



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS LOCAIS E IMUNOLÓGICOS DECORRENTES
DE ACIDENTE BOTRÓPICO NO AMAZONAS**

TÁVILA TATIANE AMORIM CAVALCANTE

MANAUS
MARÇO/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS LOCAIS E IMUNOLÓGICOS DECORRENTES
DE ACIDENTE BOTRÓPICO NO AMAZONAS**

TÁVILA TATIANE AMORIM CAVALCANTE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Sartim

MANAUS

MARÇO/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C376a Cavalcante, Távila Tatiane Amorim
Avaliação dos aspectos locais e imunológicos decorrentes de
acidente botrópico no Amazonas / Távila Tatiane Amorim
Cavalcante . 2022
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marco Aurélio Sartim
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Bothrops atrox. 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Efeitos locais. 5.
Infecção secundária. I. Sartim, Marco Aurélio. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à pessoa mais importante da minha vida, à pessoa que merece todo o meu esforço e à pessoa que mais amo no universo: eu mesma, Távila Cavalcante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à pessoa mais importante da minha vida, à pessoa que mais amo e a qual vale a pena tudo o que faço: eu mesma.

Agradeço a Deus, ao universo, meus guias e a espiritualidade por me auxiliarem nessa jornada de pós-graduação e em toda a minha vida. Não ando sozinha e sei que sempre serei guiada.

À minha família, principalmente meu pai, segunda pessoa mais importante da minha vida, por todo o investimento e paciência comigo. Também agradeço à minha mãe, principalmente por se orgulhar e falar de mim com tanta admiração. Aos meus irmãos Emily e Paulo Henrique, sempre tornando minha caminhada mais leve e mais feliz. À minha prima Nina e à minha afilhada Frida, assim como todos os animais que fazem parte da minha vida. Essa conquista também é de vocês.

Ao Paulo Collyer, meu amigo, companheiro e primeiro amor da minha vida. Muito do que passei nesse processo você esteve comigo me encorajando e sei que sempre vai estar.

À pessoa que me inspirou a ser melhor como mestrande e como pessoa, meu orientador: Dr. Marco Aurélio Sartim. Obrigada pela oportunidade e atenção desde o início dessa jornada. Obrigada pela paciência, forma única de ensinar e por sempre acreditar em mim.

Aos meus colaboradores, principalmente Dra. Jacqueline Sachett. Sinto muito orgulho em dar continuidade em um projeto que ela iniciou com tanto zelo e dedicação. Agradeço também aos doutores Wuelton Monteiro, Allyson Guimarães e ao Mestre Najibe Ibiapina por todas as dúvidas respondidas e reuniões que me ajudaram nesse trabalho.

Aos meus colegas de equipe que considero irmãos científicos: Ciro Judah, Adriane Batalha, Karolaine Bentes, Victor Prado, Márcia Beatriz, Thaís Lemos e aos demais colegas da equipe de laboratório.

Aos meus melhores amigos Karol Bentes, Yasmin Brandão, Rafael Gonçalves, Jansen Miranda, Nicole Freitas, Sarah Ribeiro, Alessandro Carvalho, Felipe Rodolfo e Itaciara Seixas por todo apoio, carinho e leveza que me proporcionaram durante os momentos mais tensos.

Aos colegas que conheci no PPGIBA e que sempre irei lembrar: Itaciara Seixas, Saintclayton, Felipe Rodolfo, Jéssica Samile, Damy Caroline, Gustavo Coelho e Josué Lacerda.

Agradeço imensamente à prof. Dra. Jerusa Araújo, melhor coordenadora que já conheci. Agradeço aos professores do PPBIGA, especialmente à Aya Sadahiro, uma das pessoas mais bondosas, brilhantes e maravilhosas que já tive a honra de conhecer.

Aos excelentes profissionais que fazem parte da secretaria do PPGIBA, Edson e Ana Paula, por sempre ajudarem tirando todas as dúvidas e fornecendo todas as informações necessárias.

Agradeço a Fundação de Medicina Tropical, o Instituto de Pesquisa Carlos Borborema (IPCCB), aos professores e à secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – PPGMT, ao grupo de pesquisa CEPCLAM, Biorepositório e toda equipe de laboratório do hospital e do instituto. Muito obrigada pela oportunidade e pelo acolhimento de alguns.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA).

À agência de financiamento FAPEAM, pela concessão de bolsa.

A todos os participantes desse estudo.

A todas as mulheres da ciência (que fazem parte ou não da minha vida) que amam o que fazem e o fazem muito bem.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho, muito obrigada!

***“O amor ao conhecimento
é um tipo de loucura.”***

- C. S. Lewis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ATP	Adenosina trifosfato
C1q	Componente 1q
C3a	Componente 3a
C4a	Componente 4a
C5a	Componente 5a
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCL-2	Proteína quimioatraente 1 de monócitos
CCL-5	Ligante 5 de quimiocina CC
CK	Creatina fosfoquinase
CXCL	Ligante 1 de quimiocina CXC
CXCL-2	Ligante 2 de quimiocina CXC
CXCL-8	Ligante 8 de quimiocina CXC
CXCL-9	Ligante 9 de quimiocina CXC
CXCL-10	Ligante 10 de quimiocina CXC
DAMPS	Damage-associated molecular patterns
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMT-HVD	Fundação de medicina tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
IL	Interleucina
INF	Interferon
LTB4	Leucotrieno B4
mL	Mililitro
ONU	Organização das Nações Unidas
PGE ₂	Prostaglandina E2
PPGIBA	Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada
PPGMT	Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical
RPM	Rotação por minuto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
UEA	Universidade estadual do Amazonas

UFAM
VAMPS

Universidade federal do amazonas
Venom Associated Molecular Pattern

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição espacial de picadas de cobra no Estado do Amazonas, de 2007 a 2012.....	4
Figura 2. Algumas espécies responsáveis por envenenamentos de <i>Bothrops</i> na Amazônia brasileira e áreas circunvizinhas e cerrado.....	5
Figura 3. Complicações locais decorrentes de envenenamentos por serpentes do gênero <i>Bothrops</i> na Amazônia.....	8
Figura 4. Escala visual analógica.....	17
Figura 5. Fluxograma de inclusão dos pacientes.....	18
Figura 6. Descrição dos eventos clínicos locais.....	21
Figura 7. Correlação entre moléculas solúveis e parâmetros clínicos.....	22
Figura 8. Perfil de citocinas, quimiocinas, parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com variáveis níveis de dor em T0.....	23
Figura 9. Perfil clínico parâmetros locais entre pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo.....	25
Figura 10. Avaliação dos mediadores imunológicos em pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo.....	26
Figura 11. Avaliação dos parâmetros laboratoriais em pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo.....	27
Figura 12. Perfil dos mediadores imunológicos em pacientes com e sem infecção secundária do dia do diagnóstico e do dia anterior.....	29, 30
Figura 13. Perfil dos parâmetros clínicos locais e laboratoriais em pacientes com e sem infecção secundária do dia do diagnóstico e do dia anterior.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos fisiopatológicos do envenenamento botrópico	7
Tabela 2. Descrição dos exames laboratoriais.....	17
Tabela 3. Características epidemiológicas dos pacientes do estudo.....	19
Tabela 4. Caracterização clínica dos pacientes do estudo.....	24

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Epidemiologia ofidismo	3
2.2 Fisiopatologia do envenenamento botrópico e <i>Bothrops atrox</i>	6
2.3 Processo inflamatório no envenenamento botrópico	8
2.4 Infecção secundária no envenenamento botrópico	10
3. JUSTIFICATIVA	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo geral.....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
5. METODOLOGIA	15
5.1 Modelo e local de estudo.....	15
5.2 População de estudo e amostra.....	15
5.3 Aspectos éticos.....	15
5.4 Coleta de amostras biológicas.....	16
5.5 Avaliação parâmetros clínicos	16
5.6 Avaliação parâmetros laboratoriais.....	17
5.7 Dosagem de citocinas.....	18
5.8 Análise estatística.....	18
6. RESULTADOS	19
6.1 Caracterização dos pacientes	19
6.2. Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes.....	19
6.4 Correlação entre mediadores inflamatórios solúveis e parâmetros clínicos e laboratoriais	22
6.5 Infecção secundária e características demográficas e epidemiológicas dos pacientes	25
6.6 Infecção secundária e parâmetros clínicos, laboratoriais e mediadores inflamatórios	25
7. DISCUSSÃO	34
8. CONCLUSÃO	43
9. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10. ANEXOS	56
10.1 Anexo I – Protocolo de Pesquisa.....	56
10.2 Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	80

RESUMO

A serpente da espécie *Bothrops atrox* é responsável pela maioria das notificações de acidentes ofídicos na região Norte do Brasil. A reação inflamatória desencadeada pela peçonha é responsável por graves efeitos locais e sistêmicos observados nos pacientes. Porém, dada a uma limitação da ação local do soro no paciente, os efeitos locais do veneno são de maior dificuldade de tratamento. Considerando a importância da resposta inflamatória associada aos efeitos clínicos observados no envenenamento, o presente projeto teve como objetivo avaliar aspectos clínicos, laboratoriais e imunológicos dos efeitos locais decorrentes de envenenamento botrópico no Amazonas. Trata-se de um estudo observacional de série de casos, longitudinal e retrospectivo realizado em pacientes vítimas de acidentes botrópicos atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), entre 2014 e 2016. Na admissão do paciente (T0), 24h (T1), 48h (T2), 72h (T3) e 7 dias após a soroterapia (T4) foram os momentos em que as amostras de sangue foram coletadas e os parâmetros clínicos (edema local, temperatura local e dor) e laboratoriais foram avaliados. Do plasma obtido do sangue dos pacientes, foram avaliadas citocinas e quimiocinas, além de parâmetros laboratoriais como leucócitos totais, neutrófilos e velocidade de hemossedimentação (VHS), creatinaquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). Um total de 94 pacientes foram considerados elegíveis para o estudo, sendo 42 com infecção secundária e 52 sem infecção secundária. Em relação aos parâmetros clínicos, observou-se um edema e aumento de temperatura local, que mantiveram aumentados ao longo do tempo, porém sem alterações entre esses tempos. Quanto a dor, pacientes apresentaram maior frequência de dores moderadas e intensas em T0, reduzindo ao longo do tempo. Na análise de correlação entre citocinas/quimiocinas, parâmetros laboratoriais e parâmetros clínicos observou-se uma correlação positiva entre edema e temperatura local com IL-6 e TNF, leucócitos totais, neutrófilos e VHS. Essa mesma análise foi capaz de evidenciar um perfil de resposta envolvendo mediadores solúveis e parâmetros celulares e de lesão tecidual. Não foram observadas correlações entre dor e mediadores inflamatórios e laboratoriais. As análises entre pacientes com e sem infecção secundária mostraram que o evento da infecção bacteriana foi responsável por potencializar a resposta inflamatória relacionada a ação do veneno, sendo os mediadores IL-6, IL-10, CXCL-8, leucócitos totais, neutrófilos e VHS aumentados quando a infecção está instalada. Ainda, os mediadores IL-10, CCL-2, CXCL-8 e CXCL-10 apresentaram-se elevadas previamente ao dia do diagnóstico de infecção secundária, creditam tais citocinas/quimiocinas como potenciais preditores de infecção. Já os valores de VHS encontram-se aumentados a partir da confirmação de infecção secundária, podendo ser um marcador que auxilia na confirmação diagnóstica dessa infecção. Os resultados obtidos no presente estudo foram capazes de elucidar aspectos fisiopatológicos dos efeitos locais associados ao processo inflamatório, associando parâmetros clínicos e laboratoriais. O estudo também evidenciou pela primeira vez a real importância da infecção secundária nos aspectos inflamatórios, potencializando a resposta imune induzida pelo veneno.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*; inflamação; citocinas; efeitos locais; infecção secundária.

ABSTRACT

Bothrops atrox snake is responsible for most reports of snakebites in the North region of Brazil. The inflammatory reaction triggered by the venom is responsible for serious local and systemic effects observed in patients. However, given a limitation of the local action of the serum on the patient, the local effects of the venom are more difficult to treat. Considering the importance of the inflammatory response associated with the clinical effects observed in the envenomation, the present project aimed to evaluate clinical, laboratory and immunological aspects of the local effects resulting from bothropic envenomation in Amazonas. This is an observational case series study, longitudinal and retrospective carried out in patients who were victims of bothropic accidents attended at the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), between 2014 and 2016. At patient admission (T0), 24h (T1), 48h (T2), 72h (T3) and 7 days after serum therapy (T4) were the moments when blood samples were collected and clinical parameters (local edema, local temperature and pain) and laboratory parameters were evaluated. From the plasma obtained from the patients' blood, cytokines and chemokines were evaluated, in addition to laboratory parameters such as total leukocytes, neutrophils and erythrocyte sedimentation rate (ESR), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH). A total of 94 patients were considered eligible for the study, 42 with secondary infection and 52 without secondary infection. Regarding the clinical parameters, an edema and a local temperature rise were observed, which remained raised over time, but without changes between these times. As for pain, patients had a higher frequency of moderate and severe pain at T0, decreasing over time. In the correlation analysis between cytokines/chemokines, laboratory parameters and clinical parameters a positive correlation was observed between edema and local temperature with IL-6 and TNF, total leukocytes, neutrophils and ESR. This same analysis was able to show a response profile involving soluble mediators and cellular and tissue injury parameters. No correlations were observed between pain and inflammatory and laboratory mediators. The analyzes between patients with and without secondary infection showed that the bacterial infection event was responsible for potentialize the inflammatory response related to the action of the venom, with the mediators IL-6, IL-10, CXCL-8, total leukocytes, neutrophils and ESR being increased when the infection is installed. Furthermore, the mediators IL-10, CCL-2, CXCL-8 and CXCL-10 were elevated prior to the day of diagnosis of secondary infection, crediting such cytokines/chemokines as potential predictors of infection. On the other hand, ESR values are increased from the confirmation of secondary infection, which may be a marker that helps in the diagnostic confirmation of this infection. The results obtained in the present study were able to elucidate pathophysiological aspects of the local effects associated with the inflammatory process, associating clinical and laboratory parameters. The study also showed for the first time the real importance of secondary infection in inflammatory aspects, enhancing the immune response induced by the venom.

Keywords: *Bothrops atrox*; inflammation; cytokines; local effects; secondary infection.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um importante problema de saúde pública no mundo, atualmente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas. Eles constituem importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente na Ásia, África Subsaariana, América Latina e partes da Oceania (1). Dados mundiais mostram uma estimativa de 1,8 a 2,7 milhões de casos anualmente, com aproximadamente 81.000 mortes (2).

No Brasil, envenenamentos por serpentes representam um significativo problema de saúde pública pela frequência com que ocorrem (cerca de 28.000 casos) e pela mortalidade associada (0,4% letalidade) (3). A região Norte é responsável por cerca de 33% das notificações de acidentes ofídicos no país (3), sendo no Estado do Amazonas uma incidência anual média de 52,8 casos por 100.000 habitantes, com uma letalidade de 0,6% para picadas de serpente na Amazônia brasileira, superior a de outras regiões do país (4). Esta taxa é maior em outros países amazônicos, principalmente se o antiveneno estiver indisponível (1).

Dentre as espécies, *Bothrops atrox* (jararaca-do-norte), serpente mais encontrada na Amazônia, é responsável por mais de 80% dos casos (5). A espécie *Bothrops atrox* é a de maior abundância na Amazônia, sendo a principal responsável dos acidentes na região (5,6). Os acidentes causados por essa serpente caracterizam-se por manifestações clínicas locais, como edema, equimose e dor, podendo surgir bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico (7). As complicações locais mais frequentes são: infecção secundária (celulite e abscesso), necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (8,9). As principais manifestações sistêmicas são: cefaleia, tontura, náuseas, vômitos, alterações da coagulação e sangramentos, podendo aparecer choque (10). As principais manifestações sistêmicas são caracterizadas por distúrbios hemostáticos, que levam a um quadro de incoagulabilidade sanguínea e sangramentos, choque, insuficiência renal aguda e sepse (11).

Os acidentes botrópicos são responsáveis por altos números de incapacitação de pacientes, sendo o processo inflamatório responsável por efeitos locais e sistêmicos capazes de gerar lesões e alterações funcionais em membros e órgãos (12). Os eventos inflamatórios causados pela peçonha de *Bothrops atrox* e seus componentes isolados podem induzir a um conjunto de eventos inflamatórios graves, o caracterizado pela

migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos, síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, mediadores lipídicos e componentes do sistema complemento (13–18). Os efeitos da inflamação associados aos efeitos prejudiciais das toxinas do veneno de serpentes podem contribuir para complicações locais em pacientes como edema, necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (7,9,19). Dentre as complicações sistêmicas, o processo inflamatório também está associado a alterações renais, por um efeito citotóxico direto de toxinas nos rins, ou pela produção de mediadores inflamatórios e consequente acúmulo leucocitário no local (7,20–22). O processo inflamatório também é capaz de alterar o equilíbrio hemostático para favorecer a ativação da coagulação (23).

Um outro aspecto importante associado aos efeitos inflamatórios está também associado a instalação de infecções secundárias decorrente do envenenamento. Dentre as manifestações clínicas, essas infecções são consideradas um episódio importante nos acidentes ofídicos, caracterizados como infecção bacteriana secundária no local da picada. Seu diagnóstico é descrito pelo aparecimento de sinais de infecção da ferida como abscesso, celulite ou fascíte necrosante, além de outras manifestações também atribuídas à atividade do veneno como eritema, calor, inchaço e/ou dor (24,25). A incidência desse evento varia de acordo com a espécie agressora, localização geográfica e unidade de saúde, cujos relatos anteriores mostraram o desenvolvimento de infecções de feridas em até 77% dos casos estudados (26,27). De acordo com Sachett et al. (9), em Manaus, as infecções bacterianas secundárias foram observadas em cerca de 40% das picadas de serpentes *Bothrops*.

Dentre os agentes patogênicos, tem sido relatado que bactérias Gram-positivas e negativas, assim como anaeróbicas, estiveram associadas a essas complicações, cuja inoculação está relacionada a cavidade oral colonizada, presas ou veneno da serpente (24,26,28). O tratamento consiste no uso empírico de antibioticoterapia, como amoxicilina/clavulanato ou ampicilina/sulbactam, e ciprofloxacina. Porém, uma resistência a essa estratégia empírica tem sido relatada (9,24,26,29). Portanto, o tratamento da infecção secundária é fundamental para evitar danos tissulares locais extensos e sepse progressiva (25,30).

E quando associada a uma ação do veneno, a instalação de uma infecção oportunista no local da picada por agentes patogênicos, como bactérias, também leva a uma resposta inflamatória, que pode piorar o quadro inflamatório. Estes efeitos são

responsáveis pela lesão local e formação de edema, dor, abscesso e celulite, podendo resultar em necrose e formação de bolhas, além de responsáveis pela diminuição da capacidade de regeneração tecidual (31–33) evidenciando assim que tanto a inflamação quanto os efeitos locais e a infecção secundária estão associados ao contexto de envenenamento por serpente.

Porém, ainda são escassos os estudos que mostram a participação dos eventos inflamatórios relacionados a infecção secundária decorrente de acidentes ofídicos, e o quanto esses efeitos interferem nos aspectos locais do envenenamento. Como ocorre com as picadas de cobra envolvendo outras espécies do gênero *Bothrops*, as reações locais não são neutralizadas de forma eficaz por soroterapia antiveneno convencional (34). Apesar de uma boa eficácia no controle dos efeitos nocivos, o soro antiofídico ainda apresenta adversidades quanto à sua efetividade, principalmente em relação aos efeitos locais (35).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia ofidismo

O acidente ofídico é uma doença tropical negligenciada e um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento. É uma causa relevante de morbidade e mortalidade, especialmente em áreas de extrema pobreza, como África Subsaariana, Sul e Sudeste Asiático, Papua Nova Guiné, América Central e América Latina (11). Dados mundiais mostram uma estimativa de 1,8 a 2,7 milhões de casos anualmente, com aproximadamente 81.000 mortes (2).

No Brasil, envenenamentos por serpentes representam um significativo problema de saúde pública pela frequência com que ocorrem (cerca de 28.000 casos) e pela mortalidade associada (0,4% letalidade) (36). Sendo o gênero *Bothrops* responsável pela maioria dos acidentes em todo o país (1). A Amazônia brasileira reporta a maior incidência de acidente ofídico no país, com 52,6 casos por 100.000 habitantes (11) e de acordo com Wen et al. (5), a *Bothrops atrox* também é a serpente peçonhenta mais comum nessa região, causando 80-90% dos envenenamentos. No Estado do Amazonas, a taxa

média de incidência é de 52,8 casos por 100.000 habitantes por ano, chegando a mais de 150 casos por 100.000 habitantes por ano em alguns municípios (4).

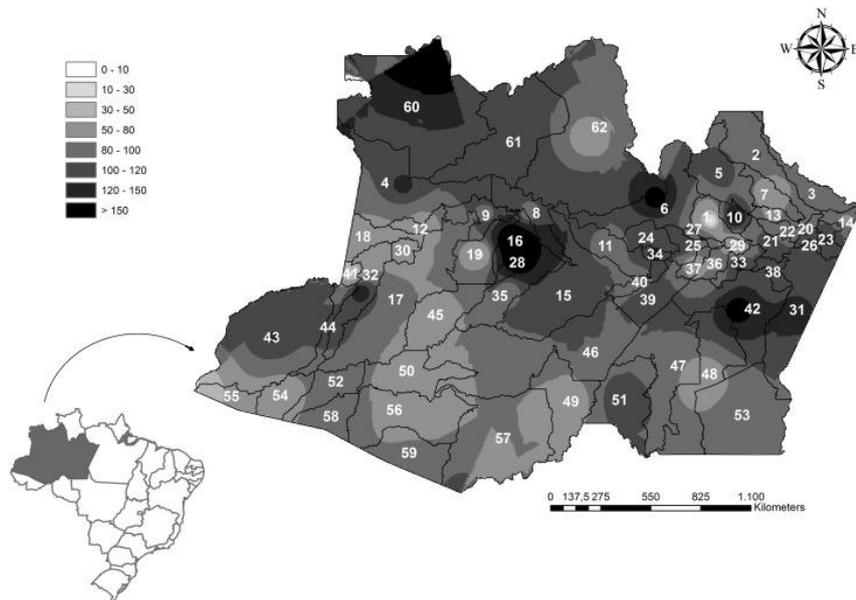


Figura 1. Distribuição espacial de picadas de cobra no Estado do Amazonas, de 2007 a 2012. Uma ampla área com altas taxas de incidência se estende do Nordeste à região Central do estado, onde as taxas de incidência são de aproximadamente 150 casos por 100.000 habitantes / ano (Feitosa *et al.*, 2015).

Existem cerca de 366 espécies de serpentes no Brasil, classificadas em 78 gêneros e reunidas em 10 famílias, sendo as serpentes peçonhentas correspondentes a 15% das espécies, pertencentes a duas famílias: família Viperidae, abrangendo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*; e a família Elapidae, correspondendo aos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (37). Nas áreas de floresta tropical da Amazônia brasileira, são encontradas as seguintes espécies de serpentes do gênero *Bothrops*: *B. atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili*, *B. marajoensis* e *B. taeniatus* (7,19). Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica (e consequentemente apresentam uma maior incidência nos casos de acidentes ofídicos), por exemplo, a *B. atrox* nas regiões de floresta amazônica (38). Esta espécie é encontrada especificamente nas planícies tropicais da América do Sul (39), exceto no Paraguai, Argentina e Uruguai, ocorrendo predominantemente por toda a Amazônia (40). Também é encontrada no leste dos Andes, incluindo o sudeste da Colômbia, sul e leste da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, leste do Equador e Peru, Panamá, norte da Bolívia e região norte de Brasil (41).



Figura 2. Algumas espécies responsáveis por envenenamentos de *Bothrops* na Amazônia brasileira e áreas circunvizinhas de cerrado. a) *Bothrocophias hyoprora*; b) *Bothrops atrox*; c) *Bothrops bilineatus*; d) *Bothrops brazili*; e) *Bothrops moojeni*; f) *Bothrops mattogrossensis* (Alcântara et al, 2018).

A serpente *Bothrops atrox* habita mais exclusivamente nas áreas florestais, apesar de ser ocasionalmente encontrada em habitats perturbados em torno de assentamentos humanos (o que inclui pastagens e lavouras) e áreas urbanas (39). Trata-se de uma espécie generalista, de coloração críptica, podendo ultrapassar 1,5 m de comprimento (40). Seu tamanho quando adulta, medido pelo comprimento focinho-cloaca (SVL), varia de 537 mm a 1532 mm (6,19), com os machos atingindo a maturidade com tamanhos menores que as fêmeas (19,22). *B. atrox* é uma serpente ativa principalmente durante a noite; o adulto caça preferencialmente no chão, enquanto os juvenis são mais encontrados sobre a vegetação (42,43). Esta serpente é comumente conhecida como jararaca, surucucurana, surucucu, surucucu-do-barranco, boca-podre e comboia (44). A composição de seu veneno é significativamente conhecida e tem sido usada para rastrear a relevância do

fenótipo do veneno para a adaptação em diferentes ambientes e para a evolução das espécies de serpentes (39).

2.2 Fisiopatologia do envenenamento botrópico e *Bothrops atrox*

Acidentes por serpentes peçonhentas são decorrentes da inoculação da peçonha, produzida por glândulas venenosas, por presas especializadas, podendo gerar alterações locais e sistêmicas na pessoa acidentada. As peçonhas de serpente consistem em uma mistura complexa de moléculas bioativas, conhecidas como toxinas, que são liberadas em suas vítimas por meio de picadas e usadas para defesa ou predação. As toxinas, por sua vez, exibem uma grande diversidade de composição química, incluindo proteínas, peptídeos, aminas biogênicas, lipídios e polissacarídeos, exibindo forte atividade e alta especificidade para seus alvos, que compreendem potencialmente todos os sistemas fisiológicos e tecidos (45). A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* apresenta uma composição química variada, sendo constituída principalmente por proteínas e peptídeos bioativos. Dentre as classes de toxinas presentes, podem-se citar as metalo e serinoproteases, fosfolipases, lectinas do tipo-C, L-aminoácido oxidases, peptídeos potenciadores de bradicinina, desintegrinas e hialuronidases (46–48). A análise proteômica da peçonha de *B. atrox* mostra que metaloproteases consiste na classe de toxinas mais abundante, sendo a classe PIII de maior concentração, seguidas de lectinas do tipo-C, serinoproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases (47,48).

A espécie *Bothrops atrox* é a de maior abundância na Amazônia, sendo a principal responsável dos acidentes na região (5,6). Os acidentes possuem características sazonais em paralelo com estação chuvosa, ocorrendo, principalmente, entre os meses de dezembro a junho, e o grande número de acidentes demonstra a carga desse problema na região (4). Os envenenamentos por *B. atrox* causam manifestações locais e, em proporção significativa, sistêmicas, dependendo da cobra envolvida, das características da vítima e das circunstâncias da lesão (39).

Os acidentes botrópicos se caracterizam por manifestações clínicas locais, como edema, equimose e dor, podendo surgir bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico. As marcas da presa no local da picada geralmente são visíveis, assim como o sangramento nos pontos de inoculação das presas. Poucas horas após o acidente pode aparecer linfadenomegalia regional com gânglios aumentados e dolorosos (11). As

principais manifestações sistêmicas são cefaleia, tontura, náuseas, vômitos, alterações da coagulação e sangramentos, podendo aparecer choque (7,10). As complicações locais mais frequentes incluem infecção secundária (celulite e abscesso), necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (8,9). Dentre as complicações sistêmicas surgem a insuficiência renal aguda e septicemia (7,9), mas as principais manifestações sistêmicas são caracterizadas por distúrbios hemostáticos, que levam a um quadro de incoagulabilidade sanguínea e sangramentos (gengivorragia, hematúria, sangramento conjuntival, hematêmese e hemorragia intracraniana), choque, insuficiência renal aguda e sepse (36). Tabela (1).

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

Tabela 1. Efeitos fisiopatológicos do envenenamento botrópico (adaptado Ministério da Saúde, 2019).

As principais manifestações clínicas locais são caracterizadas pela dor e edema local em mais de 90% dos pacientes, com a presença de equimose (8,7%) e formação de bolhas (1,7%), além de casos com necrose tecidual (12,3%) e celulite causada por infecção secundária bacteriana (40%) (Figura 1) (6,10,49,50). Já em relação às manifestações sistêmicas, distúrbios de coagulação e alterações renais são presentes nos envenenamentos sendo 15,3% dos pacientes apresentam sangramento sistêmico e insuficiência renal aguda (12,9%) (7,10).



Figura 3. Complicações locais decorrentes de envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* na Amazônia. **A)** Paciente 12 horas após a picada, com bolhas de inchaço e sero-hemorrágicas no membro superior esquerdo. **B)** paciente 24 horas após a picada apresentando síndrome compartimental no membro superior esquerdo, necessitando de fasciotomia. **C)** Paciente 24 horas após a picada com extensa área de edema e necrose no membro superior esquerdo e gangrena do quarto dedo. **D)** O mesmo paciente mostrado em C, após amputação do quarto dedo (na fase de cicatrização) (Wen *et al.*, 2015).

2.3 Processo inflamatório no envenenamento botrópico

O processo inflamatório é um mecanismo fisiológico de defesa da imunidade inata que visa a uma resposta inespecífica a agentes estranhos. O processo se caracteriza pelo acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e líquido derivado do sangue em um sítio de infecção ou lesão tecidual extravascular. Os leucócitos e proteínas plasmáticas, elementares para a resposta inata contra microrganismos, normalmente circulam no sangue e são recrutados para os sítios de infecção e lesão, onde desempenham as funções efetoras que destroem microrganismos e iniciam o reparo do tecido danificado. A inflamação aguda pode desenvolver-se em minutos a horas e durar dias. A inflamação crônica é um processo que assume o controle após a inflamação aguda, quando a infecção não é eliminada ou a lesão tecidual é prolongada. Em geral, envolve o recrutamento e ativação de monócitos e linfócitos. Os sítios de inflamação crônica frequentemente também sofrem remodelamento tecidual, com angiogênese e fibrose. Mesmo que estímulos imunes inatos contribuem para a inflamação crônica, pode haver também o

envolvimento do sistema imune adaptativo, pois as citocinas produzidas pelas células T são potentes indutores de inflamação (51).

A resposta inflamatória ao envenenamento por serpentes é considerada uma questão importante para a maioria das serpentes peçonhentas, como as da família Viperidae, e é principalmente associada ao dano tecidual local (52). Esse processo é iniciado pela capacidade de leucócitos locais e circulantes em reconhecerem diretamente os componentes da peçonha (VAMPs), além de produtos da degradação de componentes celulares e extracelulares gerados pela ação de toxinas nos tecidos (DAMPs) (17,53). Essa estimulação é responsável pela produção de mediadores inflamatórios presentes no plasma (sistema complemento) e produzidos por células (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos), culminando em um infiltrado inflamatório de células e resultando em um edema proeminente e a geração de dor, acompanhado de hemorragia e mionecrose (54,55).

As peçonhas do gênero *Bothrops* são compostas por moléculas em sua maioria de caráter imunogênico, isto é, capazes de induzirem uma resposta imune. Essa resposta é amplamente variada, dada a grande complexidade das toxinas, e é responsável pela estimulação de uma resposta inata e adaptativa, com o objetivo de neutralizar e eliminar as toxinas (54). As peçonhas desse gênero também podem induzir um conjunto de eventos inflamatórios graves, o que inclui o edema, a migração de leucócitos e uma rede complexa de mediadores liberados. Esses eventos podem progredir para uma resposta eficaz ou uma resposta inflamatória excessiva e descontrolada, dependendo do volume de veneno injetado na vítima (45).

Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, estudos em modelos animais mostraram que a peçonha de *Bothrops atrox* apresenta efeitos locais mais intensos comparados a outras espécies (56,57). Os eventos inflamatórios causados pela peçonha de *Bothrops atrox* e seus componentes isolados são caracterizados pela migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos, e síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas (IL-12p70, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e INF- γ), quimiocinas (CXCL-8, CXCL-1 e CXCL-2), mediadores lipídicos (PGE2, LTB4 e CysLeucotrienos) e componentes do sistema complemento (C1q, C3a, C4a e C5a) (14–18). Recentemente, um estudo foi realizado por Ibiapina e colaboradores (58) com pacientes que sofreram acidente por serpentes da espécie *Bothrops atrox*, os quais apresentaram um aumento plasmático dos mediadores inflamatórios CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL10,

IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10, além da diminuição de C3a, C4a e C5a. Esses pacientes também apresentaram valores de CXCL-8, CCL-2, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-5, além de C3a, C4a e C5a aumentados no exsudato das bolhas no local da picada quando comparados aos valores plasmáticos. Os autores ainda evidenciaram que níveis aumentados de IL-6, TNF- α e IL-1 β estavam associados à gravidade do envenenamento (58).

Dessa forma, uma reação inflamatória exacerbada induzida pelas peçonhas de serpentes estão diretamente associadas a um caráter degenerativo, isto é, responsáveis por um efeito adverso causado principalmente por neutrófilos e fagócitos pela produção de espécies reativas de oxigênio gerando lesões celulares (33,59). Associados aos efeitos nocivos das toxinas, esses efeitos deletérios da inflamação podem contribuir para complicações locais em pacientes como necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (7,9,19).

Dentre as complicações sistêmicas, o processo inflamatório também está associado a alterações renais, por um efeito citotóxico direto de toxinas nos rins, ou pela produção de mediadores inflamatórios e consequente acúmulo leucocitário no local (7,20,60). Além dos rins, alterações morfológicas e funcionais pulmonares com a presença de infiltrados leucocitários também foram evidenciados (61,62). Ainda, o processo inflamatório é capaz de alterar o equilíbrio hemostático para favorecer a ativação da coagulação (23). Uma vez induzido pela peçonha de serpentes botrópicas, esse processo inflamatório sistêmico é responsável pela ativação do eixo inflamação/coagulação, sendo o processo inflamatório responsável pela expressão do fator tecidual, molécula causadora da ativação da via extrínseca da cascata de coagulação (10,52,63).

2.4 Infecção secundária no envenenamento botrópico

O processo infeccioso no local da picada secundário ao acidente ofídico é caracterizado por uma infecção que se estabelece após o paciente já estar debilitado por uma primeira infecção, ocorrência essa devido ao comprometimento do sistema imunológico (64). Elas são diagnosticadas a partir de celulites, abscessos e fascíte necrótica. A infecção secundária possui uma ocorrência variada, devido à presença ou ausência dos fatores influenciadores na população estudada. Até o momento é incerto

afirmar a frequência em que ocorrem essas infecções e quais as bactérias que são responsáveis, além de suas origens, uma vez que a aplicação de torniquetes, terapias alternativas, ingestão de misturas nativas, incisões ou sucção no local do acidente potencializam o desenvolvimento das infecções secundárias. Na Amazônia brasileira, abscessos e celulite aparecem no local da mordida cerca de 40% dos pacientes picados por *Bothrops* (9). Além desses sinais, estudos têm demonstrado a presença de sinais clínicos de gravidade, como sinais flogísticos, tais como calor, rubor, dor e vesículas, necrose e secreção purulenta. Pacientes com acidentes ofídicos classificados como moderados ou graves, com maior lesão tecidual, são considerados mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecção bacteriana secundária (9,29).

A nível mundial, foi demonstrado em Taiwan que os pacientes apresentaram esta complicação em 44% dos casos, necessitando a realização de cirurgias. Na Nigéria, 41,7% das vítimas foram tratadas para infecção da ferida que foi definida como eritema, aumento da temperatura local, secreção purulenta e febre. Na Colômbia, as infecções foram identificadas em 30,8% dos acidentes e na Índia, 2,5% dos acidentes (65–68). No Brasil, foi demonstrada uma prevalência de 15,3% de infecções secundárias para acidentes botrópicos e laquéticos em Tocantins (69), 4,7% em acidentes botrópicos em São Paulo/Minas Gerais (70) e 15,7% dos pacientes em Goiânia evoluíram com formação de abscesso no local da picada (71). Nos acidentes botrópicos da região amazônica a prevalência de infecção foi de 8,3% nos pacientes em municípios do interior do Amazonas e 39,0% nos pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Vieira Dourado em Manaus (49,62,67).

Infecções secundárias em acidentes ofídicos podem resultar da invasão do tecido pela microbiota da pele do paciente e/ou microbiota oral da serpente causadora do acidente, que compreende uma ampla gama de microrganismos aeróbios e anaeróbios (9,26,38). Relatos da microbiota diversa nos abscessos dos acidentes botrópicos no Brasil passaram a ser documentados em estudos de casos em hospitais de referência como o Hospital Vital Brazil (Instituto Butantan, SP) e o Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (Secretaria de Estado da Saúde, GO), porém, tal prática nunca fez parte da rotina desses hospitais, dificultando o estabelecimento de correlações temporais (72,73). Foram encontrados microrganismos nas presas de variadas serpentes como *Bothrops*, víboras, cascavéis e naja, mostrando uma colonização de várias bactérias, as quais incluíram Enterobactérias, *Morganella spp.* e *Escherichia coli*, Estreptococos,

Aeromonas spp., *Staphylococcus aureus*, e anaeróbios tais como *Clostridium spp.* (26,72,74).

No estudo realizado por Taylor et al. (74), 15 cascavéis tiveram suas cavidades orais analisadas e das bactérias cultivadas, foram encontradas 58 cepas aeróbias e 28 cepas anaeróbias. As espécies frequentemente isoladas foram: *Pseudomonas aeruginosa*, espécies *Proteus*, Estafilococos coagulase-negativo, e as espécies de *Clostridium*. Num estudo de Bastos et al. (75), foram isoladas *Salmonella* (27,3%), *Citrobacter* (26,0%) e *Escherichia* (12,3%) de culturas de *Bothrops jararaca*. As bactérias isoladas em abscessos incluem espécies presentes tanto na boca quanto no veneno das serpentes, bem como na pele dos pacientes vítimas de acidente, como *Staphylococcus aureus*, por exemplo (67,76,77). Os abscessos das vítimas também têm sido estudados a fim de identificar o agente causador das infecções secundárias. Os bacilos Gram negativos aeróbicos foram os mais comuns na identificação, destacando-se a *Morganella morganii* (44,4% das culturas), *Escherichia coli* (20,2%), *Providencia sp* (13,1%) e *Staphylococcus aureus* (8,1%), de acordo com Andrade et al. (72). Os autores desse estudo realizaram o isolamento e caracterização bacteriana do material de 99 abscessos de acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* em Goiás, no período de 1984 a 1988. Nessa pesquisa, os autores procedem com um amplo estudo de antibiograma indicando o uso profilático de Cloranfenicol, por ser conhecidamente ativo contra a maioria das bactérias aeróbicas e anaeróbicas encontradas. Mas geralmente o tratamento para infecções secundárias consiste no uso empírico de antibioticoterapia, como amoxicilina/clavulanato ou ampicilina/sulbactam, e ciprofloxacina. Porém, uma resistência a essa estratégia empírica tem sido relatada (9,24,26,29). Portanto, o tratamento da infecção secundária é fundamental para evitar danos tissulares locais extensos e sepse progressiva (25,30).

3. JUSTIFICATIVA

Os acidentes botrópicos são responsáveis por altos números de incapacitação de pacientes, sendo o processo inflamatório responsável por efeitos locais e sistêmicos capazes de gerar lesões e alterações funcionais em membros e órgãos (12). Apesar de uma boa eficácia no controle dos efeitos nocivos, o soro antiofídico ainda apresenta adversidades quanto à sua efetividade, principalmente em relação aos efeitos locais (35). Dentre os mecanismos, o processo inflamatório observado no envenenamento botrópico tem como patogênese a ação das toxinas, associada a um efeito direto e indireto, além da instalação de infecções secundárias. O efeito direto consiste na ativação direta de leucócitos através dos VAMP's (17,18,59) e o efeito indireto está associado aos produtos da ação de toxinas sobre componentes de membrana basal, de matriz extracelular e citotoxicidade (DAMP's) (53,78). Associado a uma ação do veneno, a instalação de uma infecção oportunista no local da picada por agentes patogênicos, como bactérias, também leva a uma resposta inflamatória podendo piorar o quadro inflamatório. Esses efeitos são responsáveis pela lesão local e formação de edema, dor, abscesso e celulite, podendo resultar em necrose e formação de bolhas, além de responsáveis pela diminuição da capacidade de regeneração tecidual (31,33).

Para isso, a avaliação dos aspectos clínicos locais, laboratoriais e de mediadores imunológicos (citocinas e quimiocinas), além da avaliação da dinâmica progressão/regressão dos parâmetros ao longo do tempo após a soroterapia, representam uma ferramenta importante para melhor entender o mecanismo de resposta imune decorrente do envenenamento botrópico provocado por bactérias ou toxinas presentes nas peçonhas de serpentes. Dessa forma, estudos que visam melhor entender os mecanismos inflamatórios do envenenamento botrópico tem como objetivo desenvolver melhorias para o manejo clínico dos pacientes, avaliando eficácia da terapia antiofídica e a busca por novos biomarcadores de prognóstico da doença.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar aspectos clínicos, laboratoriais e imunológicos dos efeitos locais decorrentes de envenenamento botrópico no Amazonas.

4.2. Objetivos específicos

1) Quantificar mediadores imunológicos (quimiocinas e citocinas) em amostras de plasma de pacientes;

2) Descrever o perfil dos parâmetros clínicos locais associados ao envenenamento antes e após a soroterapia;

3) Correlacionar os parâmetros clínicos locais e os parâmetros laboratoriais e mediadores inflamatórios antes e após a soroterapia;

4) Avaliar os parâmetros clínicos locais, laboratoriais e mediadores inflamatórios entre pacientes com e sem infecção secundária.

5. METODOLOGIA

5.1 Modelo e local de estudo

Trata-se de um estudo observacional de série de casos, longitudinal e retrospectivo, realizado em pacientes vítimas de acidentes botrópicos atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), entre 1º de julho de 2014 e 31 de julho de 2016. A FMT-HVD é o centro de referência para o tratamento de acidentes por animais peçonhentos em indivíduos atendidos na rede hospitalar do estado do Amazonas. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes já foram coletados (disponíveis em sistema junto à FMT-HVD), além do plasma armazenado para realização das dosagens de mediadores inflamatórios.

5.2 População de estudo e amostra

A população de estudo constituiu um total de 186 pacientes diagnosticados vítimas de acidente ofídico causado por serpente do gênero *Bothrops*, atendidos na FMT-HVD, na faixa etária de 18 a 70 anos e que não realizaram soroterapia prévia. Como critério de exclusão, os pacientes que receberam soro ofídico em outra unidade hospitalar não foram incluídos, assim como gestantes, indígenas e indivíduos com doenças inflamatórias previamente notificadas. Também foram excluídos do estudo pacientes com amostra insuficientes ou malconservadas. O critério clínico de envenenamento obedeceu ao protocolo do Ministério da Saúde do Brasil, e os acidentes foram classificados como leves, moderados e graves. Todos os pacientes diagnosticados por envenenamento botrópico receberam soroterapia antibotrópica de acordo com o Manual do Ministério da Saúde do Brasil (Ministério da Saúde, 2017). Os pacientes incluídos foram acompanhados por 7 dias, sendo realizadas avaliações clínicas e laboratoriais em 5 momentos, sendo eles: antes da soroterapia (T0), 24 horas (T1), 48 horas (T2), 72 horas (T3) e 7 dias (T4) após a administração do soro antiofídico.

5.3 Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto maior que tem como título “Antibioticoterapia empírica precoce: um ensaio clínico randomizado para a avaliação de superioridade de ciprofloxacina versus placebo em infecção bacteriana secundária de pacientes vítimas de acidentes ofídicos na Amazônia Brasileira” aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical com CAAE: 19380913.6.3001.0005 (aprovação 492.892

/ 2014) e que inclui autorização para análise de citocinas/quimiocinas desses pacientes. Foram incluídos aqueles pacientes que leram e aceitaram participar do estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Todos os pacientes foram tratados de acordo com o Manual do Ministério da Saúde do Brasil (11).

5.4 Coleta de amostras biológicas

Foram coletados aproximadamente 4mL de sangue periférico nos 4 momentos distintos (T0 a T3 como descrito previamente) por punção venosa em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3.500 RPM por 5 minutos, o plasma foi aliquoteado e o armazenamento feito em freezer a -80°C, visando à realização da dosagem de quimiocinas e citocinas. Os dados clínico-epidemiológicos (sexo, idade, acidente anterior, zona de ocorrência, classificação do acidente e região anatômica acometida) e laboratoriais dos pacientes foram obtidos nos prontuários físicos e eletrônicos (sistema iDoctor) da FMT-HVD.

5.5 Avaliação parâmetros clínicos

1) Edema

1.1) Circunferência: utilizou-se uma fita métrica (escala em centímetros) para mensurar a circunferência do membro afetado na proximidade do local do acidente e no membro contralateral. Os resultados foram expressos entre a razão da circunferência, entre o membro afetado e contralateral.

1.2) Classificação: O edema também foi avaliado pela sua extensão no membro afetado, onde foi classificado como ausente, leve (afetando 1-2 segmentos de membro), moderado (afetando 3-4 segmentos de membro) e grave (afetando mais de 5 segmentos de membro).

2) Temperatura: mensurou-se por termômetro clínico digital infravermelho MODELO COLOR CHECK AC322. A aferição foi realizada o mais próximo do local da picada e na região anatômica idêntica do membro contralateral. Os resultados foram dados com o Δ temperatura (temperatura do lado acometido – temperatura contralateral).

3) Dor: Com o objetivo de avaliar a intensidade da dor, utilizou-se uma escala visual analógica que se estende de "sem dor" a "dor tão forte quanto poderia ser" com o valor de 0 a 10, respectivamente; o método de classificação gráfica com os termos descritivos intensa, moderada, leve e ausente também foi utilizado (79).

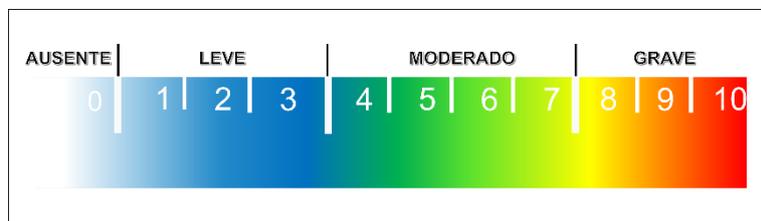


Figura 4: Escala visual analógica. Utilizando os termos descritivos ausente, leve, moderado e grave para caracterizar o nível de dor.

4) Infecção secundária: A infecção secundária ao acidente botrópico foi definida para este estudo como a presença de celulite e/ou abscesso Stevens et al. (80) até 48 horas após a admissão em qualquer um dos grupos foi o desfecho primário, sendo feita a antibioticoterapia com clindamicina (600mg – 6/6h) ou amoxicilina/clavulanato (875/125 mg – 12/12h) a critério do estabelecido no ensaio clínico e da rotina médica.

5.6 Avaliação parâmetros laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados pela rotina de atendimento do FMT-HVD, realizado no Laboratório de Análises Clínicas (Tabela 2).

Tipo de exame	Periodicidade da coleta	Local da realização
- Hemograma	Na admissão – 24h – 48h – 72h – 7 dias	FMT-HDVD
- Velocidade de hemossedimentação (VHS)		
- Creatina quinase (CK)		
- Lactato desidrogenase		

Tabela 2. Descrição dos exames laboratoriais. Os exames foram realizados nos pacientes durante sete dias de acompanhamento.

5.7 Dosagem de citocinas

As moléculas solúveis CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A foram quantificadas utilizando a técnica de CBA (Cytometric Bead Array). Utilizou-se os kits BD™ Human Chemokine (Code N° 552990, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA), e BD™ Human Th1, Th2, Th17 Cytokine (Code n° 560484, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo orientações descritas pelo fabricante. Para a aquisição das amostras, usou-se o Citômetro de Fluxo FACS Canto II (BD® Biosciences, San Jose, CA, EUA) realizado na Fundação HEMOAM, em conjunto com o software FCAP-Array™ (v3.01) para calcular os níveis de quimiocinas e citocinas.

5.8 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com os softwares GraphPad Prism (versão 8.0.1). Inicialmente, realizaram-se testes para verificar normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. As comparações de variáveis únicas com três ou mais grupos foram feitas por meio do teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn's. Comparações entre grupos com duas variáveis foram realizadas pelo teste 2way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey para múltiplas comparações ou pós-teste de Dunnet comparado a um controle. Para teste de duas amostras independentes, empregou-se o teste de Mann-Whitney. Para análise de correlação, aplicou-se o teste de Spearman e, em seguida, as redes foram construídas de acordo com a metodologia de Ibiapina HNS, 2019, com o software Cytoscape 3.0.3 (Cytoscape Consortium San Diego, CA, EUA), seguindo as recomendações e instruções do software. As correlações positivas e negativas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O padrão de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação em fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($r \geq 0,36$ a $r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$). Os níveis de significância estatística foram considerados como $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos pacientes

Um total de 94 pacientes foram incluídos no estudo pelos critérios de elegibilidade. Desse total, 42 apresentaram infecção secundária e 52 não apresentaram o sintoma. O diagnóstico de envenenamento por *Bothrops* nos pacientes incluídos foi confirmado por imunoensaio enzimático.

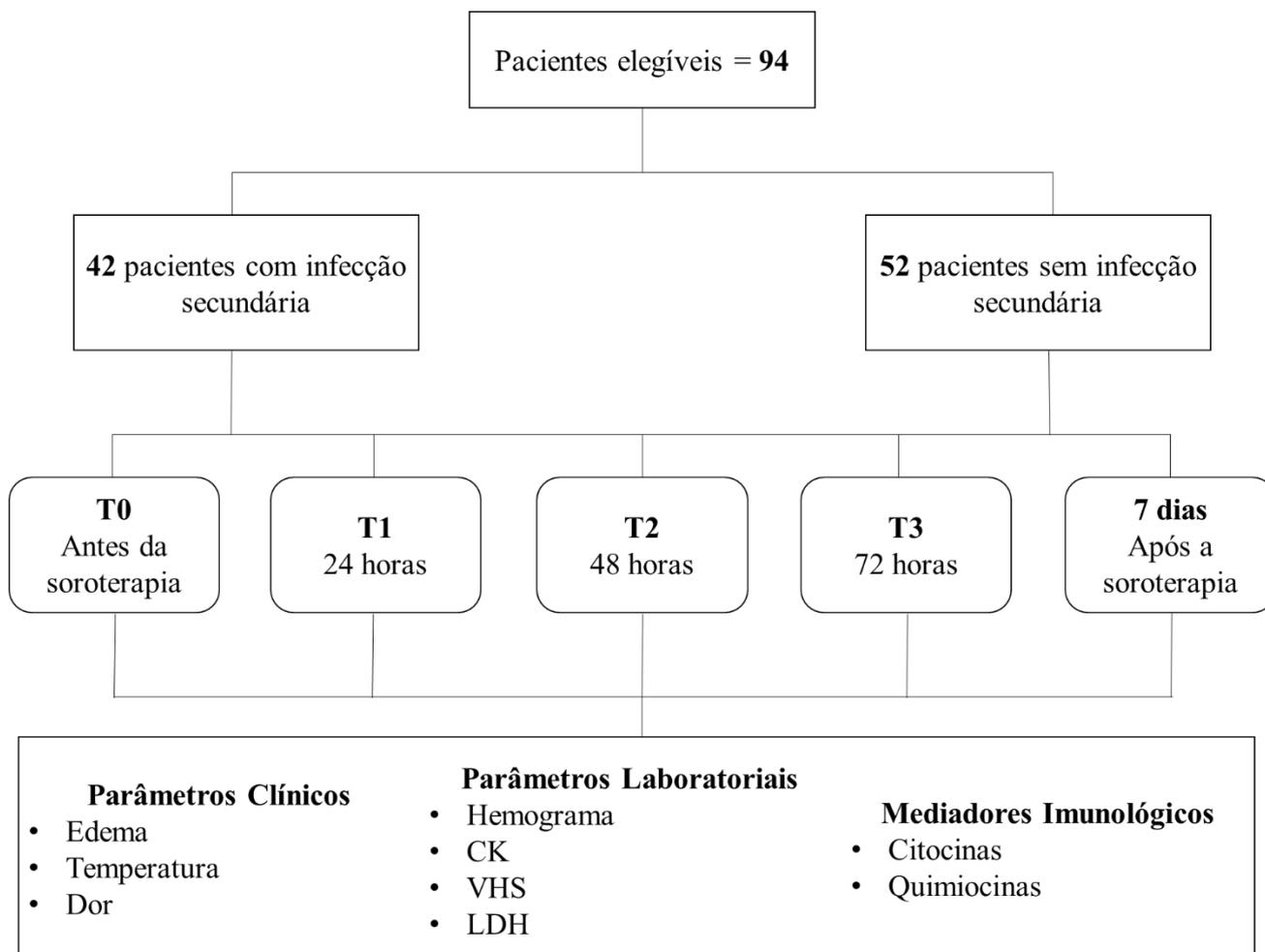


Figura 5. Fluxograma de inclusão dos pacientes. Momentos em que as amostras foram coletadas e os parâmetros avaliados. Os exames foram realizados nos pacientes durante sete dias de acompanhamento.

6.2. Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes

A caracterização epidemiológica evidenciou predominância dos acidentes em pacientes do sexo masculino (85,11%), principalmente advindos da zona rural (92,47%).

A faixa etária mais acometida foi entre 21-40 anos (39,78%). O sítio anatômico mais acometido foi em membros inferiores, especificamente os pés (62,37%), possuindo estatisticamente maior risco de acidentes neste local. Um total de 47,31% de acidentes foram classificados como relacionados ao trabalho. O tempo decorrido, desde a mordida até o atendimento médico, foi superior a 3 horas em 61,70%. Destes, 13,98% dos participantes relataram histórico anterior de picada de serpente. Ademais, 37,63% fizeram uso de medicamentos tópicos tradicionais, 33,33% fizeram uso de medicamentos orais, 8,51% relataram comorbidades anteriores ao acidente e o uso de torniquete foi relatado em 23,66% dos casos (Tabela 3).

Tabela 3: Características epidemiológicas dos pacientes do estudo.

Variáveis	N (%) 94	Com IS (%) 42	Sem IS (%) 52	OR	IC95%	Valor de p*
Sexo						
Feminino	14 (14.89)	6 (14.29)	8 (15.38)	0.917	0.291-2.885	0.882
Masculino	80 (85.11)	36 (85.71)	44 (84.62)	1	-	-
Idade (anos)						
0-10	5 (5.38)	4 (9.52)	1 (1.96)	1	-	-
11-20	11 (11.83)	5 (11.90)	6 (11.76)	0.208	0.017-2.518	0.217
21-40	36 (39.78)	16 (38.10)	21 (41.18)	0.190	0.019-1.873	0.155
41-60	27 (29.03)	13 (30.95)	14 (27.45)	0.232	0.023-2.357	0.217
>60	13 (13.98)	4 (9.52)	9 (17.65)	0.111	0.009-1.337	0.083*
Área de ocorrência						
Urbana	7 (7.53)	3 (7.14)	4 (7.84)	1	-	-
Rural	86 (92.47)	39 (92.86)	47 (92.16)	1.106	0.233-5.244	0.899
Local anatômico da mordida						
Membros inferiores	18 (19.35)	10 (23.81)	8 (15.69)	1	-	-
Membros superiores	2 (2.15)	0 (0)	2 (3.92)	#	-	-
Mão	15 (16.13)	3 (7.14)	12 (23.53)	0.200	0.042-0.961	0.045*
Pé	58 (62.37)	29 (69.05)	29 (56.86)	0.800	0.276-2.315	0.681
Mordida relacionada ao trabalho	44 (47.31)	18 (42.86)	26 (50.98)	0.721	0.317-1.639	0.435
Tempo decorrido da mordida até a assistência médica (em horas)						
0-3	58 (61.70)	23 (54.7)	35 (67.3)	1	-	-
4-6	17 (17.02)	10 (23.8)	7 (13.4)	1.956	0.638-5.991	0.240
>6	19 (21.28)	9 (21.4)	10 (19.2)	1.522	0.547-4.229	0.421
História anterior de picada de serpente	13 (13.98)	6 (14.29)	7 (13.73)	0.954	0.294-3.094	0.938
Uso de medicamentos tópicos tradicionais	35 (37.63)	14 (33.33)	21 (41.18)	0.714	0.305-1.671	0.438
Uso de medicamentos orais	31 (33.33)	13 (30.95)	18 (35.29)	0,84	0,37 - 2,02	0,8261
Uso de torniquete	22 (23.66)	11 (26.19)	11 (21.57)	1.290	0.495-3.364	0.602
Classificação do acidente						
Leve	36 (38.71)	11 (26.19)	25 (49.02)	1	-	-
Moderado	48 (51.61)	26 (61.90)	22 (43.14)	2.686	1.083-6.662	0.033*
Grave	9 (9.68)	5 (11.90)	4 (7.84)	2.841	0.638-12.654	0.171
Número de ampolas						
2-4	15 (15.9)	4 (9.5)	11 (21.1)	1	-	-
5-8	59 (62.7)	27 (64.2)	32 (61.5)	2.320	0.662-8.129	0.188
9-12	19 (20.2)	11 (26.1)	8 (15.3)	3.361	0.793-14.246	0.100
Comorbidades	8 (8.51)	3 (7.14)	5 (9.62)	0.723	0.162-3.218	0.670

IS = infecção secundária; # Não foi possível calcular a medida de associação devido ao tamanho da amostra; *valor de p mensurado pelo teste exato de Fisher.

6.3 Parâmetros clínicos locais

Dentre os parâmetros clínicos locais, o edema, temperatura local e dor foram avaliados (Figura 6). Para os parâmetros clínicos locais de edema, o membro acometido e o membro saudável (contralateral) foram medidos conforme descrito na metodologia, e a razão entre os dois parâmetros foi considerada normal quando igual a 1, e o membro edemaciado considerado quando valor >1 (Figura 6A). Dessa forma, observamos que a mediana de circunferência entre os pacientes de cada tempo analisado apresentou um valor acima de 1, caracterizando a formação de edema. Porém, não houve diferença significativa entre os tempos (figura 6A).

Para a temperatura, a diferença de temperatura entre os membros (Δ) foi avaliada, sendo o valor referência definido como 0. Conforme a Figura 6B, um aumento de temperatura foi analisado ao longo do tempo, apresentando uma tendência de aumento da temperatura progressiva, porém sem significância estatística (figura 6B).

Na análise de dor, foi aplicada a escala analógica classificada em intensa, moderada, leve e ausente. Como ilustrados na Figura 3C, pode-se observar uma distribuição da dor em T0, sendo a frequência de dor intensa em 38% dos pacientes, moderada em 30%, leve em 16% e ausente em 15%. Porém, a partir do T1 ao T4, observa-se uma redução drástica na frequência de dor intensa nos pacientes (figura 6C) e um aumento da frequência de pacientes com dor ausente.

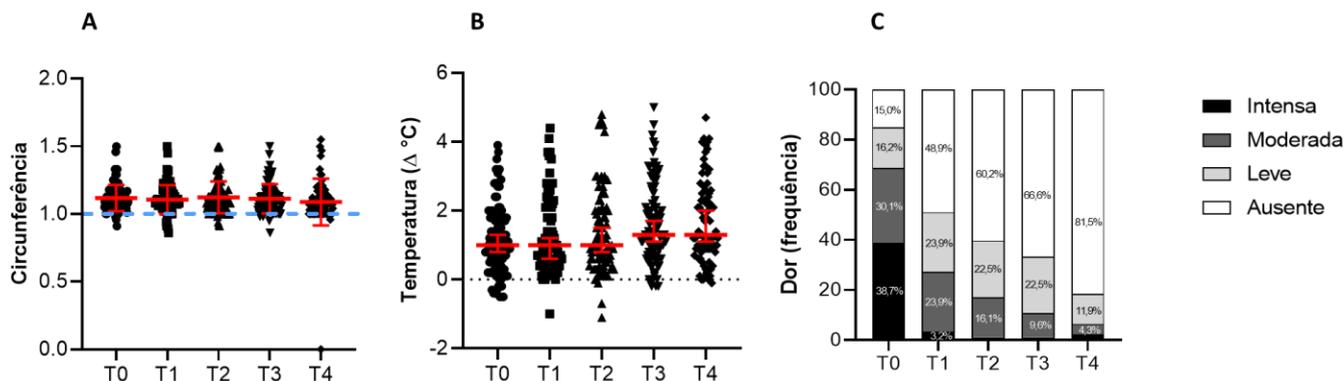


Figura 6. Descrição dos eventos clínicos locais. A) Avaliação da razão das medidas de circunferência (cm) entre os membros acometido e saudável, sendo valor de referência (sem edema) determinado como 1.0 (linha azul tracejada) B) Avaliação da diferença de temperatura entre os membros acometido e saudável, sendo valor de referência determinado como zero (linha tracejada). Em ambos os gráficos A e B, os dados foram reportados como mediana dos valores \pm intervalo interquartil determinado nessa análise. C) Frequência (%) dos pacientes com níveis de intensidade da dor, classificados em ausente, leve, moderada e intensa. * $P < 0,05$ quando comparados os valores de cada grupo (T1, T2, T3 e T4) ao grupo T0, sendo estatística realizada pelo método de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn's.

6.4 Correlação entre mediadores inflamatórios solúveis e parâmetros clínicos e laboratoriais

Uma análise de correlação foi realizada entre os mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), parâmetros laboratoriais bioquímicos (CK e LDH) e hematológicos (Leucócitos totais, neutrófilos e VHS) e os parâmetros clínicos (edema circunferência e Δ temperatura) durante o período de internação dos pacientes (T0 a T4) (Figura 7). Em relação aos parâmetros clínicos, uma correlação positiva entre a citocina IL-6 com o edema em todos os tempos (T0 a T4) foi observada, sendo uma correlação fraca no tempo T0, T1, T2 e T4; e moderada em T3. Ainda com relação ao edema, notou-se correlações positivas fracas entre a citocina TNF em T1, entre VHS em T3 e T4, leucócitos totais em T2, T3 e T4, neutrófilos em T2 e uma correlação positiva moderada entre neutrófilo em T4 (figura 7A).

Em relação ao Δ de temperatura, observou-se uma correlação positiva fraca com a citocina IL-6 em T1, com VHS em T2, T3 e T4 e com leucócitos em T4 (figura 7B). Em relação a correlação entre os mediadores inflamatórios e parâmetros laboratoriais, houve correlações positivas fracas, moderadas e leves, além de correlações negativas fracas. Observou-se um maior perfil de correlação positiva forte e moderada entre citocinas e quimiocinas nos tempos T0 e T3. Já entre os parâmetros laboratoriais e as citocinas/quimiocinas, o número de correlações fortes e moderadas mostrou-se relativamente aumentada a partir de T2 (Figura 7 A e B).

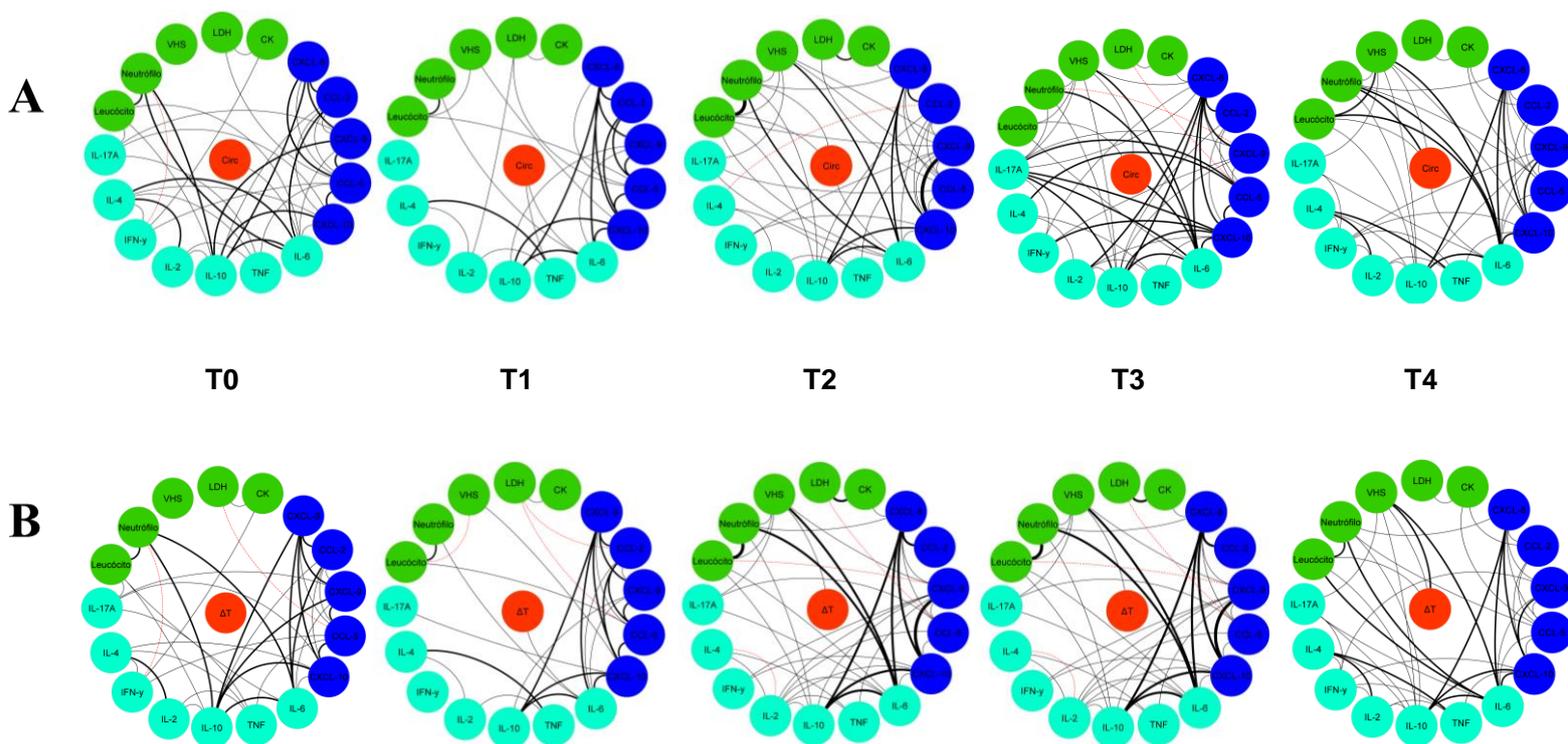


Figura 7. Correlação entre moléculas solúveis e parâmetros clínicos. Gráfico de rede de correlação entre quimiocinas/citocinas e parâmetros laboratoriais e os parâmetros clínicos edema e temperatura. Cada grupo de círculos coloridos é usado para identificar quimiocinas (azul escuro), citocinas (azul claro) e parâmetros laboratoriais (verde). As linhas em preto indicam correlação positiva e em vermelho indicam correlação negativa, enquanto a espessura mostra a força da correlação (leve, moderada e forte). O índice de correlação (r) foi usado para categorizar a força de correlação como fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($r \geq 0,36$ a $r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$). Correlação não-paramétrica de Spearman foi utilizada para a análise.

Com relação a intensidade de dor, foram avaliadas as concentrações de citocinas e quimiocinas, parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes com dor ausente, leve, moderada e intensa no T0. Apesar de observarmos uma tendência na diminuição de IL-6, IL-10, CXCL-8, Δ temperatura, neutrófilos, além de um aumento de INF- γ , CXCL-9 e CXCL-10, CCL-5 e VHS entre pacientes com dor ausente e pacientes com dor leve, moderada ou intensa, não foram observados significância estatística entre eles (Figura 8).

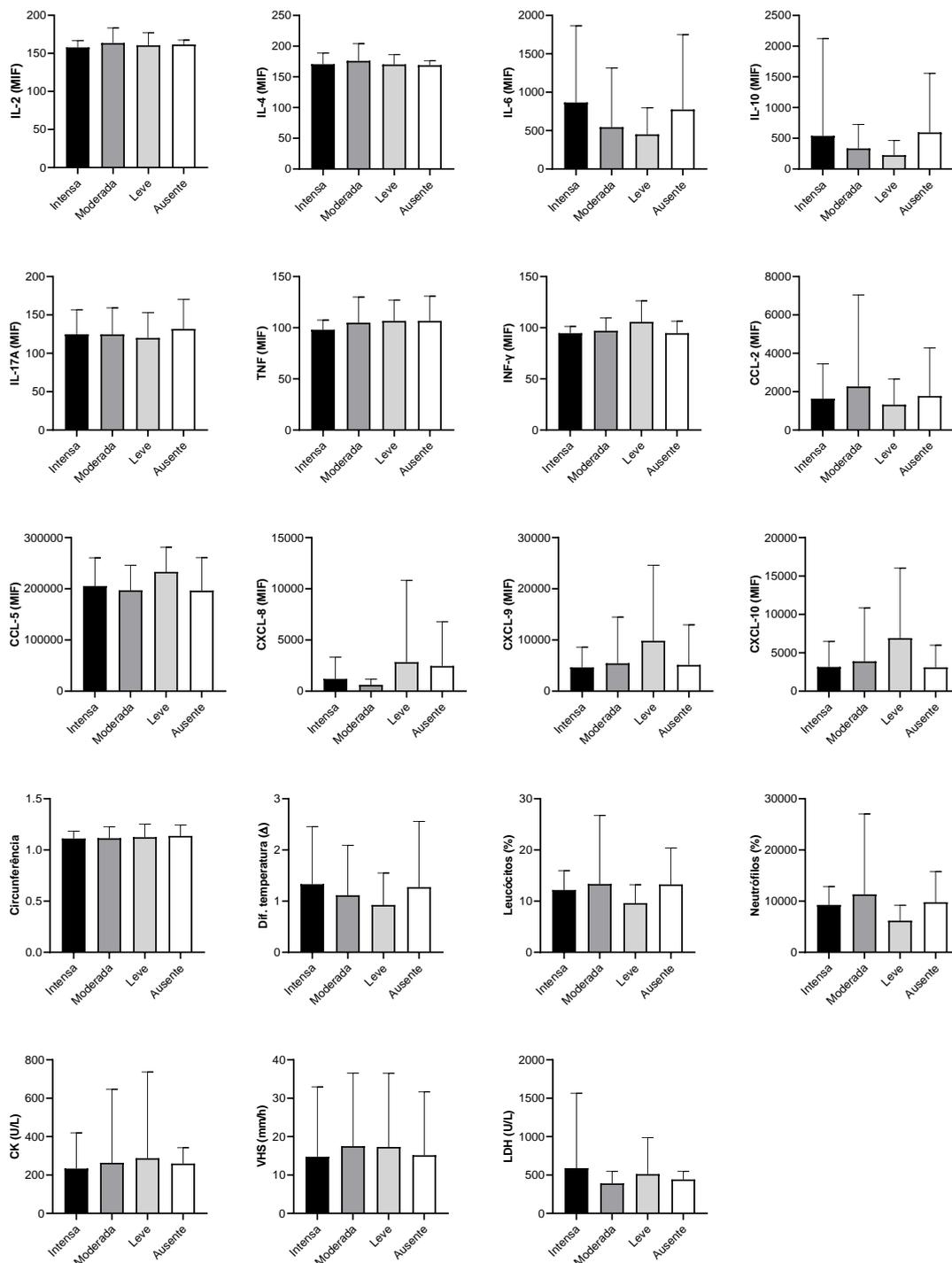


Figura 8. Perfil de citocinas, quimiocinas, parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com variáveis níveis de dor em T0. A análise representa o perfil das citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de parâmetros clínicos e laboratoriais (bioquímicos e hematológicos) dos pacientes classificados com dor ausente, leve, moderada e intensa no T0. Os valores são representativos da mediana dos valores \pm intervalo interquartil. * $P < 0,05$ quando comparados os valores entre todos os grupos, sendo estatística realizada pelo método de One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.5 Infecção secundária e características demográficas e epidemiológicas dos pacientes

Quando avaliada Tabela 3 (acima), observa-se que acidentes classificados como moderado apresentam um risco maior (OR = 2,6) para infecção secundária (com IS) comparado a pacientes sem infecção secundária (sem IS). Ainda, os dados da tabela mostram que pacientes acima de 60 anos apresentam um risco menor a adquirirem infecção secundária, assim como a mão apresenta-se como membro com menor incidência de infecções secundárias (Tabela 3).

Quando avaliados os parâmetros clínicos de dor, edema e temperatura entre pacientes com e sem infecção secundária, observa-se que em pacientes com edema moderado o risco de infecção secundária é maior (OR=2,1). As manifestações clínicas mais observadas no momento da admissão foram dor moderada (30,8%), de acordo com a escala visual analógica (EVA), apresentando risco duas vezes maior entre o grupo com IS (OR= 2,348), porém sem diferença estatística ($p= 0.184$). A diferença de temperatura entre o local da mordida e o local contralateral foi predominantemente em 0-1 (41.86%), com um risco maior entre o grupo com IS (OR= 1,667) e a razão da circunferência do edema em centímetros (cm) foi <1.0 em 50,59% dos casos, porém também sem significância (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros clínicos de dor, edema e temperatura entre pacientes com e sem infecção secundária

Edema	N (%) 94	Com IS (%) 42	Sem IS (%) 52	OR	IC95%	Valor de p^*
Leve	42 (44.68)	14 (33.3)	28 (53.85)	1	-	-
Moderado	44 (46.81)	23 (54.76)	21 (40.38)	2.191	0.915-5.242	0.078*
Grave	8 (8.51)	5 (11.90)	3 (5.77)	3.333	0.695-15.999	0.132
Edema (razão da circunferência, cm)						
<1.0	43 (50.59)	15 (40.54)	28 (58.33)	1	-	-
1.1-1.3	38 (43.6)	20 (54.05)	18 (37.50)	2.074	0.849-5.069	0.110
>1.3	4 (29.7)	2 (5.41)	2 (4.17)	1.867	0.238-14.614	0.552
Dor (escala)						
Ausente	14 (14.8)	4 (9.5)	10 (19.2)	1	-	-
Leve (1-3)	15 (15.9)	7 (16.6)	8 (15.3)	2.187	0.469-10.210	0.319
Moderada (4-7)	30 (30.8)	14 (33.3)	15 (28.8)	2.348	0.667-8.270	0.184
Grave (8-10)	8 (8.5)	5 (11.9)	3 (5.7)	0.400	0.125-1.275	0.121
Temperatura (Δ)						
<0	8 (9.30)	3 (7.89)	5 (10.42)	1	-	-
0-1	36 (41.86)	18 (47.37)	18 (37.50)	1.667	0.345-8.038	0.525
1.1-2	27 (31.40)	12 (31.58)	15 (31.25)	1.333	0.264-6.739	0.728
>2	15 (17.44)	5 (13.16)	10 (20.83)	0.833	0.139-4.987	0.842

* Valor de p mensurado pelo teste exato de Fisher.

6.6 Infecção secundária e parâmetros clínicos, laboratoriais e mediadores inflamatórios

Os mediadores clínicos temperatura e circunferência do edema, além dos mediadores inflamatórios (CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL-10, IL-6, TNF, IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-4 e IL-17A), marcadores bioquímicos (CK, e LDH) e hematológicos (leucócitos, neutrófilos e VHS), também foram analisados comparando os valores entre os pacientes com e sem infecção secundária nos diferentes tempos.

Com relação aos parâmetros clínicos de edema e temperatura, não foram observados valores significativos de diferença entre os grupos com e sem infecção secundária. Porém, foi possível observar uma tendência de aumento da temperatura nos pacientes com infecção secundária ao longo do tempo, indicando que este aumento possa estar associado à infecção. (Figura 9).

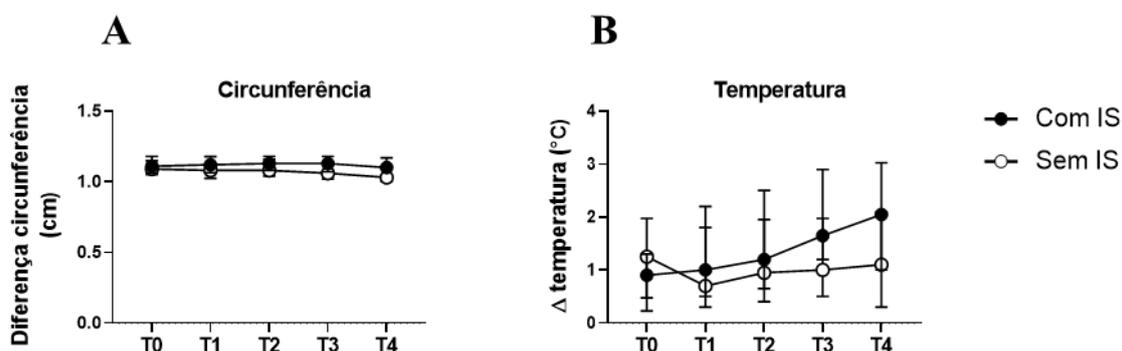


Figura 9. Perfil clínico dos parâmetros locais entre pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo. **A)** Avaliação da razão das medidas de circunferência (cm) e **B)** Δ temperatura entre pacientes com infecção secundária (círculo preto) e sem infecção secundária (círculo branco) nos tempos T0, T1, T2, T3 e T4. **A e B,** os dados foram reportados como mediana dos valores \pm intervalo interquartil determinado nessa análise. **C)** Frequência (%) dos pacientes com níveis de intensidade da dor, classificados em ausente, leve, moderada e intensa entre pacientes com e sem infecção secundária em T0. * $P < 0,05$ quando comparados os valores entre grupos com e sem infecção secundária em cada tempo (T1, T2, T3 e T4), sendo estatística realizada pelo método de Two-Way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Já em relação aos mediadores inflamatórios, os pacientes com infecção secundária apresentaram um aumento de IL-6 em T1 e T2; IL-10 em T0 e da quimiocina CXCL-8 em T2 (Figura 10).

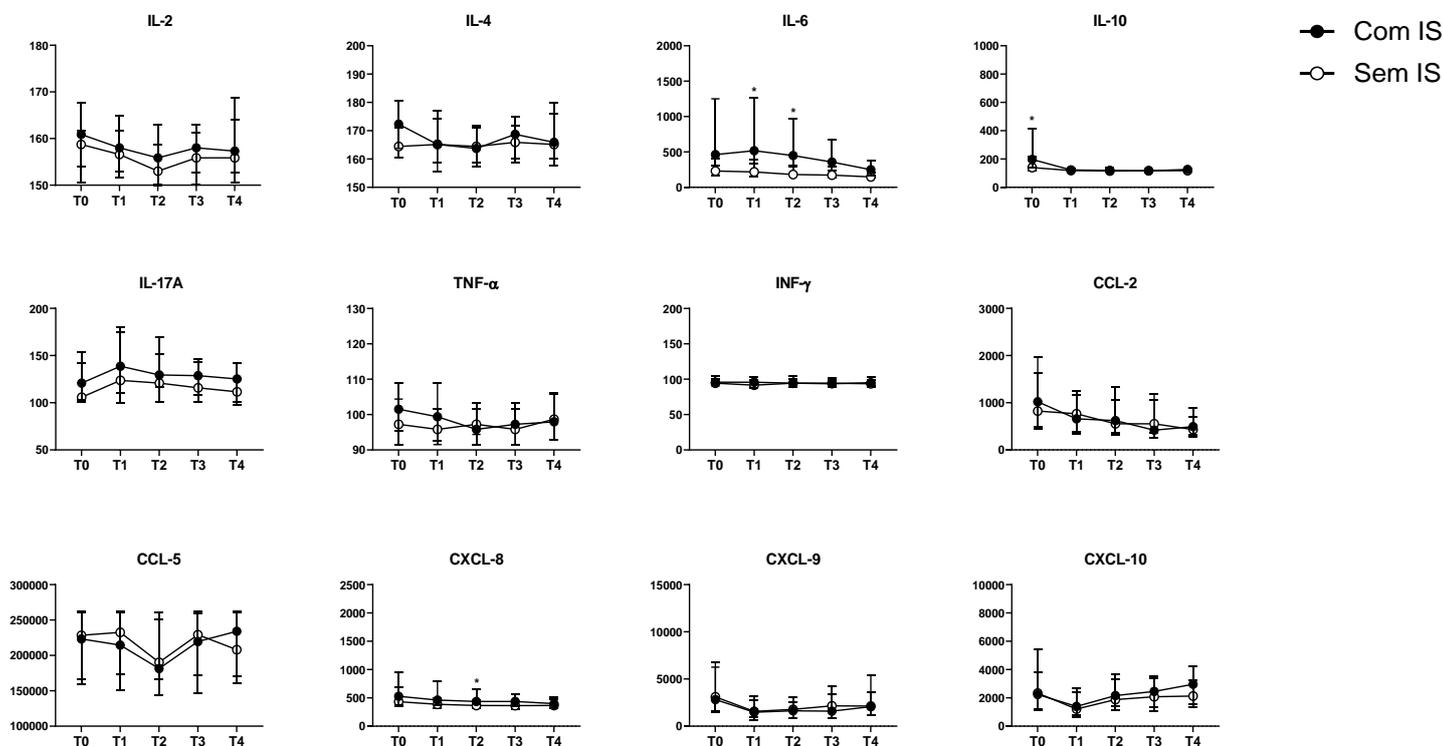


Figura 10. Avaliação dos mediadores imunológicos em pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo. Valores de mediana de intensidade de fluorescência (MFI) \pm intervalo interquartil das citocinas e quimiocinas entre pacientes com (círculo preto) e sem (círculo branco) infecção secundária. * $P < 0,05$ quando comparados os valores entre grupos com e sem infecção secundária em cada tempo (T1, T2, T3 e T4), sendo estatística realizada pelo método de Two-Way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Com relação aos parâmetros laboratoriais, observou-se também que pacientes com infecção secundária apresentaram aumento de leucócitos em T0, T1 e T3, aumento de neutrófilos e creatina quinase em T0 e aumento da velocidade de hemossedimentação em T3 e T4 (Figura 11).

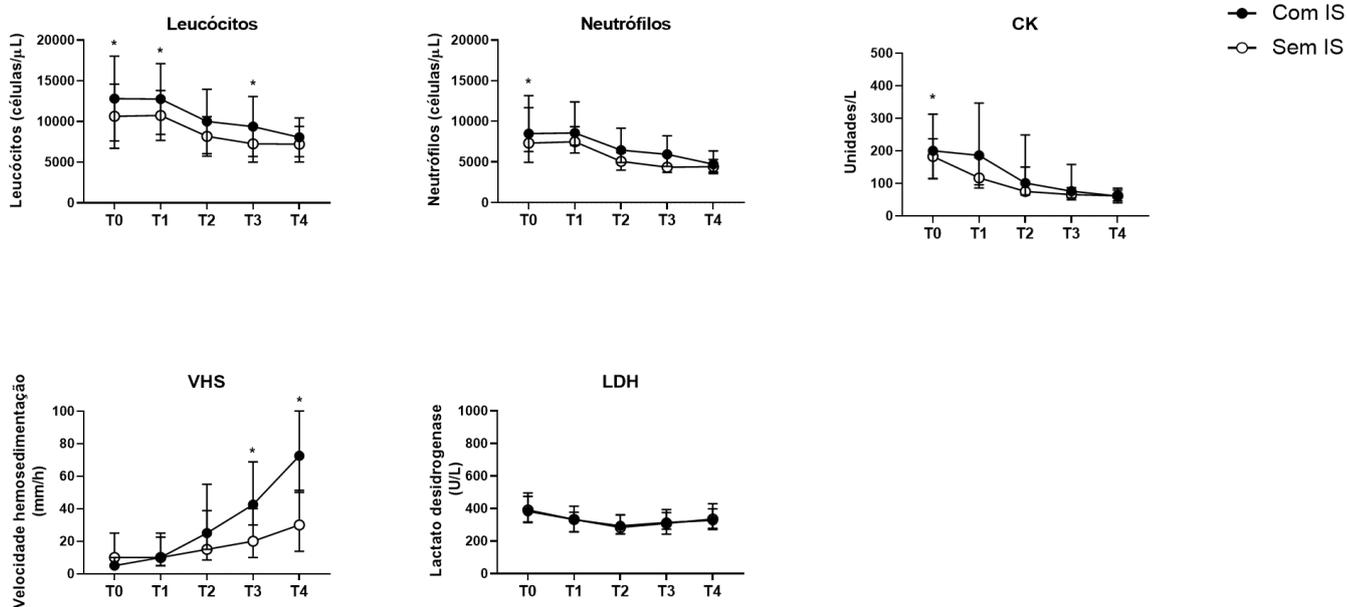
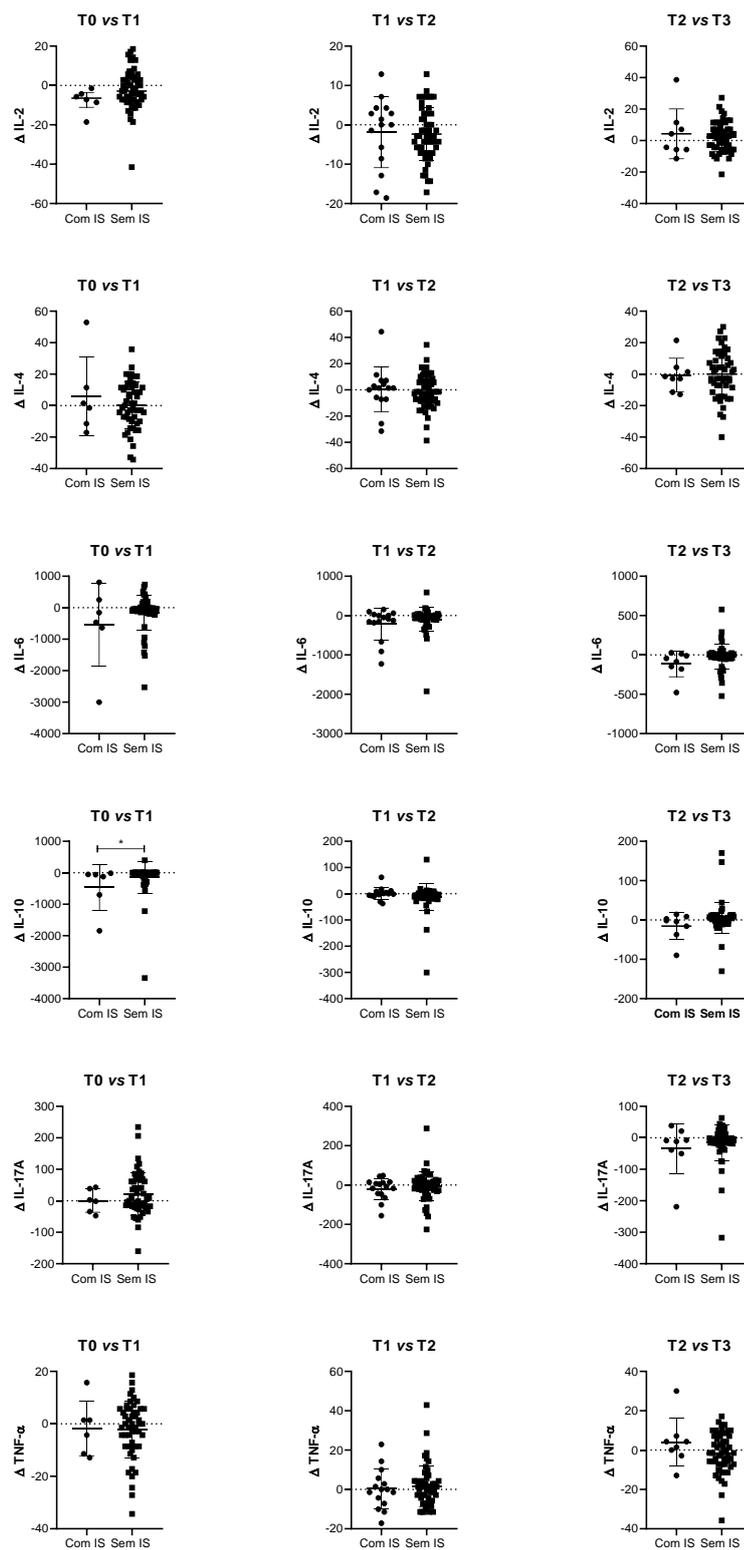


Figura 11. Avaliação dos parâmetros laboratoriais em pacientes com e sem infecção secundária ao longo do tempo. Valores de mediana \pm intervalo interquartil dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre pacientes com (círculo preto) e sem (círculo branco) infecção secundária. * $P < 0,05$ quando comparados os valores entre grupos com e sem infecção secundária em cada tempo (T1, T2, T3 e T4), sendo estatística realizada pelo método de Two-Way ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Ainda, avaliamos o perfil dos mediadores imunológicos, parâmetros clínicos locais e laboratoriais nos pacientes com e sem infecção secundária no dia do diagnóstico, comparando ao perfil desses parâmetros do dia do diagnóstico de infecção secundária com o dia anterior ao diagnóstico. Para isto, calculamos o Δ dos valores de todos os mediadores imunológicos e parâmetros clínicos da seguinte forma: subtraímos os valores do dia em que foi diagnosticada a infecção secundária pelos valores do dia anterior ao diagnóstico dessa infecção de cada paciente respectivo. Ainda, essa análise foi realizada agrupando aqueles pacientes que foram diagnosticados em T1 (T0 vs T1), em T2 (T1 vs T0) ou em T3 (T2 vs T3) (Figuras 12 e 13). De uma forma generalista, os valores que foram abaixo de zero significam que o parâmetro avaliado no dia anterior ao diagnóstico estava maior que no dia da confirmação da infecção. Assim como os valores que foram

acima de zero significam que o parâmetro avaliado no dia da confirmação de infecção secundária estava maior que no dia anterior do diagnóstico.

Dentre as citocinas e quimiocinas (Figura 12), foi observado que pacientes com infecção secundária diagnosticada em T1 (T0 vs T1) apresentaram níveis maiores de IL-10 no dia anterior a confirmação da infecção, sendo significativamente diferentes dos pacientes sem infecção secundária os quais apresentaram níveis equivalentes T0 e T1 (Figura 12). Resultados semelhantes também foram encontrados para as quimiocinas CCL-2, CXCL-8 e CXCL-10, onde os pacientes com infecção secundária confirmada em T3 (T2 vs T3) apresentaram valores das quimiocinas aumentadas no dia anterior ao diagnóstico da infecção, sendo significativamente diferentes dos pacientes sem infecção secundária os quais apresentaram níveis equivalentes entre T2 e T3 (Figura 12).



Continuação Figura 12

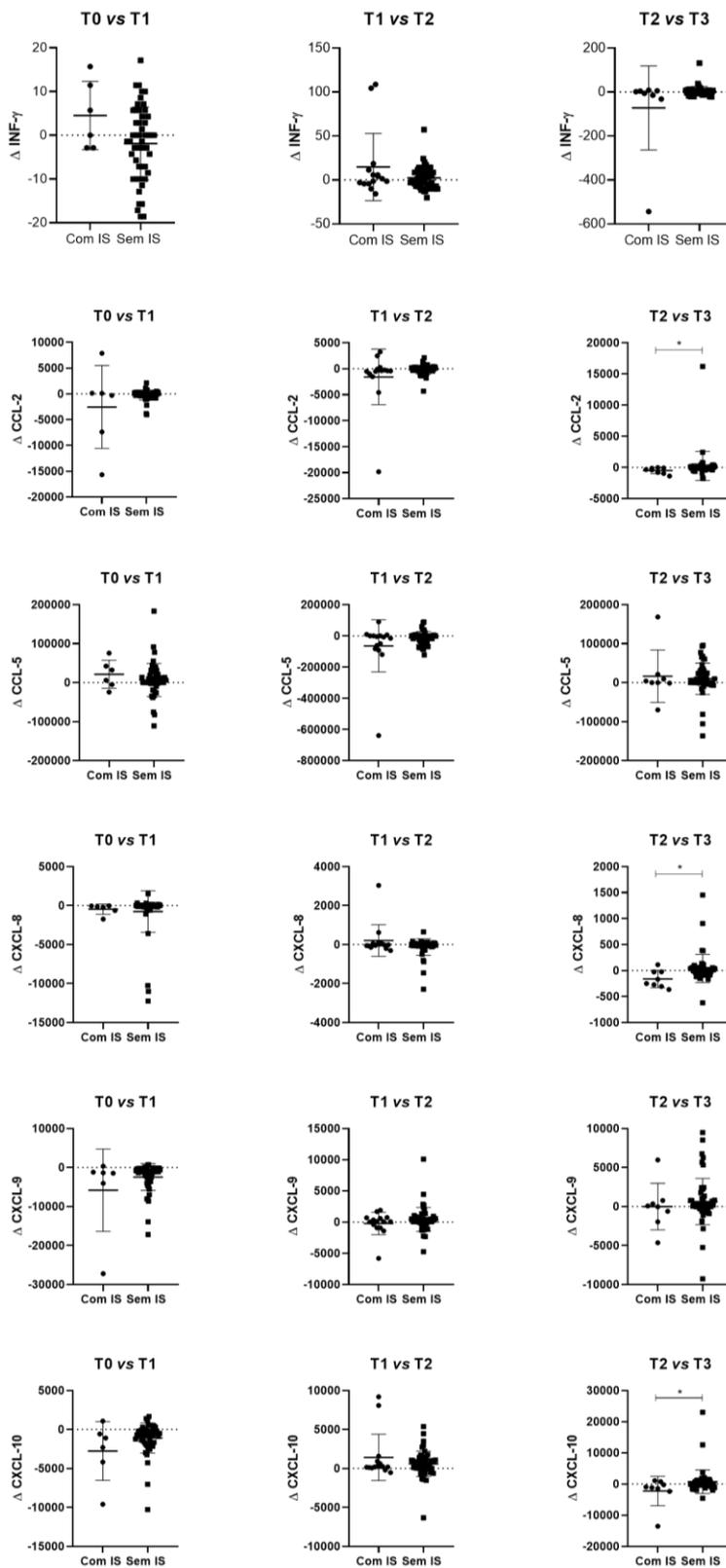


Figura 12. Perfil dos mediadores imunológicos em pacientes com e sem infecção secundária do dia do diagnóstico e do dia anterior. Δ MFI citocinas/quimiocinas = valor dia confirmação infecção secundária – valor do dia anterior ao diagnóstico (de cada paciente independente). Esses valores são representativos dos pacientes que foram diagnosticados em T1 (T0 vs T1), em T2 (T1 vs T0) ou em T3 (T2 vs T3). Com IS (com infecção secundária) e sem IS (sem infecção secundária). A estatística realizada foi o método de Mann-Whitney para comparações entre os grupos de pacientes em dois tempos ($*p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros clínicos locais e laboratoriais (Figura 13), pacientes com infecção secundária diagnosticados em T1 (T0 vs T1) também apresentaram valores aumentados de leucócitos totais e neutrófilos no dia prévio ao diagnóstico de infecção, quando comparado aos pacientes sem infecção (Figura 13). Já em relação a VHS, pacientes com infecção secundária apresentaram valores aumentados no dia do diagnóstico (comparado ao dia prévio), quando comparado aos pacientes sem diagnóstico de infecção secundária os quais também não apresentaram variação entre T2 e T3.

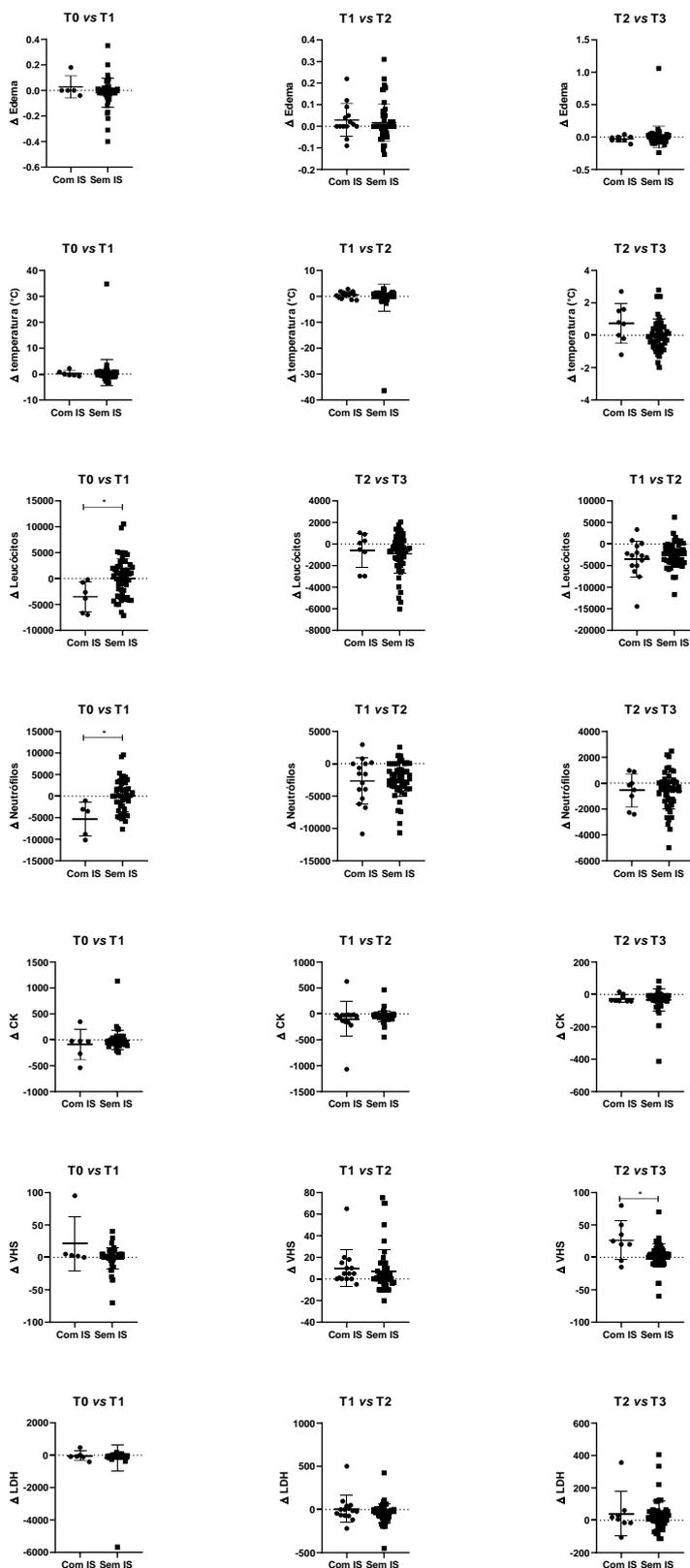


Figura 13. Perfil dos parâmetros clínicos locais e laboratoriais em pacientes com e sem infecção secundária do dia do diagnóstico e do dia anterior. Δ parâmetros clínicos/laboratoriais = valor dia confirmação infecção secundária – valor do dia anterior ao diagnóstico (de cada paciente independente). Esses valores são representativos dos pacientes que foram diagnosticados em T1 (T0 vs T1), em T2 (T1 vs T0) ou em T3 (T2 vs T3). Com IS (com infecção secundária) e sem IS (sem infecção secundária). A estatística realizada foi o método de Mann-Whitney para comparações entre os grupos de pacientes em dois tempos ($*p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

A reação inflamatória representa um mecanismo fisiológico de defesa do tecido, identificado principalmente pelos sinais clássicos de dor, calor, rubor e edema. Estas manifestações se estabelecem de forma rápida e, quando associadas à infecção secundária e à neutralização ineficiente do estímulo nocivo, podem agravar a lesão tecidual e levar à amputação ou ao prejuízo funcional do membro afetado (11,81,82). O envenenamento botrópico é responsável por um efeito inflamatório agudo, induzido por três principais mecanismos: I) toxinas do veneno são responsáveis pela ativação direta de células e mediadores imunológicas; II) a ação lesiva de toxinas do veneno sobre células e componentes extracelulares são capazes de gerar produtos que levam a uma resposta inflamatória; III) infecções oportunistas acometidas por agentes bacterianos no local da picada. Esses eventos são responsáveis por induzirem uma resposta caracterizada pela migração de leucócitos e a produção de mediadores inflamatórios, levando a um evento inflamatório local intenso. Dessa forma, podemos observar manifestações clínicas características do envenenamento botrópico como edema, dor, calor, caracterizando os efeitos locais do envenenamento, podendo levar a complicações mais graves como necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (9,45,53,83). Associado a limitação do soro antiofídico em neutralizar os efeitos locais do envenenamento (35), estudos que visam melhor entender os aspectos fisiopatológicos dos efeitos locais, associados a resposta inflamatória do veneno, são de grande relevância para o desenvolvimento de melhores estratégias de diagnóstico, manejo e terapêutica dos acidentes botrópicos.

Portanto, procuramos obter resultados que fornecessem um melhor entendimento dos efeitos locais do envenenamento por *Bothrops*, associados aos aspectos clínicos laboratoriais, imunológicos e aos aspectos clínicos da inflamação causada por esse tipo de envenenamento, ao longo do tempo. A avaliação inicial dos eventos clínicos locais dos 94 pacientes incluídos no estudo mostrou que os pacientes apresentaram um edema e aumento de temperatura que se perpetuaram ao longo do tempo de internação dos pacientes (Figura 6). O edema é uma manifestação clínica clássica associada ao acidente botrópico, no entanto que esse parâmetro é utilizado nos critérios diagnósticos de classificação de gravidade do envenenamento. Diversos estudos pré-clínicos e clínicos mostram que o edema no local da administração do veneno é muito evidente nesses acidentes (9,39,58). Porém, poucos estudos relatam alterações de temperatura local nos

acidentes por animais peçonhentos. Um estudo conduzido no Estado de São Paulo com pacientes vítimas de acidente botrópico (dentre outras) mostrou que o uso de termografia infravermelho foi capaz de precisar e associar o aumento de temperatura no local da picada (84). Porém, nenhum estudo até hoje foi conduzido mostrando as alterações desse parâmetro clínico ao longo do tratamento do paciente. Os resultados observados no presente estudo (Figura 6) mostram que ambos os parâmetros (edema e temperatura) não apresentam uma melhora ao longo do tempo com a soroterapia, sugerindo que a ação local do soro antibotrópico tem uma eficiência limitada de ação local. Esses dados vão de encontro a diversos estudos que mostram a menor efetividade da soroterapia mundial, contra diversas serpentes peçonhentas, dado diversos fatores como a baixa distribuição do soro aos tecidos (35). Ainda, estudos recentes mostram que no conteúdo de bolhas locais de pacientes vítimas de acidente por *Bothrops atrox* foram encontrados níveis de imunoglobulinas do soro botrópico não conjugadas a toxinas do veneno. Esses dados revelam que apesar da presença do soro no local, esses apresentam sua capacidade de neutralização limitada, não sendo capazes de prevenir danos teciduais e formação das bolhas (85). Em relação ao parâmetro de dor, foi observado que as intensidades foram reduzindo ao longo do tempo, até o ponto em que os pacientes relatavam uma ausência de dor (Figura 6). Dentre as possíveis razões para essa diminuição se dá pela administração de analgésicos, como dipirona e tramal aos pacientes, além do próprio soro antiofídico.

Durante uma resposta imunológica desencadeada no corpo humano, a participação de mediadores químicos, como quimiocinas, citocinas e eicosanoides, são de grande relevância para a efetividade da resposta envolvendo a participação de células de defesa ou tecidos no processo de regeneração. As quimiocinas e citocinas são proteínas secretadas que determinam a natureza das respostas imunológicas, apresentando funções variadas como modular o crescimento, diferenciação e ativação, e o tráfego celular (51). A detecção no sangue de citocinas e quimiocinas associados aos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos de inflamação consistiu na estratégia principal do presente trabalho para correlacionar com eventos clínicos locais de edema e temperatura, avaliando assim a inflamação induzida pelo acidente botrópico na região. Uma correlação positiva direta foi observada entre o edema (medida de circunferência) e as citocinas IL-6 e TNF-alpha, além de leucócitos totais, neutrófilos e velocidade de hemossedimentação (VHS) (Figura 7). Os dados obtidos estão em acordo com diversos estudos sobre o

processo de formação de edema no envenenamento botrópico, sejam em modelos animais ou pacientes, onde há a participação de diversas citocinas, dentre elas a IL-6 e TNF-alpha, induzindo a ativação sistêmica de leucócitos, principalmente neutrófilos, culminando no recrutamento dessas células ao local do envenenamento (58,86,87). Ainda, a correlação com VHS é um importante dado laboratorial, creditando tal parâmetro como importante para caracterização da inflamação no acidente botrópico, como já descrito em estudos prévios (88,89).

Em relação a temperatura local, a citocina IL-6 e os parâmetros leucócitos totais e VHS também apresentaram uma correlação positiva, evidenciando que o processo inflamatório local está diretamente associado ao aumento da temperatura no local do acidente. A citocina IL-6 é produzida por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea e está relacionada com a ativação, crescimento e diferenciação de células T, a produção de proteínas da fase aguda e a pirexia (51). Já o TNF-alpha é produzido por células mononucleares, mas também por neutrófilos, linfócitos ativados, células NK, células endoteliais e mastócitos, e está relacionado a ativação de neutrófilos e proteínas de fase aguda da inflamação assim como o processo de coagulação (51).

Curiosamente, tanto em relação ao edema quanto à temperatura, houve correlações negativas entre o parâmetro laboratorial LDH e a quimiocina CCL-5, entre neutrófilo e INF- γ , além de uma correlação negativa entre leucócitos e VHS na temperatura (Figura 7). Isto sugere que o aumento dessas células circulantes e recrutadas pela quimiocina CCL-5, que é responsável pelo recrutamento de leucócitos (51), além de outras quimiocinas correlacionadas positivamente entre si, houve um estabelecimento de resposta contínua para controlar os sinais da inflamação, diminuindo assim os parâmetros sugestivos de inflamação no local. Em relação ao INF- γ , sua correlação negativa com os neutrófilos, que é um leucócito polimorfonuclear, dá-se pelo fato de que este mediador inibe a produção de células T CD4+ de IL-17, que regula o recrutamento de neutrófilos (51).

Nessa mesma análise (Figura 7), observamos que as correlações entre citocinas/quimiocinas e parâmetros laboratoriais apresentaram associações entre si. Um perfil maior de correlação nos tempos T0 e T3 entre quimiocinas e citocinas evidenciam a intercomunicação desses mediadores na resposta inflamatória ao envenenamento botrópico, nos pontos principais relacionados a admissão dos pacientes no hospital (início

da resposta inflamatória) e 72 horas após (início do processo de regeneração tecidual). Esse efeito também pôde ser observado em estudo prévio que mostra a participação de macrófagos residentes, e sua produção de citocinas e quimiocinas, no processo inicial de resposta inflamatória, seguida da regeneração tecidual (90). Estudo recente de Ibiapina e colaboradores (58) também evidenciaram que pacientes vítimas de acidentes por *Bothrops atrox* também apresentaram um perfil de correlações positiva entre moléculas de diferentes perfis de resposta (Th1, Th2 e Th17 ou padrões mistos), sugerindo assim que a resposta local tem uma pluralidade no perfil de resposta. As quimiocinas são um grupo de pequenas moléculas capazes de induzir a migração de células ao local da resposta, como neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos e queratinócitos. Já as citocinas, são moléculas particularmente eficazes na promoção do infiltrado celular e reparos teciduais, característicos da inflamação. São produzidas por diferentes linhagens leucocitárias, e células teciduais, e apresentam diversas funções como ativação de células e na regulação do processo inflamatório, seja induzindo ou inibindo. Assim, é esse arranjo entre citocinas e quimiocinas que determinam a natureza das respostas imunes e controlam o tráfego de células imunes e o arranjo celular dos órgãos (51).

Em relação a dor, nota-se uma frequência maior de dor intensa nos pacientes no T0 (primeiras horas após o acidente) (Figura 6), pois a partir do momento em que o veneno da serpente é inoculado, diversos mediadores químicos são liberados das células que foram lesadas, além de células como mastócitos, macrófagos e neutrófilos, que são imunocompetentes, logo são recrutadas da região lesada para responder à ação direta e/ou indireta das diferentes toxinas presentes nesse veneno (91). Estes mediadores podem atuar nos nociceptores, o que resulta em inflamação e sensibilização do sistema nervoso, tornando-o mais suscetível à ativação das vias de nocicepção. O estudo de Nadur-Andrade et al. (44) relatou a ativação direta de neurônios sensoriais no veneno de *Bothrops moojeni*. Além disso, algumas SVMP's, presente no veneno das serpentes, também são capazes de induzir inflamação, o que resulta no surgimento de edema e dor no local da picada de cobra, desencadeando hiperalgesia (92–94). Porém, no presente estudo não foram observados dados significativos confirmando diferenças nos valores de citocinas e quimiocinas em comparação com pacientes com dor intensa, moderada, leve e ausente (Figura 8). Porém, os resultados deste estudo mostram que a frequência de dor intensa é reduzida drasticamente a moderada, leve e ausente ao longo do tempo (Figura 6). Um

estudo realizado por Yamashita et al. (95) demonstrou que a injeção do veneno de *B. jararaca* em camundongos é capaz de induzir hiperalgesia e, após 24h, o limiar nociceptivo retorna aos níveis basais. No entanto, a hipótese inicial apontada para essa redução é a administração dos medicamentos utilizados nos pacientes do estudo (dipirona e tramal), além da própria administração do soro antiofídico, o que demonstra ser bastante eficaz em relação a dor. Assim, torna-se imprescindível estudos futuros para a identificação de biomarcadores com potencial para predição de dor em acidentes botrópicos.

O processo inflamatório infeccioso por agentes bacterianos dá-se início pelo reconhecimento de endotoxinas bacterianas por leucócitos induzindo uma ativação via receptores de reconhecimento padrão, e estimulando a produção de mediadores inflamatórios (TNF, IL-1, IL-6 e quimiocinas), promovendo reação inflamatória aguda local. Os neutrófilos polimorfonucleares permitem a fagocitose de bactérias e detritos celulares, descontaminando assim a ferida. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias aumentam na presença de bactérias e, se os níveis bacterianos não forem reduzidos, essas citocinas podem permanecer elevadas, prolongando a fase inflamatória. Quando a fase inflamatória dura muito tempo, ocorre processos degenerativos com a piora do quadro na região (96). Em uma revisão realizada por De Faria et al. (73), foi relatado que em acidentes com serpentes peçonhentas no Brasil, no período de 2008 a 2010, a maior incidência de acidentes ofídicos foi com serpentes do gênero *Bothrops*, com uma incidência entre 1% e 20% de infecções secundárias/abscessos, com o indicativo de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, anaeróbicas e cocos Gram-negativos (menos comuns). Porém, nos casos com serpentes do gênero *Crotalus*, *Lachesis* e não peçonhentas não houve relatos de abscessos ou infecções secundárias. Assim, assume-se que a infecção secundária a acidentes ofídicos é considerada um fator de agravamento dos aspectos inflamatórios, resultado na exacerbação dos danos locais.

O presente estudo também investigou os aspectos clínicos, laboratoriais e mediadores inflamatórios de pacientes com e sem infecção secundária. Foi observado que pacientes classificados como acidentes moderados apresentam um risco maior para infecção secundária (Tabela 3). Dentre os critérios de classificação de gravidade segundo manual do Ministério da Saúde, a infecção secundária é considerada um parâmetro local de avaliação. Esse evento está muito relacionado justamente a classificação moderada dos pacientes observada, quando apresenta um agravamento do quadro local (Ministério da

Saúde). Observamos também que a mão se apresenta como membro com menor probabilidade para infecções secundárias (Tabela 3). Ainda, os dados mostram que pacientes acima de 60 anos apresentam um risco menor a adquirirem infecção secundária (Tabela 3). A hipótese inicial apontada para esse resultado pode se dá pelo número reduzido de pacientes desta faixa etária no estudo, além de que os acidentes acometidos nos pacientes nessa idade não são relacionados ao trabalho, diferentemente de pacientes mais jovens que, por estarem trabalhando, apresentam-se mais expostos a contaminantes microbiológicos no meio rural, tornando-os mais suscetíveis a infecções secundárias. Embora os idosos apresentem um sistema imunológico mais fragilizados, a maioria dos pacientes dentre essa faixa sofreram o acidente em áreas periurbanas ou mesmo em suas residências, com os membros sem contato/exposição com agentes microbianos que possivelmente são encontrados em locais de trabalho na zona rural.

Quando avaliados os parâmetros clínicos, laboratoriais e inflamatórios entre pacientes com e sem infecção secundária (Figura 9), pode-se observar que pacientes com infecção apresentaram, em sua grande maioria, níveis médios desses parâmetros aumentados. Essa análise generalista dos dados mostra que a infecção secundária de fato apresenta uma influência na piora desses marcadores. Porém, quando considerados os aspectos estatísticos das análises, estiveram aumentados em pacientes com infecção (Figuras 9, 10 e 11): leucócitos em T0, T1 e T3; neutrófilos T0; creatina quinase (CK) em T0; IL-10 em T0; IL-6 em T1 e T2; CXCL-8 em T2; e VHS em T3 e T4. Esses dados creditam a possibilidade de avaliação de níveis de leucócitos, neutrófilos, CK e IL-10 como marcadores preditores de infecção secundária, uma vez que apresentam elevados em T0 nesses pacientes, sendo precedentes ao diagnóstico de infecção nos pacientes (infecção somente ocorrem a partir de T1). Ainda, os níveis elevados de VHS em pacientes com infecção secundária observados em T3 e T4 também podem desempenhar como marcador de confirmação de diagnóstico de infecção.

A IL-10 desempenha um papel chave na regulação imunológica, uma vez que inibe a produção de IFN- γ e IL-12, além da expressão de moléculas coestimuladoras, reduzindo a intensidade e a duração de respostas imunes, prevenindo respostas exacerbadas (97). Assim, níveis aumentados de IL-10 indicam um possível mecanismo do corpo humano em controlar mais eficientemente o processo inflamatório induzido pela associação veneno e infecção. Além do fato de estudos prévios evidenciarem o aumento dos níveis de IL-10 induzidos pelo veneno de *B. atrox* (98–100). Já a IL-6, aumentada em

T1 e T2, pode estar associada a instalação ao processo infeccioso associado ao envenenamento (101), além de atuar também como fator na regeneração tecidual, uma vez que a mudança de um microambiente pró-inflamatório para um microambiente reparador deve ser rigidamente regulada (102).

Conforme um estudo realizado por Stuart et al. (103), o VHS pode ser utilizada como indicador da presença de infecção bacteriana invasiva em crianças. Este dado é importante, pois de acordo com De Faria et al. (73), a diversidade bacteriana da cavidade oral das serpentes oferece um enorme potencial de interferentes nas infecções secundárias e abscessos nos acidentes ofídicos. Ainda sugerimos que esta escassez na literatura também se dá pelo fato deste exame ser bastante inespecífico como marcador de doenças e que nossos dados podem ajudar futuros estudos sobre ofidismo utilizando o VHS, pois pode ser utilizado em combinação com outros testes para determinar a presença de atividade inflamatória aumentada, além de ter sido usado há muito tempo como um "indicador de doença" devido à sua alta reprodutibilidade e baixo custo (104).

No contexto do envenenamento por serpentes, vários estudos relataram que os neutrófilos são predominantes nas primeiras horas da resposta à inflamação. Dados de Menaldo et al. (18) mostram que, em experimentos com animais, o infiltrado inflamatório nas primeiras 24h após a inoculação do veneno é representado principalmente por neutrófilos e depois por monócitos/macrófagos. Em uma resposta inflamatória aguda, este tipo de leucócito migra rapidamente para o local lesionado e são os principais responsáveis pela fagocitose inicial de agentes infecciosos e pela liberação de citocinas (105,106). Além disso, no envenenamento por *B. atrox* em camundongos BALB/c, a presença de neutrófilos mostrou a capacidade de influenciar os níveis de IL-1 β (diminuição), IL-6, CXCL-1 e CXCL-2 (de Cássia *et al.*, 2005). Este tipo de leucócito é descrito como o primeiro a atingir o local do dano devido aos níveis elevados de CXCL-8, que é uma das primeiras moléculas de quimiotaxia produzidas em caso de lesão (107).

Infecções secundárias são caracterizadas como mecanismos com que bactérias oportunistas são capazes de colonizar um determinado sítio, do qual contam com fatores de predisposição relacionado ao paciente ou a doença de base responsável pelas mudanças fisiológicas (como o trauma) para propagar a proliferação bacteriana e causar danos de diferentes intensidades (108,109). A partir do início da infecção, é iniciada a resposta imune no combate do microrganismo invasor através da resposta inflamatória, sendo responsável por gerar manifestações clínicas como abscessos e celulite. Um abscesso

cutâneo geralmente aparece como um nódulo inchado com conteúdo purulento sob a superfície da pele, sendo a celulite bacteriana aguda da pele e tecido subcutâneo caracterizada pela observação de eritema de rápida disseminação e edema local (110).

Assim, o processo inflamatório em infecções secundárias tem o início prévio ao aparecimento de sinais e sintomas clínicos necessários para a confirmação diagnóstica da infecção. Sendo assim, as análises das Figuras 12 e 13 tiveram como objetivo fazer uma avaliação comparativa do perfil dos marcadores de inflamação, laboratoriais e clínicos no dia da confirmação de infecção secundária e no dia prévio ao diagnóstico. De uma forma generalizada, podemos observar que a maioria dos parâmetros se apresentaram elevados no dia prévio a instalação da infecção, porém alguns no dia da confirmação (Figura 12 e 13). Dentre os marcadores que apresentaram uma significância quando comparados os dois grupos de pacientes, foi observado que as citocinas/quimiocinas IL-10, CCL-2, CXCL-8 e CXCL-10, além de leucócitos totais e neutrófilos apresentaram-se aumentadas no dia prévio ao diagnóstico da infecção (Figura 12 e 13). Assim, esses dados confirmam que previamente a confirmação de infecção secundária um mecanismo inflamatório envolvendo citocinas/quimiocinas e leucócitos sanguíneos é instalado de uma forma que potencializam as respostas já desencadeadas pelas toxinas do veneno. Esses dados também são de grande relevância pois mostram que a instalação inicial do processo inflamatório é capaz de alterar biomarcadores inflamatórios previamente a confirmação da instalação da infecção local, creditando esses marcadores a serem usados na predição da infecção ajudando a antibiótico terapia utilizada nos acidentes ofídicos.

Estudo clínico prévio de Sachett e colaboradores (9) evidenciaram que o agente bacteriano *Morganella morganii* está associado com a maioria dos casos de infecção secundária diagnosticados em pacientes vítimas de acidente por *Bothrops atrox* no Estado do Amazonas. *Morganella morganii* é uma bactéria entérica Gram-negativo anaeróbio facultativo, estando associado a infecções oportunistas de trato urinário e pele. A sequência do genoma revelou que os fatores de virulência de *M. morganii* onde as adesinas fimbriais, ureases e TCSs desempenham um papel importante na colonização e a adesão, sendo o primeiro passo no qual um patógeno interage com o hospedeiro (Liu *et al.*, 2016). É um patógeno cada vez mais importante por causa de sua virulência e aumento da resistência aos medicamentos, tanto que no estudo conduzido por Sachett e colaboradores (9), os autores concluíram que a terapia com amoxicilina associada a

clavulanato foi ineficaz na prevenção de infecção secundária nos acidentes botrópicos da região.

Além de possíveis marcadores de predição da infecção, os resultados da Figura 13 também mostraram que o parâmetro laboratorial velocidade de hemossedimentação (VHS) também se apresentou elevado a partir de T3 nos pacientes com infecção secundária. Esses dados estão em acordo com estudo prévio realizado por Barraviera e colaboradores (89), do qual evidenciou que valores de VHS estavam aumentados em pacientes vítimas de acidente botrópico após 30 dias dos valores da admissão do paciente no atendimento hospitalar. Assim, o exame de VHS mostrou-se como uma estratégia importante não apenas na confirmação de um evento inflamatório que esteja ocorrendo, mas também como um parâmetro confirmatório importante devido sua alta reprodutibilidade e baixo custo (104).

8. CONCLUSÃO

A reação inflamatória decorrente do envenenamento por *Bothrops atrox* representa um fator de grande relevância na fisiopatologia do envenenamento, principalmente associado aos efeitos locais. Assim, a análise dos parâmetros clínicos e marcadores laboratoriais representam uma importante estratégia para o aprimoramento da avaliação de diagnóstico, prognóstico e terapêutica do paciente. Dentre os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- Os parâmetros de edema e temperatura encontram-se aumentados nos pacientes e estão diretamente correlacionados com aumento de citocinas IL-6 e TNF- α , além dos parâmetros de contagem de leucócitos totais e neutrófilos e VHS. Foi observado ainda que não houve uma melhora clínica significativa desses parâmetros clínicos ao longo do tempo de internação, evidenciando uma possível limitação do efeito do soro antiofídico nos efeitos locais;

- A análise de correlação entre os parâmetros laboratoriais e citocinas/quimiocinas foram capazes de evidenciar uma associação entre esses marcadores de inflamação, evidenciando um perfil de resposta envolvendo mediadores solúveis e parâmetros celulares e de lesão tecidual. Um maior número de correlações entre citocinas e quimiocinas foi observada nos tempos T0 e T3, caracterizando padrões de uma resposta inflamatória aguda relacionada a ação do veneno e de regeneração tecidual, respectivamente nesses tempos;

- As análises entre pacientes que desenvolveram ou não infecção secundária mostraram que o evento da infecção bacteriana foi responsável por potencializar a resposta inflamatória relacionada a ação do veneno, sendo os mediadores IL-6, IL-10, CXCL-8, leucócitos totais, neutrófilos e VHS. Ainda, os parâmetros IL-10, leucócitos totais e neutrófilos apresentaram uma diferença logo em T0, o que creditam esses marcadores como possíveis preditores de infecção secundária;

- As citocinas/quimiocinas IL-10, CCL-2, CXCL-8 e CXCL-10 apresentaram-se elevadas previamente ao dia do diagnóstico de infecção secundária, diferentemente dos pacientes sem infecção, apresentando um caráter de predição de infecção secundária em T0. Assim como os valores de VHS encontram-se aumentados a partir da confirmação de infecção secundária, podendo ser um marcador que auxilia os parâmetros clínicos na confirmação do diagnóstico de infecção secundária.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo foram capazes de elucidar aspectos fisiopatológicos dos efeitos locais associados ao processo inflamatório, associando parâmetros clínicos e laboratoriais. Esses parâmetros também se mostraram efetivos na predição e confirmação do diagnóstico de infecção secundária. O estudo também evidenciou pela primeira vez a real importância da infecção secundária nos aspectos inflamatórios, potencializando a resposta imune induzida pelo veneno.

9. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jun 21;11(6).
2. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming [Internet]. Vol. 3, Nature reviews. Disease primers. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2022 Feb 17]. p. 17063. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201763>
3. Brasil. Ministério da Saúde. Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - SINAN NET, DATASUS [Internet]. Ministério da saúde. 2021 [cited 2022 Feb 21]. p. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinann>. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinann>
4. 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* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 17];48:34–41. Available from: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/zpDPfvxmm9BYc35N4X6xfvC/?lang=en&format=html>
5. 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 May 21;9(5).
6. de Oliveira Pardal PP, Souza SM, da Costa Monteiro MR de C, Fan HW, Cardoso JLC, França FOS, *et al*. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 17];98(1):28–42. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/98/1/28/1901141>
7. de Oliveira SS, de Souza Sampaio V, de Almeida Gonçalves Sachett J, Campos Alves E, da Silva VC, Alcântara de Lima JA, *et al*. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. In: [herpetofauna.com.br](http://www.herpetofauna.com.br) [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 17]. p. 73–99. Available from: http://www.herpetofauna.com.br/SnakebitesInTheBrazilianAmazon-CurrentKnowledge_and_Perspectives.pdf
8. Sant'Ana Malaque CM, Gutiérrez JM. Snakebite Envenomation in Central and South America. In: *Critical Care Toxicology* [Internet]. Springer International; 2015 [cited 2022 Feb 17]. p. 1–22. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Jose-Gutierrez-17/publication/308786422_Snakebite_envenomation_in_Central_and_South_America_In_Critical_Care_Medicine_Brendt_et_al_Eds_Springer_International_Switzerland_pp_1-22/links/57f1324708ae91deaa56139d/Snakebite
9. Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, *et al*. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from Bothrops snakebites in the Brazilian Amazon: A

- randomized controlled clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jul 10;11(7).
10. Oliveira SS, Alves EC, Santos AS, Pereira JPT, Sarraff LKS, Nascimento EF, *et al*. Factors associated with systemic bleeding in bothrops envenomation in a tertiary hospital in the Brazilian Amazon. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 17];11(1). Available from: <https://www.mdpi.com/390594>
 11. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços B. Guia de Vigilância em Saúde : volume único [recurso eletrônico]. 2019 [cited 2022 Feb 17];3^a. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf
 12. Magalhães SFV, Peixoto HM, Moura N, Monteiro WM, De Oliveira MRF. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: A descriptive study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 17];113(3):143–51. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/113/3/143/5204422>
 13. Almeida MT De. Reação inflamatória induzida por duas SVMPs isoladas do veneno de *Bothrops atrox* e por fragmentos peptídicos gerados da hidrólise de componentes da membrana basal por estas enzimas Reação inflamatória induzida por duas SVMPs isoladas do veneno de *Bothrops*. 2020;
 14. 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* [Internet]. 2006 [cited 2022 Feb 21];211(1–2):37–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298505001695>
 15. Pidge-Queiroz G, Furtado M de F, Filgueiras CF, Pessoa LA, Spadafora-Ferreira M, van den Berg CW, *et al*. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. *Mol Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2022 Feb 17];47(16):2537–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589010005043>
 16. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, da Silva HB, Fernandes CM, D'Império Lima MR, *et al*. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 17];60(1):12–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112000669>
 17. Sartim MA, Riul TB, Del Cistia-Andrade C, Stowell SR, Arthur CM, Sorgi CA, *et al*. Galatrox is a C-type lectin in *Bothrops atrox* snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. *Glycobiology* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 17];24(11):1010–21. Available from: <https://academic.oup.com/glycob/article-abstract/24/11/1010/2900458>
 18. Menaldo DL, Bernardes CP, Zoccal KF, Jacob-Ferreira AL, Costa TR, Del Lama MPFM, *et al*. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. *Mol Immunol* [Internet].

- 2017 [cited 2022 Feb 17];85:238–47. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017300792>
19. Silva de Oliveira S, Campos Alves E, dos Santos Santos A, Freitas Nascimento E, Tavares Pereira JP, Mendonça da Silva I, *et al.* Bothrops snakebites in the Amazon: recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy. *Clin Toxicol*. 2020 Apr 2;58(4):266–74.
 20. Means R, Cabrera J, Moreno X, Amini R. Remote South American Snakebite with Extensive Myonecrosis. *Clin Pract Cases Emerg Med* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 17];1(1):47–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5965440/>
 21. Albuquerque PLMM, Junior GB da S, Meneses GC, Martins AMC, Lima DB, Raubenheimer J, *et al.* Acute kidney injury induced by bothrops venom: Insights into the pathogenic mechanisms. *Toxins (Basel)*. 2019;11(3):1–14.
 22. Bernal JCC, Bisneto PF, Pereira JPT, Ibiapina HN dos S, Sarraff LKS, Monteiro-Júnior C, *et al.* “Bad things come in small packages”: predicting venom-induced coagulopathy in Bothrops atrox bites using snake ontogenetic parameters. *Clin Toxicol* [Internet]. 2020 May 3 [cited 2022 Feb 17];58(5):388–96. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15563650.2019.1648817>
 23. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation [Internet]. Vol. 131, *British Journal of Haematology*. 2005 [cited 2022 Feb 17]. p. 417–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2141.2005.05753.x>
 24. Huang LW, Wang J Der, Huang JA, Hu SY, Wang LM, Tsan YT. Wound infections secondary to snakebite in central Taiwan. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(3):272–6.
 25. Sadeghi M, Barazandeh M, Zakariaei Z, Davoodi L, Tabaripour R, Fakhar M, *et al.* Massive cutaneous complications due to snakebite: A case report and literature review. *Clin Case Reports*. 2021 May 1;9(5).
 26. Garg A, Sujatha S, Garg J, Acharya NS, Parija SC. Wound infections secondary to snakebite. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(3):221–3.
 27. Mao YC, Liu PY, Hung DZ, Lai WC, Huang ST, Hung YM, *et al.* Bacteriology of *Naja atra* snakebite wound and its implications for antibiotic therapy. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 May 1;94(5):1129–35.
 28. Bhaumik S, Beri D, Lassi ZS, Jagnoor J. Interventions for the management of snakebite envenoming: An overview of systematic reviews. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Oct 1;14(10):1–26.
 29. Resiere D, Gutiérrez JM, Névière R, Cabié A, Hossein M, Kallel H. Antibiotic therapy for snakebite envenoming. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26.
 30. Seifert SA, Armitage JO, Sanchez EE. Snake Envenomation. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2022 Jan 6 [cited 2022 Feb 17];386(1):68–78. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra2105228>
 31. Teixeira CFP, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, *et al.* Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle and Nerve*. 2003 Oct 1;28(4):449–59.
 32. Teixeira CFP, Chaves F, Zamunér SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, *et al.* Effects of neutrophil depletion in the local pathological

- alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int J Exp Pathol*. 2005 Apr;86(2):107–15.
33. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Herrera C, Fernández J, Lomonte B, *et al*. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms [Internet]. Vol. 148, *Toxicon*. 2018 [cited 2022 Feb 17]. p. 123–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010118301594>
 34. 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* [Internet]. 2001 [cited 2022 Feb 17];17(6):425–9. Available from: https://journals.lww.com/pec-online/fulltext/2001/12000/systemic_cytokine_response_in_children_bitten_by.6.aspx
 35. Laustsen AH, María Gutiérrez J, Knudsen C, Johansen KH, Bermúdez-Méndez E, Cerni FA, *et al*. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon* [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 17];146:151–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010118301144>
 36. Brasil. Ministério da Saúde. Animais peçonhentos [Internet]. Ministério da Saúde. 2021 [cited 2021 Jun 22]. p. 5. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/29/2018-059.pdf>
 37. Cardoso JLC, França FO de S, Wen FH, Malaque CMS, Haddad Junior V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2003;468–468.
 38. Cardoso J, França F, ... FW-R do I, 2003 U. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *revistas.usp.br* [Internet]. [cited 2022 Feb 17]; Available from: <https://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/download/30767/32651>
 39. 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* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 17];6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171020300151>
 40. Auerbach PS. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. *Wilderness Environ Med* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 17];16(3):e13–e13. Available from: <https://www.canadianfieldnaturalist.ca/index.php/cfn/article/download/204/204/0>
 41. Nogueira CC, Argôlo AJS, Arzamendia V, Azevedo JA, Barbo FE, Bérnils RS, *et al*. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. *South Am J Herpetol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 17];14(sp1):1. Available from: <https://bioone.org/journals/south-american-journal-of-herpetology/volume-14/issue-sp1/SAJH-D-19-00120.1/Atlas-of-Brazilian-Snakes--Verified-Point-Locality-Maps-to/10.2994/SAJH-D-19-00120.1.short>
 42. Oliveira M, Martins O. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead *Bothrops atrox* in central Amazonia, Brazil. *Herpetol Nat Hist* [Internet]. 2001 [cited 2022 Feb 17];8(2):101–10.

- Available from: <https://www.academia.edu/download/31238057/atrox-activity.pdf>
43. Turci L, Albuquerque S, ... PB-B, 2009 undefined. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. SciELO Bras [Internet]. [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.scielo.br/pdf/bn/v9n3/v9n3a20.pdf>
 44. Nadur-Andrade N, Dale CS, Oliveira VR da S, Toniolo EF, Feliciano R dos S, da Silva JA, *et al.* Analgesic Effect of Photobiomodulation on *Bothrops moojeni* Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 17;10(10).
 45. Moreira V, Gutiérrez JM, Lomonte B, Vinolo MAR, Curi R, Lambeau G, *et al.* 12-HETE is a regulator of PGE2 production via COX-2 expression induced by a snake venom group IIA phospholipase A2 in isolated peritoneal macrophages. Chem Biol Interact. 2020 Feb 1;317:108903.
 46. Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. J Proteomics [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 17];75(7):2181–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912000486>
 47. 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).
 48. Amazonas DR, Portes-Junior JA, Nishiyama-Jr MY, Nicolau CA, Chalkidis HM, Mourão RHV, *et al.* Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. J Proteomics [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 17];181:60–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391918301398>
 49. Campos Borges C, Sadahiro M, dos Santos MC. Epidemiological and clinical aspects of snake bites in the municipalities of the state of Amazonas, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 1999 [cited 2022 Feb 17];32(6):637–46. Available from: <https://search.proquest.com/openview/691bea19914e9192d3696b81c6f05e37/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1796426>
 50. Souza ARB. Snakebite by *Bothrops atrox* (Lin. 1758) in the State of Amazonas - Brazil: Study of 212 cases with identified snake [Internet]. Vol. 31, Revista de Patologia Tropical. 2002 [cited 2022 Feb 21]. p. 267–8. Available from: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Souza+ARB.+Snakebite+by+Bothrops+atrox+%28Lin.+1758%29+in+the+State+of+Amazonas+-+Brazil%3A+Study+of+212+cases+with+identified+snake.+Rev+Patol+Trop+%5BInternet%5D.+2002+%5Bcited+2015+Mar+17%5D
 51. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, Shiv. Imunologia celular e molecular. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2015. 1262 p. Imunidade celular e molecular. Immunol Cel e Mol. 2015;1260.
 52. Sartim MA, Cezarette GN, Jacob-Ferreira AL, Frantz FG, Faccioli LH, Sampaio S V. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. Int J Biol

- Macromol [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 17];103:1077–86. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301730449X>
53. 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)* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 17];8(12). Available from: <https://www.mdpi.com/167230>
 54. León G, Sánchez L, Hernández A, Villalta M, Herrera M, Segura Á, *et al.* Immune response towards snake venoms [Internet]. Vol. 10, *Inflammation and Allergy - Drug Targets*. 2011 [cited 2022 Feb 17]. p. 381–98. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/iadt/2011/00000010/00000005/art00008>
 55. Burin SM, Menaldo DL, Sampaio S V., Frantz FG, Castro FA. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms [Internet]. Vol. 109, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 [cited 2022 Feb 17]. p. 664–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017345956>
 56. Furtado M de F, Silva WD da. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos: I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* ... *Mem Inst Butantan* [Internet]. 1991 [cited 2022 Feb 17];53(2):149–59. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-125821>
 57. Assakura MT, de Fatima Furtado M, Mandelbaum FR. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem* [Internet]. 1992 [cited 2022 Feb 17];102(4):727–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030504919290071X>
 58. 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. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 59. Echeverría S, Leiguez E, Guijas C, do Nascimento NG, Acosta O, Teixeira C, *et al.* Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 17];281:24–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279717310463>
 60. Júnior FAN, Jorge ARC, Marinho AD, Silveira JA de M, Alves NTQ, Costa PHS, *et al.* *Bothrops alternatus* Snake Venom Induces Cytokine Expression and Oxidative Stress on Renal Function. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 21];19(22):2058–68. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2019/00000019/0000022/art00012>
 61. Silveira KSO, Boechem NT, Do Nascimento SM, Murakami YLB, Barboza APB, Melo PA, *et al.* Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 17];139(2):167–77. Available from:

62. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904803002532>
da Silva Souza A, de Almeida Gonçalves Sachett J, Alcântara JA, Freire M, Alecrim M das GC, Lacerda M, *et al.* Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. *Toxicon* [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 17];145:15–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010118300849>
63. Cezarette GN, Sartim MA, Sampaio S V. Inflammation and coagulation crosstalk induced by BJcuL, a galactose-binding lectin isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 17];144:296–304. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019367881>
64. Van Vught LAV, Klouwenberg PMCK, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, *et al.* Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 17];315(14):1469–79. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2503469>
65. Chen CM, Wu KG, Chen CJ, Wang CM. Bacterial infection in association with snakebite: A 10-year experience in a northern Taiwan medical center. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2011 [cited 2022 Feb 17];44(6):456–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118211001320>
66. Michael GC, Thacher TD, Shehu MIL. The effect of pre-hospital care for venomous snake bite on outcome in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2011 [cited 2022 Feb 17];105(2):95–101. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/105/2/95/1883380>
67. 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* [Internet]. 1996 [cited 2022 Feb 17];90(6):696–700. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920396904423>
68. Suchithra N, Pappachan JM, Sujathan P. Snakebite envenoming in Kerala, South India: Clinical profile and factors involved in adverse outcomes. *Emerg Med J* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 17];25(4):200–4. Available from: <https://emj.bmj.com/content/25/4/200.short>
69. Paula RCMF. Perfil Epidemiológico Dos Casos De Acidentes Ofídicos Atendidos No Hospital De Doenças Tropicais De Araguaína-To (Triênio 2007-2009) [Internet]. Dissertação. 2010 [cited 2022 Feb 17]. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-29082011-140727/en.php>
70. Jorge MT, Malaque C, Ribeiro LA, Fan HW, Cardoso JLC, Nishioka SA, *et al.* Failure of chloramphenicol prophylaxis to reduce the frequency of abscess formation as a complication of envenoming by *Bothrops* snakes in Brazil: Q double-blind randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 17];98(9):529–34. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/98/9/529/1917404>
71. Andrade JG, Pinto RNL, De Andrade ALSS, Martelli CMT, Zicker F. Bacterial flora of abscesses following *Bothrops* snakebite. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 1989 [cited 2022 Feb 17];31(6):363–7. Available from:

- <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/KV8g3tLLGJFcxPRKhRbjTMr/?stop=previous&lang=pt&format=html>
72. Andrade JG, Pinto RNL, De Andrade ALSS, Martelli CMT, Zicker F. Bacterial flora of abscesses following Bothrops snakebite. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 1989 [cited 2022 Feb 17];31(6):363–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2640511/>
 73. Regina Gomes Verissimo de Faria Silva P, Virgínia Rocha Vilela R, Paula Possa A. Infecções secundárias em acidentes ofídicos: uma avaliação bibliográfica. *seer.pucgoias.edu.br* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 17];43(1):17–26. Available from: <http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/5191>
 74. Taylor P. Bite wounds and infection [Internet]. Vol. 15, *Clinical Infectious Diseases*. 1992 [cited 2022 Feb 17]. p. 740. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/14/3/633/282040>
 75. Bastos HM, Lopes LFL, Gattamorta MA, Matushima ER. Prevalence of enterobacteria in bothrops jararaca in São Paulo State: Microbiological survey and antimicrobial resistance standards. *Acta Sci - Biol Sci* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 17];30(3):321–6. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1871/187115876014.pdf>
 76. Jorge MT, Ribeiro LA, Da Silva MLR, Kusano EJU, de Mendonça JS. Microbiological studies of abscesses complicating Bothrops snakebite in humans: A prospective study. *Toxicon* [Internet]. 1994 [cited 2022 Feb 17];32(6):743–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010194903433>
 77. Chacur M, Gutiérrez JM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Britto LRG, Maier SF, *et al.* Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: An initial examination of spinal cord mediators. *Pain* [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 17];111(1–2):65–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304395904002787>
 78. Montecucco C, Gutiérrez J, Life BL-C and M, 2008 undefined. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Springer* [Internet]. 2008 Sep [cited 2022 Feb 21];65(18):2897–912. Available from: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-008-8113-3&casa_token=s_H87RIUY14AAAAA:evhoW7WjZR5NThpIRkLu2PyBH1FJYE5Tju7ZqTAd4BorlZiKk5ZvHP2AoE6EFotHfushv96GEQe5okVh
 79. lancet EH-T, 1974 undefined. Measurement of pain. *Elsevier* [Internet]. [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673674908848>
 80. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF. Erratum: Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the infectious diseases Society of America (*Clinical Infectious Diseases* (2014) 59 (e10-e52)). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 17];60(9):1448. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/59/2/e10/2895845>
 81. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. Vol. 140, *Cell*. Elsevier B.V.; 2010. p. 871–82.
 82. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Vol. 140, *Cell*. Elsevier B.V.; 2010. p. 771–6.

83. Teixeira C, Moreira V, Gutiérrez JM. Venoms. In: *Inflammation - From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017. p. 99–128.
84. Alberto De Souza Ribeiro J, Gomes G, Leal Brioschi M, Maria De Macedo Barbosa S, Teixeira J. Inflammation and fever after Bothrops snakebite: a brief clinical-epidemiological review through case report and infrared thermography follow-up. *abraterm.com.br* [Internet]. [cited 2022 Feb 17]; Available from: <http://abraterm.com.br/revista/index.php/PAJMT/article/view/85>
85. Gimenes SNC, Sachett JAG, Colombini M, Freitas-De-Sousa LA, Ibiapina HNS, Costa AG, *et al.* Observation of Bothrops atrox snake envenoming blister formation from five patients: pathophysiological insights. *mdpi.com* [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/11/800>
86. Toni L De, Menaldo D, ... AC-I, 2015 undefined. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from Bothrops atrox snake venom. Elsevier [Internet]. [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156757691500291X>
87. Mamede CCN, de Sousa Simamoto BB, da Cunha Pereira DF, de Oliveira Costa J, Ribeiro MSM, de Oliveira F. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade [Internet]. Vol. 187, *Toxicon*. 2020 [cited 2022 Feb 17]. p. 10–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010120303573>
88. Sano-Martins I, Santoro M, ... PM-BJ of, 1995 undefined. Hematological changes induced by Bothrops jararaca venom in dogs. *europemc.org* [Internet]. [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://europemc.org/article/med/8520523>
89. 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* [Internet]. 1995 [cited 2022 Feb 17];1(1):11–22. Available from: <https://www.scielo.br/j/jvat/a/qCL3ppG3K7MqRm7QdNY4Qwq/?lang=en&format=html>
90. 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. *Wiley Online Libr* [Internet]. 2010 [cited 2022 Feb 21];62(1):268–79. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/art.27183>
91. Chen J, Guan SM, Sun W, Fu H. Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. Vol. 32, *Neuroscience Bulletin*. Science Press; 2016. p. 265–72.
92. Dale CS, Gonçalves LRDC, Juliano L, Juliano MA, Moura Da Silva AM, Giorgi R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. *Peptides*. 2004 Jan 1;25(1):81–9.
93. Da Silva IRF, Lorenzetti R, Rennó AL, Baldissera L, Zelanis A, Serrano SMDT, *et al.* BJ-PI2, A non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 17];1820(11):1809–21. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416512002164>
94. Bernardes CP, Menaldo DL, Mamede CCN, Zoccal KF, Cintra ACO, Faccioli LH, *et al.* Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom. *Mol Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 17];68(2):456–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589015300857>
 95. Yamashita KM, Nogueira TO, Senise L V., Cirillo MC, Gonçalves LRC, Sano-Martins IS, *et al.* Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2011 Oct [cited 2022 Feb 17];9(10):2057–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1538-7836.2011.04449.x>
 96. Raziyeveva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A, *et al.* Immunology of acute and chronic wound healing. *mdpi.com* [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.mdpi.com/1101132>
 97. King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv Wound Care*. 2014 Apr;3(4):315–23.
 98. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, *et al.* Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon- γ and interleukin-10. *J Exp Med* [Internet]. 1996 [cited 2022 Feb 17];183(6):2559–69. Available from: <https://rupress.org/jem/article-abstract/183/6/2559/21434>
 99. Garcia CA, Wang H, Benakanakere MR, Barrett E, Kinane DF, Martin M. c-Jun Controls the Ability of IL-12 to Induce IL-10 Production from Human Memory CD4 + T Cells . *J Immunol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Feb 17];183(7):4475–82. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/183/7/4475.short>
 100. Durrant DM, Metzger DW. IL-12 can alleviate Th17-mediated allergic lung inflammation through induction of pulmonary IL-10 expression. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2022 Feb 17];3(3):301–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/mi20109>
 101. 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* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 17];46(7):806–13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105003107>
 102. Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *mdpi.com* [Internet]. [cited 2022 Feb 21]; Available from: <https://www.mdpi.com/704908>
 103. Stuart J, Whicher JT. Tests for detecting and monitoring the acute phase response. *Arch Dis Child* [Internet]. 1988 [cited 2022 Feb 17];63(2):115–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1778749/>
 104. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Feb 17];39(5):448–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijlh.12693>
 105. Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell

- adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2003 [cited 2022 Feb 17];24(12):640–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614703003225>
106. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* [Internet]. 2009 [cited 2022 Feb 17];54(1):67–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109002785>
107. García-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident Cell Chemokine Expression Serves as the Major Mechanism for Leukocyte Recruitment During Local Inflammation. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6467–73.
108. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244–69.
109. Aftab S, Monowar Tarik M, Abdullah Siddique M, Abdullah Yusuf M. Clinical and microbiological aspect of wound infection: a Review Update. *banglajol.info* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 21];32(2). Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/BJID/article/view/24903>
110. Martinez N. Skin and Soft-Tissue Infections: It's More Than Just Skin Deep. *Adv Emerg Nurs J* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 21];42(3):196–203. Available from: https://journals.lww.com/aenjournal/Fulltext/2020/07000/Skin_and_Soft_Tissue_Infections__It_s_More_Than.9.aspx?context=LatestArticles

10. ANEXOS

10.1 Anexo I – Protocolo de Pesquisa

Formulário de Registro Clínico - CRF

“Ensaio clínico randomizado para avaliação da superioridade de Amoxicilina/Ácido Clavulânico versus placebo na prevenção de infecção bacteriana secundária em acidentes ofídicos na Amazônia Brasileira”

Prontuário:

Nome:

Cod. Estudo:

Pesquisadores Responsáveis: Jacqueline A. G. Sachett **Contato:** (92) 8151-8086

Iran Mendonça da Silva **Contato:** (92) 9322-3774

Critérios de Não Inclusão		
1. Tempo entre o acidente e o atendimento maior que 24 horas ou não saber informar a hora do acidente	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
2. Tratamento prévio com antibioticoterapia nos últimos 30 dias	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
3. Possui abscesso ou infecção claramente definida	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
4. Alérgico ao Clavulin BD	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
5. Está grávida ou suspeita de gravidez (fazer teste específico)	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
6. Utilizou soro antiofídico em outra unidade de saúde	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
8. Incapacidade ou falta de vontade de assinar o consentimento informado (paciente e/ou pais / representante legal)	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
7. Indisponibilidade antecipada para acompanhamento/retorno no sétimo dia após o acidente	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
8. Qualquer condição descompensada ou não controlada como tuberculose ativa, doença maligna, malária grave, HIV, hanseníase, doença fúngica sistêmica (histoplasmose, paracoccidiodomicose), hepatite B, hepatite C ou qualquer outra doença infecto-contagiosa;	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não

PARA SELEÇÃO DO INDIVÍDUO, TODAS AS RESPOSTAS DEVEM SER “**NÃO**”

Randomização

Grupo 1: () Placebo

Grupo 2: () Clavulin BD - 25/3,6mg/kg/dia – 12x12 horas - Crianças e adolescentes

875/125 mg – 12x12 horas - Adultos

Hora da Administração do Antibiótico: _____:_____

Assinatura e carimbo: _____

- UTILIZAR TABELA DE RANDOMIZAÇÃO

1. Dados do paciente

1.1 Contato telefônico: () _____ () _____

1.2 Endereço: _____ nº _____ Bairro: _____

1.3 Município: _____

1.4 Sexo: 1-Masculino 2-Feminino1.5 Data de nascimento ____/____/____ 1.6 Idade: **2. Dados do acidente ofídico**2.1 Procedência: 1-Manaus 2-Interior Qual? _____

2.2 Data do Acidente: ____/____/____ 2.3 Hora Aproximada do Acidente: ____:____

2.4 Data da internação na FMT-HVD: ____/____/____ 2.5 Hora da Admissão: ____:____

2.6 Data da saída na FMT-HVD: ____/____/____

2.7 Motivo: 1-Alta 2-Óbito 3-Transferência2.8 Zona de Ocorrência: 1-Rural 2-Urbana 3-Periurbana 9-Ignorado2.9 Local da picada: 1-Cabeça 2-Braço 3-Perna 4-Tronco 5-Pescoço 6-Mão
7-Coxa 8-Antebraço 9-Pé 10-Outro (Espec.): _____2.10 Lado do corpo afetado: 1-Direito 2-Esquerdo 3-Central2.11 Andou ou caminhou após acidente: 1-Não 2-Sim. Quanto tempo? ____ min.2.12 Acidente relacionado ao trabalho: 1-Não 2-Sim2.13 Houve acidente anterior: 1-Não 2-Sim. Quantos? _____

Data do último: ____/____ (mês/ano)

Assinatura e Carimbo: _____

3. Histórico – Dia 1 (0-12 horas)**3.1 Houve medicamentos orais/injetáveis anteriores a internação:**

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

3.2 Houve uso de produtos no local do acidente:

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

3.3 Condutas adotadas após o acidente 1-Não 2-Sim

Torniquete/garrote Sucção Labial Outro: _____

4. Dados clínicos do paciente

4.1 Data da avaliação: |_|_|/|_|_|/|_|_|

4.2 Hora: ____:____

4.3 Pressão arterial |_|_|_|/|_|_|_| mm Hg **4.4 Pulso** |_|_|_| por min

4.5 Peso corporal |_|_| kg **4.6.Temp.** |_|_|. |_|_| °C **4.7 Freq. Resp.** |_|_| rpm

4.8 Doenças ou Queixas concomitantes

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

4.9 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

- **Leve:** quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos)

sangramento em pele ou mucosas

- **Moderado** edema (edema local de 3 a 4 segmentos) equimose evidentes

sangramento sem comprometimento do estado geral

- **Grave:** alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos)

- **Outros:** dor necrose rubor bolhas calor-T: ____ °C

somente a marca da presa outro: _____

4.10 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

- oligúria anúria hematúria hematêmese hemoptise
- Enterorragia(melena e hematoquezia) hipermenorragia Gengivorragia
- epistaxe otorragia hemorragia conjuntival petéquias Choque
- convulsão sudorese náuseas vômito cólicas abdominais
- diarreia outras:_____

Assinatura e Carimbo: _____

5. Exames Laboratoriais antes da Soroterapia					
5.1 Data da amostra: _ _ _ _ _ _ _			5.2 Horário da Coleta: ___:___		
Variável	Dimensão	Resultados	Variável	Dimensão	Resultados
5.3 Hemácia	Milhões/mm ³		5.16 Potássio	mEq/l	
5.4 Hemoglobina	[g/dl]		5.17 Sódio	mEq/l	
5.5 Plaquetas	[1/mm ³]		5.18 Proteína C	[mg/dl]	
5.6 Hematócrito	[%]		5.19 DHL		
5.7 Leucócitos	[1/mm ³]		5.20 AST		
5.8 Uréia	[mg/dl]		5.21 TNF- α		
5.9 Creatinina	[mg/dl]		5.22 CCL-2		
5.10 CPK - Creatina fosfoquinase	[UI/L]		5.23 CXCL-8		
5.11 VHS	mm/h		5.24 TGF- β		
5.12 Fibrinogênio	mg/dl		5.25 IL-1 β		
5.13 Tempo Coag	Min.		5.26 IL-6		
5.14 CK-MB	[UI/L]		5.57 IL-10		
5.15 TAP	%		5.28 Dot-Elisa		

Assinatura e Carimbo: _____

6. Soroterapia – Classificação do Acidente ofídico6.1 Tipo do acidente 1-Botrópico 2-Laquétrico 3-Não identificado6.2 Classificação do acidente (**vide tabela abaixo**): 1-Leve 2-Moderado 3-Grave**Classificação do Acidente e Soroterapia (*antes de iniciar soroterapia coletar sangue conforme POP – coleta sanguínea):**

Botrópico	
Leve: quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos), sangramento em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação. Soro: Antibotrópico (SAB)	2 a 4 ampolas
Moderado: edema (edema local de 3 a 4 segmentos) e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação. Soro: Antibotrópico (SAB)	5 a 8 ampolas
Grave: alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos), hemorragia grave, hipotensão, anúria. Soro: Antibotrópico (SAB)	12 ampolas

Laquétrico	
Moderado: quadro local presente (Idem Bothropico), pode haver sangramentos, manifestações vagais leves (PA > 80x40mmHg e Pulso acima de 50bpm) Soro: Antibotrópico-laquétrico (SABL)	10 ampolas
Grave: quadro local intenso (Idem Bothropico), hemorragia intensa, com manifestações vagais (PA < 80x40mmHg e Pulso abaixo de 50bpm) Soro: Antibotrópico-laquétrico (SABL)	20 ampolas

6.3 Hora da Soroterapia: _____:_____

6.4 Reação Adversa à Soroterapia (até 24 horas após infusão): 1-Não 2-Sim

- taquicardia taquipneia dispneia urticária náuseas
- vômitos hipotensão prurido choque broncoespasmo
- rouquidão e estridor laríngeo reação anafilática
- outra: _____

6.5 Hora da Reação Adversa: _____:_____

Assinatura e Carimbo: _____

7. Dados da lesão do acidente ofídico7.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: 1-Não 2-Sim

7.2 Data do diagnóstico: ____/____/____ 7.3 Hora: ____:____

7.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

 dor rubor edema celulite abscesso bolha calor-Temp: ____°C Outro (Espec.): _____**8. Lesões cutâneas: Exame Clínico***Favor documentar o tamanho da lesão bem como o grau de epitelização (para lesões ulceradas) e / ou área de infiltração (para lesões infiltradas).***Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.**

Lesão	Tamanho da lesão [mm x mm]	Área de infiltração [mm x mm]
	□□□ x □□□	□□□ x □□□

Assinatura e Carimbo: _____

9. Tratamento/medicação concomitante (até o final do tratamento)

9.1 Data: □□□□□□□□

9.2 Medicções concomitantes? 1-Não 2-Sim – Especifique:

Marca / Nome genérico	Via/formul.	Regime	Indicação	Data de início	Data de término
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□
.....	□□□□□□□□○□□□□□□□□	□□□□□□□□

Assinatura e Carimbo: _____

10. Dados da serpente**10.1 Trouxe a serpente:** 1-Não 2-Sim**INFORMAÇÕES ABAIXO SERÃO INFORMADAS PELA GERÊNCIA DE ANIMAIS PEÇONHENTOS****10.2 Serpente envolvida:** 1-*Bothrops* 2-*Lachesis* 9-Ignorado

3-Outro (Espec.): _____

10.3 Sexo da serpente: 1-Masculino 2-Feminino**10.4 Idade da serpente:** _____ **10.5 Tamanho da serpente:** _____cm.

11. Dados clínicos do paciente - Dia 2 (12-24 horas)	
11.1 Data da avaliação: _ _ _ _ _ _ 11.2 Hora: ____:____	
11.3 Pressão arterial _ _ _ _ / _ _ _ _ mm Hg	11.4 Pulso _ _ _ _ por min
11.5 Temp. _ _ . _ °C	11.6 Freq. Resp. _ _ _ rpm
11.7 Queixas concomitantes	
<input type="checkbox"/> 1-Não 2-Sim (Espec.):_____	
11.8 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim	
- Leve: <input type="checkbox"/> quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos) <input type="checkbox"/> sangramento em pele ou mucosas	
- Moderado <input type="checkbox"/> edema (edema local de 3 a 4 segmentos) <input type="checkbox"/> equimose evidentes <input type="checkbox"/> sangramento sem comprometimento do estado geral	
- Grave: <input type="checkbox"/> alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos)	
- Outros: <input type="checkbox"/> dor <input type="checkbox"/> necrose <input type="checkbox"/> rubor <input type="checkbox"/> bolhas <input type="checkbox"/> calor-T:____°C <input type="checkbox"/> somente a marca da presa <input type="checkbox"/> outro: _____	

11.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X
<input type="checkbox"/> oligúria <input type="checkbox"/> anúria <input type="checkbox"/> hematúria <input type="checkbox"/> hematêmese <input type="checkbox"/> hemoptise
<input type="checkbox"/> Enterorragia(melena e hematoquezia) <input type="checkbox"/> hipermenorragia <input type="checkbox"/> Gengivorragia
<input type="checkbox"/> epistaxe <input type="checkbox"/> otorragia <input type="checkbox"/> hemorragia conjuntival <input type="checkbox"/> petéquias <input type="checkbox"/> Choque
<input type="checkbox"/> convulsão <input type="checkbox"/> sudorese <input type="checkbox"/> náuseas <input type="checkbox"/> vômito <input type="checkbox"/> cólicas abdominais
<input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> outras:_____

Assinatura e Carimbo: _____

11.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

- oligúria anúria hematúria hematêmese hemoptise
- Enterorragia(melena e hematoquezia) hipermenorragia Gengivorragia
- epistaxe otorragia hemorragia conjuntival petéquias Choque
- convulsão sudorese náuseas vômito cólicas abdominais
- diarreia outras:_____

12. Exames Laboratoriais após da Soroterapia					
12.1 Data da amostra:			12.2 Hora da Coleta: ____:____		
Variável	Dimensão	Resultados	Variável	Dimensão	Resultados
12.3 Hemácia	Milhões		12.16 Potássio	mEq/l	
12.4 Hemoglobina	[g/dl]		12.17 Sódio	mEq/l	
12.5 Plaquetas	[1/mm ³]		12.18 Proteína C	[mg/dl]	
12.6 Hematócrito	[%]		12.19 DHL		
12.7 Leucócitos	[1/mm ³]		12.20 AST		
12.8 Uréia	[mg/dl]		12.21 TNF- α		
12.9 Creatinina	[mg/dl]		12.22 CCL-2		
12.10 CPK Creatina fosfoquinase	[UI/L]		12.23 CXCL-8		
12.11 VHS	mm/h		12.24 TGF- β		
12.12 Fibrinogênio	mg/dl		12.25 IL-1 β		
12.13 Tempo Coag	Min.		12.26 IL-6		
12.14 CK-MB	[UI/L]		12.57 IL-10		
12.15 TAP	%				

Assinatura e Carimbo: _____

13. Dados da lesão do acidente ofídico	
13.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: <input type="checkbox"/> 1-Não 2-Sim	
13.2 Data do diagnóstico: ____/____/____	13.3 Hora: ____:____
13.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim 9-Ignorado	
<input type="checkbox"/> dor <input type="checkbox"/> rubor <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> celulite <input type="checkbox"/> abscesso <input type="checkbox"/> bolha <input type="checkbox"/> calor-Temp: ____°C <input type="checkbox"/> Outro (Espec.): _____	

14. Lesões cutâneas: Exame Clínico

Favor documentar o tamanho da lesão bem como o grau de epitelização (para lesões ulceradas) e / ou área de infiltração (para lesões infiltradas).

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

Lesão	Localização (parte do corpo)	Tamanho da lesão [mm x mm]	Área de infiltração [mm x mm]
		□ □ X □ □	□ □ X □ □

Assinatura e Carimbo: _____

15. Dados clínicos do paciente - Dia 3 (24-48 horas)15.1 Data da avaliação: 15.2 Hora: : 15.3 Pressão arterial / mm Hg15.4 Pulso por min15.5 Temp. °C15.6 Freq. Resp. rpm**15.7 Queixas concomitantes** 1-Não 2-Sim

(Espec.): _____

15.8 Manifestações Locais: 1-Não 2- Sim- **Leve:** quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos) sangramento em pele ou mucosas- **Moderado** edema (edema local de 3 a 4 segmentos) equimose evidentes sangramento sem comprometimento do estado geral- **Grave:** alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos)- **Outros:** dor necrose rubor bolhas calor-T: °C somente a marca da presa outro: _____

Assinatura e Carimbo: _____

16. Exames Laboratoriais					
16.1 Data da amostra:			16.2 Hora da Coleta: ____:____		
Variável	Dimensão	Resultados	Variável	Dimensão	Resultados
16.3 Hemácia	Milhões		16.16 Potássio	mEq/l	
16.4 Hemoglobina	[g/dl]		16.17 Sódio	mEq/l	
16.5 Plaquetas	[1/mm ³]		16.18 Proteína C	[mg/dl]	
16.6 Hematócrito	[%]		16.19 DHL		
16.7 Leucócitos	[1/mm ³]		16.20 AST		
16.8 Uréia	[mg/dl]		16.21 TNF- α		
16.9 Creatinina	[mg/dl]		16.22 CCL-2		
16.10 CPK Creatina fosfoquinase	[UI/L]		16.23 CXCL-8		
16.11 VHS	mm/h		16.24 TGF- β		
16.12 Fibrinogênio	mg/dl		16.25 IL-1 β		
16.13 Tempo Coag	Min.		16.26 IL-6		
16.14 CK-MB	[UI/L]		16.57 IL-10		
16.15 TAP	%				

Assinatura e Carimbo: _____

17. Dados da lesão do acidente ofídico
17.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: 1-Não 2-Sim

17.2 Data do diagnóstico: ____/____/____ **17.3 Hora:** ____:____

17.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim 9-Ignorado

 dor rubor edema celulite abscesso bolha

 calor-Temp: ____°C Outro (Espec.): _____

18. Lesões cutâneas: Exame Clínico

Favor documentar o tamanho da lesão bem como o grau de epitelização (para lesões ulceradas) e / ou área de infiltração (para lesões infiltradas).

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

Lesão	Localização (parte do corpo)	Tamanho da lesão [mm x mm]	Área de infiltração [mm x mm]
		□□□ x □□□	□□□ x □□□

Assinatura e Carimbo: _____

19. Dados clínicos do paciente - Dia 4 (48-72 horas)19.1 Data da avaliação: 19.2 Hora: : 19.3 Pressão arterial / mm Hg 19.4 Pulso por min19.5 Temp. °C 19.6 Freq. Resp. rpm**19.7 Queixas concomitantes** 1-Não 2-Sim (Espec.): _____**19.8 Manifestações Locais:** 1-Não 2-Sim 9-Ignorado- **Leve:** quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos) sangramento em pele ou mucosas- **Moderado** edema (edema local de 3 a 4 segmentos) equimose evidentes sangramento sem comprometimento do estado geral- **Grave:** alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos)- **Outros:** dor necrose rubor bolhas calor-T: °C somente a marca da presa outro: _____**19.9 Manifestações Sistêmicas:** 1-Não 2-Sim, marcar um X oligúria anúria hematúria hematêmese hemoptise Enterorragia(melena e hematoquezia) hipermenorragia Gengivorragia epistaxe otorragia hemorragia conjuntival petéquias Choque convulsão sudorese náuseas vômito cólicas abdominais diarreia outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

20. Exames Laboratoriais					
20.1 Data da amostra:			20.2 Hora da Coleta: ____:____		
Variável	Dimensão	Resultados	Variável	Dimensão	Resultados
20.3 Hemácia	Milhões		20.16 Potássio	mEq/l	
20.4 Hemoglobina	[g/dl]		20.17 Sódio	mEq/l	
20.5 Plaquetas	[1/mm ³]		20.18 Proteína C	[mg/dl]	
20.6 Hematócrito	[%]		20.19 DHL		
20.7 Leucócitos	[1/mm ³]		20.20 AST		
20.8 Uréia	[mg/dl]		20.21 TNF- α		
20.9 Creatinina	[mg/dl]		20.22 CCL-2		
20.10 CPK Creatina fosfoquinase	[UI/L]		20.23 CXCL-8		
20.11 VHS	mm/h		20.24 TGF- β		
20.12 Fibrinogênio	mg/dl		20.25 IL-1 β		
20.13 Tempo Coag	Min.		20.26 IL-6		
20.14 CK-MB	[UI/L]		20.27 IL-10		
20.15 TP	%				

21. Dados da lesão do acidente ofídico	
21.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: <input type="checkbox"/> 1-Não 2-Sim	
21.2 Data do diagnóstico: ____/____/____	21.3 Hora: ____:____
21.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim 9-Ignorado	
<input type="checkbox"/> dor <input type="checkbox"/> rubor <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> celulite <input type="checkbox"/> abscesso <input type="checkbox"/> bolha <input type="checkbox"/> calor-Temp: ____°C <input type="checkbox"/> Outro (Espec.): _____	

Assinatura e Carimbo: _____

22. Lesões cutâneas: Exame Clínico			
<i>Favor documentar o tamanho da lesão bem como o grau de epitelização (para lesões ulceradas) e / ou área de infiltração (para lesões infiltradas).</i>			
<u>Fotodocumentação:</u> Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.			
Lesão	Localização (parte do corpo)	Tamanho da lesão [mm x mm]	Área de infiltração [mm x mm]
		□□□ x □□□	□□□ x □□□

23. Dados clínicos do paciente - Dia 7 (retorno ambulatorial)23.1 Data da avaliação: / / **23.2 Hora:** : 23.3 Pressão arterial / mm Hg **23.4 Pulso** por min23.5 Temp. . °C **23.6 Freq. Resp.** rpm**23.7 Queixas concomitantes** 1-Não 2-Sim (Espec.): _____**23.8 Manifestações Locais:** 1-Não 2-Sim- **Leve:** quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos) sangramento em pele ou mucosas- **Moderado** edema (edema local de 3 a 4 segmentos) equimose evidentes sangramento sem comprometimento do estado geral- **Grave:** alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos)- **Outros:** dor necrose rubor bolhas calor-T: °C somente a marca da presa outro: _____**23.9 Manifestações Sistêmicas:** 1-Não 2-Sim, marcar um X oligúria anúria hematúria hematêmese hemoptise Enterorragia(melena e hematoquezia) hipermenorragia Gengivorragia
 epistaxe otorragia hemorragia conjuntival petéquias Choque convulsão sudorese náuseas vômito cólicas abdominais diarreia outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

24. Exames Laboratoriais					
24.1 Data da amostra:			24.2 Hora da Coleta: ____:____		
Variável	Dimensão	Resultados	Variável	Dimensão	Resultados
24.3 Hemácia	Milhões		24.16 Potássio	mEq/l	
24.4 Hemoglobina	[g/dl]		24.17 Sódio	mEq/l	
24.5 Plaquetas	[1/mm ³]		24.18 Proteína C	[mg/dl]	
24.6 Hematócrito	[%]		24.19 DHL		
24.7 Leucócitos	[1/mm ³]		24.20 AST		
24.8 Uréia	[mg/dl]		24.21 TNF- α		
24.9 Creatinina	[mg/dl]		24.22 CCL-2		
24.10 CPK Creatina fosfoquinase	[UI/L]		24.23 CXCL-8		
24.11 VHS	mm/h		24.24 TGF- β		
24.12 Fibrinogênio	mg/dl		24.25 IL-1 β		
24.13 Tempo Coag	Min.		24.26 IL-6		
24.14 CK-MB	[UI/L]		24.57 IL-10		
24.15 TAP	%				

Assinatura e Carimbo: _____

25. Dados da lesão do acidente ofídico

25.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: 1-Não 2-Sim

25.2 Data do diagnóstico: ____/____/____ **25.3 Hora:** ____:____

25.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim 9-Ignorado

dor rubor edema celulite abscesso bolha

calor-Temp: ____°C Outro (Espec.): _____

26. Lesões cutâneas: Exame Clínico

Favor documentar o tamanho da lesão bem como o grau de epitelização (para lesões ulceradas) e / ou área de infiltração (para lesões infiltradas).

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

Lesão	Localização (parte do corpo)	Tamanho da lesão [mm x mm]	Área de infiltração [mm x mm]
		□□□ x □□□	□□□ x □□□

Assinatura e Carimbo: _____

27. INFEÇÃO LOCAL: 1-Não 2-Sim**27.1 Tipo de amostra** 1- Hemocultura 2-Aspirado da Lesão 3- Biópsia

27.2 Data da amostra: |_|_|||_|_|||_|_|

27.3 Bactérias Identificadas

1-Não 2-Sim, marcar um X

- não identificado *Staphylococcus aureus* *Enterococcus faecalis*
 Streptococcus spp *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae*
 Proteus spp *Morganella morganii* *Pseudomonas aeruginosa*
 Acinetobacter spp *Enterobacter spp* *Citrobacter ssp*
 Providencia rettgeri *Salmonella entérica diarizonae*
 Outra: _____

Antibiograma**27.4 Sensível a:**

1-Não 2-Sim 9-Não testado

- Amicacina Ampicilina Amoxicilina/Ácido Clavulânico
 Cefalexina Cefalotina Cefepima Cefoxitina
 Cefotaxima Ceftazidima Ceftriaxona Ciprofloxacino
 Clindamicina Cloranfenicol Eritromicina Gentamicina
 Ertapenem Imipenem Meropenem Neomicina
 Oxacilina Penicilina Piperacilian Tazobactam
 Tetraciclina Vancomicina Sulfametoxazol/trimetropim
 Outro: _____

27.5 Resistente a:

1-Não 2-Sim 9-Não testado

- Amicacina Ampicilina Amoxicilina/Ácido Clavulânico
 Cefalexina Cefalotina Cefepima Cefoxitina
 Cefotaxima Ceftazidima Ceftriaxona Ciprofloxacino
 Clindamicina Cloranfenicol Eritromicina Gentamicina
 Ertapenem Imipenem Meropenem Neomicina
 Oxacilina Penicilina Piperacilian Tazobactam
 Tetraciclina Vancomicina Sulfametoxazol/trimetropim

Outro: _____

28. Avaliação Final

28.1 Última adm. da medicação do estudo | | | | | | | |

28.2 Completou todos os procedimentos 1-Não 2-Sim

Se não, Especifique: _____

29. Após 30 (trinta) dias do acidente ofídico

29.1 Data: | | | | | | | |

29.2 Contato telefônico: 1-Não 2-Sim

Se não, Especifique: _____

29.3 Avaliação: 1-Não 2-Sim 9-Ignorado

cicatrização completa da ferida infecção da lesão debridamento

amputação de membro sem alteração

Observação: _____

10.2 Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Ensaio clínico randomizado para avaliação da superioridade de Amoxicilina/Ácido Clavulânico versus placebo na prevenção de infecção bacteriana secundária em acidentes ofídicos na Amazônia Brasileira”

Nome _____ do _____ Voluntário: _____

Você procurou e será atendido para o acompanhamento do acidente envolvendo serpente (cobra) da Fundação de Medicina Tropical e será internado. Por isso está sendo convidado a participar, de um estudo clínico que envolve a evolução da ferida decorrente da picada da serpente e seus sinais e sintomas.

Este estudo tem sua justificativa na complicação frequente em infecções bacterianas secundárias, ou seja, infecção da ferida decorrente da picada da serpente (cobra). Muitos pacientes retornam para casa sem a nova possibilidade de retorno ao hospital, para tratamento das complicações decorrentes dessa ferida. Com isso, este estudo propõe conhecer as causas e possíveis tratamentos preventivos destas infecções e inflamações para melhorar o cuidado à esses pacientes.

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a eficácia da antibioticoterapia empírica precoce na prevenção de infecções secundárias em pacientes vítimas de acidentes ofídicos.

Avaliar a reação inflamatória decorrente dos acidentes ofídicos.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em 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). Um exame complementar de biópsia (retirada de um pequeno fragmento) poderá ser realizado no local da lesão para avaliar alterações no tecido decorrentes ao envenenamento, este procedimento pode levar a sangramento local.

Para os exames envolvidos neste estudo será utilizada uma parte do material (sangue) obtido para a realização de exames rotineiros como já referido. Se você apresentar infecção local decorrente do acidente com serpente (cobra), durante o período de internação, será adicionalmente avaliado por ultrassonografia, hemocultura e biópsia (retirada de um pequeno fragmento) da ferida.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Para prevenir a infecção da ferida decorrente do acidente, você poderá ter a indicação ou não, da prescrição de antibiótico, de acordo com o grupo de pesquisa que você for selecionado.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. A **coleta de sangue** para o estudo coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros, de forma a não ser prevista punção venosa (retirada de sangue) **adicional**. **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 para exames laboratoriais, que são partes de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção e/ou manchas roxas transitórias (que desaparecem com o tempo), chamadas equimoses.

BENEFÍCIOS

A sua participação neste estudo irá contribuir para a criação de um protocolo de prevenção de infecção secundária e, controle e tratamento da inflamação, em indivíduos após os acidentes com serpentes, além de maior resolutividade das necessidades de saúde da população na Região Amazônica, e, conseqüentemente, redução de gastos públicos nas complicações de eventos desta natureza.

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.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Você será acompanhado por profissionais especialistas da Fundação Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e terá toda a assistência disponível na FMT-HVD 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.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética da FMT-HVD e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da FMT-HVD. Seu tratamento e acompanhamento médico, ocorrerão independentemente de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida. O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para Enfermeira Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett no telefone (92) 981518086 ou para o médico Dr Iran Mendonça da Silva (92) 993223775. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com outra forma de

