentam diferentes contagem de células e níveis séricos de moléculas imunes em comparação ao GC***

Nas análises imunofenotípicas foi observado que em ambos os grupos de caso, houve aumento estatisticamente significativo quando comparado ao GC nas porcentagens das populações de monócitos inflamatórios, células NKT, linfócitos B1 e linfócitos T, e redução dos monócitos clássicos, DCs plasmocitóides e TCD4+. Entretanto, houve um declínio estatisticamente significativo de células NK apenas para o grupo grave. Do mesmo modo, foi observado que em ambos os grupos houve um aumento das quimiocinas CCL-2, CXCL-9, CCL-5 e CXCL-10, assim como das interleucinas IL-1β, IL-6 e IL-10, porém, os pacientes apresentaram declínio de TNF neste tempo avaliado. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de acidentados apontam um aumento dos monócitos clássicos e linfócitos B para o grupo grave **(Figura 18)**.



**Figura 18.** Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis em pacientes com picado por *B. atrox*. Os fenótipos celulares (A) e os mediadores imunológicos solúveis (B) foram avaliados na circulação de pacientes com picada por *B. atrox* antes da soroterapia, estratificados em Leve (■), Grave (■) e um grupos de doadores saudáveis como controle (□). A frequência de fenótipos celulares e mediadores imunológicos solúveis foram medidos por citometria de fluxo e CBA, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste t de Student e o teste de Mann Whitney. Os resultados são apresentados usando gráficos de barras, em escala linear. As diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*)  $p < 0.05$  (\*).

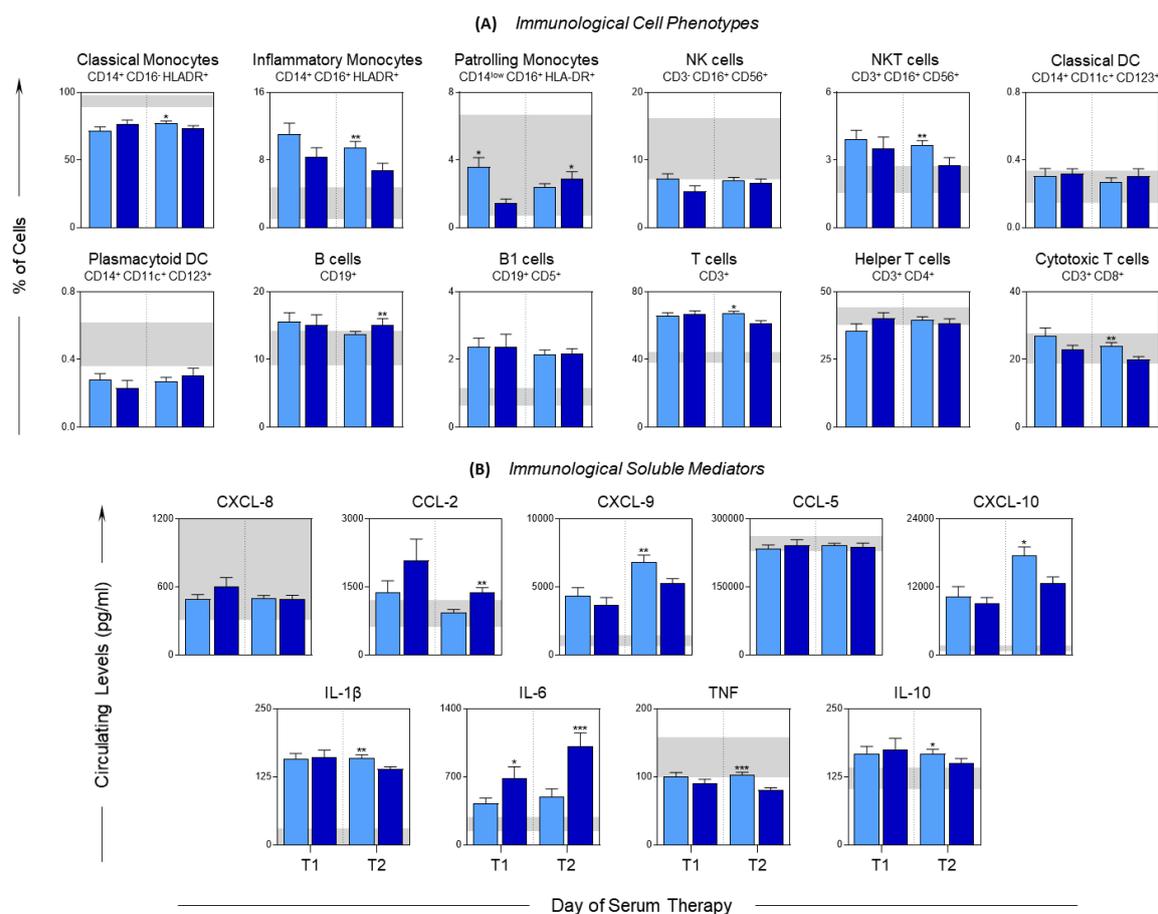
### ***Acompanhamento da resposta celular e dinâmica da produção de quimiocinas e citocinas durante a evolução clínica dos grupos leve e grave acidentados por *B. atrox****

A análise imunofenotípica comparativa entre os grupos ao T1 apontam diferenças estatisticamente significativas dos monócitos patrulhadores, com aumento no grupo leve e redução no grupo grave. Dentre as moléculas imunes

avaliadas somente a IL-6 apresentou aumento significativo para grupo grave. Porém, este mesmo grupo não demonstrou acréscimos nos percentais celulares no tempo em questão.

Ao T2, houve um aumento significativo no grupo leve dos monócitos clássicos, monócitos inflamatórios, células NKT, linfócitos T e TCD8<sup>+</sup>, com redução no grave. Em contrapartida, houve um aumento dos monócitos patrulhadores e linfócitos B para o grupo grave e redução no leve.

O grupo leve demonstrou um aumento significativo ao longo do tempo das quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10, assim como das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF e IL-10. Todavia, a citocina IL-6 demonstrou aumento estatisticamente significativo no grupo grave ao T1, que permaneceu de forma temporal, juntamente com a quimiocina CCL-2 que apresentou níveis elevados ao longo do tempo (**Figure 19**).

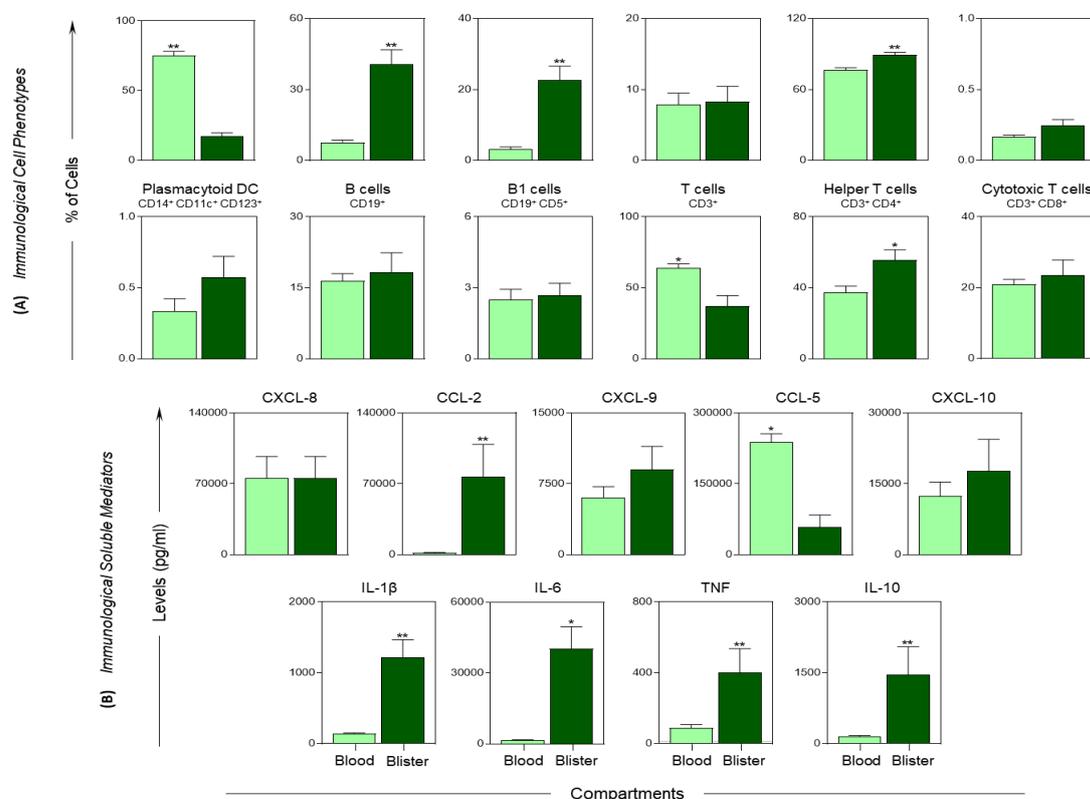


**Figura 19.** Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis em grupos leves e graves durante o acompanhamento. Os fenótipos celulares (A) e mediadores imunológicos solúveis (B) foram avaliados na circulação do grupo Leve (□) e Grave (■) em

dois momentos após a administração do antiveneno, denominados: T1 e T2 (24 e 48 horas após a soroterapia, respectivamente). Os intervalos interquartílicos (25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>) dos resultados são observados nos Doadores Saudáveis, usados como intervalo de referência, representados em fundo cinza (□). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de classificações assinadas de pares combinados de Wilcoxon. Os resultados são apresentados em gráficos de barras, em escala linear. As diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*)  $p < 0.05$  (\*).

### **Perfil de células e moléculas imunes sistêmicas e locais de pacientes graves acidentados por *B. atrox***

A nível sistêmico houve um aumento significativo comparado ao conteúdo exsudativo das bolhas das populações de monócitos clássicos e linfócitos T, assim como a nível local, foram observados aumentos significativos dos monócitos inflamatórios, patrulhadores, de células NKT e TCD4<sup>+</sup>, bem como da quimiocina CCL2 e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e IL-10 (**Figura 20**).



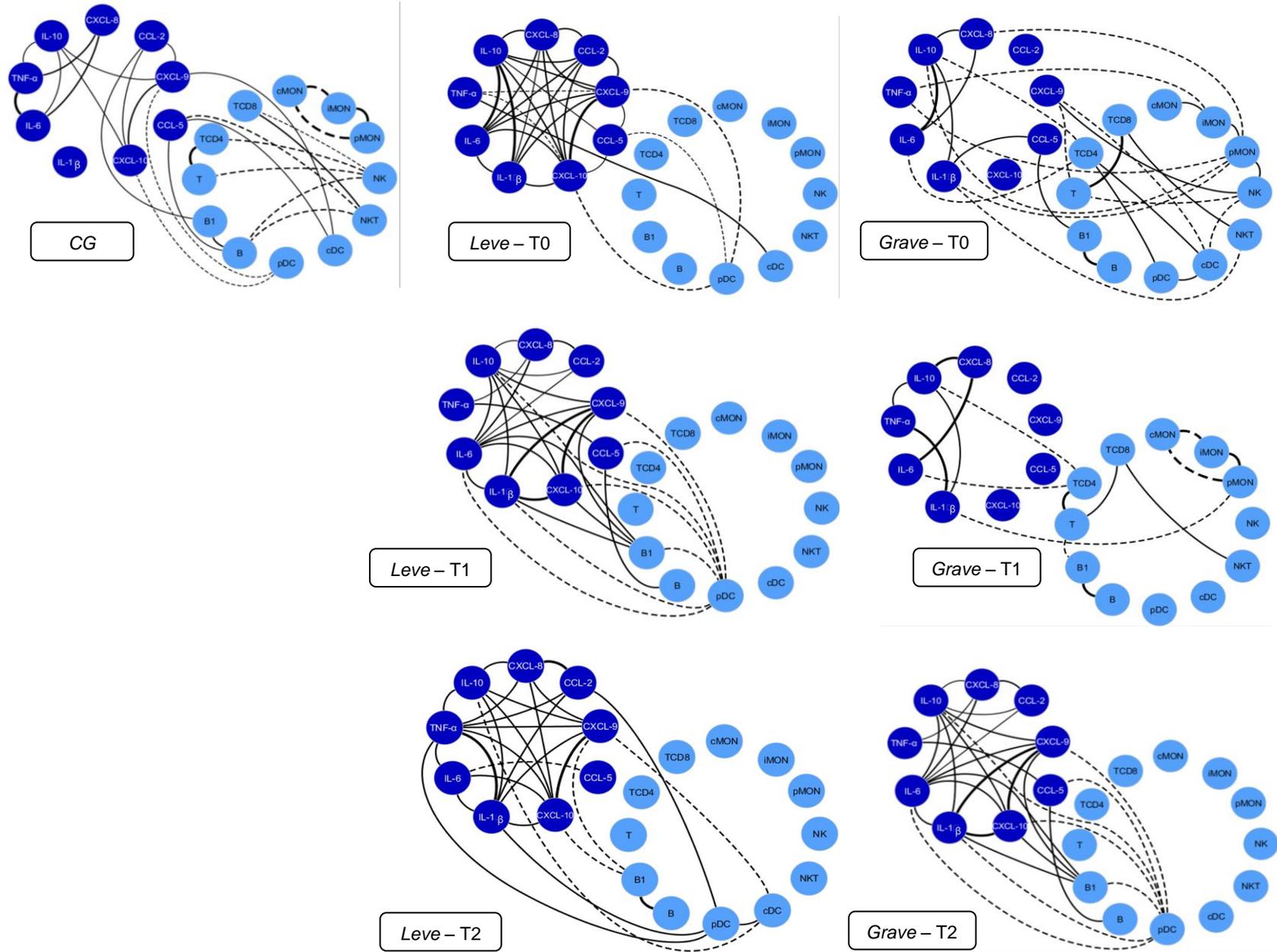
**Figura 20.** Imunofenotipagem celular e perfil de mediadores imunológicos solúveis no compartimento da bolha de pacientes graves acidentados por *B. atrox*. Análise comparativa de

fenótipos celulares (A) e mediadores imunológicos solúveis (B) em sangue periférico (□) e exsudato das bolhas (■) das amostras pareadas de pacientes graves. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de classificações assinadas de pares combinados de Wilcoxon. Os resultados são apresentados em gráficos de barras, em escala linear. As diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

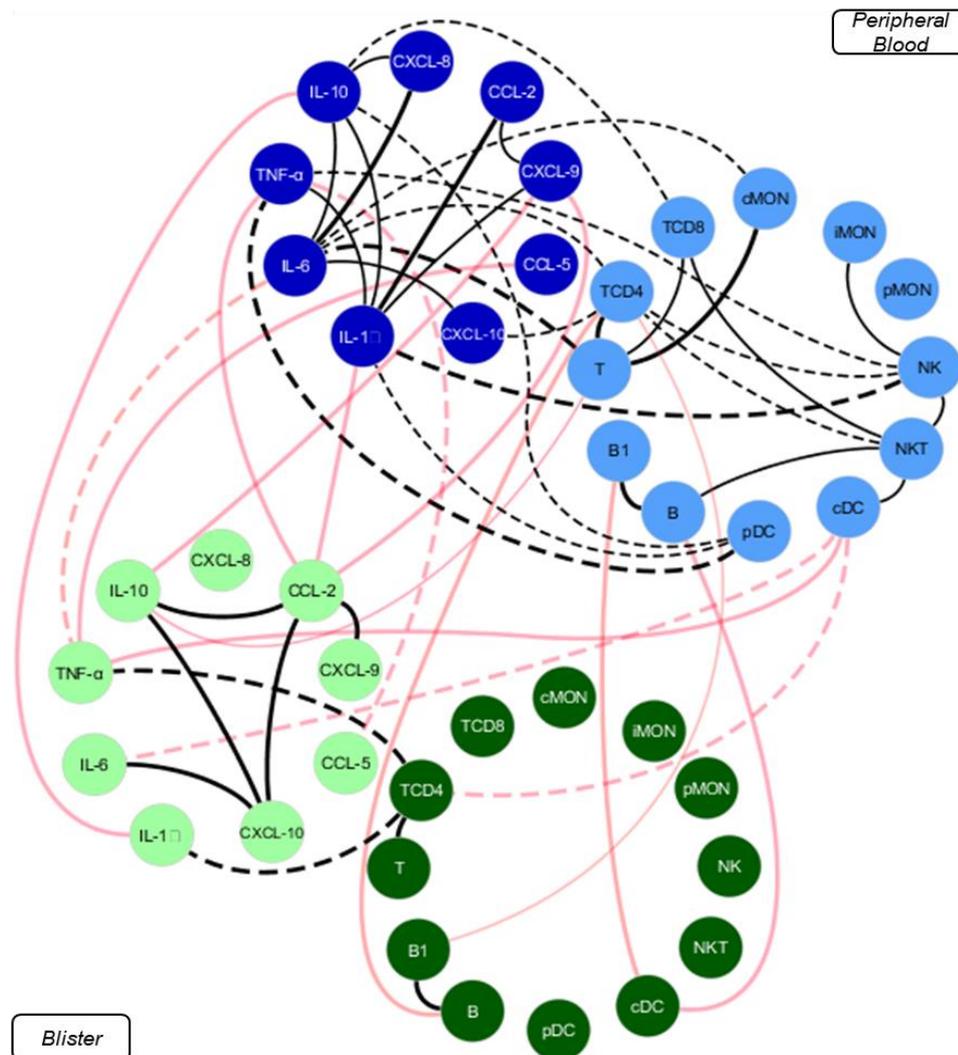
### ***Os pacientes apresentam redes complexas de interações entre células e moléculas circulantes e exsudadas em bolhas***

Os pacientes saudáveis do GC apresentam ausência de uma atividade inflamatória aguda e foram utilizados para avaliar as correlações dos pacientes acidentados, que demonstram redes de comportamentos distintos. Ao T0, o grupo leve apresentou em sua maioria ausência de correlações positivas entre as populações celulares com maior interação entre as moléculas. Por outro lado, os pacientes graves no pré-tratamento expõem de um maior número de correlações positivas dos linfócitos B1 com as quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10 e citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, com correlações negativas entre as moléculas regida pelas DCs plasmocitóides, e a molécula chave no tempo e grupo em questão com maior número de correlações positivas é a CXCL-9 (**Figura 21A e 21B**). Os pacientes graves no pré-tratamento demonstram fortes interações entre os linfócitos B e B1 e monócitos patrulhadores com inflamatórios, e moderadas de TCD8<sup>+</sup> com linfócitos T e NKT. Apresenta também correlações negativas entre TCD4<sup>+</sup> com IL-10 e IL-6.

(A) Networks of Chemokines, Cytokines and Cells in peripheral blood



(B) Networks of Chemokines, Cytokines and Cells between peripheral blood and blister exudate



**Figura 21.** Rede de moléculas solúveis e células imunes mostra interações ocorrendo entre grupos durante o acompanhamento do estudo. Cada grupo de cores é usado para identificar as quimiocinas e citocinas (■) e células (□) no sangue periférico; e quimiocinas e citocinas (■) e células (■) presentes no exsudato da bolha. As linhas tracejadas entre as moléculas indicam uma correlação negativa, enquanto as linhas sólidas indicam uma correlação positiva. As linhas vermelhas indicam a correlação entre o exsudato da bolha e o sangue periférico. O índice de correlação ( $r$ ) foi usado para categorizar a força da correlação em fraca ( $r \leq 0,35$ ), moderada ( $r \geq 0,36$  a  $r \leq 0,67$ ) ou forte ( $r \geq 0,68$ ).

## DISCUSSÃO

As complicações teciduais causadas por acidentes botrópicos influenciam diretamente no prognóstico clínico dos pacientes afetados, sendo que os fatores clínicos epidemiológicos são primordiais para desfechos não favoráveis, onde a idade avançada, assim como a ausência ou retardo do tratamento, estão associados a gravidade, e estes dados corroboram com nossos achados, pois o grupo grave apresentou uma mediana de idade superior, assim como maior tempo para chegada ao centro médico e tratamento (**tabela 05**) (10,125,126).

As alterações dos parâmetros hematológicos são achados laboratoriais comuns nos envenenamentos botrópicos. O processo hemorrágico causa redução da contagem dos eritrócitos, da concentração de hemoglobina e plaquetopenia. Clinicamente, a redução destes parâmetros correlacionam-se com a gravidade, e a trombocitopenia na admissão é positivamente relacionada ao intenso quadro hemorrágico local e sistêmico, o que é característico de pacientes com acidente grave (**Tabela 06**) (14,127). Além disso, ambos os grupos de casos avaliados apresentaram aumento na contagem dos leucócitos totais na admissão, com redução ao longo do tempo (**Tabela 06**).

Estudos revelam leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda nos pacientes acidentados, e a leucocitose com neutrofilia tem sido relacionada a extensão dos danos teciduais (127,128). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a atingir o tecido danificado, além disso, atuam frente as complicações infecciosas após a picada, e induz a síntese de mediadores inflamatórios, a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e formação de armadilhas extracelulares (NETs) (128–131). Também estão envolvidos em alguns aspectos da imunidade adaptativa, regulando as funções das células T (132). Lomonte *et al.*, em estudos experimentais observou uma rápida inversão na proporção de neutrófilos para linfócitos, mostrando que a peçonha botrópica promove alterações imunes precoces (133). Além disso, a amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas associada a proporção de linfócitos vem sendo associada a um preditor de gravidade nos pacientes acidentados (134).

No tecido, as toxinas do veneno induzem danos nas fibras musculares, em componentes da matriz celular e na membrana basal dos capilares, o que promove a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), tanto extracelulares como intracelulares (54). Simultaneamente há a liberação de produtos microbianos que são reconhecidos por células residentes através dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Assim, as células imunes tornam-se ativadas por DAMPs, PAMPs e diretamente por toxinas do veneno, o que atualmente vem sendo associado a teoria de padrões moleculares associados ao veneno (VAMPs) (135,136). Receptores de reconhecimento padrão (PRRs), são primordiais neste processo de resposta inicial, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs). Moreira *et al.*, descreve a importância de TLR-2, TLR-4 e CD14 no processo inflamatório induzido por *B. atrox* (99). Além da transmissão de sinais aos TLRs por meio do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (97). E estes eventos induzem a alterações fenotípicas nas células endoteliais, liberação de substâncias quimiotáticas, recrutamento leucocitário e liberação de mediadores, no qual ocorre concomitantemente com acréscimos nos percentuais dos leucócitos circulantes (68).

Nossos achados apontam um aumento significativo na admissão em ambos os grupos de caso das populações de monócitos inflamatórios, células NKT, linfócitos B1 e linfócitos T, com diferença apenas na população de monócitos clássicos e linfócitos B, que exibiram de acréscimos nas contagens no grupo grave frente ao grupo leve (**Figura 18**). Os monócitos são fagócitos mononucleares que quando recrutados aos tecidos, se diferenciam em macrófagos e secretam inúmeras citocinas pró-inflamatórias, intensificando o recrutamento leucocitário. Soehnlein *et al.*, observou que os mediadores produzidos por neutrófilos abrem caminho para monócitos inflamatórios, proporcionando liberação de citocinas e aumento da depuração bacteriana, sendo assim, células importantes na resposta inicial, o que pode justificar o aumento destas células ao T0 (**Figura 06**) (137). Além disso, o estímulo lesivo faz com que o processo inflamatório perdure. Pires *et al.*, demonstrou através do acoplamento da lectina do tipo C a molécula de fluorescência FITC, que os linfócitos atuam na produção de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, o

que aumenta a capacidade responsiva dos leucócitos e migração leucocitária, pois concentrações não citotóxicas influenciam na resposta celular (26). Estudos descrevem aumento na expressão das moléculas de adesão no endotélio e em leucócitos, o que sucede no processo sequencial de rolamento, adesão e transmigração das células para o local afetado pelo veneno (103,138). Pacientes que apresentam altos níveis da relação neutrófilos/linfócitos possuem maior tempo de internação (139), pois são células que estão associadas a produção de citocina e óxido nítrico após envenenamento grave (140).

Pires *et al.*, demonstra interações de monócitos, células B, células NK e subpopulações de células T. E essas interações célula-célula promoveu a liberação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatória que induziram a proliferação de linfócitos T e B, o que corrobora com nossos achados (**Figura 18 e 19**) (26).

A resposta humoral e a produção de anticorpos é desencadeada pelo reconhecimento das toxinas do veneno. Partículas antigênicas são capturadas e apresentadas às células que expressam peptídeos via MHC de classe I ou II, o que resultará na produção e liberação dos anticorpos (105). Luna *et al.*, avaliou a produção de IgM no soro de pacientes picados por serpentes do gênero *B. erythromelas* e investigou se os antígenos da peçonha interagem com os anticorpos dos pacientes. Em seus resultados observou a presença de uma proteína de 38 KDa 24h antes da soroterapia, demonstrando potencial para biomarcador do envenenamento (141).

Ibiapina *et al.*, demonstraram que as vítimas de envenenamento por *B. atrox* apresentaram altos níveis das moléculas inflamatórias CXCL-9, CXCL10, IL-6 e IL-10 circulantes antes da administração do antiveneno (T0), decorrente da inflamação aguda em resposta à picada (108). Estes achados corroboram com nossos resultados, onde ambos os grupos de caso apresentaram acréscimos destes mediadores quando comparados ao GC na admissão (**Figura 18**). Outros estudos também demonstram que a ação da peçonha botrópica está associada ao aumento de CCL-2, CCL-5 e IL-1 $\beta$  (55,98,99). O que pode estar associado ao aumento das populações celulares ao longo do tempo, pois a

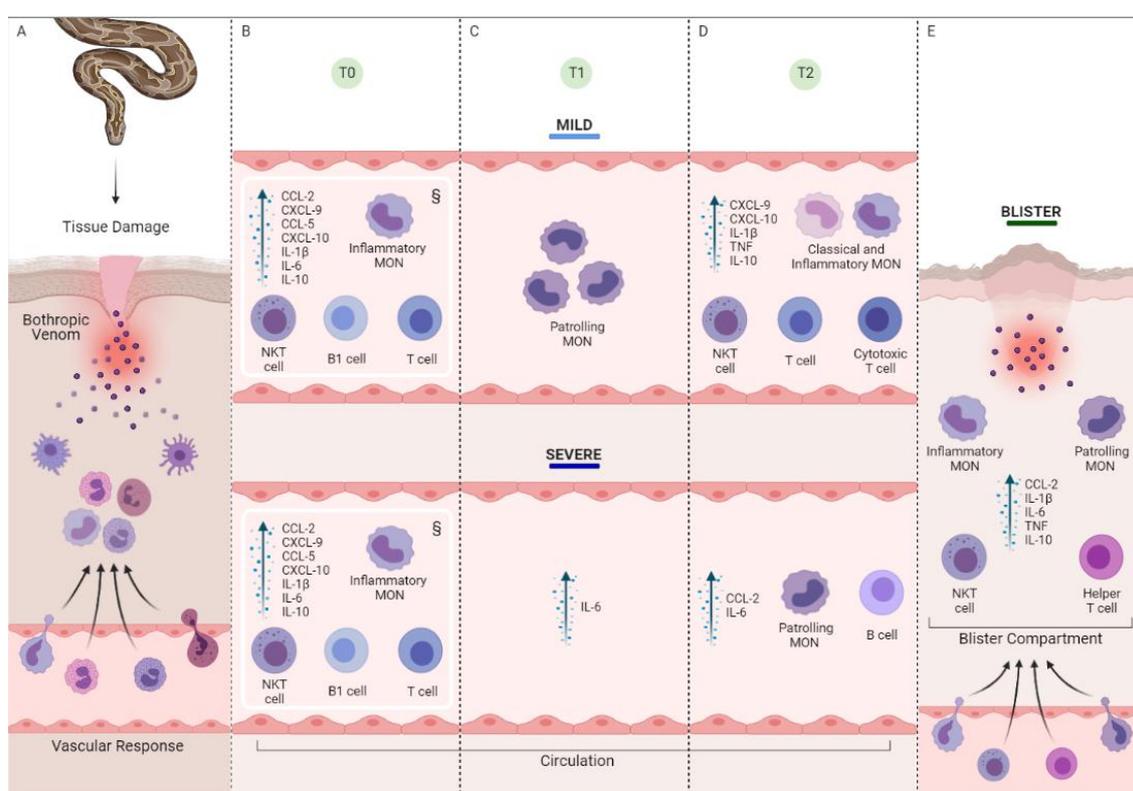
quimiocina CCL-2 e CCL-5 estão associadas com o aumento da infiltração de monócitos e CXCL-9 e CXCL-10 de células T efetoras (**Figura 18 e 19**).

As células NKT são células da imunidade inata que em poucas horas podem ser ativadas, uma vez ativadas, potencializam a ação dos leucócitos, como DCs, macrófagos e linfócitos B, também atuando na supressão de respostas imunes (86) (87), o que pode estar associado a redução dos percentuais celulares em 24h após o tratamento. Entretanto, apesar da diminuição, ainda foi observado um aumento dos monócitos patrulhadores no grupo leve, provavelmente decorrente da remoção das células lesionadas e início do processo de cicatrização (142), o que só foi observado em 48h após o acidente no grupo grave. Neste grupo, ao T1 foi observado aumento apenas da citocina IL-6. Citocina pró-inflamatória que promove a maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos, além de induzir e controlar a produção e liberação de proteínas de fase aguda (143) (144) (**Figura 19**).

A nível local, em 48h após a soroterapia, foi observado um infiltrado inflamatório com predominância de monócitos inflamatórios, patrulhadores, células NKT e linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Estudos experimentais demonstram que após as primeiras 24h a inoculação do veneno, o infiltrado inflamatório é composto principalmente por monócitos, que são percussores de macrófagos e atuam na indução do processo inflamatório agudo e na reparação tecidual (81,94,145). Acredita-se que os macrófagos atuam no reconhecimento dos VAMPs, o que resulta na produção e liberação de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ , que ativam a inflamação e induzem a síntese de proteínas de fase aguda (136). Esses dados corroboram com nossos achados, pois no conteúdo exsudativo os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF apresentaram-se elevados (**Figura 20**), o que é associado à gravidade (146).

A quimiocina CCL-2 apresentou altas concentrações tanto a nível sistêmico quanto local no grupo grave (**Figura 18 e 19**), como no conteúdo exsudativo (**Figura 20**), sendo uma proteína quimioatrativa de monócitos com potencial para um biomarcador de complicação tecidual grave (108,140,147,149). Pires et al, atribuiu a liberação de TNF  $\alpha$  às células NK e monócitos (26), o que pode justificar o aumento no local picado (**Figura 20**). Além

disso, neste cenário também observamos a presença da citocina IL-10 e de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, o que possivelmente está associado a uma atividade imunomoduladora no local contra os danos causados pelo processo inflamatório agudo. Pires et al, também atribuiu a liberação de IL-10 às células TCD4<sup>+</sup>, o que pode associar-se a uma possível atividade regulatória também a nível local (26). Na **(Figura 22)** encontra-se um resumo esquemático da resposta imune local e sistêmica apresentada pelos pacientes com e sem complicação grave.



**Figura 22.** Resumo esquemático da resposta inflamatória temporal local e sistêmica de pacientes acidentados por *B. atrox* com e sem complicação tecidual grave. O quadrante (A) representa a picada e injeção subcutânea/intramuscular do BaV, induzindo ao dano tecidual e promovendo ativação de células residentes, resposta vascular e recrutamento de células circulantes para o local acometido. (B), Resposta pré-soroterapia dos pacientes estratificados em grupos leve e grave, comparados ao grupo controle, representado pelo símbolo (§). Os grupos de caso demonstraram ao T0 um padrão de resposta similar, com aumento nos percentuais dos monócitos inflamatórios, linfócitos T, NKT e células B. Concomitantemente as quimiocinas CCL-2, CXCL9, CCL-5, CXCL-10 e citocinas IL-1β e IL-10 elevaram. (C), mudança do perfil de resposta em 24 horas após soroterapia. Possível atuação de monócitos patrulhadores no grupo leve e da citocina inflamatória IL-6 no grupo grave. (D), novamente os percentuais celulares

elevam em 48 pós-tratamento, entretanto, no grupo leve os monócitos clássicos e linfócitos TCD8<sup>+</sup> elevaram, assim como TNF e IL-10. Contrariamente, no grupo grave, o repertório de resposta ainda é escasso, com possível atuação de monócitos patrulhadores, linfócitos B e das moléculas CCL-2 e IL-6. O quadrante (E) representa a resposta a nível local, *que demonstrou uma possível atuação das subpopulações de monócitos inflamatórios e patrulhadores, além dos linfócitos NKT e TCD4<sup>+</sup> e dos mediadores CCL-2, IL1  $\beta$ , IL-6 e IL-10.* **Fonte:** Elaborado pelos autores, 2021.

A principal limitação encontrada no decorrer do estudo foi o curto período de recrutamento, além do fato de que a complicação local avaliada não foi elevada em nossos pacientes recrutados, o que refletiu no tamanho amostral. Além disso, o curto período de internação dos pacientes na fundação inviabilizou um acompanhamento mais extenso. As populações celulares avaliadas no presente estudo não determinou o perfil de neutrófilos, macrófagos e mediadores lipídicos. No entanto, os resultados aqui apresentados ajudam a compreender o repertório de resposta imune local e sistêmica destes envenenamentos que são de grande significância clínica. Embora não tenhamos avaliado o uso terapêutico de anti-inflamatórios adjuvantes, descrevemos possíveis alvos terapêuticos para estudos futuros, pela proposta de um possível biomarcador de prognóstico.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que pacientes acidentados por *B. atrox* com e sem complicações desenvolvem uma resposta inflamatória aguda na admissão, com níveis elevados de moléculas solúveis e células inflamatórias. Sugerimos que as moléculas CCL-2 e IL-6 exercem um importante papel na complicação tecidual grave, conjuntamente com o aumento dos percentuais das células B, apesar do destaque ao T0 durante as análises no grupo leve. Além disso, demonstramos que o perfil de resposta local difere do sistêmico, com a presença de um perfil inflamatório e imunomodulador no local da picada.

## **APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO**

Todos os protocolos e formulários de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMT-HVD (CAAE: 92017118.3.0000.0005; Seem:2.831.006). Os pacientes foram tratados de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## **FINANCIAMENTO**

As contribuições financeiras foram fornecidas por doações da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). KFC, HNSI, JCFN, FBAB e IAMWC possuem bolsas da FAPEM e CAPES (mestrado acadêmico e doutorado). MVGL, AMAM e WMM são bolsistas pesquisadores do CNPq. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

## **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

KFC, AGC, WMM, AMAM e MVGL projetaram e realizaram os experimentos, conceberam e supervisionaram o projeto, desenharam os experimentos, interpretaram os dados, escreveram e revisaram o manuscrito.

KFC, IAMWC, FBAB, JAGS e AMT realizaram os experimentos e analisaram dados. KFC, HNSI, FMG e JCFN projetaram os experimentos, interpretaram os dados, escreveram e revisaram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

1. World Health Organization. Snakebite envenoming A strategy for prevention and control. Vol. 393, The Lancet. 2019. 131 p.
2. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Bull World Health Organ. 1998;76(5):515–24.
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17063.
4. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(2):12–4.
5. World Health Organization. Snakebite envenoming. 2019.
6. Ministerio da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2da edição. FUNASA, editor. Brasília: Ministerio da Saúde; 2001. 112 p.
7. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Notificação de acidentes botrópicos no Brasil segundo região [Internet]. datasus.gov.br. 2020. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisAM.def>
8. Feitosa ES, Sampaio V, Sachett J, De 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. Célio Campos Borges MS e MC dos S. Epidemiological and clinical aspects of snake accidents in the municipalities of the State of Amazonas, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. 1999;32(11):637–46.
10. 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):1–15.
11. 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):1–12.
12. Warrell DA. Snake bite. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2010;375(9708):77–88.
13. Fox JW, Serrano SMT. Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*. 2008;8(4):909–20.
14. Cardoso, João Luiz., Haddad Jr., Vidal, França, Francisco S., Malaque, Ceila Maria S., Wen F. *Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2nd ed. Sarvier, editor. São Paulo; 2009. 540 p.
15. Mebs D. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*. 2001;39(1):87–96.
16. Nature D primers. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(1):2017.
17. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics [Internet]*. Elsevier B.V; 2017;159:32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>
18. Moura-Da-silva AM, Contreras-Bernal JC, Gimenes SNC, Freitas-De-sousa LA, Portes-Junior JA, Peixoto P da S, et al. The relationship between clinics and the venom of the causative amazon pit viper (*Bothrops atrox*).

- PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(6):1–17.
19. Fox JW, Serrano SMT. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;72(2):200–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>
  20. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):969–85.
  21. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
  22. Catarina de Fátima Pereira Teixeira, Cristina Maria Fernandes, Juliana Pavan Zuliani SFZ. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases Catarina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(1):181–4.
  23. Olaoba OT, Karina dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon X* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;7:100052. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>
  24. Panunto PC, Da Silva MA, Linardi A, Buzin MP, Melo SESFC, Mello SM, et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2006;47(1):21–31.
  25. Kassab B, de Carvalho D, Marangoni S, Novello J. Characterization Of A Hemagglutinating Glycoprotein Isolated From *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Protein Pept Lett*. 2005;8(1):13–20.
  26. Pires WL, Kayano AM, de Castro OB, Paloschi MV, Lopes JA, Boeno CN, et al. Lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom induces IL-10 release by TCD4+ cells and TNF- $\alpha$  release by monocytes and natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2019;106(3):595–605.
  27. 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.
28. Kini RM, Clemetson KJ, Markland FS, McLane MA, Morita T. Toxins and hemostasis: From bench to bedside. *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside.* 2011. 1-797 p.
  29. Pradniwat P, Rojnuckarin P. Snake venom thrombin-like enzymes. *Toxin Rev.* 2014;33(1–2):16–22.
  30. Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon.* 2002;40(6):659–65.
  31. 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]. Elsevier Ltd; 2013;62:75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.009>
  32. Costa TR, Burin SM, Menaldo DL, de Castro FA, Sampaio S V. Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20(1):1–7.
  33. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1488(1–2):1–19.
  34. Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2014;9(10).
  35. Fernandes CAH, Comparetti EJ, Borges RJ, Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Marangoni S, et al. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from *Bothrops brazili* venom. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;1834(12):2772–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.10.009>
  36. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic

- myotoxicity. *Toxicon*. 2003;42(8):915–31.
37. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MRM, Fuly AL, Corrêa FMA, Rosa JC, et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(4):723–32.
  38. Díaz C, Gutiérrez J, Lomonte B, Gené J. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. *BBA - Biomembr*. 1991;1070(2):455–60.
  39. Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003;42(8):947–62.
  40. Monteiro WM, Contreras-Bernal JC, Bisneto PF, Sachett J, Mendonça da Silva I, Lacerda M, et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. *Toxicon X*. 2020;6.
  41. Ministério da Saúde do Brasil. Guia de vigilância em saúde 3ª edição [Internet]. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2019. 741 p. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_volume\\_unico\\_3ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf)
  42. 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.
  43. Jiménez N, Escalante T, Gutiérrez JM, Rucavado A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2421–8.

44. Witjas FMR, van den Berg BM, van den Berg CW, Engelse MA, Rabelink TJ. Concise Review: The Endothelial Cell Extracellular Matrix Regulates Tissue Homeostasis and Repair. *Stem Cells Transl Med.* 2018;8(4):375–82.
45. Miner JH. Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech.* 2008;71(5):349–56.
46. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C, Fox JW. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel).* 2016;8(10).
47. Herrera C, Escalante T, Voisin MB, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, et al. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(4):1–21.
48. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel).* 2016;8(4).
49. Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adhes Migr.* 2013;7(1):135–41.
50. Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JCR, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol.* 2008;17(6):473–80.
51. Kanashiro MM, De Escocard RCM, Petretski JH, Prates M V., Alves EW, Machado OLT, et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(7):1179–86.
52. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(18):2897–912.

53. Costal-Oliveira F, Stransky S, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Vivas-Ruiz DE, Yarlequé A, et al. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.
54. Rucavado A, Nicolau CA, Escalante T, Kim J, Herrera C, Gutiérrez JM, et al. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. *Toxins (Basel)*. 2016;8(12):1–14.
55. Maria Fernandes C, Regina Zamuner S, Pavan Zuliani J, Rucavado A, Maria Gutiérrez J, de Fátima Pereira Teixeira C. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. 2006;47(5):549–59.
56. Otero R, Gutiérrez JM, Núñez V, Robles A, Estrada R, Segura E, et al. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(6):696–700.
57. Rucavado A, Núñez J GJ. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int J Exp Pathol*. 1998;79((4)):245–54.
58. Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;72(2):183–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>
59. Panfoli I, Calzia D, Ravera S, Morelli A. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: Old and new approaches. *Toxins (Basel)*. 2010;2(4):417–27.
60. Hawgood BJ. Pioneers of Anti-Venomous Serotherapy: History. 1992;30(5):573–9.
61. 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).
62. Shaykhiev R. Co-operative regulation of epithelial homeostasis and immunity homeostasis and immunity. 2007;(July). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/36724846\\_Co-operative\\_regulation\\_of\\_epithelial\\_homeostasis\\_and\\_immunity](https://www.researchgate.net/publication/36724846_Co-operative_regulation_of_epithelial_homeostasis_and_immunity)
63. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Vol. 8, Elsevier. 2015. 1195 p.
64. Palomino DC arolin. T, Marti LC avalheir. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(3):469–73.
65. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 SUPPL. 2):460–75.
66. Inflammation A. Acute Inflammation. *Acta Otolaryngol*. 1931;16(3--Feb):171–231.
67. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55(5):662–75.
68. 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]*. Elsevier Ltd; 2012;60(1):12–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.004>
69. 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*. Elsevier Ltd; 2017;85:238–47.
70. Murphy K, Travers P, Walport M, Paula A, Lambert F, Beatriz C, et al. *Imunobiologia de Janeway*. 7ª. Machado DC, editor. Porto Alegre: Artmed; 2010.

71. Punchard NA, Whelan CJ, Adcock I. The Journal of Inflammation. *J Inflamm*. 2004;1:1–4.
72. Carl Nathan. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(19/26):846–52.
73. Gallin JI. Leukocyte chemotaxis. *Fed Proc*. 1983;42(11):2851–62.
74. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. [Review] [103 refs]. *Nature*. 1998;392(6673):245–52.
75. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci* [Internet]. Japanese Society for Investigative Dermatology; 2015;77(2):85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.08.012>
76. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1219–26.
77. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2760–9.
78. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The Proinflammatory CD14 + CD16 + DR ++ Monocytes Are a Major Source of TNF . *J Immunol*. 2002;168(7):3536–42.
79. Me F, C SO, C D, M N, Ha A. Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Nature research*. 2020;1–16.
80. Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *Int Rev Immunol*. 2014;33(6):470–89.
81. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: Origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;178(1):19–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.08.003>

82. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591–619.
83. Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:551–79.
84. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocyte. *Nature.* 1989;341(6241):447–50.
85. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173(5):1099–109.
86. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1379–88.
87. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: Progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877–900.
88. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity: Immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):347–55.
89. Kilmer PD. Review Article: T and B Lymphocytes in Humans. *Journalism.* 1975;11(3):369–73.
90. Pierce SK, Morris JF, Grusby MJ, Kaumaya P, Buskirk A VAN, Srinivasan M, et al. Antigen-Presenting Function of B Lymphocytes. *Immunol Rev.* 1988;106(1):149–80.
91. Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks GL, Mashaly MM. Initiation of humoral immunity. II. The effects of T-independent and T-dependent antigens on the distribution of lymphocyte populations. *Dev Comp Immunol.* 2002;26(8):761–71.
92. De Almeida MT, Freitas-De-Sousa LA, Colombini M, Gimenes SNC, Kitano ES, Faquim-Mauro EL, et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from *Bothrops atrox* venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. *Toxins (Basel).* 2020;12(2).

93. Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, Pereira Teixeira CDF. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: Release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. 2005;46(7):806–13.
94. Gutiérrez JM, Chaves F, Cerdas L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop*. 1986;34(2):209–14.
95. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):469–78.
96. Zoccal KF, Bitencourt CDS, Paula-Silva FWG, Sorgi CA, De Castro Figueiredo Bordon K, Arantes EC, et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. *PLoS One*. 2014;9(2).
97. 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]. Elsevier Ltd; 2013;67:37–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.010>
98. Clissa PB, Laing GD, Theakston RDG, Mota I, Taylor MJ, Moura-da-Silva AM. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. 2001;39(10):1567–73.
99. 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*. 2012;60(1):12–20.
100. Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon*. 2001;39(10):1505–13.
101. Pires WL, de Castro OB, Kayano AM, da Silva Setúbal S, Pontes AS, Nery

- NM, et al. Effect of BjcUL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;41:30–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.003>
102. Olivo R do A, Teixeira CFP, Wallace JL, Gutierrez JM, Zamuner SR. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*. 2007;49(5):670–7.
103. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;54(1):67–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.019>
104. Moreira V, Gutiérrez JM, Amaral RB, Zamuner SR, Teixeira C de FP. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2009;80(2–3):107–14.
105. da Silva WD, Tambourgi D V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2011;10(5):343–57.
106. Menaldo DL, Bernardes CP, Jacob-Ferreira AL, Nogueira-Santos CG, Casare-Ogasawara TM, Pereira-Crott LS, et al. Effects of *Bothrops atrox* venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;80:91–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.10.015>
107. Rodrigues FG, Petretski JH, Kanashiro MM, Lemos L, Dias Da Silva W, Kipnis TL. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. *Mol Immunol*. 2004;40(16):1149–56.
108. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in bothrops atrox snakebites. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1–12.

109. Leon G, Sanchez L, Hernandez A, Villalta M, Herrera M, Segura A, et al. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2012;10(5):381–98.
110. 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.
111. FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001. 120 p.
112. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163–76.
113. Watson DA, Gaskill DF, Brown LO, Doorn SK, Nolan JP. Spectral measurements of large particles by flow cytometry. *Cytom Part A*. 2009;75(5):460–4.
114. MARINS SA, RANGEL SA. Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Inst Oswaldo Cruz. 2018;29:1–137.
115. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow cytometry. *J Invest Dermatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;132(10):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.282>
116. Menon V, Thomas R, Ghale AR, Reinhard C, Pruszek J. Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. *J Vis Exp*. 2014;(94):1–2.
117. BD Biosciences. BD Cytometric Bead Array - Multiplexed Bead-Based Immunoassays. BD Biosci. 2012;
118. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr*. 1990;6(1):35–9.
119. Costa AG, Ramasawmy R, Val FFA, Ibiapina HNS, Oliveira AC, Tarragô AM, et al. Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence

- cytokine productions in malaria-vivax. *Cytokine* [Internet]. Elsevier; 2018;110(January):374–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.008>
120. 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.
  121. Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys*. 1989;275(1):63–71.
  122. Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Vol. 63, *Experimental and Molecular Pathology*. 1995. p. 186–99.
  123. Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WHK, Vorraro F, De Franco M, Ibañez OM, et al. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: The role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. *Toxicon*. 2008;52(5):619–27.
  124. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):268–79.
  125. Silva FS, Ibiapina HNS, Neves JCF, Coelho KF, Barbosa FBA, Lacerda MVG, et al. Severe tissue complications in patients of bothrops snakebite at a tertiary health unit in the Brazilian Amazon: Clinical characteristics and associated factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54(February).
  126. Nicoletti AF, de Medeiros CR, Duarte MR, França FO de S. Comparison of *Bothropoides jararaca* bites with and without envenoming treated at the vital Brazil hospital of the Butantan Institute, state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):657–61.

127. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JLC, Theakston RDG, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*. 2008;51(8):1440–8.
128. Zuliani JP, Soares AM, Gutiérrez JM. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. *Toxicon*. 2020;187(July):188–97.
129. Resiere D, Mehdaoui H, Névière R, Olive C, Severyns M, Beaudoin A, et al. Infectious Complications following Snakebite by *Bothrops lanceolatus* in Martinique: A case series. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(1):232–40.
130. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: Physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*. 2019;9(8):1–15.
131. de Cássia Mothé Escocard R, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Queiroz de Carvalho EC, Dias da Silva W, et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*. 2006;211(1–2):37–46.
132. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1223–48.
133. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ. Host response to *Bothrops asper* snake venom - Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*. 1993;17(2):93–105.
134. Köse A, Akdeniz A, Babus SB, Göçmen M, Temel GO. The Usefulness of Platelet Distribution Width and Platelet Distribution Width to Lymphocyte Ratio in Predicting Severity and Outcomes in Patients with Snakebite. *Wilderness Environ Med [Internet]*. Elsevier Inc; 2021;32(3):284–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wem.2021.03.006>
135. Moreira V, Teixeira C, Borges Da Silva H, D'Império Lima MR, Dos-Santos MC. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. *Toxicon*. 2016;118:121–8.
136. Pucca MB, Peigneur S, Cologna CT, Cerni FA, Zoccal KF, Bordon KDCF,

- et al. Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. *Biochimie* [Internet]. Elsevier B.V; 2015;115:8–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.010>
137. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112(4):1461–71.
  138. D'Amélio F, Vigerelli H, de Brandão Prieto da Silva ÁR, Kerkis I. Bothrops moojeni venom and its components - an overview. *J Venom Res*. 2021;11:26–33.
  139. Elbey B, Baykal B, Yazgan ÜC, Zengin Y. The prognostic value of the neutrophil/lymphocyte ratio in patients with snake bites for clinical outcomes and complications. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(2):362–6.
  140. Petricevich VL. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004;3(3):325–32.
  141. Karla Oliveira Luna DP, Patricia Oliveira Luna K, Maria Xavier E, Peruhype Magalhães Pascoal V, Assis Martins-Filho O, Rêgo Alves Pereira V. Communication/Comunicação Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas* Resposta imune humoral em pacientes picados pela serpente *Bothrops erythromelas*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):731–2.
  142. Wellmann IAM, Ibiapina HNS, Sachett JAG, Sartim MA, Silva IM, Oliveira SS, et al. Correlating Fibrinogen Consumption and Profiles of Inflammatory Molecules in Human Envenomation's by *Bothrops atrox* in the Brazilian Amazon. *Front Immunol*. 2020;11.
  143. BARRAVIERA B, LOMONTE B, TARKOWSKI A, HANSON LÅ, 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.
  144. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines

- and Pain. *Brazilian J Anesthesiol.* 2011;61(2):255–65.
145. 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]. Elsevier Ltd; 2017;85:238–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.008>
146. 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.
147. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JMTJ, Politi V, Crampton JM, et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol.* 1996;26(9):2000–5.
148. 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.
149. Farsky SHP, Walber J, Costa-Cruz M, Curry Y, Teixeira CFP. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: In vivo and in vitro studies. *Toxicon.* 1997;35(2):185–93.

## 8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

A principal limitação encontrada no decorrer do estudo foi o curto período de recrutamento, além do fato de que a complicação local avaliada não foi elevada em nossos pacientes recrutados, o que refletiu no tamanho amostral. Além disso, o curto período de internação dos pacientes na fundação inviabilizou um acompanhamento mais extenso. As populações celulares avaliadas no

presente estudo não determinaram o perfil de neutrófilos, macrófagos e mediadores lipídicos. No entanto, os resultados aqui apresentados ajudam a compreender o repertório de resposta imune local e sistêmica destes envenenamentos que são de grande significância clínica. Embora não tenhamos avaliado o uso terapêutico de anti-inflamatórios adjuvantes, descrevemos possíveis alvos terapêuticos para estudos futuros, pela proposta de um possível biomarcador de prognóstico

## 9. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que pacientes acidentados por *B. atrox* com e sem complicações desenvolvem uma resposta inflamatória aguda na admissão, com níveis elevados de moléculas solúveis e células inflamatórias. Sugerimos que as moléculas CCL-2 e IL-6 exercem um importante papel na complicação tecidual grave, conjuntamente com o aumento dos percentuais das células B, apesar do destaque ao T0 durante as análises no grupo leve. Além disso, demonstramos que o perfil de resposta local difere do sistêmico, com a presença de um perfil inflamatório e imunomodulador no local da picada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

1. World Health Organization. Snakebite envenoming A strategy for prevention and control. Vol. 393, The Lancet. 2019. 131 p.
2. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. Bull World Health Organ. 1998;76(5):515–24.
3. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17063.
4. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD, et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. PLoS Negl Trop Dis.

- 2019;13(2):12–4.
5. World Health Organization. Snakebite envenoming. 2019.
  6. Ministerio da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2da edição. FUNASA, editor. Brasília: Ministerio da Saúde; 2001. 112 p.
  7. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Notificação de acidentes botrópicos no Brasil segundo região [Internet]. datasus.gov.br. 2020. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisAM.def>
  8. Feitosa ES, Sampaio V, Sachett J, De 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. Célio Campos Borges MS e MC dos S. Epidemiological and clinical aspects of snake accidentes in the municipalities of the State of Amazonas, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. 1999;32(11):637–46.
  10. 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):1–15.
  11. 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):1–12.
  12. Warrell DA. Snake bite. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2010;375(9708):77–88.
  13. Fox JW, Serrano SMT. Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*. 2008;8(4):909–20.
  14. Cardoso, João Luiz., Haddad Jr., Vidal, França, Francisco S., Malaque, Ceila Maria S., Wen F. *Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2nd ed. Sarvier, editor. São Paulo; 2009. 540p

15. Mebs D. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*. 2001;39(1):87–96.
16. Nature D primers. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(1):2017.
17. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V; 2017;159:32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>
18. Moura-Da-silva AM, Contreras-Bernal JC, Gimenes SNC, Freitas-De-sousa LA, Portes-Junior JA, Peixoto P da S, et al. The relationship between clinics and the venom of the causative amazon pit viper (*Bothrops atrox*). *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(6):1–17.
19. Fox JW, Serrano SMT. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;72(2):200–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>
20. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):969–85.
21. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 2005;45(8):997–1011.
22. Catarina de Fátima Pereira Teixeira, Cristina Maria Fernandes, Juliana Pavan Zuliani SFZ. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases Catarina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(1):181–4.
23. Olaoba OT, Karina dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon X* [Internet]. Elsevier Ltd; 2020;7:100052. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>

24. Panunto PC, Da Silva MA, Linardi A, Buzin MP, Melo SESFC, Mello SM, et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2006;47(1):21–31.
25. Kassab B, de Carvalho D, Marangoni S, Novello J. Characterization Of A Hemagglutinating Glycoprotein Isolated From *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Protein Pept Lett*. 2005;8(1):13–20.
26. Pires WL, Kayano AM, de Castro OB, Paloschi MV, Lopes JA, Boeno CN, et al. Lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom induces IL-10 release by TCD4+ cells and TNF- $\alpha$  release by monocytes and natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2019;106(3):595–605.
27. 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.
28. Kini RM, Clemetson KJ, Markland FS, McLane MA, Morita T. Toxins and hemostasis: From bench to bedside. *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*. 2011. 1-797 p.
29. Pradniwat P, Rojnuckarin P. Snake venom thrombin-like enzymes. *Toxin Rev*. 2014;33(1–2):16–22.
30. Du XY, Clemetson KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*. 2002;40(6):659–65.
31. 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]. Elsevier Ltd; 2013;62:75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.009>
32. Costa TR, Burin SM, Menaldo DL, de Castro FA, Sampaio S V. Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20(1):1–7.
33. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta - Mol*

- Cell Biol Lipids. 2000;1488(1–2):1–19.
34. Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. PLoS One. 2014;9(10).
  35. Fernandes CAH, Comparetti EJ, Borges RJ, Huancahuire-Vega S, Ponce-Soto LA, Marangoni S, et al. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from Bothrops brazili venom. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;1834(12):2772–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.10.009>
  36. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. Toxicon. 2003;42(8):915–31.
  37. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MRM, Fuly AL, Corrêa FMA, Rosa JC, et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. Biochem Pharmacol. 2002;64(4):723–32.
  38. Díaz C, Gutiérrez J, Lomonte B, Gené J. The effect of myotoxins isolated from Bothrops snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. BBA - Biomembr. 1991;1070(2):455–60.
  39. Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. Toxicon. 2003;42(8):947–62.
  40. Monteiro WM, Contreras-Bernal JC, Bisneto PF, Sachett J, Mendonça da Silva I, Lacerda M, et al. Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. Toxicon X. 2020;6.
  41. Ministério da Saúde do Brasil. Guia de vigilância em saúde 3ª edição

- [Internet]. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2019. 741 p. Available from: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_volume\\_unico\\_3ed.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf)
42. 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.
  43. Jiménez N, Escalante T, Gutiérrez JM, Rucavado A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2421–8.
  44. Witjas FMR, van den Berg BM, van den Berg CW, Engelse MA, Rabelink TJ. Concise Review: The Endothelial Cell Extracellular Matrix Regulates Tissue Homeostasis and Repair. *Stem Cells Transl Med*. 2018;8(4):375–82.
  45. Miner JH. Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech*. 2008;71(5):349–56.
  46. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C, Fox JW. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel)*. 2016;8(10).
  47. Herrera C, Escalante T, Voisin MB, Rucavado A, Morazán D, Macêdo JKA, et al. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):1–21.
  48. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins (Basel)*. 2016;8(4).

49. Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adhes Migr*. 2013;7(1):135–41.
50. Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JCR, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol*. 2008;17(6):473–80.
51. Kanashiro MM, De Escocard RCM, Petretski JH, Prates M V., Alves EW, Machado OLT, et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(7):1179–86.
52. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(18):2897–912.
53. Costal-Oliveira F, Stransky S, Guerra-Duarte C, Naves de Souza DL, Vivas-Ruiz DE, Yarlequé A, et al. L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–14.
54. Rucavado A, Nicolau CA, Escalante T, Kim J, Herrera C, Gutiérrez JM, et al. Viperid envenomationwound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. *Toxins (Basel)*. 2016;8(12):1–14.
55. Maria Fernandes C, Regina Zamuner S, Pavan Zuliani J, Rucavado A, Maria Gutiérrez J, de Fátima Pereira Teixeira C. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. 2006;47(5):549–59.
56. Otero R, Gutiérrez JM, Núñez V, Robles A, Estrada R, Segura E, et al. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(6):696–700.
57. Rucavado A, Núñez J GJ. Blister formation and skin damage induced by

- BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int J Exp Pathol*. 1998;79((4)):245–54.
58. Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;72(2):183–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.020>
  59. Panfoli I, Calzia D, Ravera S, Morelli A. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: Old and new approaches. *Toxins (Basel)*. 2010;2(4):417–27.
  60. Hawgood BJ. Pioneers of Anti-Venomous Serotherapy: History. 1992;30(5):573–9.
  61. 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).
  62. Shaykhiev R. Co-operative regulation of epithelial homeostasis and immunity homeostasis and immunity. 2007;(July). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/36724846\\_Co-operative\\_regulation\\_of\\_epithelial\\_homeostasis\\_and\\_immunity](https://www.researchgate.net/publication/36724846_Co-operative_regulation_of_epithelial_homeostasis_and_immunity)
  63. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Vol. 8, Elsevier. 2015. 1195 p.
  64. Palomino DC, Arolin T, Marti LC, Avalheir. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(3):469–73.
  65. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 SUPPL. 2):460–75.
  66. Inflammation A. Acute Inflammation. *Acta Otolaryngol*. 1931;16(3--Feb):171–231.
  67. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 1994;55(5):662–75.
  68. 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]. Elsevier Ltd; 2012;60(1):12–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.004>
69. 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*. Elsevier Ltd; 2017;85:238–47.
70. Murphy K, Travers P, Walport M, Paula A, Lambert F, Beatriz C, et al. *Imunobiologia de Janeway*. 7<sup>a</sup>. Machado DC, editor. Porto Alegre: Artmed; 2010.
71. Panchard NA, Whelan CJ, Adcock I. *The Journal of Inflammation*. *J Inflamm*. 2004;1:1–4.
72. Carl Nathan. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(19/26):846–52.
73. Gallin JI. Leukocyte chemotaxis. *Fed Proc*. 1983;42(11):2851–62.
74. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. [Review] [103 refs]. *Nature*. 1998;392(6673):245–52.
75. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci* [Internet]. Japanese Society for Investigative Dermatology; 2015;77(2):85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.08.012>
76. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1219–26.
77. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2760–9.
78. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The Proinflammatory CD14 + CD16 + DR ++

- Monocytes Are a Major Source of TNF . *J Immunol.* 2002;168(7):3536–42.
79. Me F, C SO, C D, M N, Ha A. Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Nature research.* 2020;1–16.
  80. Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. *Int Rev Immunol.* 2014;33(6):470–89.
  81. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: Origin, phenotype, and function. *Am J Pathol [Internet]. Elsevier Inc.;* 2011;178(1):19–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.08.003>
  82. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591–619.
  83. Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:551–79.
  84. Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocyte. *Nature.* 1989;341(6241):447–50.
  85. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173(5):1099–109.
  86. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1379–88.
  87. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: Progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:877–900.
  88. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity: Immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):347–55.
  89. Kilmer PD. Review Article: T and B Lymphocytes in Humans. *Journalism.* 1975;11(3):369–73.

90. Pierce SK, Morris JF, Grusby MJ, Kaumaya P, Buskirk A VAN, Srinivasan M, et al. Antigen-Presenting Function of B Lymphocytes. *Immunol Rev.* 1988;106(1):149–80.
91. Gehad AE, Lillehoj HS, Hendricks GL, Mashaly MM. Initiation of humoral immunity. II. The effects of T-independent and T-dependent antigens on the distribution of lymphocyte populations. *Dev Comp Immunol.* 2002;26(8):761–71.
92. De Almeida MT, Freitas-De-Sousa LA, Colombini M, Gimenes SNC, Kitano ES, Faquim-Mauro EL, et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from *Bothrops atrox* venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. *Toxins (Basel).* 2020;12(2).
93. Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, Pereira Teixeira CDF. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: Release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon.* 2005;46(7):806–13.
94. Gutiérrez JM, Chaves F, Cerdas L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop.* 1986;34(2):209–14.
95. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(6):469–78.
96. Zoccal KF, Bitencourt CDS, Paula-Silva FWG, Sorgi CA, De Castro Figueiredo Bordon K, Arantes EC, et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. *PLoS One.* 2014;9(2).
97. 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]. Elsevier Ltd; 2013;67:37–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.010>

98. Clissa PB, Laing GD, Theakston RDG, Mota I, Taylor MJ, Moura-da-Silva AM. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. 2001;39(10):1567–73.
99. 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*. 2012;60(1):12–20.
100. Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon*. 2001;39(10):1505–13.
101. Pires WL, de Castro OB, Kayano AM, da Silva Setúbal S, Pontes AS, Nery NM, et al. Effect of BjcUL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Vitr [Internet]*. Elsevier Ltd; 2017;41:30–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.003>
102. Olivo R do A, Teixeira CFP, Wallace JL, Gutierrez JM, Zamuner SR. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*. 2007;49(5):670–7.
103. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon [Internet]*. Elsevier Ltd; 2009;54(1):67–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.019>
104. Moreira V, Gutiérrez JM, Amaral RB, Zamuner SR, Teixeira C de FP. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2009;80(2–3):107–14.
105. da Silva WD, Tambourgi D V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2011;10(5):343–57.
106. Menaldo DL, Bernardes CP, Jacob-Ferreira AL, Nogueira-Santos CG,

- Casare-Ogasawara TM, Pereira-Crott LS, et al. Effects of Bothrops atrox venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;80:91–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.10.015>
107. Rodrigues FG, Petretski JH, Kanashiro MM, Lemos L, Dias Da Silva W, Kipnis TL. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a Bothrops atrox snake venom low molecular mass proteinase. *Mol Immunol*. 2004;40(16):1149–56.
  108. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in bothrops atrox snakebites. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1–12.
  109. Leon G, Sanchez L, Hernandez A, Villalta M, Herrera M, Segura A, et al. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2012;10(5):381–98.
  110. 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.
  111. FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2001. 120 p.
  112. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163–76.
  113. Watson DA, Gaskill DF, Brown LO, Doorn SK, Nolan JP. Spectral measurements of large particles by flow cytometry. *Cytom Part A*. 2009;75(5):460–4.
  114. MARINS SA, RANGEL SA. Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Inst Oswaldo Cruz. 2018;29:1–137.
  115. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow

- cytometry. *J Invest Dermatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;132(10):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.282>
116. Menon V, Thomas R, Ghale AR, Reinhard C, Pruszek J. Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. *J Vis Exp*. 2014;(94):1–2.
117. BD Biosciences. *BD Cytometric Bead Array - Multiplexed Bead-Based Immunoassays*. BD Biosci. 2012;
118. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr*. 1990;6(1):35–9.
119. Costa AG, Ramasawmy R, Val FFA, Ibiapina HNS, Oliveira AC, Tarragô AM, et al. Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence cytokine productions in malaria-vivax. *Cytokine* [Internet]. Elsevier; 2018;110(January):374–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.008>
120. 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.
121. Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch Biochem Biophys*. 1989;275(1):63–71.
122. Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Vol. 63, *Experimental and Molecular Pathology*. 1995. p. 186–99.
123. Carneiro AS, Ribeiro OG, Cabrera WHK, Vorraro F, De Franco M, Ibañez OM, et al. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: The role of host genetic background on expression of adhesion molecules

- and release of endogenous mediators. *Toxicon*. 2008;52(5):619–27.
124. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):268–79.
  125. Silva FS, Ibiapina HNS, Neves JCF, Coelho KF, Barbosa FBA, Lacerda MVG, et al. Severe tissue complications in patients of bothrops snakebite at a tertiary health unit in the Brazilian Amazon: Clinical characteristics and associated factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54(February).
  126. Nicoletti AF, de Medeiros CR, Duarte MR, França FO de S. Comparison of Bothropoides jararaca bites with and without envenoming treated at the vital Brazil hospital of the Butantan Institute, state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):657–61.
  127. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JLC, Theakston RDG, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, Bothrops jararaca, in Brazil. *Toxicon*. 2008;51(8):1440–8.
  128. Zuliani JP, Soares AM, Gutiérrez JM. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. *Toxicon*. 2020;187(July):188–97.
  129. Resiere D, Mehdaoui H, Névière R, Olive C, Severyns M, Beaudoin A, et al. Infectious Complications following Snakebite by Bothrops lanceolatus in Martinique: A case series. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(1):232–40.
  130. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: Physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*. 2019;9(8):1–15.
  131. de Cássia Mothé Escocard R, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Queiroz de Carvalho EC, Dias da Silva W, et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with Bothrops atrox venom. *Immunobiology*. 2006;211(1–2):37–46.
  132. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1223–48.

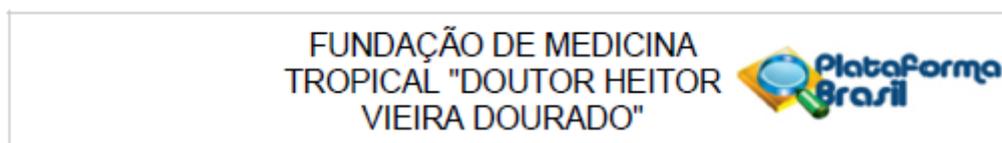
133. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LÅ. Host response to Bothrops asper snake venom - Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*. 1993;17(2):93–105.
134. Köse A, Akdeniz A, Babus SB, Göçmen M, Temel GO. The Usefulness of Platelet Distribution Width and Platelet Distribution Width to Lymphocyte Ratio in Predicting Severity and Outcomes in Patients with Snakebite. *Wilderness Environ Med [Internet]*. Elsevier Inc; 2021;32(3):284–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wem.2021.03.006>
135. Moreira V, Teixeira C, Borges Da Silva H, D'Império Lima MR, Dos-Santos MC. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by Bothrops atrox snake venom. *Toxicon*. 2016;118:121–8.
136. Pucca MB, Peigneur S, Cologna CT, Cerni FA, Zoccal KF, Bordon KDCF, et al. Electrophysiological characterization of the first Tityus serrulatus alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. *Biochimie [Internet]*. Elsevier B.V; 2015;115:8–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.010>
137. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112(4):1461–71.
138. D'Amélio F, Vigerelli H, de Brandão Prieto da Silva ÁR, Kerkis I. Bothrops moojeni venom and its components - an overview. *J Venom Res*. 2021;11:26–33.
139. Elbey B, Baykal B, Yazgan ÜC, Zengin Y. The prognostic value of the neutrophil/lymphocyte ratio in patients with snake bites for clinical outcomes and complications. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(2):362–6.
140. Petricevich VL. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004;3(3):325–32.
141. Karla Oliveira Luna DP, Patricia Oliveira Luna K, Maria Xavier E, Peruhype Magalhães Pascoal V, Assis Martins-Filho O, Rêgo Alves Pereira V. Communication/Comunicação Humoral immune response of patients

- bitten by the snake *Bothrops erythromelas* Resposta imune humoral em pacientes picados pela serpente *Bothrops erythromelas*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(6):731–2.
142. Wellmann IAM, Ibiapina HNS, Sachett JAG, Sartim MA, Silva IM, Oliveira SS, et al. Correlating Fibrinogen Consumption and Profiles of Inflammatory Molecules in Human Envenomation's by *Bothrops atrox* in the Brazilian Amazon. *Front Immunol*. 2020;11.
143. BARRAVIERA B, LOMONTE B, TARKOWSKI A, HANSON LÅ, 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.
144. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and Pain. *Brazilian J Anesthesiol*. 2011;61(2):255–65.
145. 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]. Elsevier Ltd; 2017;85:238–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.008>
146. 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.
147. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JMTJ, Politi V, Crampton JM, et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol*. 1996;26(9):2000–5.
148. 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.

149. Farsky SHP, Walber J, Costa-Cruz M, Curry Y, Teixeira CFP. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: In vivo and in vitro studies. *Toxicon*. 1997;35(2):185–93.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES LOCAIS E PERFIL CELULAR ENVOLVIDO NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES DE ACIDENTES OFÍDICOS BOTRÓPICOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

**Pesquisador:** Allyson Guimarães da Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 92017118.3.0000.0005

**Instituição Proponente:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MT/AM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.831.006

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se da segunda avaliação de um estudo intitulado AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES LOCAIS E PERFIL CELULAR ENVOLVIDO NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES DE ACIDENTES OFÍDICOS BOTRÓPICOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA do pesquisador Allyson Guimarães da Costa e colaboradores. Os autores informam que o estudo terá duas seções, uma retrospectiva e outra prospectiva utilizando o sistema iDoctor para captar informações clínico-epidemiológica dos pacientes atendidos na FMT-HVD no período de 2009-2018, enquanto que a seção prospectiva do estudo contará com amostragem por demanda espontânea, composta por indivíduos vítimas de acidente ofídico por serpente do gênero Bothrops que procuram atendimento na FMT-HVD no período de outubro de 2018 a maio de 2019. Serão realizadas coletas de sangue total e do conteúdo de flictenas periféricas ao local da picada. Essas amostras serão submetidas à técnica de citometria de fluxo (imunofenotipagem) para análise morfométrica e imunofenotípica. A coleta de sangue para o estudo será realizada no mesmo horário em que o paciente for atendido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), visando uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Caso se necessite coleta de sangue adicional, esta será realizada apenas em casos de extrema necessidade, como para confirmar algum resultado do diagnóstico. Estas punções venosas (coletas de sangue) para exames laboratoriais, que são partes de seu tratamento regular,

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 "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.831.006

podem causar dor no local da punção e/ou manchas roxas transitórias (que desaparecem com o tempo), tecnicamente conhecidas como equimoses e para diminuir esses riscos a equipe conta com integrantes com experiência em realizar esse tipo de procedimento.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Descrever a frequência de manifestações locais e o perfil celular envolvido na resposta imune local e sistêmica em pacientes de acidentes ofídicos botrópicos na Amazônia brasileira.

**Objetivo Secundário:**

Caracterizar as principais manifestações locais em acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* no período de 2009-2018;

Estimar a frequência de flictena e em pacientes de acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* no período de 2009-2018;

Descrever a influência do surgimento de flictena com o tempo de internação e evolução clínica em pacientes de acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* no período de 2009-2018;

Analisar o perfil morfológico e imunofenotípico das células envolvidas na resposta imune local e sistêmica em pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos da Amazônia brasileira;

Associar o perfil de células locais e sistêmicas com a evolução clínica de pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos oriundos da Amazônia brasileira.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A coleta de sangue para o estudo será realizada no mesmo horário em que o paciente for atendido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), visando uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Caso se necessite coleta de sangue adicional, esta será realizada apenas em casos de extrema necessidade, como para confirmar algum resultado do diagnóstico. Estas punções venosas (coletas de sangue) para exames laboratoriais, que são partes de seu tratamento regular, podem causar dor no local da punção e/ou manchas roxas transitórias (que desaparecem com o tempo), tecnicamente conhecidas como equimoses e para diminuir esses riscos a equipe conta com integrantes com experiência em realizar esse tipo de procedimento.

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 "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.831.006

**Benefícios:**

Os pacientes não terão benefícios imediatos, porém, a participação desses no estudo contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos (locais e sistêmicos) em resposta ao veneno da serpente e poderá, futuramente, colaborar para a implantação de novas terapias para o tratamento de acidentes ofídicos, visando um melhor controle da inflamação e possíveis infecções em indivíduos após os acidentes com serpentes, além de maior entendimento das necessidades de saúde da população na região Amazônica e, conseqüentemente, redução de gastos públicos com esses eventos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante e se devidamente adequada, estará apta para sua execução

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

FORAM ANEXADOS A ESTE PROTOCOLO OS SEGUINTE DOCUMENTOS:

- CARTA DE ANUÊNCIA DO DIRETOR DA DAM
- TCUD;
- CARTA DE ANUÊNCIA DO DIRETOR DE ENSINO E PESQUISA;
- TCLE
- CURRICULUM LATTES DOS 5 PESQUISADORES (HIPER LINCK);
- TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO;
- FOLHA DE ROSTO DEVIDAMENTE ASSINADA.

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

PENDÊNCIA 01: O pesquisador informa que a amostragem será por demanda espontânea, composta por indivíduos vítimas de acidente ofídico com característica botrópica que procurarem atendimento na FMT-HVD no período de outubro de 2018 a setembro de 2019. Informa também que os pacientes serão acompanhados em três momentos: entrada no Pronto Atendimento da FMT-HVD, antes da soroterapia (T0); 24 horas após o início da soroterapia (T24) e 48 horas após o início da soroterapia (T48). Como o estudo trás um desenho prospectivo com informações que mostram possíveis abordagens a pacientes vítimas de acidentes ofídicos, solicita-se a inclusão do TCLE (com linguagem de fácil compreensão para todas as faixas etárias).

PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 02: Solicita-se que seja anexado a este protocolo o curriculum lattes de todos os envolvidos na pesquisa e com a descrição (inclusive na metodologia) das atividades de cada um

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 "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.831.006

dos colaboradores na pesquisa.

PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 04: Solicita-se que seja incluída a carta de anuência do diretor de assistência medica da FMT/HVD.

PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 5: O pesquisador informa que O período retrospectivo do projeto levantará dados clínico epidemiológicos de 2009-2018. Como trata-se de um estudo que utilizará dados secundários e retrospectivos, solicita-se que seja anexado ao protocolo o termo de consentimento de utilização de dados-TCUD.

PENDÊNCIA ATENDIDA

**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 o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1181284.pdf	03/08/2018 16:56:05		Aceito
Outros	TermoDeAnuenciaInstitucional_DAM.pdf	03/08/2018 16:48:00	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	TCUD.pdf	02/08/2018 17:25:56	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia.pdf	02/08/2018 17:25:25	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Lista_De_Pesquisadores_E_Funcoes.pdf	02/08/2018 17:19:38	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_De_Dispensa_TCLE.pdf	02/08/2018 17:13:32	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/08/2018 17:13:00	Allyson Guimarães da Costa	Aceito

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 "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.831.006

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/06/2018 17:14:20	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	20/06/2018 01:52:09	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores.pdf	20/06/2018 01:42:32	Allyson Guimarães da Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 20 de Agosto de 2018

---

**Assinado por:**  
**Marilaine Martins**  
**(Coordenador)**

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

## **9.2 Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

#### **“Avaliação das Manifestações Locais e Perfil Celular Envolvido na Resposta Imune em Pacientes de Acidentes Ofídicos Botrópicos na Amazônia Brasileira”**

**Pesquisador:** Allyson Guimarães da Costa

Nome do Voluntário

---

Ao procurar atendimento na Fundação de Medicina Tropical - Doutor Heitor Vieira Dourado por ter sofrido acidente ofídico (ter sofrido picada de cobra) você será atendido, acompanhado e internado (caso necessário). Por isso está sendo convidado a participar de um estudo prospectivo que envolve a análise da resposta imune local e sistêmica (local da picada e no sangue) em pacientes com diferentes evoluções clínicas e seus sinais e sintomas.

Muitos pacientes retornam para casa sem a nova possibilidade de retorno ao hospital, para tratamento das complicações decorrentes dessa ferida, além disso, alguns evoluem para um quadro clínico que há presença de bolhas no local da picada em regiões próximas que podem, ou não, contribuir como facilitadoras de infecções secundárias. Com isso, este estudo (citado no título do termo) propõe entender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta ao veneno da serpente (cobra) para tentar conhecer as causas e possíveis tratamentos preventivos destas infecções e inflamações para melhorar o cuidado a esses pacientes.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações:

### **OBJETIVOS DO ESTUDO**

Identificar o perfil de resposta celular no local da picada em pacientes de acidentes ofídicos por Jararacas (serpentes do gênero Bothrops) com diferentes evoluções clínicas; Descrever o perfil celular envolvido na resposta imune do microambiente tecidual (local da picada) e circulante (no sangue) de acidentes ofídicos; Identificar um possível biomarcador de prognóstico de infecção secundária, envolvido no microambiente tecidual (local da picada) e circulante (sangue); Relacionar o perfil de resposta imune de acordo com o tempo de lesão e evolução clínica do paciente.

### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Se você aceitar participar deste estudo, neste primeiro dia de internação responderá a um questionário e será coletado sangue para exames laboratoriais de acordo com a rotina do hospital para o acidente ofídico (picada de cobra).

Para os exames realizados neste estudo será utilizado uma parte do material (5mL de sangue coletado) obtido para a realização de exames rotineiros como citado anteriormente. As coletas serão realizadas antes da realização do tratamento com antiveneno, 24 horas após a utilização do antiveneno e 48 horas após a utilização do antiveneno. Além disso, será realizada a coleta (aproximadamente 0,5mL) do material da flictena (bolha) formada na região próxima a picada.

## **RISCOS**

O seu tratamento não mudará, será exatamente o mesmo, caso você aceite participar ou não deste estudo. A coleta de sangue para o estudo será realizada no mesmo horário em que você foi atendido na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), visando uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Caso se necessite coleta de sangue adicional, esta será realizada apenas em casos de extrema necessidade, como para confirmar algum resultado do diagnóstico. Estas punções venosas (coletas de sangue) para exames laboratoriais, que são partes de seu tratamento regular, podem causar dor no local da punção e/ou manchas roxas transitórias (que desaparecem com o tempo), tecnicamente conhecidas como equimoses.

## **BENEFÍCIOS**

A sua participação contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos em resposta ao veneno da serpente (cobra) e poderá, futuramente, colaborar para a implantação de novas terapias para o tratamento de picada de serpentes (cobra), visando um melhor controle da inflamação e possíveis infecções em indivíduos após os acidentes com serpentes (cobra), além de maior entendimento das necessidades de saúde da população na Região Amazônica, e, conseqüentemente, redução de gastos públicos com esses eventos. Além disso, terá auxílio significativo no direcionamento de políticas públicas de saúde, visando à prevenção de infecções secundárias das lesões e, controle e tratamento da inflamação, decorrentes de acidentes ofídicos.

## **ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

Você será acompanhado e receberá assistência do quadro de funcionários composto por profissionais que são especialistas da Fundação

Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e ganhará toda a assistência disponível na FMTHVD para seu cuidado. Durante os dias de internação, ou seja, durante a participação neste estudo, sempre terá como referência os responsáveis pela pesquisa, listados neste Termo de Consentimento.

Em caso de dano por conta do desenvolvimento do estudo, e que seja necessário atendimento médico, ficará a cargo da FMT-HVD. Seu tratamento, e acompanhamento médico, acontecerão independentemente de sua participação neste estudo.

### **CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS**

Além da equipe de saúde da qual você receberá cuidados, os registros médicos referentes a você poderão ser consultados pelo Comitê de Ética da FMT-HVD e equipe de pesquisadores envolvidos. Ademais, seu nome não será revelado em nenhum momento ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que poderão ocorrer.

### **CUSTOS**

Não haverá qualquer custo para o paciente ou qualquer forma de pagamento/remuneração ao mesmo por sua participação neste estudo.

### **EM CASO DE PARTICIPAÇÃO**

É de suma importância que você fique ciente que a sua participação neste estudo é totalmente voluntária, também vale ressaltar que você poderá recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem qualquer penalidade ou perda de nenhum benefício o qual você tem direito.

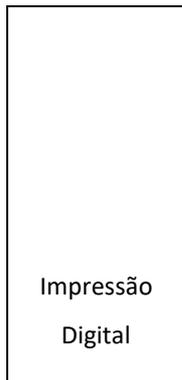
Diante disso, se você decidir que quer interromper a participação no estudo, a equipe deverá ser informada e as coletas de material referentes à pesquisa será interrompida imediatamente. Além disso, o médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

### **ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato ligando para o Enfermeiro Allyson Guimarães da Costa (tel. 92 9 81535233) ou Biomédico Hiochelson Najibe dos Santos Ibiapina (tel. 92 9 81651542). Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante deste estudo, também pode contar com outra forma de esclarecimento, com Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical, pelo telefone (92) 2127-3572 ou e-mail: cep@fmt.am.gov.br

### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA**

- Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo.
- Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por meio deste documento, dou livremente meu consentimento para participar do estudo.
- Entendo que poderei ser submetido a exames laboratoriais caso necessários para meu tratamento e não receberei de forma alguma qualquer compensação monetária por minha participação neste estudo.
- Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.



\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Paciente)      dia   mês   ano

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(Assinatura de Testemunha, se necessário)      dia   mês   ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Pesquisador)      dia   mês   ano

### 9.3 Anexo III – Questionário Clínico Epidemiológico

#### QUESTIONÁRIO – PÓS-CONSENTIMENTO

Prontuário \_\_\_\_\_ ID paciente: \_\_\_\_\_

Nome completo \_\_\_\_\_

Sexo: M  F

Data de nascimento:    /    /    Idade \_\_\_\_\_

Estado \_\_\_\_\_

Procedência do acidente \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

Zona de ocorrência \_\_\_\_\_ Acidente anterior \_\_\_\_\_

Data acidente:    /    /    Hora do acidente: \_\_\_\_\_

Chegada no P.A. \_\_\_\_\_ recebeu o soro: \_\_\_\_\_ tempo até receber o soro: \_\_\_\_\_

Acidente relacionado ao trabalho    SIM     NÃO

Profissão \_\_\_\_\_

Atividade efetuada na hora do acidente \_\_\_\_\_

Tipo acidente/ SORO: BOTROPICO  BOTROPICO/LAQUETICO

Local da picada: \_\_\_\_\_ lado acometido: \_\_\_\_\_ marca da presa \_\_\_\_\_

Número ampolas: \_\_\_\_\_

Classificação acidente: LEVE  MODERADO  GRAVE

Reação adversa: SIM  NÃO

Taquicardia: SIM  NÃO

Taquipneia: SIM  NÃO

Dispneia: SIM  NÃO

Urticária: SIM  NÃO

Náuseas: SIM  NÃO

Vômito: SIM  NÃO

Hipotensão: SIM  NÃO

Prurido: SIM  NÃO

Choque: SIM  NÃO

Broncoespasmo: SIM  NÃO

Rouquidão: SIM  NÃO

Reação anafilática: SIM  NÃO

Outra reação adversa, qual? \_\_\_\_\_

Medidas, qual? \_\_\_\_\_ NÃO

Produto local, qual? \_\_\_\_\_ NÃO

Comorbidades, qual? \_\_\_\_\_ NÃO

Fármaco, qual? \_\_\_\_\_ NÃO

Sangramento Local: SIM  NÃO

Gosto de sangue na boca: SIM  NÃO

Sangramento ocular: SIM  NÃO

Visão turva: SIM  NÃO

Equimose Local: SIM  NÃO

Equimose distal, onde? \_\_\_\_\_ NÃO

Vermelhidão: SIM, onde? \_\_\_\_\_ NÃO

Necrose: SIM, onde? \_\_\_\_\_ NÃO

Infecção: SIM, que dia? \_\_\_\_\_ NÃO

Síndrome compartimental: SIM, que dia? \_\_\_\_\_ NÃO

Abscesso: SIM, que dia? \_\_\_\_\_ NÃO

Flictenas: SIM, que dia e onde? \_\_\_\_\_ NÃO

Insuficiência renal: SIM, que dia? \_\_\_\_\_ NÃO

Íngua: SIM, onde? \_\_\_\_\_ NÃO

Febre: SIM  NÃO

#### 9.4 Anexo IV – Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de Imunofenotipagem Celular

<b>PROTOCOLO DE IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR</b>
<b>UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA</b>
<b>PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL FMT-HVD</b>
<b>ALUNO (a) RESPONSÁVEL: KEROLAINE FONSECA COELHO</b>
<b>ORIENTADOR: ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA</b>

***Projeto: perfil celular envolvido na resposta imune em pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos na Amazônia brasileira***

#### ❖ **Marcação de Superfície das Células do Sangue Periférico:**

1.1 Identificar e distribuir os Anticorpos (Ac) de superfície em 6 tubos conforme a tabela abaixo:

<b>Tubos</b>	<b>Perfil fenotípico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Volume</b>
<b>1</b>	<i>Controle Negativo</i>	-	-	10µL (PBS-W)
<b>2</b>	<i>Monócitos e Ativação Celular</i>	<i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-HLADR</i>	FITC APC PE	2 µL 1 µL 2 µL
<b>3</b>	<i>Células NK e NKT</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD56</i>	PE-Cy7 FITC PE	1 µL 1 µL 5 µL

<b>4</b>	<i>Células Dendríticas</i>	<i>Human Anti-CD123</i> <i>Human Anti- CD11c</i> <i>Human Anti-CD14</i>	FITC PE APC	2 µL 5 µL 1 µL
<b>5</b>	<i>Células B e B1</i>	<i>Human Anti-CD5</i> <i>Human Anti-CD19</i>	PE FITC	1 µL 1 µL
<b>6</b>	<i>Células T</i> <i>T CD4+ e T</i> <i>CD8+</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD4</i> <i>Human Anti-CD8</i>	FITC PE-Cy7 PE	1 µL 1 µL 1 µL

❖ **Marcação de Superfície das Células do Conteúdo Exsudativo:**

1.2 Identificar e distribuir os Anticorpos (Ac) de superfície em 6 tubos conforme a tabela abaixo:

<b>Tubos</b>	<b>Perfil fenotípico</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Volume</b>
<b>1</b>	<i>Controle Negativo</i>	-	-	10µL (PBS-W)
<b>2</b>	<i>Monócitos e Ativação Celular</i>	<i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-HLADR</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC APC PE PERCEP	2 µL 1 µL 2 µL 2 µL
<b>3</b>	<i>Células NK e NKT</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD16</i> <i>Human Anti-CD56</i> <i>Human Anti-CD45</i>	PE-Cy7 FITC PE PERCEP	1 µL 1 µL 5 µL 2 µL

4	<i>Células Dendríticas</i>	<i>Human Anti-CD123</i> <i>Human Anti- CD11c</i> <i>Human Anti-CD14</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC PE APC PERCEP	2 µL 1 µL 1 µL 2 µL
5	<i>Células B e B1</i>	<i>Human Anti-CD5</i> <i>Human Anti-CD19</i> <i>Human Anti-CD45</i>	PE FITC PERCEP	1 µL 1 µL 2 µL
6	<i>Células T</i> <i>T CD4+ e T</i> <i>CD8+</i>	<i>Human Anti-CD3</i> <i>Human Anti-CD4</i> <i>Human Anti-CD8</i> <i>Human Anti-CD45</i>	FITC PE-Cy7 PE PERCEP	1 µL 1 µL 1 µL 2 µL

❖ **Procedimentos:**

- 1.3 Após a distribuição dos anticorpos, adicione uma alíquota de 100µL da amostra de sangue total em cada tubo;
- 1.4 Vortexar;
- 1.5 Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz;
- 1.6 Ao final da incubação, adicionar 2mL de Solução de Lise (diluir 1:10 em água destilada);
- 1.7 Vortexar;
- 1.8 Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
- 1.9 Finalizada a incubação, centrifugar as amostras a 1500 rpm por 5 minutos;
- 1.10 Descartar o sobrenadante;
- 1.11 Adicionar 2mL de PBS-W em cada tubo;
- 1.12 Vortexar;

- 1.13 Logo em seguida, centrifugar as amostras novamente a 1500 rpm 5 minutos;
- 1.14 Descartar o sobrenadante;
- 1.15 Ressuspender em 300 $\mu$ L de PBS-W ou MFF (caso a leitura da mostra seja no dia posterior);
- 1.16 Vortexar brevemente;
- 1.17 Realizar aquisição no Citômetro de Fluxo.

## 9.5 Anexo V – Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de *Cytometric Bead Array* – CBA

<b>PROTOCOLO CYTOMETRIC BEAD ARRAY - CBA</b>
<b>UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA</b>
<b>PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL FMT-HVD</b>
<b>ALUNO (a) RESPONSÁVEL: KEROLAINE FONSECA COELHO</b>
<b>ORIENTADOR: ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA</b>

***Projeto: perfil celular envolvido na resposta imune em pacientes vítimas de acidentes ofídicos botrópicos na Amazônia brasileira***

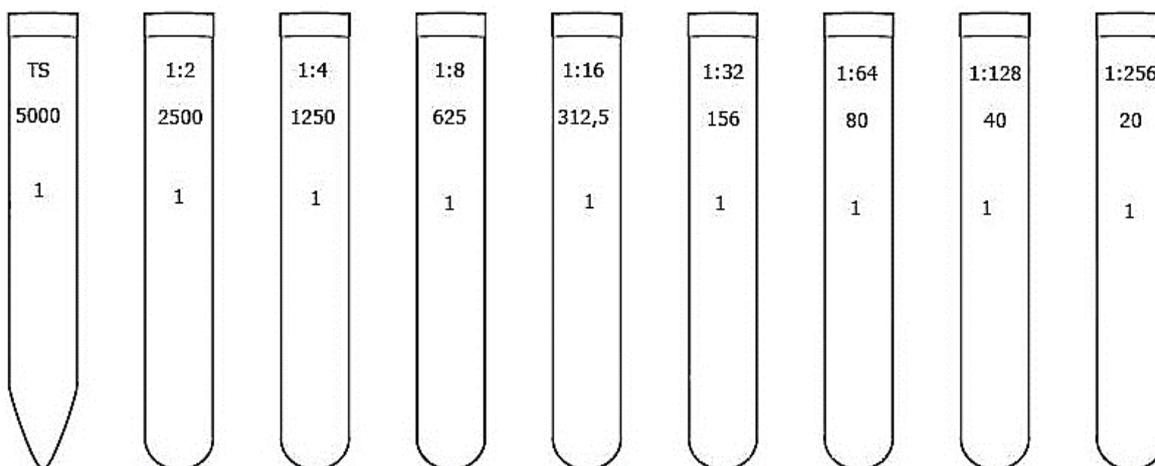
### ***Quantificação das Quimiocinas e Citocinas***

#### **1. Preparando do experimento (Dia anterior):**

- 1.1 Verificar o número de amostras a ser feita;
- 1.2 Separar as amostras em alíquotas de 100 µl em eppendorfs menores;
- 1.3 Para aliquotar as amostras, descongelar em banho maria (37°C) e centrifugar por 10 min a 14.000 rpm. Retirar o sobrenadante e colocar em eppendorfs menores. É importante utilizar o fluxo laminar para não contaminar as amostras;
- 1.4 Colocar novamente as amostras no freezer;
- 1.5 Identificar os tubos das amostras a serem utilizadas. É preferível utilizar números sequenciais para facilitar o procedimento (ex: 1, 2, 3, 4, 5, 5,);
- 1.6 Identificar um tubo para o controle negativo com a sigla “CN”;
- 1.7 Identificar um tubo para fazer o pool de BEADS com a sigla “BD”;

- 1.8 Identificar os 9 tubos da curva padrão para realizar as diluições. Identificar todos os tubos com o número 1 e suas respectivas concentrações e diluições:

**Exemplo:**



- 1.9 Identificar outros 9 tubos da curva padrão para fazer a reação e leitura no citômetro. Identificar todos com o número 2 e sua respectiva concentração e diluição;

- 1.10 Calcular quanto vai ser utilizado de cada BEAD;

**Exemplo:** 04 amostras:

**Soma-se:** 4 Amostras

09 Curva

01 CN

2 tubos (segurança) – Para não faltar reagente

**Total:** 16 tubos

**Cálculo:** 16 tubos x 50 (quantidade que eu vou colocar em cada tubo) = 800

800 / 05 (Número de BEADS que vou utilizar) = 160 µL

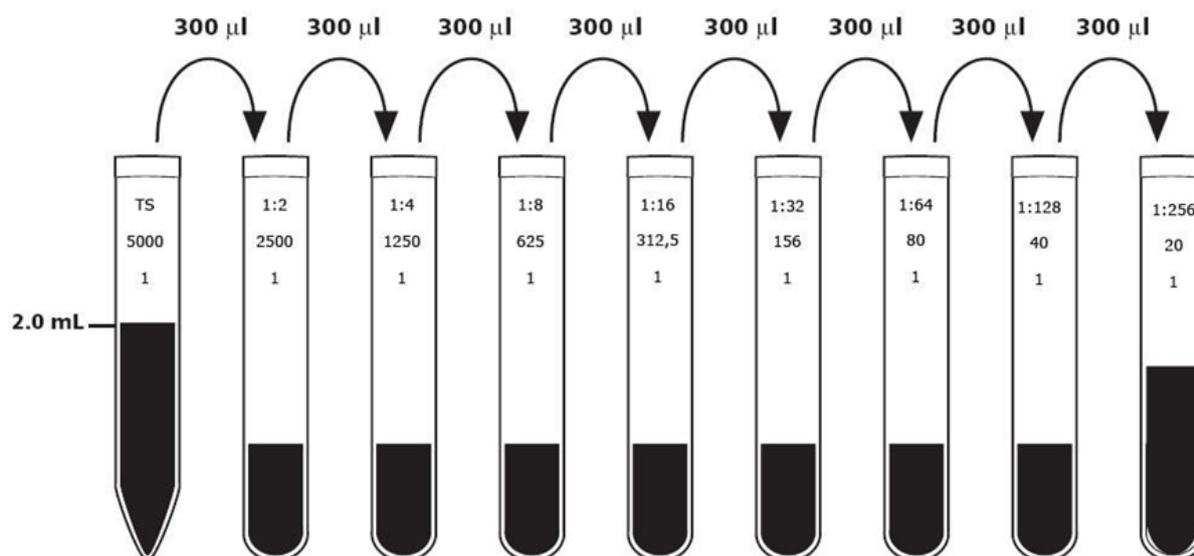
Utilizar 160 µL de cada BEAD.

**2. Preparo das amostras e Reagentes “G” e “F” (Dia do experimento):**

- 2.1 Descongelar as amostras em banho maria (37°C) e centrifugar por 10 min, a 14.000 rpm. Utilizar este mesmo procedimento se precisar diluir as amostras, caso seja necessário, utilizar o reagente G do kit pra diluição;
- 2.2 Colocar os reagentes G e F em tubos Falcon e centrifugar por 10 min a 2.000 rpm;
- 2.3 Retirar os tubos identificados e deixar todos prontos para o início do experimento, separar ponteiras, pipetas, descartes, etc.

### **3. Preparo dos Padrões:**

- 3.1 Reconstituir o padrão 15 min antes de começar o experimento. O padrão deve ser reconstituídos com 4,0 mL do reagente G. Após abrir o padrão, colocar 1000 µL do reagente G e agitar bem lentamente e com movimentos circulares por uns 5 min. Adicionar mais 1000 µL do reagente G e continuar mexendo bem suavemente. Com uma pipeta, passar o padrão para o tubo TS “1”. Colocar mais 1000 µL do reagente G para lavar o recipiente do padrão e com a pipeta transferir para o TUBO TS “1”. Repetir o procedimento com mais 1000 µL do reagente G, mexendo suavemente por 15 min ou até solubilizar bem;
- 3.2 OBS: Nunca vortexar o padrão e nem agitar fortemente.
- 3.3 Colocar 300 µL do reagente G em cada tubo da curva de diluição “1” exceto no tubo TS que está o padrão. Realizar diluições sucessivas conforme o exemplo abaixo;
- 3.4 No tubo CN colocar apenas o reagente “G”.



#### 4. Preparo do pool de BEADS:

- 4.1 Pegar o cálculo de quanto será necessário utilizar das BEADS (ex. 160  $\mu\text{L}$ );
- 4.2 Colocar 160  $\mu\text{L}$  de cada BEAD (reagentes A1 – A5 do kit) no tubo “BD”, vortexar novamente;
- 4.3 Utilizar 50  $\mu\text{L}$  do pool de BEADS para cada tubo de amostra, curva de diluição “2” e controle negativo (CN).

#### 5. Execução das reações:

- 5.1 Colocar 50  $\mu\text{L}$  do pool de BEADS em cada tubo da curva de diluição “2”. Não esquecer de vortexar as BEADS de tempo em tempo;
- 5.2 Colocar 50  $\mu\text{L}$  do pool de BEADS em todos os tubos das amostras e no tubo CN, sempre vortexando as BEADS;
- 5.3 Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do padrão dos tubos da curva de diluição “1” nos tubos da diluição “2”. Colocar respeitando as respectivas diluições;
- 5.4 Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de amostra nos seus respectivos tubos. É importante pegar somente o sobrenadante dos tubos;
- 5.5 Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do reagente G no tubo CN;

- 5.6 Adicionar 50  $\mu\text{L}$  do reagente “B” em cada tubo. Tanto nos tubos da curva de diluição “2”, quanto nos das amostras e CN;
- 5.7 Vortexar todos os tubos;
- 5.8 Incubar por 3h ao abrigo da luz;
- 5.9 Após incubação, adicionar 500  $\mu\text{L}$  do reagente “F” em cada tubo;
- 5.10 Centrifugar os tubos por 5 min a 1.500 rpm à 18°C;
- 5.11 Aspirar o sobrenadante deixado aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  em cada tubo;
- 5.12 Vortexar todos os tubos e proceder à leitura.

## **6. Aquisição das amostras e padrões no citômetro:**

- 6.1 Criar 2 etapas: “Standard” e “Samples”. Pode adquirir todas as amostras em uma única pasta e depois separar as 10 primeiras para pasta Standard e o restante para a Samples;
- 6.2 Abrir o Template de aquisição do CBA;
- 6.3 Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “Acquisition and Storage” a resolução do canal está em 1024;
- 6.4 Ajustar o número de eventos a serem contados para 2.100 em R1 (300 beads de cada analito);
- 6.5 Colocar o nome do arquivo no item FILE com caracteres alfa-numéricos. Exemplo: As iniciais de quem está fazendo o experimento e data do dia do procedimento. Ex: JP02052008.001;
- 6.6 Assegurar que a gate R1 está delimitando todas as beads. Adicionar a velocidade High;
- 6.7 Começar a leitura com o tubo CN e depois em ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para menor até o tubo TS.