Carlos Roberto de Medeiros

**Manifestações alérgicas aos venenos ofídicos como
moléstia ocupacional em herpetologistas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro

SÃO PAULO

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Medeiros, Carlos Roberto de

Manifestações alérgicas aos venenos ofídicos como moléstia ocupacional em
herpetologistas / Carlos Roberto de Medeiros. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Fábio Fernandes Morato Castro.

Descritores: 1.Hipersensibilidade 2.Venenos de serpentes 3.Imunoglobulina E
4.Borthrops 5.Doenças profissionais

USP/FM/SBD-160/07

*Aos funcionários do Instituto Butantan que, no dia a dia, lidam com esses
incríveis animais, as serpentes, e tornam possível a obtenção do soro
antiveneno.*

Aos meus filhos Rubens e Cássio.

À Marina, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro, meu orientador, pela aposta sempre confiante no meu trabalho.

À Dra. Kátia Cristina Barbaro, pelo encorajamento e incentivo constantes e, em especial, pelo seu empenho e paciência em ensinar-me os experimentos laboratoriais.

À Dra. Vera Lúcia Zaher, pela solicitude e colaboração inestimável na elaboração do questionário com foco na saúde ocupacional.

À Dra. Cristina Maria Kokron, pelo empenho na realização dos experimentos relativos às dosagens de IgE específicas.

À Marcela da Silva Lira, amiga mais recente, pela sua contribuição valiosa na realização dos ensaios de ELISA, *Western blotting* e inibição do *ImmunoCAP*.

Ao Prof. Dr. Francisco Oscar de Siqueira França, amigo e companheiro de trabalho no Hospital Vital Brazil, pelo constante incentivo acadêmico.

Ao Dr. João Luiz Costa Cardoso, a quem devo a minha formação na área de acidentes por animais peçonhentos, pela constante riqueza de nossas interlocuções.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, pela acolhida institucional deste projeto e pelas suas observações preciosas e objetivas.

Aos assistentes da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da FMUSP, Dr. Antônio Abílio Motta, Dr. Luiz Augusto Marcondes Fonseca e Dr. Clóvis Eduardo Santos Galvão, pelas ricas sugestões e críticas sempre pertinentes.

À equipe do LIM 60 da FMUSP, Carlos, Elza e Santa, pela boa vontade e inestimável capacidade técnica.

Ao Serafim, do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da FMUSP, amigo de longa data, pelo esforço na realização das dosagens de IgG e IgE totais.

À Tânia, pela amizade, apoio e esforço sem tamanho para a conclusão deste trabalho.

À Elza e à Lourdes, da equipe de enfermagem do Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, pelo inestimável trabalho na coleta e preparo das amostras sangüíneas.

À Fundação Butantan, em particular ao Sr. Eduardo Ferreira Rodrigues Neto, que tornou possível o envio do material para o desenvolvimento do *ImmunoCAP* na Suécia.

À *Pharmacia Diagnostics* e, em especial, aos seus representantes no Brasil, a Sra. Eliane Ferraz e o Sr. Fábio Acuri, que tornaram possível o desenvolvimento do *ImmunoCAP* para o veneno de *Bothrops jararaca*.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Duarte, responsável pela Seção de Recepção de Serpentes do Laboratório de Herpetologia, ao Dr. Wilson Fernandes, responsável pela Seção de Venenos do Laboratório de Herpetologia, ao Dr. Giuseppe Puerto, responsável pelo Museu Biológico, ao Dr. José Roberto Marcelino, responsável pela Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, e a todos os funcionários e estagiários do Instituto Butantan que participaram deste estudo, pelo apoio incondicional, sem o qual jamais este trabalho seria concretizado.

*“Aprendi que só o trabalho realizado com
amor, dedicação e perseverança é construtivo
e que o ódio nada constroi.”*

Vital Brazil

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	ALERGIA E DOENÇAS ALÉRGICAS	2
1.2	ALERGIA OCUPACIONAL	11
1.3	SERPENTES PEÇONHENTAS E SEUS VENENOS	16
1.4	ALERGIA AOS VENENOS OFÍDICOS	22
1.5	O TRABALHO DOS HERPETOLOGISTAS DO INSTITUTO BUTANTAN	31
2	OBJETIVOS.....	43
3	MÉTODOS	45
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO E POPULAÇÃO	45
3.2	QUESTIONÁRIO	46
3.3	DETERMINAÇÃO DA IGE TOTAL E ESPECÍFICA.....	48
3.4	CRITÉRIO DE ATOPIA	49
3.5	ANTÍGENOS.....	50
3.6	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE).....	51

3.7	<i>WESTERN BLOT</i>	52
3.8	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	53
3.9	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA IGE ESPECÍFICA (INIBIÇÃO DO <i>IMMUNOCAP</i>).....	55
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4	RESULTADOS	60
4.1	DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E OCUPACIONAIS.....	60
4.2	DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E IMUNOLÓGICAS.....	65
4.2.1	Atopia e nível sérico total de anticorpos da classe IgE	70
4.2.2	Sintomas alérgicos relacionados à exposição ocupacional aos venenos ofídicos .	71
4.2.3	Determinação dos níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno botrópico	74
4.2.4	Relação entre o teste <i>ImmunoCAP</i> para o veneno de <i>Bothrops jararaca</i> e a presença de sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico...	76
4.3	RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE ATOPIA E A SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA AO VENENO BOTRÓPICO	80
4.4	RELAÇÃO ENTRE O NÍVEL SÉRICO DE IGE TOTAL E A SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA AO VENENO BOTRÓPICO.....	81
4.5	RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E A SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA AO VENENO BOTRÓPICO.....	82
4.6	ACIDENTES OCUPACIONAIS PROVOCADOS POR PICADAS DE SERPENTES..	84
4.7	ACIDENTES OCUPACIONAIS PROVOCADOS PELO CONTATO DE VENENO DE SERPENTE COM MEMBRANAS MUCOSAS	87
4.8	RELAÇÃO ENTRE O TESTE <i>IMMUNOCAP</i> PARA O VENENO DE <i>BOTHROPS</i> <i>JARARACA</i> E OS SINTOMAS ALÉRGICOS DESENCADEADOS PELA EXPOSIÇÃO AOS VENENOS DE OUTRAS SERPENTES	90
4.9	RELAÇÃO ENTRE A SENSIBILIZAÇÃO AO VENENO BOTRÓPICO E A SENSIBILIZAÇÃO AOS VENENOS DE HIMENÓPTEROS	92

4.10	RELAÇÃO ENTRE O EXERCÍCIO DE TAREFAS RELACIONADAS À EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SERPENTE <i>BOTHROPS JARARACA</i> OU AO SEU VENENO E O DESENVOLVIMENTO DE SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA AO VENENO BOTRÓPICO ..	94
4.11	ÍNDICES DE EXPOSIÇÕES OCUPACIONAIS À SERPENTE <i>BOTHROPS JARARACA</i> OU AO SEU VENENO.....	97
4.12	RELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES DE EXPOSIÇÕES OCUPACIONAIS À SERPENTE <i>BOTHROPS JARARACA</i> OU AO SEU VENENO E O DESENVOLVIMENTO DE SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA AO VENENO BOTRÓPICO.....	103
4.13	IDENTIFICAÇÃO DOS ALÉRGENOS PRESENTES NO VENENO DE <i>BOTHROPS JARARACA</i>	108
4.14	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA IGE ESPECÍFICA AO VENENO DE <i>BOTHROPS JARARACA</i> (INIBIÇÃO DO <i>IMMUNOCAP</i>)	112
5	DISCUSSÃO.....	116
6	CONCLUSÕES.....	134
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
	ANEXOS	157

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
d.C.	Depois de Cristo
e.g.	por exemplo
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a porção Fc da IgE
i.e.	isto é
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
μg	Microgramo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
ng	Nanogramo
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
pg	Picogramo
RAST	<i>Radioallergosorbent Test</i>
Th ₂	Linfócito T auxiliador do tipo 2
T _{regs}	Linfócito T reguladores

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo o local de trabalho.	60
Tabela 2 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo as variáveis sexo, idade e tempo de atividade.....	62
Tabela 3 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	66
Tabela 4 – Características demográficas, sintomas alérgicos e variáveis imunológicas dos trabalhadores com sensibilização alérgica ao veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	75
Tabela 5 – Distribuição dos participantes do estudo segundo a presença ou não dos sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico e o teste <i>ImmunoCAP</i> positivo ou não para o veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	76
Tabela 6 – Distribuição dos níveis séricos da IgE específica aos venenos de himenópteros entre os trabalhadores com IgE específica positiva ao veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	92
Tabela 7 – Associação entre cada tarefa implicada na exposição ocupacional do trabalhador à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico	95
Tabela 8 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo os índices de exposições à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno, ligados ao exercício de cada tarefa específica.	98
Tabela 9 – Distribuição das medianas dos índices de exposições ocupacionais à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno segundo cada modalidade de tarefa exercida pelos trabalhadores	102

Tabela 10 – Relação entre os índices de exposições ocupacionais à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno, devido ao exercício de cada tarefa específica, e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico. Resultados obtidos pela aplicação do teste estatístico Mann-Whitney.	104
Tabela 11 – Cargas dos índices de exposições ocupacionais à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno decorrentes de cada tarefa, após rotação pelo método <i>Varimax</i>	105
Tabela 12 – Nomeação dos fatores extraídos após análise de componentes principais dos índices de exposições ocupacionais à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sensibilização ao alérgeno e desenvolvimento de células B e T específicas de memória. A introdução de um antígeno e sua apresentação às células T <i>naive</i> estimula a diferenciação e expansão clonal das células Th ₂ e a troca de classe (“ <i>switching</i> ”) IgE nas células B. Ocorre a expansão clonal das células B de memória, que também podem facilitar a apresentação do antígeno às células T.	5
Figura 2 – Reação de hipersensibilidade do tipo I (fase imediata da reação alérgica). A ligação do antígeno aos anticorpos da classe IgE ligados aos receptores FcεRI presentes nas superfícies dos mastócitos e basófilos leva à ativação dessas células e à liberação de mediadores químicos.....	6
Figura 3 – Método <i>ImmunoCAP</i> . (1) o alérgeno de interesse acoplado ao <i>ImmunoCAP</i> reage com a IgE específica do soro do paciente; (2) depois da lavagem da IgE não específica, são adicionados anticorpos marcados com enzima para formar um complexo; (3) após a incubação, a anti-IgE marcada com enzima é lavada e o complexo então é incubado com o agente de desenvolvimento; (4) a reação é interrompida e determina-se a fluorescência no eluato. Quanto maior a fluorescência, mais IgE específica há no soro do paciente.....	10
Figura 4 – Representantes dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas do Brasil: (A) <i>Bothrops</i> (jararacas); (B) <i>Crotalus</i> (cascavéis); (C) <i>Lachesis</i> (surucucus); (D) <i>Micrurus</i> (corais).....	18
Figura 5 – <i>Bothrops jararaca</i>	19
Figura 6 – Seqüência de imagens mostrando a atividade de troca de caixa de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan	34
Figura 7 – Seqüência de imagens mostrando a atividade de alimentação de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.	35

Figura 8 – Seqüência de imagens mostrando a atividade de extração de veneno de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan	36
Figura 9 – (A) Dessecador a vácuo. As placas de Petri contendo veneno eram colocadas no seu interior para secagem e posterior raspagem manual; (B) Liofilizadora automática. Não é necessário a raspagem, nem o envase manual	37
Figura 10 – Cabine com fluxo de ar laminar utilizada para a pesagem de veneno liofilizado no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O fluxo de ar não é utilizado para não provocar ondas de turbulência que espalham o veneno.	38
Figura 11 – Câmara de exaustão utilizada na Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Butantan. O sistema de exaustão de ar não espalha o veneno e protege o operador	39
Figura 12 – Interior do Museu Biológico do Instituto Butantan. As serpentes são expostas vivas em biodioramas que reproduzem os seus habitats naturais.	40
Figura 13 – Interior do Serpentário do Instituto Butantan. As serpentes vivas são expostas como atração para os visitantes.	40
Figura 14 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a escolaridade.	63
Figura 15 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a profissão.	64
Figura 16 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo o cargo (ou função)	64
Figura 17 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo (A) a presença de atopia e (B) de níveis séricos de IgE total > 100 kU/L.....	70
Figura 18 – Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno ofídico segundo o gênero da serpente.	71

Figura 19 – Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno botrópico segundo a modalidade do sintoma: (A) rinite; (B) conjuntivite; (C) asma; (D) urticária e (E) anafilaxia.	72
Figura 20 – Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno botrópico segundo a forma de exposição: (A) contato do veneno com mucosas; (B) contato do veneno com a pele; (C) inalação do veneno em pó; (D) inalação do veneno líquido e (E) picada da serpente.	73
Figura 21 – Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema <i>ImmunoCAP</i>) e sintomas de rinite.	78
Figura 22 – Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema <i>ImmunoCAP</i>) e sintomas alérgicos cutâneos (urticária).	78
Figura 23 – Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema <i>ImmunoCAP</i>) e sintomas de conjuntivite.	79
Figura 24 – Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema <i>ImmunoCAP</i>) e sintomas asmáticos.	79
Figura 25 – Relação entre a presença de atopia e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	80
Figura 26 – Relação entre o nível sérico total de anticorpos da classe IgE maior que 100 kU/L e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	81
Figura 27 – Histogramas das distribuições das frequências da variável tempo de exposição ocupacional ao veneno botrópico antes (A) e após (B) a transformação logarítmica.	82
Figura 28 – Distribuição dos trabalhadores vítimas de acidentes ocupacionais ocasionados por picadas de serpentes segundo o gênero da serpente.	84

Figura 29 – Relação entre acidentes provocados por picadas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	85
Figura 30 – Relação entre os acidentes provocados por picadas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno botrópico.	86
Figura 31 – Distribuição dos trabalhadores vítimas de acidentes ocupacionais ocasionados pelo contato do veneno ofídico com membranas mucosas segundo o gênero da serpente.	87
Figura 32 – Relação entre acidentes provocados pelo contato do veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> com membranas mucosas e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	88
Figura 33 – Relação entre os acidentes provocados pelo contato do veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> com membranas mucosas e a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno botrópico.	89
Figura 34 – Relação entre sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ocupacional ao veneno de serpente do gênero <i>Crotalus</i> e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	90
Figura 35 – Relação entre sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ocupacional ao veneno de serpente do gênero <i>Micrurus</i> e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico.	91
Figura 36 – Relação entre a presença no soro de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno botrópico e de anticorpos da classe IgE específicos aos venenos de himenópteros.	93
Figura 37 – Distribuição dos 67 trabalhadores segundo as tarefas relacionadas à exposição ocupacional do trabalhador à serpente <i>Bothrops jararaca</i> ou ao seu veneno.....	94
Figura 38 – <i>Western blotting</i> das proteínas do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> com anti-IgE e soro dos trabalhadores nº 18 e nº 50. Os números à direita indicam a	

mobilidade dos marcadores de massa molecular. (E) eletroforese do veneno de *Bothrops jararaca* 109

Figura 39 – *Western blotting* das proteínas do veneno de *Bothrops jararaca* com anti-IgG e soro dos trabalhadores nº 1, nº 4, nº 18, nº 40, nº 45, nº 47, nº 50, nº 60 e nº 67. Os números à direita indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. (-) controle negativo; (+) controle positivo (paciente picado por serpente do gênero *Bothrops*); (E) eletroforese do veneno de *Bothrops jararaca*..... 111

Figura 40 – Inibição do *ImmunoCAP*. Inibição das dosagens dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno do *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP*) observada no soro do trabalhador número 50 após absorção com diferentes concentrações do veneno botrópico (linha vermelha) e veneno crotálico (linha azul) 113

Figura 41 – Inibição do *ImmunoCAP*. Inibição das dosagens dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno do *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP*) observada no soro do trabalhador número 18 após absorção com diferentes concentrações do veneno botrópico (linha vermelha) e veneno crotálico (linha azul) 114

RESUMO

Medeiros CR. *Manifestações alérgicas aos venenos ofídicos como moléstia ocupacional em herpetologistas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

INTRODUÇÃO: Desde 1930, quando o primeiro caso de sensibilização alérgica a um veneno ofídico foi descrito na literatura, os venenos de todas as principais famílias de serpentes têm sido implicados como causadores de reações alérgicas. O desenvolvimento deste tipo de hipersensibilidade tem sido descrito após recorrentes exposições aos venenos através de picadas e, presumivelmente, de repetidas inalações ou contato desses venenos com a pele ou membranas mucosas. Esta condição tem sido observada entre os profissionais que manuseiam as serpentes e/ou os seus venenos. Entretanto, pouco se conhece a respeito da prevalência dessa doença entre esses trabalhadores, seus determinantes, e natureza molecular dos alérgenos envolvidos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a prevalência da alergia ao veneno de *Bothrops jararaca*, apontando os fatores preditores para o seu desenvolvimento, entre trabalhadores expostos à serpente e/ou ao seu veneno, e demonstrar o envolvimento de um mecanismo IgE-mediado neste tipo de doença ocupacional. **MÉTODOS:** Sessenta e sete herpetologistas de um instituto de pesquisa, expostos à serpente *Bothrops jararaca* e/ou ao seu veneno, foram submetidos a um questionário e a testes imunológicos, para avaliar a presença de alergia ao veneno. A sensibilização ao veneno foi determinada pela quantificação de anticorpos da classe IgG e IgE, específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*, através dos testes sorológicos *ImmunoCAP* e ELISA. Os alérgenos foram caracterizados através de *Western blotting* e de ensaios de inibição do *ImmunoCAP*. **RESULTADOS:** Doze dos 67 trabalhadores reportaram sintomas alérgicos variando desde urticária, rinoconjuntivite e asma, até anafilaxia. Sete indivíduos apresentaram anticorpos IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* (prevalência = 10,4 %). Destes, seis apresentavam sintomas clássicos de reações alérgicas IgE-mediadas, quando expostos ao veneno botrópico. A presença de anticorpos IgG específicos também foi observada nos indivíduos com sensibilização alérgica ao veneno. O nível sérico elevado de IgE total ($p=0,034$), o tempo de exposição ocupacional ($p=0,042$), o manuseio de veneno em pó ($p=0,014$) e, possivelmente, a história pessoal de atopia ($p=0,051$), se constituíram em fatores preditores associados à sensibilização. Um componente do veneno de aproximadamente 32 kDa, que apresentou intensa ligação à IgE sérica de dois trabalhadores sensibilizados, pode ser um dos alérgenos principais desse veneno. Os ensaios de inibição do *ImmunoCAP* sugeriram a possibilidade de reações cruzadas ente os venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus durissus*. **CONCLUSÕES:** O veneno de *Bothrops jararaca* pode ser considerado uma importante fonte de alérgenos responsável pelo desenvolvimento de alergia ocupacional em trabalhadores que manuseiam as serpentes e/ou os seus venenos, através de mecanismo IgE-mediado. A prevalência da sensibilização alérgica a este veneno, neste grupo de trabalhadores, é da ordem de 10,4 %, e o nível sérico elevado de IgE total, o tempo de exposição à serpente ou ao seu veneno, o manuseio do veneno em pó e, possivelmente, a história pessoal de atopia, são importantes fatores preditores.

Descritores: 1.Hipersensibilidade; 2.Venenos de serpentes; 3.Imunoglobulina E; 4.*Bothrops*; 5.Doenças profissionais.

SUMMARY

Medeiros CR. *Occupational allergy in herpetologists caused by snake venom*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

BACKGROUND: Allergic sensitization to snake venom was first reported in 1930 and since that time, venoms from the major snake families have been implicated as cause of allergic reactions. The development of hypersensitivity to snake venom has been described after recurrent exposure through bites and, presumably, through repeated inhalations or repeated contact of the venom with skin or mucous membranes. This condition has been observed in amateur and professional snake handlers. However, only limited information is available on the prevalence of the disease among those workers, their determinants and the molecular nature of these allergens. The aim of this study was to evaluate the prevalence and the predictors of snake venom allergy among workers exposed to *Bothrops jararaca* venom and to demonstrate the involvement of IgE-mediated mechanisms in this occupational disease. **METHODS:** Sixty seven workers exposed to *Bothrops jararaca* snakes and/or their venoms in a research institute were assessed for snake venom-related allergy using questionnaires and immunological tests. Presence of snake venom sensitization was determined by quantification of specific IgE and IgG to *Bothrops jararaca* venom using the UniCAP[®] system and ELISA. Allergens were characterized by Western blotting and ImmunoCAP inhibition assays. **RESULTS:** Twelve of the 67 workers experienced symptoms ranging from urticaria, rhinoconjunctivitis and asthma to anaphylaxis. Seven individuals had specific IgE antibodies to *Bothrops jararaca* snake venom (prevalence = 10,4 %). Six of them had typical symptoms of an IgE-mediated allergic reaction when exposed to *Bothrops* venom. Specific IgG antibodies could also be observed in sensitized individuals. High levels of total IgE ($p=0,034$), exposure level ($p=0,042$), handling of dried venom ($p=0,014$) and personal history of atopy ($p=0,051$) could be demonstrated as predictors for sensitization. A component of approximately 32 kDa which strongly bound to specific-IgE may be the major allergen present in this venom. Cross-reactivity between *Bothrops jararaca* snake venom and *Crotalus durissus durissus* snake venom was demonstrated using ImmunoCAP inhibition. **CONCLUSIONS:** *Bothrops jararaca* snake venom can be considered a potential source of allergens which may result in occupational allergy in snake handlers though IgE-mediated mechanisms. The prevalence rate of this condition is 10,4 % among these workers and the handling of dried venom, high levels of total IgE, exposure level and probably personal history of atopy are important predictors.

Descriptors: 1.Hypersensitivity; 2.Snake venoms; 3.Immunoglobulin E; 4.*Bothrops*; 5.Occupational diseases.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia e Doenças Alérgicas

A primeira descrição de uma reação alérgica de que se tem notícia refere-se às inscrições encontradas no túmulo do faraó egípcio Menes, datadas de 2641 a.C., que descrevem a sua morte em decorrência de uma provável reação anafilática após uma picada de “*kheb*”^{*} (Cohen, 1989). Por volta de 375 a.C., Hipócrates descreveu reações urticariformes provocadas pelo leite e pelo queijo e, já na década de 1870, Charles Blackley reconheceu que os sintomas da rinite alérgica, também conhecida como febre do feno, poderiam ser desencadeados pela inalação de polens (Johansson, 2002).

Foi em 1902 que Portier e Richet introduziram o termo “*anafilaxia*” (do grego, *an* = contra, *filaxia* = proteção), ao observarem reações de hipersensibilidade em cães experimentalmente sensibilizados com o veneno de anêmona do mar (Cohen; Zelaya-Quesada, 2002). Todavia, a palavra “*alergia*” foi pela primeira vez empregada em 1906 pelo médico austríaco Clemens von Pirquet, ao observar que alguns pacientes tratados com antitoxina diftérica preparada a partir do soro de cavalos imunizados apresentavam uma série de sintomas não relacionados à doença de base. Von Pirquet, acreditando que tais reações eram devidas a alterações provocadas por substâncias externas no sistema imune, introduziu o termo

^{*} Há controvérsias quanto ao significado do hieróglifo “*kheb*”: para alguns significa “*grande vespa*”, outros interpretam como “*hipopótamo*”!

“*alergia*” para distinguir as respostas imunes prejudiciais ao hospedeiro daquelas que eram advindas do estado fisiológico de imunidade protetora (Von Pirquet, 1963; Kay, 2006). Nascia também o termo “*alérgeno*”, ou seja, a substância responsável pelas reações observadas (Johansson, 2002). Com o decorrer dos anos a palavra “*alergia*” sofreu alterações no seu significado. Hoje, é freqüentemente utilizada como sinônimo de doença IgE-mediada (Kay, 2001).

Em 1919, Ramirez publicou um caso de um paciente portador de anemia que havia se tornado alérgico a cavalos após ter recebido uma transfusão sangüínea de um portador de asma alérgica desencadeada pelo contato com cavalos (Ramirez, 1919). Poucos anos depois, em 1921, Prausnitz e Küstner realizaram o clássico experimento em que mostraram a transferência passiva de sensibilização na pele de indivíduos normais através da injeção de soro de indivíduos alérgicos (Prausnitz; Küstner, 1963; Johansson, 2002; Cohen; Zelaya-Quesada, 2004; Larché et al., 2006). Durante os 50 anos seguintes, variações desse teste permaneceram como métodos de diagnóstico de sensibilização.

Em 1925, Coca e Grove, estudando os fatores sensibilizantes da pele presentes no soro de pacientes com febre do feno, chamaram esses fatores de “*reaginas*” (Zeiss; Pruzansky, 1997). As “*reaginas*” foram identificadas como imunoglobulinas somente na década de 1960, com os trabalhos independentes do casal Ishizaka (Ishizaka; Ishizaka, 1967), nos Estados Unidos, e de Bennich e Johansson, na Suécia (Johansson; Bennich, 1967). O *International Reference Center for Immunoglobulins* da Organização

Mundial da Saúde reconheceu esta nova classe de imunoglobulina, a IgE, em 1968 (Bennich et al., 1968).

O termo “*atopia*” (do grego *atopos*, significando “*fora de lugar*”) é usado para descrever doenças IgE-mediadas. Pessoas com atopia possuem uma predisposição hereditária para produzir anticorpos da classe IgE contra antígenos ambientais comuns, os aeroalérgenos, e apresentar uma ou mais doenças atópicas (i.e., rinite alérgica, asma ou dermatite atópica) (Kay, 2001).

Classicamente, as reações IgE-mediadas envolvem uma fase de sensibilização e desafios subseqüentes com o alérgeno. Durante a fase de sensibilização, o alérgeno, complexado com as moléculas da classe II do MHC, é apresentado às células T *naive* pelas chamadas células apresentadoras de antígenos, representadas principalmente pelas células dendríticas (Figura 1). As células T *naive* se diferenciam em células CD4+, denominadas T auxiliaadoras do tipo 2 (Th₂), que sofrem expansão clonal e produzem citocinas (IL-4 e IL-13). Estas citocinas induzem a produção de IgE alérgeno-específica e a expansão clonal das populações de células B *naive* e B de memória. A IgE ligada às superfícies de células B alérgeno-específicas também facilita a apresentação do antígeno às células T. A ativação das células T, na presença de IL-4, aumenta a diferenciação em células Th₂. Finalmente, as moléculas de IgE alérgeno-específicas irão se ligar às superfícies dos mastócitos e basófilos, através de receptores de alta afinidade para cadeias pesadas ϵ , chamados Fc ϵ RI, constitutivamente expressos nessas células (Abbas; Lichtman, 2005; Larché et al., 2006).

Figura 1. Sensibilização ao alérgeno e desenvolvimento de células B e T específicas de memória. A introdução de um antígeno e sua apresentação às células T *naive* estimula a diferenciação e expansão clonal das células Th₂ e a troca de classe (“switching”) IgE nas células B. Ocorre a expansão clonal das células B de memória, que também podem facilitar a apresentação do antígeno às células T. Adaptado de Larché et al. (2006)

A reação aguda de hipersensibilidade imediata ocorre quando, numa re-exposição, os antígenos se ligam aos anticorpos da classe IgE presentes nas superfícies dos mastócitos e basófilos (Figura 2). A ligação cruzada de dois receptores FcεRI presentes nas superfícies resultará na desgranulação dessas células e na liberação e síntese de múltiplos mediadores, incluindo a histamina, leucotrienos C₄, D₄ e E₄, prostaglandinas, e fator ativador de plaquetas, além de quimiocinas e citocinas (Kay, 2002; Larché et al., 2006;

Bischoff, 2007), responsáveis pelos clássicos sintomas de anafilaxia, rinoconjuntivite e urticária (Kay, 2001).

Figura 2. Reação de hipersensibilidade do tipo I (fase imediata da reação alérgica). A ligação do antígeno aos anticorpos da classe IgE ligados aos receptores FcεRI presentes nas superfícies dos mastócitos e basófilos leva à ativação dessas células e à liberação de mediadores químicos. Adaptado de Larché et al. (2006).

Uma fase tardia da reação alérgica, que ocorre de seis a vinte-e-quatro horas após a exposição ao alérgeno, também é observada. Ela consiste em um acúmulo de leucócitos inflamatórios, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células T CD4+. Dependendo do órgão alvo, a fase de reação tardia pode ser provocada por mastócitos ou células T (Kay, 2002). Migrando para o sítio de exposição ao alérgeno, sob a influência de

quimiocinas e citocinas, as células T alérgeno-específicas sofrem reativação e expansão clonal. A apresentação de antígenos pelas células dendríticas, facilitada pela IgE, também aumenta a ativação das células T. Eosinófilos, mastócitos e basófilos ativados liberam mediadores, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Larché et al., 2006).

Existe um consenso geral de que a inflamação alérgica seja decorrente da ativação das células Th₂ produzindo IL-4 e IL-13, que contribui para a produção de IgE, e IL-5 que promove a inflamação eosinofílica. Entretanto, apesar de existir um considerável corpo de evidências ligando a resposta Th₂ aos alérgenos à sensibilização atópica e a doenças alérgicas, nem todos os indivíduos sensibilizados desenvolvem sintomas (Ahern; Robinson, 2005). Os mecanismos pelos quais a resposta imune a antígenos ambientais não-patogênicos induz à alergia ainda não estão totalmente esclarecidos. A teoria atual enfatiza o papel das células T reguladoras (T_{regs}) no desenvolvimento da alergia.

Diversos subtipos de células T_{regs} já foram descritas, incluindo aquelas com desenvolvimento central, no timo, específicas para os auto-antígenos ou antígenos próprios (conhecidas como células T_{regs} CD25+ naturais) e aquelas que se desenvolvem na periferia com a exposição aos alérgenos ou antígenos exógenos (chamadas de células T_{regs} adaptativas). Estas últimas teriam um papel importante na limitação das respostas imunes aos alérgenos, prevenindo a doença alérgica, através de múltiplos mecanismos supressores, incluindo a secreção de IL-10 e TGF- β . Nos indivíduos alérgicos, as T_{regs} estariam suprimidas ou com algum defeito. A

precisa relação entre esses subtipos de T_{regs} ainda não está muito clara (Lafaille; Lafaille, 2004; Stock et al., 2006).

O diagnóstico de alergia é estabelecido com base numa história clínica criteriosa, considerando os tipos de sintomas e as circunstâncias em que ocorrem, associada à demonstração da presença de anticorpos da classe IgE específicos ao alérgeno responsável pelo desencadeamento dos sintomas (Booth, 1997), através de testes cutâneos ou sorológicos.

Descrito por Wide e colaboradores (1967), o RAST (*RadioAllergoSorbent Test*, *Pharmacia Diagnostics AB*, Uppsala, Suécia) foi um dos primeiros métodos utilizados para a quantificação dos anticorpos IgE específicos no soro de pacientes alérgicos. O alérgeno era covalentemente ligado às partículas da fase sólida e incubado com o soro do paciente. Após um período de incubação, os anticorpos IgE específicos se ligavam às partículas da fase sólida. A fase sólida era então lavada extensivamente, e colocada em contato com anticorpos anti-IgE marcados radioativamente. A contagem da anti-IgE marcada refletia a quantidade de IgE específica ligada ao alérgeno (Zeiss, Pruzansky, 1997). Nos últimos anos, a técnica do RAST sofreu diversas alterações, incluindo mudanças na fase sólida, quantificação em unidades absolutas, uso de anticorpos monoclonais anti-IgE, e a introdução de técnicas de fluorescência em vez da detecção radioativa (Hamilton; Adkinson, 2004; Erwin et al., 2005). No entanto, o termo “RAST” tornou-se de uso coloquial para descrever todo imunoensaio para detecção de IgE específica (Ahlstedt, 2002; Dolen, 2003).

Considerado um ensaio de “última geração” do RAST, o *ImmunoCAP* (*UniCAP® System, Pharmacia Diagnostics AB*, Uppsala, Suécia) é tido como mais sensível, específico, quantitativo e reprodutivo do que o seu antecessor. (Hamilton; Adkinson, 2003; 2004). Trata-se de um teste “in vitro” automatizado capaz de medir a concentração de IgE circulante no soro humano específica para um determinado alérgeno. O princípio da técnica baseia-se no acoplamento covalente do alérgeno de interesse a uma superfície fixa de esponja de celulose que reage com a IgE específica da amostra de soro. Após lavagem, adicionam-se anticorpos anti-IgE marcados enzimaticamente para a formação de complexos com a IgE que permaneceu aderida à superfície fixa. Após nova lavagem, procede-se à incubação do complexo com o substrato. A reação é então interrompida e mede-se a fluorescência no eluato (Figura 3). Quanto mais alto o valor da resposta, maior a presença de IgE específica na amostra. Para avaliar os resultados do ensaio, a resposta da amostra é convertida em concentrações (kU/L) através da utilização de uma curva de calibração.

Figura 3. Método *ImmunoCAP*. (1) o alérgeno de interesse acoplado ao *ImmunoCAP* reage com a IgE específica do soro do paciente; (2) depois da lavagem da IgE não específica, são adicionados anticorpos marcados com enzima para formar um complexo; (3) após a incubação, a anti-IgE marcada com enzima é lavada e o complexo então é incubado com o agente de desenvolvimento; (4) a reação é interrompida e determina-se a fluorescência no eluato. Quanto maior a fluorescência, mais IgE específica há no soro do paciente. Adaptado de Phadia AB (2006).

1.2 Alergia ocupacional

Em 1700, era publicada em Modena, na Itália, a primeira edição do livro “*De Morbis Artificum Diatriba*” – as doenças dos trabalhadores – escrito pelo médico Bernardino Ramazzini (Mendes, 1995). Nesta obra, Ramazzini fez a primeira descrição científica de asma ocupacional, a doença dos artesões, descrevendo os sintomas de tosse e dispnéia que acometiam os padeiros, moleiros e trabalhadores em armazéns de cereais, e que julgava serem decorrentes da exposição ao trigo. Conhecida hoje como “asma dos padeiros”, esta doença só teve o seu caráter alérgico reconhecido após 1909, quando foi observado pela primeira vez um teste alérgico cutâneo positivo ao extrato de trigo num padeiro que tinha asma (Houba et al., 1998). Desde então, diversos outros agentes foram reconhecidos como causadores de doenças alérgicas ocupacionais.

A alergia ocupacional é resultante da hipersensibilidade às substâncias encontradas no ambiente de trabalho. Nos dias atuais, ela representa um problema de extensão mundial, com tendência a se agravar em virtude da industrialização e do surgimento de novas substâncias. Mais de 250 agentes são reconhecidos como causadores de alergia ocupacional (Sarti, 1997).

Um grande número de agentes biológicos de alto peso molecular, predominantemente proteínas derivadas de animais, plantas, alimentos e enzimas, são capazes de desencadear alergia ocupacional por mecanismos mediados por anticorpos da classe IgE específicos (Bardana, 2003). Agentes

de baixo peso molecular, como o isocianato, os anidridos ácidos, e o ácido plicático, também são capazes de induzir alergia ocupacional, embora por mecanismos patogênicos ainda não totalmente esclarecidos (Bardana, 2003). Sabe-se, no entanto, que agentes de baixo peso molecular podem se tornar excelentes haptenos ao se combinarem com proteínas teciduais, como a albumina sérica, e funcionar como potentes imunógenos (Slavin, 2005). Seja qual for o agente causador da alergia ocupacional mediada por mecanismo IgE-dependente, a apresentação clínica não é diferente das alergias causadas pelos alérgenos inalantes comuns, encontrados no ambiente em geral.

A verdadeira prevalência das doenças alérgicas ocupacionais não é conhecida. Estima-se que a asma ocupacional seja responsável por 9 a 15% dos casos de asma entre adultos nos países industrializados (Mapp et al., 2005; Jeebhay; Quirce, 2007). Por outro lado, alguns estudos mostram a prevalência de 5 % até 65 % para as rinites ocupacionais (Walusiak, 2006). As variações observadas nesses dados epidemiológicos são decorrentes, em parte, dos diferentes critérios e técnicas diagnósticas empregadas, da área geográfica e do tipo de ocupação considerada (Walusiak, 2006; Gautrin et al., 2006). A possibilidade de omissão do trabalhador em revelar a doença devido ao receio de perder o emprego (Slavin, 2005; Bardana, 2003), e a de trabalhadores abandonarem o trabalho devido ao desenvolvimento dos sintomas (Elliott et al., 2005), são outros fatores que também podem ter influenciado esses dados. No entanto, existe o consenso de que as doenças

alérgicas ocupacionais sejam relativamente comuns e de que a sua prevalência esteja aumentando (Slavin, 2005).

O diagnóstico da alergia ocupacional depende inicialmente da associação dos sintomas alérgicos com a exposição ao ambiente de trabalho (Slavin, 2005) e da demonstração do envolvimento de um mecanismo alérgico IgE-mediado através dos testes alérgicos cutâneos ou da dosagem de IgE específica para o alérgeno, quando disponíveis. No entanto, a história de associação temporal entre os sintomas e a exposição ocupacional não se constitui em condição segura para o diagnóstico da alergia ocupacional, pois doenças alérgicas como a asma e a rinite alérgica são freqüentes, e a exposição concomitante a agentes potencialmente causadores de doença ocupacional pode se dar casualmente (Sarti, 1997). A exposição do trabalhador ao ambiente ocupacional, monitorizado por medidas de pico expiratório, e testes de provocação com o agente específico, são estratégias que podem ser empregadas para o estabelecimento da causa ocupacional (Slavin, 2005).

Estudos epidemiológicos têm sido realizados não apenas para se determinar os fatores de riscos envolvidos no desenvolvimento das alergias ocupacionais, como o nível de exposição a um agente sensibilizante específico do ambiente de trabalho, atopia, tabagismo, sexo e predisposição genética (Houba et al., 1998; Bardana, 2003; Mapp et al., 2005; Mapp, 2005; Walusiak, 2006), assim como para validação de modelos diagnósticos baseados em questionários, objetivando discriminar trabalhadores com

maior ou menor risco de sensibilização aos alérgenos ocupacionais (Suarthana et al., 2005; Meijer, et al., 2004).

A atopia tem sido associada, na maioria dos estudos, com o maior risco de desenvolvimento de sensibilização e de asma ocupacionais em trabalhadores expostos a agentes de alto peso molecular que são capazes de induzir a produção de IgE específica, como nos padeiros expostos aos alérgenos presentes no trigo (Houba et al., 1998; Mapp et al., 2005) e nos trabalhadores expostos aos animais de laboratório (Heederik et al., 1999; Meijer et al., 2004; Mapp et al., 2005).

Por outro lado, diversos estudos têm relacionado o risco de desenvolvimento de sensibilização aos diversos agentes ocupacionais com os níveis elevados de exposição no ambiente de trabalho (Nieuwenhuijsen et al., 1999; Mapp, 2005; Mapp et al., 2005). No entanto, o nível de exposição parece ter um papel diferente entre indivíduos atópicos e não atópicos. Isto foi verificado em trabalhadores expostos aos alérgenos presentes na urina do rato. Realmente, foi verificado nesse grupo de trabalhadores que a sensibilização era mais freqüente naqueles submetidos aos maiores níveis de exposição, mas os indivíduos atópicos tinham risco de sensibilização claramente elevado com baixa exposição, e este risco não aumentava com o aumento da exposição. Para os indivíduos não atópicos, o aumento do risco só era observado com o aumento da exposição (Heederik et al., 1999; Nieuwenhuijsen et al., 2003).

Ainda em relação aos níveis de exposição aos agentes sensibilizantes ocupacionais, outras questões permanecem em aberto. Em baixas

concentrações, alguns trabalhos sugerem que os picos de exposições poderiam ser mais relevantes do que a dose acumulativa de exposição, enquanto outros sugerem que a exposição contínua é mais importante do que as exposições agudas para o desenvolvimento da sensibilização (Mapp et al., 2005).

Outro fator de risco para o desenvolvimento de alergias ocupacionais citado na literatura é o tabagismo, porém os estudos têm mostrado resultados conflitantes quanto ao seu papel no desenvolvimento da doença. Em asma alérgica ocupacional parece que o tabagismo está associado à sua maior gravidade (Mapp et al., 2005).

Uma perspectiva futura diz respeito à influência de fatores genéticos no desenvolvimento das alergias ocupacionais. Alguns trabalhos tentaram identificar os marcadores genéticos na asma ocupacional, mas novos estudos serão necessários para o entendimento de suas interações com o meio ambiente (Mapp, 2005).

1.3 Serpentes peçonhentas e seus venenos

Com exceção dos pássaros, animais venenosos e peçonhentos são encontrados praticamente em todas as classes do reino animal. Eles estão distribuídos em todos os mares e oceanos, e em todos os continentes do mundo. Embora não se saiba o número exato, existem aproximadamente 1500 espécies de animais venenosos ou peçonhentos marinhos, incontáveis artrópodes, e cerca de 400 espécies de serpentes consideradas perigosas para o homem (Russel, 2001).

O termo “*animal peçonhento*” é usualmente aplicado para aqueles que são capazes de produzir a peçonha num grupo de células ou numa glândula altamente desenvolvida e injetar o veneno através de uma picada ou ferroadada. Já o “*animal venenoso*” não possui um mecanismo, como dentes, espinhos ou ferrões, capaz de injetar o veneno. O envenenamento ocorre geralmente através da sua ingestão (Russel, 2001; Mebs, 2002). No entanto, os termos “*peçonha*” e “*veneno*” são usados como sinônimos na literatura. Oswaldo Vital Brazil (1982) propôs o uso do termo “*veneno*” devido a sua origem etimológica e por ter significado abrangente.

O veneno é ativamente aplicado pelos animais peçonhentos para aquisição da presa, podendo incluir a sua pré-digestão, assim como para a defesa contra predadores ou agressores. Raramente são substâncias “puras” e, na grande maioria dos casos, correspondem à mistura de numerosos componentes (Mebs, 2002).

Tendo surgido há mais de 135 milhões de anos, quando divergiram dos lagartos (Rage, 1994), as serpentes são classificadas atualmente como pertencentes à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Ofídia, totalizando mais de 3500 espécies. Destas, cerca de 15 % são consideradas peçonhentas e de importância médica (Russel, 2001; Gold et al., 2002), pertencendo às famílias Colubridae, Atractaspidae, Hydrophiidae, Elapidae e Viperidae (Warrell, 1989; 1993). As serpentes consideradas peçonhentas no Brasil estão distribuídas nas famílias Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* (corais), e Viperidae, representada pelos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus) (Figura 4).

Estima-se que no mundo a incidência dos acidentes provocados pelas serpentes peçonhentas possa exceder a cinco milhões por ano, com uma mortalidade associada de 125.000 óbitos/ano. Cerca de 2,5 milhões de pessoas são envenenadas a cada ano, com a metade necessitando de cuidados médicos, e, provavelmente, mais de 100.000 indivíduos evoluindo com seqüelas significativas (Chippaux, 1998). Estes acidentes são considerados um problema de saúde pública, sobretudo nos países tropicais (WHO, 1981), e acometem principalmente trabalhadores rurais, na maioria das vezes jovens e do sexo masculino (Gutiérrez et al., 2006). Segundo dados coletados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, referentes ao ano de 2006, foram notificados cerca de 27.310 envenenamentos ofídicos no Brasil. A distribuição desses acidentes por gênero de serpente foi: *Bothrops* (68,0 %), *Crotalus* (6,7 %), *Lachesis* (2,5

%) e *Micrurus* (0,6%) e nos demais os gêneros das serpentes não foram identificados ou não foram mencionados.

Figura 4. Representantes dos quatros gêneros de serpentes peçonhentas do Brasil: (A) *Bothrops* (jararacas); (B) *Crotalus* (cascavéis); (C) *Lachesis* (surucucus); (D) *Micrurus* (corais). Fotos: Aníbal Rafael Melgarejo

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela vasta maioria dos acidentes ofídicos na América Latina (Fan; Cardoso, 1995; Gutiérrez, 1995). No Brasil, correspondem a mais de 20 espécies catalogadas, distribuídas em todo território nacional (Melgarejo, 2003). A espécie *Bothrops jararaca* (Figura 5), em particular, está associada freqüentemente com os envenenamentos humanos na região sudeste do

Brasil (Cardoso et al., 1993; Fan; Cardoso, 1995). O quadro clínico decorrente do envenenamento provocado pela picada dessas serpentes é caracterizado por alterações no local da picada, que incluem sangramentos, formação de edema, dor e, eventualmente, bolhas. Ocasionalmente pode ocorrer a síndrome compartimental. Os sinais de envenenamento sistêmico incluem hemorragia gengival, hematúria microscópica, equimoses e coagulopatia de consumo. Raramente se observa hematúria macroscópica, epistaxis, hemoptise, metrorragia e hematêmese. A morte pode ocorrer devido à insuficiência renal, choque, sangramento grave e complicações septicêmicas (França et al., 2003).

Figura 5. *Bothrops jararaca*. Foto: Marcelo Duarte

Os venenos ofídicos são misturas complexas, contendo principalmente proteínas, muitas das quais com atividades enzimáticas. Em muitas espécies, os componentes de maior atividade do veneno são

peptídeos ou polipeptídeos. As proteínas e os peptídeos correspondem à cerca de 90 a 95 % do peso seco do veneno. Além disso, os venenos ofídicos contêm cátions inorgânicos como sódio, cálcio, potássio, magnésio, e pequenas quantidades de metais: zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel. Alguns venenos ofídicos também contêm carboidratos (glicoproteínas), lipídios e aminas biogênicas, enquanto outros contêm aminoácidos livres (Bieber, 1979; Russell, 2001). Diversos fatores influenciam as composições dos venenos das serpentes: a espécie, a idade, o sexo, o período sazonal, a dieta, além da variação ontogênica (Chippaux et al., 1991; Daltry et al., 1996; Monteiro et al., 1998; Moura-da-Silva et al., 2003; Saldarriaga et al., 2003; Serrano et al., 2005; Menezes et al., 2006). Estas variabilidades dos venenos podem ocorrer interfamília, intergênero, interespecie, intersubespécie e intraespécies (Chippaux et al., 1991).

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, a exemplo de outros venenos ofídicos, corresponde a uma mistura complexa de vários componentes representados por toxinas com ação fosfolipásica A₂, serinoproteases, metaloproteinases, toxinas que agem na agregação plaquetária, peptídeos potencializadores de bradicinina, e fatores de crescimento (Farsky et al., 2005). Estes componentes têm um largo espectro de ações que resumidamente incluem a ativação da cascata da coagulação sangüínea e plaquetas (Nahas et al., 1979; Zingali et al., 1990; Kamiguti; Sano-Martins, 1995), levando ao estado de incoagulabilidade sangüínea e níveis reduzidos de fibrinogênio, a indução de hemorragia local e sistêmica

(Assakura et al., 1986; Kamiguti et al., 1991; Kamiguti, 2005), e a indução de edema e inflamação (Cury et al., 1994; Farsky et al., 1997).

1.4 Alergia aos venenos ofídicos

Os primeiros autores que fizeram referência à hipersensibilidade aos venenos ofídicos em seres humanos foram Zozaya e Stadelman (1930) que descreveram o caso de um homem que, após ter trabalhado oito anos com venenos, secos e líquidos, ter sido picado acidentalmente por uma serpente *Agkistrodon sp* e ter recebido, para fins experimentais, diversas injeções intradérmicas de vários venenos (*Crotalus sp*, *Agkistrodon sp*, *Bothrops sp* e *Naja sp*), passou a apresentar sintomas sugestivos de rinite alérgica, com violentos espirros e coriza, ao manipular veneno seco. A sensibilidade deste paciente ao veneno de *Crotalus atrox* foi demonstrada através de testes intradérmicos e pela prova de Prausnitz-Küstner (PK). Nesse mesmo artigo, os autores citaram um caso descrito por Ludy, em 1926, de um paciente que havia sido picado por uma serpente cascavel (*Crotalus sp*) e que apresentava inchaços e descoramentos recorrentes no local da picada, nas primaveras ou quando visitava o Zoológico (Ludy, 1926). Enfatizaram, no entanto, que embora este paciente apresentasse reação alérgica ao “extrato” de cascavel, seu quadro clínico era atribuído às “emanações” da serpente e não diretamente ao seu veneno.

Anteriormente ao relato de Zozaya e Stadelman, Weiss (1924) havia observado anafilaxia em cobaias sensibilizadas experimentalmente com venenos de serpentes sul-americanas.

Em 1933, Peck observou o desenvolvimento de sensibilização cutânea em pacientes submetidos a repetidas injeções intradérmicas de

veneno da serpente *Ancistrodon piscivorus* e Lounsberry, em 1934, publicou um caso de um paciente masculino de 38 anos de idade que, ao ser picado pela segunda vez por uma serpente cascavel, apresentou um quadro urticariforme minutos após o acidente.

O desenvolvimento de hipersensibilidade após o tratamento com injeções de veneno de cobra também foi observado por Swinny (1941), em um paciente que recebeu injeções do veneno para tratamento de uma neurite braquial. Após a quinta injeção, o paciente desenvolveu um quadro alérgico cutâneo, caracterizado por um extenso processo inflamatório no local da aplicação da injeção. Os testes alérgicos cutâneos e o teste de transferência passiva de Prausnitz-Küstner (PK) foram positivos. O autor concluiu que os pacientes submetidos aos tratamentos com venenos ofídicos poderiam desenvolver hipersensibilidade ao veneno, e sugeriu a realização de testes alérgicos antes do curso das injeções.

No Brasil, casos de hipersensibilidade aos venenos ofídicos foram observados pela primeira vez por Barros, em 1936, em dois pesquisadores do Instituto Ezequiel Dias, Minas Gerais, que passaram a apresentar quadros alérgicos respiratórios quando em contato com o veneno seco. O autor ressaltou o fato de um dos pacientes nunca ter sido picado por serpente e a presença de sintomas asmáticos, até então não observados nos casos descritos na literatura. Nesse mesmo trabalho, o autor ainda cita que uma desenhista, que trabalhava em mesa colocada junto àquela em que se pesava o veneno, tinha o seu trabalho perturbado por salva de espirros e rinorréia abundante, quanto do início da pesagem do veneno.

Ainda no Brasil, Mendes (1950, 1952) descreveu um caso de uma funcionária de um laboratório de produção de hemo-coagulantes que, após dois anos de exposição ocupacional aos venenos botrópico e crotálico, passou a apresentar sintomas de rinoconjuntivite e asma, desencadeados pelo contato ou inalação desses venenos; os testes cutâneos e a prova de PK foram positivos, demonstrando a hipersensibilidade alérgica aos venenos. Este mesmo autor, em 1960, estudou seis pacientes que trabalhavam com venenos em laboratórios e que apresentavam sintomas alérgicos oculares e respiratórios com o contato ou inalação dos venenos; foram realizados testes alérgicos cutâneos com venenos de diferentes espécies de serpentes e alguns pacientes tiveram testes cutâneos e provas de PK positivas para venenos que não tinham tido contato prévio, levantando-se a possibilidade de haver alérgenos comuns entre os venenos de diferentes espécies de serpentes, em particular entre os venenos botrópico e crotálico.

Outros autores também observaram o desenvolvimento de quadros alérgicos aos venenos ofídicos em decorrência da exposição ocupacional, quer seja através de picadas prévias ou pelo contato direto aos venenos por via inalatória: Stanic, em 1956, observou que vários membros do *Central Institute of Hygiene*, em Zagreb, Yugoslávia, que trabalhavam com veneno de *Vipera ammodytes*, passaram a apresentar diversos graus de sensibilidade ao veneno; Parrish e Pollard, em 1959, estudaram os efeitos de repetidas picadas em 14 profissionais que manuseavam serpentes (biólogos e herpetologistas), e observaram que quatro apresentaram testes

alérgicos cutâneos positivos para os venenos das serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Agkistrodon*. Estes últimos autores observaram um fato importante: dois indivíduos que apresentaram hipersensibilidade ao veneno de *Crotalus* só tinham sido picados anteriormente por serpentes do gênero *Agkistrodon*, levantando a possibilidade da presença de proteínas antigênicas similares nos dois tipos de venenos.

Ellis e Smith, em 1965, apresentaram um caso de um profissional de 35 anos de idade que manuseava serpentes e que apresentou quadro de anafilaxia após ter sido picado por uma serpente *Crotalus adamanteus*. O episódio anafilático ocorreu três semanas após ter sido examinado devido à história de sintomas de rinoconjuntivite ao manusear veneno em pó, ocasião em que foram detectados testes alérgicos cutâneos e conjuntival positivos para o veneno. Neste artigo, os autores chamaram à atenção da possibilidade dos sintomas anafiláticos serem confundidos com os do envenenamento. Também levantaram a questão de um tratamento de dessensibilização, da forma que é realizado para o tratamento de hipersensibilidade à picada de inseto.

Em 1973, Kelly e Patterson demonstraram a presença de IgE específica, através de radioimunoensaio, para o veneno de cascavel (serpente do gênero *Crotalus*) no soro de um estudante que havia trabalhado com veneno em pó por cinco anos (cinco minutos a cada três meses), e que apresentava sintomas alérgicos respiratórios desencadeados pelo contato com os mesmos.

Em 1985, Schmutz e Stahel estudaram 74 acidentes ofídicos ocorridos no período de 1967 a 1984 na Suíça. Eles observaram reações alérgicas, incluindo urticária, dispnéia, angioedema e hipotensão, em sete casos. Esses pacientes haviam sido picados pela segunda, terceira ou quarta vez, pelas serpentes dos gêneros *Vipera*, *Agkistrodon*, *Crotalus* e *Sistrurus*. Os autores fizeram uma interessante observação de que estas reações pudessem estar interferindo na mortalidade atribuída aos acidentes ofídicos nas regiões endêmicas.

Wadee e Rabson, em 1987, demonstraram a presença de IgE específica para o veneno de *Hemachatus haemachatus*, através de ELISA, no soro de um paciente que, após vários anos em contato com serpentes, passou a apresentar urticária e sintomas alérgicos respiratórios quando em contato com o referido veneno; através de *Western blotting*, demonstraram a associação dessa hipersensibilidade com um componente de 66 kDa do veneno; também observaram a presença de IgG específica no soro do paciente para outros três venenos de serpentes que ele havia entrado em contato, porém sem apresentar sintomas alérgicos.

Em 1990, Hogan e Dire descreveram um caso de um paciente de 22 anos de idade que desenvolveu choque anafilático minutos após ter sido picado por uma serpente cascavel (*Crotalus sp*). Além das medidas convencionais para o tratamento da anafilaxia, que incluíram o uso de adrenalina, corticóides e antihistamínicos, o paciente recebeu soro antiveneno. Nessa mesma época, Kirkland (1990), apresentou um caso de um pesquisador que já havia sofrido seis picadas de serpentes, três delas

provocadas pela serpente australiana denominada “tigre” (*Notechis ater*), sem nunca ter apresentado envenenamento, e que apresentou um quadro anafilático ao sofrer nova picada da serpente. O paciente foi tratado apenas com hidrocortisona e prometazina, sem a necessidade de soro antiveneno, e recebeu alta com orientação do uso de adrenalina subcutânea auto-injetável caso necessário.

Em 1993, Kopp e colaboradores demonstraram a presença de IgE específica ao veneno de *Vipera aspis* no soro de um biólogo que havia sido picado duas vezes pela serpente, através do método da quimioluminescência, utilizando anti-IgE marcada com biotina e o conjugado avidina-peroxidase. O paciente havia apresentado quadro de angioedema, urticária e chiado no peito, ao ser picado pela segunda vez. O teste alérgico de punção (“*prick-test*”) realizado com o veneno foi positivo. Os autores enfatizaram a dificuldade de se distinguir os sintomas alérgicos dos do envenenamento, e recomendaram a mudança de profissão, uma vez que a alta toxicidade do veneno excluía a possibilidade do tratamento através da imunoterapia.

Ryan e Caravati publicaram, em 1994, o caso de um herpetologista que apresentou quadro anafilático, em duas ocasiões distintas, ao ser picado pelas serpentes *Crotalus catalinensis* e *Crotalus viridis viridis*, respectivamente. Esses autores concluíram que este caso demonstra a presença de antígenos similares entre os venenos de diferentes espécies de serpentes cascavéis. Informaram ainda que o paciente também desenvolveu sintomas alérgicos desencadeados pela inalação de veneno em pó.

Em 1995, Alonso e colaboradores detectaram a presença de IgE específica ao veneno de *Bothrops alternata*, através do RAST (Radioimmunosorbent test), em seis pacientes que apresentaram quadro alérgico urticariforme ao serem picados pela segunda vez por serpentes do gênero *Bothrops*, na região norte da Argentina. A especificidade do teste foi comprovada através de ensaio de inibição do RAST com o veneno de *Bothrops alternata*. Estes autores também observaram uma inibição parcial do RAST com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel).

Em 2000, Reimers e colaboradores estudaram oito pacientes com histórias de reações alérgicas sistêmicas pós-picadas de serpentes do gênero *Vipera*. Utilizando o RAST e testes alérgicos cutâneos, demonstraram a presença de IgE específica ao veneno em sete desses pacientes. Através do ensaio de inibição do RAST com os soros de quatro pacientes que tinham altos títulos de IgE tanto para o veneno de *Vipera*, como para o de himenópteros, em um deles verificaram reação cruzada parcial.

Brooks e Graeme descreveram em 2004 o caso de um paciente de 26 anos que apresentou anafilaxia após ter sido picado pela primeira vez por uma serpente *Crotalus cerastes*, no estado do Arizona, Estados Unidos. Os autores levantaram a hipótese de que a sensibilização teria ocorrido por via inalatória, cutânea ou gastro-intestinal, uma vez que o paciente costumava alimentar-se de serpentes.

Em 2005, Prescott e Potter descreveram o caso de um herpetologista da África do Sul (do *Johannesburg Snake Park*) que, após 20 anos de

exercício profissional, começou a apresentar urticária e sintomas asmáticos graves ao manusear a serpente *Hemachatus haemachatus*, conhecida como serpente cuspeira pela capacidade de espirrar veneno até a um metro de distância. O paciente já havia sido picado cinco vezes por serpentes de outras espécies. Através de ensaios aplicando *Western blotting* e ELISA, demonstraram no soro do paciente a presença de IgE específica ao veneno de *Hemachatus haemachatus* e aos venenos de outras oito serpentes de espécies não relacionadas com esta. Através do ensaio de inibição do ELISA, demonstraram a reatividade cruzada entre esses venenos. Os autores concluíram que a inalação do aerossol de veneno disparado pelas serpentes cuspeiras pode ser uma fonte de alérgenos capaz de induzir anafilaxia em exposições subseqüentes.

Em 2006, Frangides e colaboradores descreveram um caso de um paciente de 60 anos de idade que desenvolveu um quadro alérgico caracterizado por prurido generalizado, eritema cutâneo e desconforto respiratório, após ter sido picado por uma serpente *Vipera ammodytes*. O paciente evoluiu com a síndrome de Kounis, ou seja, a ocorrência de uma síndrome coronariana aguda associada com quadro alérgico anafilático.

Fica claro, por tudo que foi exposto acima, que embora a alergia aos venenos ofídicos seja reconhecida há mais de 75 anos como uma doença acometendo principalmente os profissionais que manuseiam as serpentes peçonhentas ou os seus venenos, os poucos trabalhos encontrados na literatura, em sua maioria, se limitam às descrições anedóticas de casos

clínicos, pouco se conhecendo sobre a prevalência e os determinantes desta doença ocupacional entre esses trabalhadores.

1.5 O trabalho dos herpetologistas do Instituto Butantan

O Instituto Butantan, um dos dezesseis institutos de pesquisa do Governo do Estado de São Paulo, é um dos principais centros produtores de vacina e soros do Brasil. É responsável pela produção de cerca de 80% dos soros utilizados no tratamento de pacientes vítimas de acidentes por animais peçonhentos (serpentes, escorpiões e aranhas) no Brasil. Sua missão é desenvolver estudos e pesquisa básica na área de Biologia e de Biomedicina, relacionadas direta ou indiretamente com a saúde pública. O Instituto Butantan congrega diversos Laboratórios de Pesquisa, o Hospital Vital Brazil, Unidades de Produção de Vacinas e Biofármacos, Museus e Biblioteca (Instituto Butantan, 2006).

Vital Brazil, na introdução do seu livro publicado em 1911, intitulado *"A defesa contra o ofidismo"*, já havia definido o papel a ser desempenhado pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan:

"É o estudo criterioso da biologia das serpentes que nos deve ensinar os melhores meios de evitar os perigosos acidentes, dando-nos conhecimentos sobre a distinção entre espécies venenosas e não-venenosas, entre espécies nocivas, indiferentes e úteis, sobre o habitat das diferentes espécies, seu gênero de alimentação. Quando os nossos conhecimentos sobre a biologia das serpentes estiverem adiantados, maior será a nossa vitória quanto a defesa profilática" (Vital Brazil, 1911).

Estes preceitos têm sempre guiado e ainda estão guiando as linhas de pesquisas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

As pesquisas desenvolvidas neste laboratório centram-se em história natural, sistemática, evolução e propriedades dos venenos de serpentes, principalmente de espécies brasileiras. O Laboratório de Herpetologia também desenvolve pesquisas na área de reprodução e manutenção de serpentes em cativeiro, incluindo estudos nas áreas de patologia, hematologia e parasitologia. Além do desenvolvimento de pesquisas, o laboratório ainda é responsável pela recepção de animais (serpentes) e manutenção da *Coleção Herpetológica Alphonse Richard Hoge*, hoje contanto com mais de 73.000 espécimes representantes dos cinco continentes zoogeográficos e de todas as espécies brasileiras descritas até o momento (Instituto Butantan, 2006).

O Laboratório de Herpetologia conta com funcionários divididos entre pesquisadores, assistentes técnicos (biólogos e veterinários) e auxiliares de apoio técnico, além de estagiários (estudantes de biologia e veterinária) que acompanham o serviço. Sua principal unidade é o biotério de serpentes, onde os animais são mantidos em cativeiro e é realizada a produção de venenos.

A manutenção das serpentes em cativeiro envolve riscos ocupacionais decorrentes da manipulação dos animais. No cativeiro, as serpentes são mantidas em caixas com telas que são abertas para higienização (limpeza para retirada de fezes e urina) (Figura 6), alimentação das serpentes (Figura 7) e retirada dos animais para pesquisa ou extração de veneno. Nesse momento há o risco da picada da serpente e do contato com o veneno em mucosas (a serpente pode dar um bote na tela da caixa

ou no gancho utilizado para manusear o animal, e o veneno espirrar para fora, atingindo o rosto do trabalhador, inclusive os olhos).

No processo de extração do veneno (Figura 8), as serpentes são retiradas das caixas, colocadas em recipientes contendo dióxido de carbono (que, por narcose, as deixam temporariamente inativas), e uma a uma são recolhidas pelo técnico, que as segura pela cabeça e introduz suas presas num plástico que recobre um recipiente de vidro envolto em gelo. Com compressões manuais das glândulas de veneno, localizadas na região posterior da cabeça do animal, o veneno flui gota a gota para o interior do recipiente.

Todo o veneno coletado é centrifugado para retirada de impurezas e congelado em freezer, para futura liofilização. Nestas várias etapas do processamento, está presente o risco de contato com o veneno.

Figura 6. Seqüência de imagens mostrando a atividade de troca de caixa de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Figura 7. Seqüência de imagens mostrando a atividade de alimentação de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Figura 8. Sequência de imagens mostrando a atividade de extração de veneno de serpente no interior da sala de cativeiro do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Até por volta de 1992 a liofilização de veneno era realizada utilizando-se um dessecador a vácuo (Figura 9-A). Nesse processo, o veneno era depositado em placas de Petri e submetido à secagem a vácuo. Uma vez seco, o veneno era manualmente raspado e colocado em frascos. Como as capelas utilizadas eram desprovidas de exaustores e os equipamentos de proteção individuais (máscaras) não ofereciam proteção segura para evitar a inalação do veneno, era patente o risco de contato do trabalhador com o veneno em pó.

Figura 9. (A) Dessecador a vácuo. As placas de Petri contendo veneno eram colocadas no seu interior para secagem e posterior raspagem manual; (B) Liofilizadora automática. Não são necessários a raspagem e o envase manual do veneno

Atualmente, a liofilização é realizada através de uma liofilizadora automática (Figura 9-B), não havendo mais a necessidade de se raspar o veneno das placas ou de envasá-lo manualmente. No entanto, o risco de contato com o veneno em pó ainda está presente durante a pesagem do veneno.

Embora exista uma cabine equipada com um sistema de fluxo de ar laminar para a pesagem do veneno (Figura 10) no Laboratório de Herpetologia, o exaustor freqüentemente não é acionado porque cria uma turbulência no ar que espalha e dificulta a pesagem do veneno.

Figura 10. Cabine com fluxo de ar laminar utilizada para a pesagem de veneno liofilizado no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O fluxo de ar não é utilizado para não provocar ondas de turbulência que espalham o veneno

A Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, subordinada à Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan, tem como função principal a produção de soros antiofídicos, antitóxicos e antivirais (Instituto Butantan, 2006). Nesta seção, o veneno ofídico é preparado para ser utilizado na imunização de cavalos para a produção dos soros antivenenos. O principal risco ocupacional envolvido nesta atividade é o contato direto com o veneno ofídico liofilizado, que deve ser pesado, diluído e processado. Nesta unidade, no entanto, é utilizada uma câmara de

exaustão especial com fluxos de ar adequados que não provocam turbulências e permitem o manuseio seguro do veneno liofilizado, protegendo o trabalhador da sua inalação (Figura 11).

Figura 11. Câmara de exaustão utilizada na Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Butantan. O sistema de exaustão de ar não espalha o veneno e protege o operador

O Museu Biológico do Instituto Butantan, organizado em 1912, é um dos mais importantes do mundo dedicado a serpentes e um dos únicos a exibir animais vivos. Possui exemplares brasileiros e de outras partes do mundo, expostos em biodioramas que reproduzem os seus *habitats* naturais (Figura 12). Além de serpentes, expõe outros animais de interesse do Instituto, como iguanas, lagartos, sapos, aranhas e escorpiões. Já o Serpentário, um dos marcos do Instituto Butantan, foi construído por volta de 1914 e destinava-se a abrigar animais enviados à Instituição. Hoje, como a maioria dos animais encontra-se alojada em salas climatizadas e com

cuidados mais adequados à finalidade de produção de venenos, é mantido como atração para o público visitante (Instituto Butantan, 2006) (Figura 13).

Figura 12. Interior do Museu Biológico do Instituto Butantan. As serpentes são expostas vivas em biodioramas que reproduzem os seus *habitats* naturais.

Figura 13. Serpentário do Instituto Butantan. As serpentes vivas são expostas como atração para os visitantes.

Os funcionários do Museu Biológico, distribuídos entre pesquisadores, assistentes técnicos (biólogos e veterinários), monitores, auxiliares de apoio,

e estagiários, são responsáveis pela manutenção das serpentes mantidas em exposição, cuidando da alimentação dos animais e da limpeza dos cativeiros, tanto do próprio Museu, como do Serpentário. Desta forma, também estão expostos aos riscos decorrentes da manipulação desses animais e eventuais contatos com os seus venenos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- 1) Avaliar a prevalência da sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca* entre trabalhadores do Instituto Butantan, expostos à serpente ou ao seu veneno;
- 2) Apontar os possíveis fatores preditores associados ao seu desenvolvimento;
- 3) Demonstrar o envolvimento de um mecanismo IgE-mediado neste tipo de doença ocupacional.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo e população

Um estudo do tipo observacional transversal foi realizado a partir de uma amostra de 67 de um total de 70 trabalhadores (pesquisadores, técnicos, estagiários e pessoal de apoio) do Museu Biológico, do Laboratório de Herpetologia e da Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes da Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Butantan, durante o mês de novembro de 2005.

O critério de inclusão dos trabalhadores no grupo de estudo foi unicamente a exposição aos venenos ou às serpentes do gênero *Bothrops*. As seguintes razões determinaram a escolha desse gênero de serpente: a importância epidemiológica dos acidentes botrópicos no Brasil e o freqüente manuseio desses animais e de seus venenos pelos profissionais do Instituto Butantan.

Todos os trabalhadores que participaram do estudo eram adultos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). O projeto obteve prévia aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 1039/03 (Anexo II).

3.2 Questionário

Todos os 67 trabalhadores foram submetidos a um questionário (Anexo III), aplicado por médico alergologista, contendo questões sobre a história pessoal de alergia, história ocupacional (e.g., tipo de trabalho, tempo de atividade na função, tarefas que envolviam a exposição direta às serpentes ou aos seus venenos), acidentes sofridos com picadas de serpentes ou com o contato de veneno em mucosas, e sintomas alérgicos relacionados ao trabalho. Sintomas alérgicos relacionados ao trabalho foram definidos como sintomas cutâneos ou respiratórios que ocorriam durante o manuseio das serpentes ou dos seus venenos (líquido ou em pó) e desapareciam nos finais-de-semana ou nos períodos de férias (i.e., quando não expostos às serpentes).

A história pessoal de alergia (e.g., asma, rinoconjuntivite alérgica e dermatite atópica) foi considerada positiva quando presente algum dos sintomas alérgicos clássicos de dispnéia, chiado no peito, coriza, espirros, lacrimejamento, prurido ocular ou prurido cutâneo, relacionados à exposição aos alérgenos comuns como poeira, animais domésticos, mofo ou polens. Trabalhadores foram considerados como tendo sintomas alérgicos relacionados ao trabalho quando responderam positivamente à questão: “Você tem sintomas de alergia (e.g., asma, rinite, conjuntivite ou urticária) quando em contato com a serpente ou o seu veneno, durante o seu trabalho?”.

Estimativas da exposição foram obtidas considerando-se cada uma das doze tarefas que os trabalhadores executavam no exercício da atividade laboral e que envolviam o contato direto com as serpentes ou os seus venenos: limpeza de caixa de serpente, alimentação de serpente, manuseio de serpente, extração de veneno, manuseio de veneno líquido, manuseio de veneno em pó, limpeza de sala de cativeiro, fixação de serpente, trabalho de campo, recepção de serpente, limpeza de terrário e dissecação de serpente. As seguintes questões foram utilizadas: “Quantos dias por semana você executa ou executava [esta determinada tarefa]?” e “Por quantos anos você vem executando ou executou [esta determinada tarefa]?”. Para cada tarefa foi calculado um índice de exposição como uma variável contínua e obtida multiplicando-se a frequência (dias/ano) pelo tempo de exposição (anos).

3.3 Determinação da IgE total e específica

Neste estudo, a dosagem quantitativa da IgE sérica específica para cada alérgeno foi realizada utilizando-se o teste *ImmunoCAP* (*UniCAP*[®] *System*, *Pharmacia Diagnostics AB*, Uppsala, Suécia).

Para a determinação da sensibilização dos trabalhadores aos aeroalérgenos comuns (poeira doméstica, ácaros, fungos e epitélios de animais), aos venenos de himenópteros (abelha, vespa e formiga) e ao látex, foram utilizados os testes *ImmunoCAP* comercialmente disponíveis: Hx2 (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, e *Blatella germanica*), Ex1 (epitélio de cavalo, boi, gato e cachorro), Mx1 (*Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata*), Rd201 (*Blomia tropicalis*), I1 (*Apis mellifera*), I4 (*Polistes sp*), I70 (*Solenopsis invicta*) e K82 (*H. brasiliensis*). Para a dosagem quantitativa da IgE sérica específica ao veneno de *Bothrops jararaca*, foi desenvolvido um *ImmunoCAP* especialmente para este estudo pela *MIAB* (Uppsala, Suécia). Conforme as especificações do fabricante, os resultados foram considerados positivos para valores maiores que 0,35 kU/L.

As dosagens séricas da IgE total foram realizadas através do método de nefelometria e os resultados foram considerados alterados para valores acima de 100 kU/L, onde 1U de IgE equivale à 2,42 ng do padrão estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para a medida de IgE humana (*WHO International Reference Preparation for Human IgE 75/502*) (Williams et al., 2001; Ahlstedt, 2002).

3.4 Critério de atopia

Como critério de atopia foi utilizada a história clínica pessoal de asma e/ou rinoconjuntivite e/ou dermatite atópica, associada à positividade de pelo menos um dos testes *ImmunoCAP* para antígenos inalantes (poeira doméstica, ácaros, fungos ou epitélios de animais).

A história clínica pessoal de asma foi considerada positiva quando presentes sintomas sugestivos, tais como “falta de ar” e “chiado no peito”, recorrentes, e a de rinoconjuntivite alérgica quando presentes os sintomas alérgicos clássicos de prurido nasal, coriza, espirros, vermelhidão ocular, lacrimejamento, ou prurido ocular, relacionados em geral à exposição aos alérgenos comuns como poeira, animais domésticos, mofo ou polens.

A história clínica pessoal de dermatite atópica foi verificada quando presentes os sintomas de prurido e lesões eczematosas com distribuição clássica em dobras cubitais ou poplíteas.

3.5 Antígenos

Extrato bruto liofilizado de veneno de *Bothrops jararaca* (Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil) foi dissolvido em solução salina tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*) com pH 7,4 e estocada em freezer à temperatura de -20 °C até a sua utilização.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As proteínas do veneno de *B. jararaca* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970).

Alíquotas de veneno (5 µg) foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (tampão TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol), fervidas por três minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida. Foi utilizado o gel de empacotamento em uma concentração de 4% (p/v) de poliacrilamida e o gel de resolução 12,5% (p/v) de poliacrilamida. O gel foi corado com nitrato de prata (Blum et al., 1987). Os padrões de massas moleculares utilizados foram: miosina (205,73), β galactosidase (133,08), soroalbumina bovina (83,91 kDa); anidrase carbônica (41,56 kDa); inibidor de tripsina de soja (31,35 kDa), lisozima (17,26 kDa) e aprotinina (7,01).

3.7 Western blotting

Os componentes do veneno de *B. jararaca* (20 µg) foram fracionados por SDS-PAGE e transferidos, sob corrente constante de 385 mA, durante 2 horas, para uma membrana de nitrocelulose, de acordo com a técnica descrita por Towbin et al. (1979). Em seguida, utilizou-se o método imunoenzimático para caracterizar as proteínas depositadas na membrana de nitrocelulose. A membrana foi cortada em tiras de 5 mm, que foram incubadas durante uma noite, a 4°C, com solução bloqueadora (tampão TRIS-salina pH 7,5 contendo 5% de leite em pó desnatado Molico-Nestlé-S. P.). Após o bloqueio, as tiras foram incubadas com os soros dos pacientes diluídos em solução bloqueadora (diluição 1:10 para detecção de IgG e 1:2 para detecção de IgE) por 2 horas, à temperatura ambiente. A seguir, as tiras foram lavadas com TRIS-salina e incubadas com o respectivo conjugado imunoenzimático anti-IgG ou anti-IgE humanos marcados com peroxidase (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO, USA), diluídos em solução bloqueadora (diluição 1:250 e 1:100, respectivamente), por 2 horas, à temperatura ambiente.

O excesso de conjugado foi removido por um novo ciclo de lavagens e os componentes antigênicos foram revelados pela adição do cromógeno 4-cloro-1-naftol 0,05% (p/v) em metanol 15% (v/v), em presença de H₂O₂ 0,03% (v/v). A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água. Os marcadores de massa molecular utilizados foram os mesmos indicados anteriormente.

3.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os títulos de anticorpos da classe IgG específicos para o veneno de *B. jararaca* foram determinados através da técnica de ELISA (Theakston et al., 1977) com algumas modificações. Para a sensibilização das placas de poliestireno, 100 µl de uma solução contendo 10 µg/ml de veneno de *B. jararaca*, diluídos em tampão alcalino de baixa força iônica (tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6), foram colocados em cada um dos poços. As placas foram incubadas em câmara úmida por 18 horas, a 4 °C. Após este período, foram realizadas 3 lavagens sucessivas, de 5 minutos cada uma, com PBS contendo 0,05% de Tween 20. O passo seguinte foi a adicionar 200 µl de solução bloqueadora (tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 contendo 3% de BSA) em cada poço, e incubar as placas em câmara úmida por 2 horas, a 37 °C. Após um novo ciclo de lavagens, foram adicionados em cada poço 100 µl dos soros diluídos (diluição inicial de 1:100) em tampão de incubação (PBS pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA), e realizada nova incubação em câmara úmida por 1 hora, a 37 °C. Após 3 lavagens, as placas foram incubadas com o conjugado imunoenzimático anti-IgG humano marcado com peroxidase, diluído com o tampão de incubação (1:1000), por 1 hora, a 37 °C. Após mais um ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição de 100 µl da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de OPD/ml em tampão citrato 0,2 M, pH 5,0 mais H₂O₂ 0,06%), por poço. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 30% por poço. A intensidade da reação foi determinada por

leitura da absorbância, utilizando-se um leitor de placas Titertek Multiskan Plus, a 492 nm. O título de anticorpos foi dado pela recíproca da diluição máxima do soro, capaz de resultar em uma leitura de absorbância variando de maior que 0,050 até 492 nm.

3.9 Ensaio de inibição da IgE específica (inibição do *ImmunoCAP*)

Para o ensaio de inibição da IgE específica ao veneno de *Bothrops jararaca*, utilizou-se o teste de inibição do RAST (Yunginger et al., 1983) com algumas modificações. Amostras de soros dos indivíduos sabidamente com altos níveis de IgE específica ao veneno botrópico (trabalhadores nº 18 e nº 50, ambos com teste *ImmunoCAP* para *Bothrops jararaca* > 100 kU/L) foram incubadas separadamente com diferentes diluições, em PBS, do veneno de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus durissus durissus*, por 1 hora, a 37 °C, com o soro do trabalhador nº 50 diluído 4 vezes, e o do trabalhador nº 18 diluído 1,3 vezes. As amostras foram incubadas com concentrações crescentes dos venenos de forma a se obter volumes finais de 300 µl e concentrações dos venenos variando de 5 mg/ml até 5 pcg/ml. O procedimento seguinte foi o mesmo para a determinação da IgE específica através do teste *ImmunoCAP* específico para o veneno de *Bothrops jararaca*, utilizando-se, no entanto, os resultados expressos em fluorescência em vez de kU/L.

Para o cálculo da porcentagem de inibição, utilizou-se a seguinte fórmula (Reimers et al., 2000):

$$\% \text{ de inibição} = (1 - F_s / F_a) \cdot 100$$

onde F_s representa o valor da fluorescência obtida com o soro do trabalhador sem a incubação prévia com o veneno, e F_a o valor da fluorescência da amostra do soro incubada previamente com veneno.

A partir dos resultados obtidos, construíram-se curvas de inibição em gráficos semilogarítmicos, colocando-se a porcentagem de inibição no eixo das ordenadas, e as concentrações dos venenos no eixo das abscissas.

3.10 Análise estatística

O exame dos histogramas e das curvas de distribuição, a análise dos valores dos coeficientes de assimetria e curtose, e o teste de Kolmogorov-Smirnov, foram utilizados para verificar a normalidade das distribuições dos valores das variáveis numéricas.

O grau de associação entre a presença de sintomatologia alérgica e a presença de sensibilização ao veneno de *Bothrops jararaca* (e.g., teste *ImmunoCAP* positivo para o veneno) foi estabelecido empregando-se o teste exato de Fisher.

Para a análise de concordância entre os resultados obtidos para determinação quantitativa da IgE sérica específica ao veneno de *Bothrops jararaca* (teste *ImmunoCAP*) e os obtidos para a IgG específica ao mesmo veneno (ELISA) utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman (r_s).

Para o estabelecimento de associações entre a maioria dos fatores preditores e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico foi utilizado o teste exato de Fisher.

A associação entre o tempo de exposição à serpente *Bothrops jararaca* e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao seu veneno foi verificada através da análise de variância de um fator (ANOVA). Para que as suposições de normalidade fossem obedecidas, utilizou-se a variável “tempo de exposição” após a sua transformação logarítmica.

Para o estabelecimento de associações entre as variáveis de índices de exposições, relacionadas ao exercício de tarefas específicas, e o

desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno, foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Este estudo foi complementado com uma análise de componentes principais, aplicada com o objetivo de obter um número menor de combinações de variáveis de índices de exposições, seguida de análise múltipla de regressão logística.

Na análise múltipla de regressão logística, o processo de modelagem foi feito a partir do modelo com todos os componentes extraídos da análise de componentes principais e, a seguir, uma a uma as variáveis foram retiradas através da significância estatística (*stepwise backward selection procedure*). Os intervalos de confiança foram de 95%.

O programa de computador SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para Windows (versão 13.0, 2004; *Statistical Products and Service Solution Inc.*, Chicago, IL, USA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição das variáveis epidemiológicas e ocupacionais

O estudo foi realizado a partir de uma amostra de 67 (95,7 %) dos 70 trabalhadores de quatro unidades do Instituto Butantan, que tinham contato direto com a serpente *Bothrops jararaca*, ou com o seu veneno, nas suas atividades laborais. Apenas 3 trabalhadores não puderam participar do estudo por não estarem disponíveis na ocasião. Vinte e oito (41,8 %) trabalhavam na Sessão de Coleção e Recepção de Serpentes e 23 (34,3 %) na Sessão de Venenos, ambas do Laboratório de Herpetologia. Treze (19,4 %) eram do Museu Biológico e 3 (4,5 %) da Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Butantan (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo o local de trabalho

Local de trabalho	Número de trabalhadores (%)
Lab. de Herpetologia / Sessão de Coleção e Recepção	28 (41,8 %)
Lab. de Herpetologia / Sessão de Venenos	23 (34,3 %)
Museu Biológico	13 (19,4 %)
Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico	3 (4,5 %)

Trinta e sete (55,2 %) dos trabalhadores eram do sexo feminino. A média das idades foi de 37,5 anos ($\pm$ 12,3 anos). O tempo de atividade

profissional variou de 1 a 35 anos, com mediana de 6 anos (intervalo interquartil de 2-17 anos).

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos 67 trabalhadores segundo o sexo, a idade e o tempo de atividade.

Tabela 2. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo as variáveis sexo, idade e tempo de atividade

Trabalhador	Sexo	Idade (anos)	Tempo de atividade (anos)	Trabalhador	Sexo	Idade (anos)	Tempo de atividade (anos)
1	F	39	12	35	M	45	12
2	F	25	2	36	M	25	3
3	F	24	2	37	M	26	5
4	M	55	33	38	F	22	1
5	M	24	1	39	F	23	1
6	F	42	13	40	M	52	35
7	F	51	29	41	F	52	19
8	F	37	17	42	M	41	18
9	M	24	3	43	M	41	18
10	F	23	2	44	F	49	18
11	M	25	1	45	F	21	4
12	F	46	13	46	F	29	5
13	F	56	4	47	F	33	9
14	F	44	5	48	M	29	2
15	M	43	7	49	F	38	10
16	F	27	2	50	M	36	14
17	M	64	11	51	M	27	3
18	M	46	18	52	F	41	5
19	F	46	5	53	M	55	19
20	F	22	1	54	F	65	26
21	M	21	1	55	M	29	3
22	M	26	3	56	M	29	1
23	F	44	9	57	F	27	3
24	F	25	1	58	F	41	13
25	M	28	2	59	F	21	1
26	M	25	3	60	F	26	2
27	M	39	15	61	M	55	6
28	M	45	24	62	M	39	18
29	F	53	20	63	F	34	14
30	F	48	17	64	F	49	16
31	F	57	18	65	F	30	6
32	F	61	16	66	F	43	13
33	M	24	2	67	M	49	30
34	M	33	4				

(M) = masculino; (F) = feminino.

A Figura 14 apresenta a distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a escolaridade. Observa-se que 45 (67,2 %) trabalhadores tinham nível superior ou pós-graduação.

Figura 14. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a escolaridade

A Figura 15 mostra a distribuição dos 67 trabalhadores segundo a variável profissão. Quarenta (59,7 %) desses trabalhadores eram biólogos.

Figura 15. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a profissão

Vinte (29,5 %) dos 67 profissionais tinham carreira de pesquisadores e 24 (35,8 %) eram estagiários ou bolsistas ligados às diversas agências de fomento à pesquisa, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo o cargo (ou função)

4.2 Distribuição das variáveis clínicas e imunológicas

A Tabela 3 apresenta a distribuição dos 67 trabalhadores segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Tabela 3. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Trabalhador	Atopia*	IgE total (kU/L)	Sintomas alérgicos ao veneno de <i>B. jararaca</i>	IgE <i>B. jararaca</i> (kU/L)	IgG** <i>B. jararaca</i> (Título)
1	+	139	***	0,85	160
2	+	52	-	-	-
3	+	31	-	-	-
4	-	342	Rinite	12,4	320
5	+	57	-	-	160
6	-	32	-	-	-
7	-	9	Urticária, rinoconjuntivite	-	-
8	-	28	-	-	-
9	+	109	Urticária, rinite	0,4	-
10	-	34	-	-	-
11	-	36	-	-	-
12	-	696	Urticária, rinite	-	-
13	-	365	-	-	-
14	-	4	-	-	-
15	-	7	Rinoconjuntivite	-	-
16	-	92	-	-	-
17	-	1260	-	-	-
18	+	435	Urticária	>100	320
19	-	32	-	-	-
20	+	126	-	-	-

continua

Tabela 3 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Trabalhador	Atopia*	IgE total (kU/L)	Sintomas alérgicos ao veneno de <i>B. jararaca</i>	IgE <i>B. jararaca</i> (kU/L)	IgG** <i>B. jararaca</i> (Título)
21	-	222	-	-	-
22	+	146	-	-	-
23	+	466	-	-	-
24	-	23	-	-	-
25	-	90	-	-	-
26	-	15	-	-	-
27	-	46	-	-	-
28	-	23	-	-	-
29	-	10	-	-	-
30	-	296	-	-	-
31	-	132	-	-	-
32	-	28	-	-	-
33	-	363	-	-	-
34	+	565	-	-	-
35	-	25	-	-	-
36	-	39	-	-	-
37	+	436	-	-	-
38	+	553	-	-	-
39	-	7	-	-	-
40	-	89	Rinoconjuntivite	-	320

continua

Tabela 3 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Trabalhador	Atopia*	IgE total (kU/L)	Sintomas alérgicos ao veneno de <i>B. jararaca</i>	IgE <i>B. jararaca</i> (kU/L)	IgG** <i>B. jararaca</i> (Título)
41	-	76	-	-	-
42	-	17	-	-	-
43	-	131	-	-	-
44	+	471	-	-	-
45	-	22	-	-	160
46	+	404	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos	-	-
47	+	68	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	8,85	80
48	+	159	-	-	-
49	+	90	-	-	-
50	-	315	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	>100	1280
51	+	187	Urticária	-	-
52	-	347	-	-	-
53	-	52	-	-	-
54	-	41	-	-	-
55	-	76	-	-	-
56	+	418	-	-	-
57	-	46	-	-	-

continua

Tabela 3 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo a presença de atopia, nível sérico de IgE total, sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico, e níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Trabalhador	Atopia*	IgE total (kU/L)	Sintomas alérgicos ao veneno de <i>B. jararaca</i>	IgE <i>B. jararaca</i> (kU/L)	IgG** <i>B. jararaca</i> (Título)
58	-	22	-	-	-
59	-	5	-	-	-
60	+	317	-	-	80
61	-	474	-	-	-
62	+	826	-	-	-
63	+	263	-	-	-
64	-	160	-	-	-
65	+	39	-	-	-
66	-	5	-	-	-
67	+	301	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	40,9	160

IgE específica quantificada através do teste *ImmunoCAP*; (-) para valores < 0,35 kU/L.
F = feminino; M = masculino.
* Definida como a presença de história pessoal positiva de atopia, associada à IgE específica positiva para pelo menos um dos alérgenos inalantes comuns, quantificada através do teste *ImmunoCAP*.
** Título (ELISA): recíproca da diluição máxima do soro, capaz de resultar em uma leitura de absorbância maior que 0,050 a 492 nm. IgG: (-) para valores < 40.
*** Conjuntivite provocada pelo veneno da serpente *Crotalus durissus*.

4.2.1 Atopia e nível sérico total de anticorpos da classe IgE

Quarenta e um (42,9 %) trabalhadores tinham história pessoal de atopia (e.g., rinite alérgica, conjuntivite alérgica, asma ou dermatite atópica). Vinte e quatro (35,8 %) foram considerados atópicos (Figura 17A), pois além da história pessoal de atopia, apresentaram no soro anticorpos da classe IgE específicos (*ImmunoCAP*) para pelo menos um dos antígenos inalantes comuns testados. Níveis séricos totais de anticorpos da classe IgE acima de 100 kU/L foram detectados em 31 (46,3 %) dos 67 trabalhadores (Figura 17B).

Figura 17. Distribuição dos trabalhadores do Instituto Butantan segundo (A) a presença de atopia e (B) níveis séricos de IgE total > 100 kU/L

4.2.2 Sintomas alérgicos relacionados à exposição ocupacional aos venenos ofídicos

Vinte (29,9 %) dos 67 trabalhadores estudados referiram sintomas alérgicos (e.g., urticária, rinite, conjuntivite, asma ou anafilaxia) quando expostos aos venenos ofídicos. Doze (17,9 %) apresentaram sintomas alérgicos desencadeados pelo veneno de serpente do gênero *Bothrops* (jararacas), nove (13,4 %) pelo veneno de serpente do gênero *Crotalus* (cascavéis), e nove (13,4 %) pelo veneno de serpente do gênero *Micrurus* (corais) (Figura 18).

Figura 18. Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno ofídico segundo o gênero da serpente

Dos 12 trabalhadores com história de sintomas alérgicos relacionados à exposição ocupacional ao veneno botrópico, dez referiram sintomas de rinite, nove de urticária, sete de conjuntivite, quatro de asma, e três de anafilaxia (Figura 19).

Figura 19. Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno botrópico segundo a modalidade do sintoma: (A) rinite; (B) conjuntivite; (C) asma; (D) urticária e (E) anafilaxia

Segundo o tipo de exposição, nove trabalhadores referiram que os sintomas eram desencadeados pela inalação do veneno em pó, quatro pela inalação do veneno líquido, quatro pelo contato cutâneo, um pelo contato do veneno com mucosas, e um pela picada da serpente (Figura 20).

Figura 20. Distribuição dos trabalhadores com sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com o veneno botrópico segundo a forma de exposição: (A) contato do veneno com mucosas; (B) contato do veneno com a pele; (C) inalação do veneno em pó; (D) inalação do veneno líquido e (E) picada da serpente

4.2.3 Determinação dos níveis séricos dos anticorpos das classes IgE e IgG específicos ao veneno botrópico

Através do sistema *ImmunoCAP*, observou-se a presença de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* no soro de sete dos 67 trabalhadores estudados (Prevalência = 10,4 %). Os valores obtidos variaram de 0,4 kU/L até acima de 100 kU/L, limite superior detectável pelo teste. Por apresentarem valores maiores que 0,35 kU/L, estes indivíduos foram considerados sensibilizados ao veneno botrópico. A Tabela 4 resume as características desses trabalhadores.

Os títulos dos anticorpos da classe IgG específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*, obtidos pela técnica de ELISA, foram positivos no soro de dez trabalhadores e variaram entre 80 e 1280. Foi observada uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos dos anticorpos IgG e IgE específicos ao veneno botrópico (coeficiente de correlação de Spearman $r_s = 0,70$; $p < 0,001$).

Tabela 4. Características demográficas, sintomas alérgicos e variáveis imunológicas dos trabalhadores com sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Trabalhador	Sexo	Idade (anos)	Tempo de atividade (anos)	Atopia*	IgE total (kU/L)	Sintomas alérgicos ao veneno de <i>B. jararaca</i>	IgE <i>B. jararaca</i> (kU/L)	IgG** <i>B. jararaca</i> (Título)
1	F	39	12	+	139	nenhum***	0,85	160
4	M	55	32	-	342	Rinite	12,4	320
9	M	24	3	+	109	Urticária, rinite	0,4	-
18	M	46	17	+	435	Urticária	>100	320
47	F	33	8	+	68	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	8,85	80
50	M	36	13	-	315	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	>100	1280
67	M	49	29	+	301	Urticária, rinoconjuntivite, sintomas asmáticos, anafilaxia	40,9	160

IgE específica quantificada através do teste *ImmunoCAP*; (-) para valores < 0,35 kU/L.

F = feminino; M = masculino.

* Definida como a presença de história pessoal positiva de atopia, associada à IgE específica positiva para pelo menos um dos alérgenos inalantes comuns, quantificada através do teste *ImmunoCAP*.

** Título (ELISA): recíproca da diluição máxima do soro, capaz de resultar em uma leitura de absorbância maior que 0,050 a 492 nm. IgG: (-) para valores < 40.

*** Conjuntivite provocada pelo veneno da serpente *Crotalus durissus*.

4.2.4 Relação entre o teste *ImmunoCAP* para o veneno de *Bothrops jararaca* e a presença de sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico

A Tabela 5 apresenta a distribuição dos participantes do estudo segundo a presença ou não dos sintomas alérgicos relacionados à exposição ocupacional ao veneno botrópico e a presença ou não dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*, detectados no soro dos trabalhadores pelo teste *ImmunoCAP*.

Tabela 5. Distribuição dos participantes do estudo segundo a presença ou não dos sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico e o teste *ImmunoCAP* positivo ou não para o veneno de *Bothrops jararaca*

Sintomas alérgicos à exposição ao veneno	<i>ImmunoCAP</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Sintomáticos	6	6	12
Assintomáticos	1	54	55
Total	7	60	67

Dos sete indivíduos que apresentavam o teste *ImmunoCAP* positivo para o veneno de *Bothrops jararaca* (desta forma, considerados sensibilizados ao veneno), seis tinham história positiva de sintomas alérgicos

relacionados à exposição ao veneno e, portanto, considerados alérgicos ao veneno botrópico. Entretanto, nota-se que aquele único que não tinha história positiva de sintomas alérgicos ao veneno botrópico, referia sintomatologia alérgica (conjuntivite) relacionada à exposição ao veneno de *Crotalus durissus* (cascavel).

Como 25 % das células apresentaram frequências esperadas menores do que 5, o teste apropriado para o estudo da associação entre as duas variáveis foi o da probabilidade exata de Fisher. Ele forneceu $p < 0,001$ para uma hipótese unilateral, com valor do V de Cramér = 0,60, indicando uma associação positiva e significativa entre a detecção de níveis séricos de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*, através do teste *ImmunoCAP*, e a presença de sintomatologia alérgica relacionada à exposição ocupacional ao veneno botrópico.

Por outro lado, a aplicação do teste de probabilidade exata de Fisher demonstrou associações positivas e significativas entre a presença do teste *ImmunoCAP* positivo para IgE específica ao veneno de *Bothrops jararaca* e sintomas de rinite ($p < 0,001$, V de Cramér = 0,54) (Figura 21), urticária ($p < 0,001$, V de Cramér = 0,58) (Figura 22), conjuntivite ($p = 0,021$, V de Cramér = 0,36) (Figura 23), e sintomas asmáticos ($p = 0,003$, V de Cramér = 0,53) (Figura 24), relacionados à exposição ocupacional ao veneno botrópico.

Figura 21. Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema *ImmunoCAP*) e sintomas de rinite

Figura 22. Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema *ImmunoCAP*) e sintomas alérgicos cutâneos (urticária)

Figura 23. Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema *ImmunoCAP*) e sintomas de conjuntivite

Figura 24. Relação entre a presença dos anticorpos da classe IgE específicos no soro (dosados pelo sistema *ImmunoCAP*) e sintomas asmáticos

4.3 Relação entre a presença de atopia e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Para verificar a associação entre atopia e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico foi aplicado o teste de probabilidade exata de Fisher que forneceu $p = 0,051$ para a hipótese unilateral, com o valor do V de Cramér = 0,25. A Figura 25 mostra a relação entre essas duas variáveis.

Figura 25. Relação entre a presença de atopia e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

4.4 Relação entre o nível sérico de IgE total e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Associação positiva e significativa foi encontrada entre nível sérico total de anticorpos da classe IgE maior que 100 kU/L e a presença de teste *ImmunoCAP* positivo para ao veneno de *Bothrops jararaca*, através do teste de probabilidade exata de Fisher que forneceu $p = 0,034$ para a hipótese unilateral, com o valor do V de Cramér = 0,27. A Figura 26 mostra a relação entre essas duas variáveis.

Figura 26. Relação entre o nível sérico total de anticorpos da classe IgE maior que 100 kU/L e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

4.5 Relação entre o tempo de exposição ocupacional e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

O histograma de freqüências da variável tempo de exposição ocupacional ao veneno botrópico resultou numa curva com padrão de distribuição positivamente assimétrica, caracterizada por um coeficiente de assimetria = 0,96 e curtose = 0,58. O teste de Kolmogorov-Smirnov aplicado a essa variável forneceu um valor de $Z = 1,57$, com $p = 0,015$, confirmando não tratar-se de uma distribuição normal. Já a transformação logarítmica dessa variável resultou numa curva normal, com coeficiente de assimetria = -0,26 e curtose = -1,22 (Figura 27). O teste de Kolmogorov-Smirnov aplicado após a transformação forneceu um valor de $Z = 1,22$, com $p = 0,10$, confirmando tratar-se de uma distribuição normal.

Figura 27. Histogramas das distribuições das freqüências da variável tempo de exposição ocupacional ao veneno botrópico antes (A) e após (B) a transformação logarítmica

Esta transformação permitiu que fosse aplicado um teste paramétrico de análise de variância de um fator (ANOVA) para se estudar a relação entre o tempo de exposição ocupacional ao veneno botrópico e o desenvolvimento da sensibilização alérgica ao veneno. Além da distribuição normal, a homogeneidade das variâncias também foi confirmada através do teste de igualdade das variâncias de Levene ($F = 3,40$, $p = 0,07$).

A análise de variância de um fator mostrou uma relação positiva e significativa entre essas duas variáveis com $F(1,65) = 4,30$ e $p = 0,042$.

4.6 Acidentes ocupacionais provocados por picadas de serpentes

Quatorze (20,9 %) dos indivíduos tinham sido vítimas de acidentes ocupacionais provocados por picadas de serpentes peçonhentas. Destes, 11 (78,6 %) tinham sido picados por serpentes do gênero *Bothrops* e 4 (28,6 %) por serpentes do gênero *Crotalus*. Acidentes com serpentes do gênero *Micrurus* não foram relatados (Figura 28).

Figura 28. Distribuição dos trabalhadores vítimas de acidentes ocupacionais ocasionados por picadas de serpentes segundo o gênero da serpente

Aplicando-se o teste de probabilidade exata de Fisher, não foi encontrada associação entre acidentes por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico ($p = 0,323$, V de Cramér = 0,11) (Figura 29). Contudo, a

associação entre a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno e acidentes por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* teve $p = 0,051$, com V de Cramér = 0,27 (Figura 30).

Figura 29. Relação entre os acidentes provocados por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Figura 30. Relação entre os acidentes provocados por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* e a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno botrópico

4.7 Acidentes ocupacionais provocados pelo contato do veneno de serpente com membranas mucosas

Quinze (22,4 %) dos indivíduos tinham sido vítimas de acidentes provocados pelo contato do veneno de serpentes peçonhentas com as membranas mucosas (olhos ou boca). Destes, 8 (53,3 %) tinham os acidentes provocados pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e 8 (53,3 %) por serpentes do gênero *Crotalus*. Acidentes com o veneno de serpentes do gênero *Micrurus* não foram relatados (Figura 31).

Figura 31. Distribuição dos trabalhadores vítimas de acidentes ocupacionais ocasionados pelo contato do veneno ofídico com membranas mucosas segundo o gênero da serpente

Aplicando-se o teste de probabilidade exata de Fisher, não foi encontrada associação entre acidentes por contato do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* com as mucosas e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico ($p = 0,193$, V de Cramér = 0,17) (Figura 32), nem com a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno ($p = 0,091$, V de Cramér = 0,23) (Figura 33).

Figura 32. Relação entre os acidentes provocados pelo contato do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* com membranas mucosas e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Figura 33. Relação entre os acidentes provocados pelo contato do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* com membranas mucosas e a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno

4.8 Relação entre o teste *ImmunoCAP* para o veneno de *Bothrops jararaca* e a presença de sintomas alérgicos desencadeados pela exposição aos venenos de outras serpentes

Aplicando-se o teste de probabilidade exata de Fisher foi possível demonstrar uma associação positiva e significativa entre o teste *ImmunoCAP* positivo para IgE específica ao veneno de *Bothrops jararaca* e a presença de sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ao veneno das serpentes cascavéis ($p = 0,005$, V de Cramér = 0,44) (Figura 34), mas não com os sintomas alérgicos desencadeados pelo veneno das serpentes corais ($p = 0,235$, V de Cramér = 0,15) (Figura 35).

Figura 34. Relação entre a presença de sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ocupacional ao do veneno de serpentes do gênero *Crotalus* e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Figura 35. Relação entre a presença de sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ocupacional ao do veneno de serpentes do gênero *Micrurus* e a sensibilização alérgica ao veneno botrópico

4.9 Relação entre a sensibilização ao veneno botrópico e a sensibilização aos venenos de himenópteros

A Tabela 6 mostra a distribuição dos níveis séricos da IgE específica aos venenos de himenópteros entre os trabalhadores com IgE específica positiva ao veneno botrópico.

Tabela 6 – Distribuição dos níveis séricos da IgE específica aos venenos de himenópteros entre os trabalhadores com IgE específica positiva ao veneno de *Bothrops jararaca*

Trabalhador	Dosagem da IgE específica ao veneno * (kU/L)			
	B. jararaca	Abelha	Vespa	Formiga
1	0,85	-	-	-
4	12,4	0,46	-	-
9	0,40	-	-	-
18	>100	-	1,49	-
47	8,85	-	-	-
50	>100	-	-	-
67	40,9	-	-	0,86

* IgE específica quantificada através do teste *ImmunoCAP*; (-) para valores < 0,35 kU/L

Aplicando-se o teste de probabilidade exata de Fisher, não foi encontrada associação entre a presença no soro de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno botrópico e de anticorpos da classe IgE específicos aos venenos de himenópteros ($p = 0,594$, V de Cramér = 0,018) (Figura 36).

Figura 36. Relação entre a presença no soro de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno botrópico e de anticorpos da classe IgE específicos aos venenos de himenópteros

4.10 Relação entre o exercício de tarefas relacionadas à exposição ocupacional à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico

A Figura 37 mostra a distribuição dos 67 trabalhadores segundo as doze tarefas ligadas à exposição ocupacional do trabalhador à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno.

Figura 37. Distribuição dos 67 trabalhadores segundo as tarefas relacionadas à exposição ocupacional do trabalhador à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno

Para verificar se havia associação entre o exercício de cada uma das tarefas e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico, foram montadas tabelas de contingência 2X2 para cada uma das tarefas em relação ao teste *ImmunoCAP* para o veneno. Como, em todos os casos, mais de 25 % das células apresentaram frequências esperadas menores do que 5, o teste estatístico apropriado foi o da probabilidade exata de Fisher. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos.

Tabela 7. Associação entre cada tarefa implicada na exposição ocupacional do trabalhador à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Tarefa	Teste exato de Fisher	
	Valor de <i>p</i>	V de Cramér
Limpeza de caixa de serpente	0,453	0,064
Alimentação de serpente	0,612	0,013
Manuseio de serpente	0,323	0,112
Extração de veneno	0,453	0,061
Manuseio de veneno líquido	0,178	0,162
Manuseio de veneno em pó	0,257	0,129
Limpeza de sala de cativeiro	0,583	0,031
Fixação de serpente	0,057	0,239
Trabalho de campo	0,382	0,085
Recepção de serpente	0,319	0,116
Limpeza de terrário	0,721	0,006
Dissecção de serpente	0,654	0,009

A análise da Tabela 7 mostra que não houve associação significativa entre o exercício de cada uma das doze tarefas e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico. Os valores obtidos para os coeficientes de Cramér indicam que os relacionamentos entre essas variáveis foram próximos a 0.

4.11 Índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno

Para verificar se havia associação entre o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico e os níveis de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, foram calculados os índices de exposições para cada uma das doze tarefas. A Tabela 8 apresenta a distribuição dos 67 trabalhadores participantes do estudo segundo os índices de exposições, ligados ao exercício de cada tarefa específica.

Tabela 8. Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo os índices de exposições à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, ligados ao exercício de cada tarefa específica.

Trab	Limpeza de caixa de serpente	Alimentação de serpente	Manuseio de serpente	Extração de veneno	Manuseio de veneno líquido	Manuseio de veneno em pó	Limpeza de sala de cativeiro	Fixação de serpente	Trabalho de campo	Recepção de serpente	Limpeza de terrário	Dissecção de serpente
1	0	132	0	1584	0	0	0	528	0	0	0	0
2	288	96	0	480	0	24	0	48	0	0	0	0
3	96	48	96	96	96	96	240	480	0	8	0	0
4	6480	1296	2304	7680	2304	2304	1792	3120	0	32	0	0
5	240	72	12	240	12	12	0	96	0	0	0	0
6	1680	84	0	672	0	1584	120	336	0	8	0	0
7	1248	312	120	3120	120	6720	1344	3120	0	0	0	0
8	3072	384	360	3840	360	360	768	3840	0	60	0	0
9	0	0	0	0	0	12	144	0	0	0	0	0
10	96	24	12	96	12	48	48	48	0	0	0	0
11	96	48	1	144	1	2	0	48	0	0	0	0
12	528	132	132	792	132	144	288	528	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	1	720	0	0	0	0
14	960	0	0	0	0	0	0	192	0	0	0	0
15	1440	36	36	0	36	36	45	12	0	3	0	0
16	240	12	24	240	24	24	0	48	0	0	0	0
17	0	0	0	2784	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua

Tabela 8 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo os índices de exposições à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, ligados ao exercício de cada tarefa específica.

Trab	Limpeza de caixa de serpente	Alimentação de serpente	Manuseio de serpente	Extração de veneno	Manuseio de veneno líquido	Manuseio de veneno em pó	Limpeza de sala de cativeiro	Fixação de serpente	Trabalho de campo	Recepção de serpente	Limpeza de terrário	Dissecção de serpente
18	1200	60	60	2448	60	60	0	1200	0	15	1056	0
19	0	0	192	480	192	0	0	0	480	0	0	0
20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	36
21	0	0	2	240	2	0	0	0	144	0	12	0
22	192	48	24	480	24	0	0	24	96	12	480	0
23	0	0	0	0	0	96	16	0	0	0	0	0
24	0	0	1	0	1	1	24	0	0	0	0	0
25	48	12	1	192	1	0	0	0	48	4	72	0
26	12	24	2	480	2	0	0	0	96	6	288	0
27	2688	336	1248	3360	1248	0	2	168	0	28	0	0
28	3168	264	528	5280	528	528	12	5280	0	1	240	0
29	3600	180	2	720	2	0	0	180	0	0	0	0
30	1152	96	0	384	0	0	0	384	0	0	0	0
31	4080	204	0	204	0	0	0	4080	0	0	0	0
32	0	0	0	1440	0	0	0	0	0	0	0	0
33	240	24	3	240	3	12	0	240	0	0	0	0
34	36	0	6	144	6	0	0	0	72	144	0	0

Continua

Tabela 8 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo os índices de exposições à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, ligados ao exercício de cada tarefa específica.

Trab	Limpeza de caixa de serpente	Alimentação de serpente	Manuseio de serpente	Extração de veneno	Manuseio de veneno líquido	Manuseio de veneno em pó	Limpeza de sala de cativeiro	Fixação de serpente	Trabalho de campo	Recepção de serpente	Limpeza de terrário	Dissecção de serpente
35	2880	144	0	2880	0	0	0	2880	1152	0	0	0
36	0	24	8	288	8	0	0	0	12	0	0	192
37	576	96	2	960	2	0	12	192	288	16	0	576
38	240	12	0	240	0	0	0	96	12	0	0	144
39	96	48	0	192	0	0	2	192	96	0	0	48
40	1872	156	3888	8160	3888	3888	672	672	1296	120	3120	0
41	36	0	1	0	1	0	0	4320	0	0	0	0
42	1200	360	16	4800	16	0	0	0	3600	40	1920	0
43	2880	288	432	4080	432	432	360	2880	1632	68	4080	0
44	4080	4080	0	1632	0	0	0	4080	480	0	0	4080
45	288	0	0	144	0	0	0	0	48	6	288	0
46	576	96	4	768	4	7	1	384	8	4	0	576
47	1536	192	56	1536	56	48	768	768	12	30	0	576
48	96	12	1	144	1	0	0	0	24	1	0	24
49	960	96	48	960	48	96	1	192	0	24	0	0
50	3120	3120	624	3120	624	624	0	3120	0	13	0	0
51	48	48	2	96	2	0	0	0	96	24	96	0

Continua

Tabela 8 (Continuação). Distribuição dos 67 trabalhadores do Instituto Butantan segundo os índices de exposições à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, ligados ao exercício de cada tarefa específica.

Trab	Limpeza de caixa de serpente	Alimentação de serpente	Manuseio de serpente	Extração de veneno	Manuseio de veneno líquido	Manuseio de veneno em pó	Limpeza de sala de cativeiro	Fixação de serpente	Trabalho de campo	Recepção de serpente	Limpeza de terrário	Dissecção de serpente
52	576	0	3	576	3	0	0	0	240	0	288	0
53	3168	0	144	2880	144	0	0	3168	480	0	432	0
54	192	132	1	2160	1	1	0	3600	2400	0	2400	0
55	96	48	0	720	0	0	0	48	144	0	288	0
56	144	12	0	144	0	0	0	36	96	0	0	0
57	0	24	6	24	6	0	0	12	192	4	0	0
58	1248	1248	96	3840	96	192	0	0	3408	32	2400	0
59	12	0	0	24	0	0	0	144	48	0	0	0
60	48	24	48	192	48	48	0	48	96	2	0	0
61	480	120	120	1200	120	0	0	0	1200	10	1200	0
62	2640	198	528	4080	528	528	396	2640	1584	360	4080	0
63	96	480	2	1224	2	2	0	240	240	2	96	120
64	1248	312	672	3015	672	672	672	336	1152	13	0	0
65	0	0	0	0	0	15	15	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	66	66	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	1440	0	0	0	0	0

Final.

A Tabela 9 apresenta as medianas, com os respectivos intervalos interquartis, dos índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno segundo cada modalidade de tarefa exercida pelos trabalhadores.

Tabela 9. Distribuição das medianas dos índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno segundo cada modalidade de tarefa exercida pelos trabalhadores

Tarefa	Número de trabalhadores	Mediana	Intervalo interquartil	
			25 %	75%
Limpeza de caixa de serpente	53	576,0	96,0	1776,0
Alimentação de serpente	49	96,0	30,0	234,0
Manuseio de serpente	56	720,0	213,0	2856,0
Extração de veneno	44	24,0	2,0	141,0
Manuseio de veneno líquido	32	63,0	12,7	504,0
Manuseio de veneno em pó	26	93,0	12,0	672,0
Limpeza de sala de cativeiro	45	336,0	96,0	2880,0
Fixação de serpente	33	144,0	60,0	1152,0
Trabalho de campo	30	13,0	4,0	32,0
Recepção de serpente	20	360,0	132,0	2280,0
Limpeza de terrário	10	168,0	45,0	576,0
Dissecção de serpente	9	288,0	96,0	1080,0

4.12 Relação entre os índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico

Os histogramas de frequências dos índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, devido ao exercício de cada tarefa específica, foram inspecionados separadamente. Como os dados eram assimétricos e não atendiam às suposições de normalidade multivariada e de iguais matrizes de variância-covariância nos grupos, o estudo da relação dessas variáveis com o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico foi abordado de duas formas: através da aplicação do teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney. Os valores dos escores para o U de Mann-Whitney, os valores de z e os níveis de probabilidades associadas com as hipóteses bilaterais (p), obtidos para cada modalidade de tarefa, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Relação entre os índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno, devido ao exercício de cada tarefa específica, e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico. Resultados obtidos pela aplicação do teste estatístico Mann-Whitney

Tarefa	Teste de Mann-Whitney		
	U	z	Valor de p
Limpeza de caixa de serpente	45,5	- 2,27	0,023
Alimentação de serpente	55,0	- 1,82	0,068
Manuseio de serpente	52,5	- 2,16	0,031
Extração de veneno	32,0	- 1,96	0,049
Manuseio de veneno líquido	56,0	- 0,60	0,550
Manuseio de veneno em pó	9,5	- 2,45	0,014
Limpeza de sala de catifeiro	50,5	- 1,79	0,073
Fixação de serpente	2,0	- 1,48	0,140
Trabalho de campo	36,0	- 0,98	0,328
Recepção de serpente	7,0	- 0,44	0,663
Limpeza de terrário	2,0	- 0,88	0,378
Dissecção de serpente	3,0	- 0,39	0,697

A análise da Tabela 10 mostra que os índices de exposições relacionados às tarefas “limpeza de caixa de serpente”, “manuseio de serpente”, “extração de veneno” e “manuseio de veneno em pó” (em negrito) apresentaram associações estatisticamente significativas com o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico.

Por outro lado, como as doze tarefas consideradas tinham em comum o contato ou o manuseio da serpente, ou, então, o contato ou o manuseio de seu veneno, era provável que algumas das variáveis índices de exposições estivessem relacionadas entre si. Com o objetivo de reduzir todas as variáveis inter-relacionadas em termos de um número mínimo de fatores, foi

aplicado o método estatístico multivariado de análise de componentes principais.

Na aplicação da análise de componentes principais foram utilizados o método de rotação fatorial ortogonal *Varimax* e o critério de cargas acima de 0,4 para decidir que itens deveriam ser utilizados na nomeação e interpretação dos fatores. A Tabela 11 mostra as cargas dos fatores obtidos, já com a rotação.

Tabela 11. Cargas dos índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno decorrentes de cada tarefa, após rotação pelo método *Varimax*

Tarefa	Componentes			
	1	2	3	4
Limpeza de caixa de serpente	-	-	0,649	-
Alimentação de serpente	-	-	0,902	-
Manuseio de serpente	0,687	-	-	-
Extração de veneno	0,752	-	-	-
Manuseio de veneno líquido	0,816	-	-	-
Manuseio de veneno em pó	0,831	-	-	-
Limpeza de sala de cativeiro	-	-	0,625	-
Fixação de serpente	-	0,849	-	-
Trabalho de campo	-	0,699	-	-
Recepção de serpente	-	0,938	-	-
Limpeza de terrário	-	-	0,824	-
Dissecção de serpente	-	-	-	0,982

(-) Cargas menores que 0,4.

A Tabela 11 aponta claramente a existência de quatro fatores. O próximo passo foi nomear os fatores extraídos do procedimento de análise fatorial, o que é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Nomeação dos fatores extraídos após análise de componentes principais dos índices de exposições ocupacionais à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno

Nome atribuído ao fator	Tarefas relacionadas
Manuseio de veneno	Extração de veneno Manuseio de veneno líquido Manuseio de veneno em pó Manuseio de serpente
Captura e classificação de serpente	Fixação de serpente Trabalho de campo Recepção de serpente
Manutenção de serpente em cativeiro	Limpeza de caixa de serpente Alimentação de serpente Limpeza de sala de cativeiro Limpeza de terrário
Dissecção de serpente	Dissecção de serpente

Para o estudo da associação desses fatores com o desenvolvimento da sensibilização alérgica ao veneno botrópico, uma análise múltipla de regressão logística foi realizada a partir de um modelo incluindo todos os componentes obtidos: “manutenção de serpente em cativeiro”, “manuseio de veneno”, “captura e classificação de serpente”, e “dissecção de serpente”.

Através da técnica denominada “procedimento de seleção retrógrado passo a passo” (*stepwise backward selection procedure*), as variáveis foram

retiradas do modelo uma a uma através da significância estatística. O critério empregado para orientar a saída das variáveis foi o maior aumento no escore $-2 \log$ verossimilhança ($-2 \log likelihood$, ou $-2LL$).

Ao final do procedimento, apenas o componente de exposição “manuseio de veneno” permaneceu no modelo, com significância 0,038 e com estimativa da razão de chances (*Odds Ratio*) = 1,804 e intervalo de 95 % de confiança de 1,032 a 3,153.

Dois testes estatísticos foram empregados para a significância do modelo final. Primeiro, um teste qui-quadrado para a variação no valor $-2LL$ em relação ao modelo base, que foi estatisticamente significativo no nível menor que 0,001. Além disso, a medida Hosmer e Lameshow de ajuste geral que teve significância 0,104, indicando que não havia diferença estatisticamente significativa entre as classificações observadas e previstas.

4.13 Identificação dos alérgenos presentes no veneno de *Bothrops jararaca*

Para estabelecer os padrões de ligação da IgE específica aos componentes do veneno de *Bothrops jararaca*, as proteínas do veneno foram inicialmente separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e submetidas, em seguida, aos ensaios de *Western Blotting*, utilizando-se amostras de soros dos sete trabalhadores (números 1, 4, 9, 18, 47, 50 e 67) que tinham o teste *ImmunoCAP* positivo para o veneno (Tabela 4).

Apenas os soros dos trabalhadores nº 18 e nº 50, com altos títulos séricos de anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP* > 100 kU/L), foram capazes de reconhecer componentes do veneno, nas condições testadas (amostras de soros diluídas em 1:2).

Diferentes componentes de vários pesos moleculares foram reconhecidos pelos anticorpos da classe IgE presentes nos soros desses trabalhadores (Figura 38). O soro do trabalhador nº 18 reconheceu regiões entre 85 e 135 kDa e entre 30 e 70 kDa. Estas mesmas regiões também foram reconhecidas pelo soro do trabalhador nº 50, porém com o reconhecimento estendendo-se até 25 kDa, e com maior intensidade. Também pode ser observado que um componente de aproximadamente 32 kDa foi reconhecido com maior intensidade pelos soros desses dois trabalhadores.

Figura 38. *Western blotting* das proteínas do veneno de *Bothrops jararaca* com anti-IgE e soro dos trabalhadores nº 18 e nº 50. Os números à direita indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. (E) eletroforese do veneno de *Bothrops jararaca*

Para a IgG específica ao veneno de *Bothrops jararaca*, os ensaios de *Western Blotting* foram realizados utilizando-se amostras de soros dos dez trabalhadores (números 1, 4, 5, 18, 40, 45, 47, 50, 60 e 67), sabidamente com títulos séricos de anticorpos das classes IgG específicos ao veneno (Tabela 3).

Dentro das condições testadas, com a utilização das amostras de soros diluídas em 1:10, os soros dos trabalhadores números 1, 4, 40, 47 e 67 não reconheceram nenhum componente do veneno de *Bothrops jararaca* pela técnica de *blotting* (Figura 39). O soro do trabalhador nº 5 reconheceu componentes nas regiões entre 85 e 135 kDa e entre 30 e 70 kDa. O soro do trabalhador nº 18 também reconheceu componentes na região entre 30 e 70 kDa e uma banda na região de 135 kDa. Esta banda também foi reconhecida pelos soros dos trabalhadores nº 50 e nº 60. O soro do trabalhador nº 50 ainda reconheceu outros componentes na região entre 30 e 83 kDa.

Apenas as bandas distintas foram consideradas, uma vez que algumas regiões das membranas que ficaram “manchadas” não foram verificadas com a repetição do *blotting*, levando a crer tratar-se de resposta inespecífica ou de falha técnica.

Figura 39. *Western blotting* das proteínas do veneno de *Bothrops jararaca* com anti-IgG e soro dos trabalhadores números 1, 4, 5, 18, 40, 45, 47, 50, 60, e 67. Os números à direita indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. (-) controle negativo; (+) controle positivo (paciente picado por serpente do gênero *Bothrops*); (E) eletroforese do veneno de *Bothrops jararaca*

4.14 Ensaios de inibição da IgE específica ao veneno de *Bothrops jararaca* (inibição do *ImmunoCAP*)

O teste *ImmunoCAP* para determinação dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* foi realizado utilizando-se os soros dos trabalhadores números 50 e 18, após a incubação com diferentes concentrações do veneno botrópico e crotálico. As Figuras 40 e 41 apresentam os resultados obtidos.

Figura 40. Inibição do *ImmunoCAP*. Inibição das dosagens dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP*) observada no soro do trabalhador número 50 após absorção com diferentes concentrações do veneno botrópico (linha vermelha) e veneno crotálico (linha azul)

Figura 41. Inibição do *ImmunoCAP*. Inibição das dosagens dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca* (*ImmunoCAP*) observada no soro do trabalhador número 18 após absorção com diferentes concentrações do veneno botrópico (linha vermelha) e veneno crotálico (linha azul)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As reações alérgicas causadas pelos venenos ofídicos são incomuns e raramente descritas (Wadee et al., 1987). O primeiro caso de sensibilização alérgica ao veneno ofídico descrito na literatura data de 1930 (Zozaya; Stadelman, 1930) e, desde aquela época, os venenos de todas as principais famílias de serpentes têm sido implicados como causadores de reações alérgicas (Parrish; Pollard, 1959; Wadee et al., 1987).

O desenvolvimento deste tipo de hipersensibilidade alérgica tem sido descrito após recorrentes exposições aos venenos através de picadas (Lounsberry, 1934; Parrish; Pollard, 1959; Hogan; Dire, 1990; Ryan; Caravati, 1994; Alonso et al., 1995; Reimers et al., 2000) e, presumivelmente, de repetidas inalações ou contato desses venenos com a pele ou membranas mucosas (Barros, 1936; Mendes, 1950, 1952; Parrish; Pollard, 1959; Stanic, 1956; Mendes et al., 1960; Ellis; Smith, 1965; Kelly; Patterson, 1973; Wadee et al., 1987; Brooks; Graeme, 2004; Prescott; Potter, 2005). Embora nos poucos relatos presentes na literatura esta condição seja observada mais freqüentemente entre profissionais que manuseiam as serpentes ou os seus venenos, são limitados os conhecimentos a respeito da prevalência dessa doença entre esses trabalhadores, de seus determinantes, da extensão de reações cruzadas entre os diferentes venenos ofídicos e da natureza molecular dos alérgenos envolvidos.

Os sintomas observados nos indivíduos sensibilizados aos venenos ofídicos incluem urticária, rinoconjuntivite e sintomas asmáticos, que podem ser desencadeados pelo contato com mínimas doses de veneno (Wadee et al., 1987). Reações anafiláticas graves também têm sido descritas, mesmo em indivíduos que não tinham sido picados anteriormente (Prescott; Potter, 2005). Trabalhos mais recentes têm mostrado evidências de que essas reações possam ser IgE-mediadas, particularmente depois de repetidas exposições aos venenos (Kelly; Patterson, 1973; Wadee et al., 1987; Kopp et al., 1993; Alonso et al., 1995; Reimers et al., 2000).

Embora tenha sido descrito na literatura o uso de testes cutâneos para o diagnóstico da hipersensibilidade aos venenos de serpentes (Hogan; Dire, 1990; Kopp et al., 1993; Reimers et al., 2000) e, historicamente, os testes cutâneos sejam considerados na prática clínica os testes de escolha e de maior sensibilidade para a confirmação de uma resposta alérgica IgE-mediada (Hamilton, 2004; Oppenheimer; Nelson, 2006), eles não foram utilizados neste estudo devido à inerente toxicidade do veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, que mostra exuberante atividade inflamatória local (Farsky et al., 2005), além da possibilidade do desencadeamento de reações anafiláticas com um antígeno não padronizado para o uso clínico (Liccardi et al., 2006). Para a detecção “in vitro” dos anticorpos da classe IgE específicos ao veneno de *Bothrops jararaca*, foi então desenvolvido, especialmente para este estudo, um teste sorológico *ImmunoCAP*, específico para o veneno, pela *MIAB* (Uppsala, Suécia). A escolha do *ImmunoCAP* foi baseada no fato de ser um dos testes sorológicos mais

sensíveis para a detecção de IgE específica disponível para a prática clínica, e ser considerado um padrão para este tipo de teste sorológico (Williams et al., 2000).

O grupo de estudo contou com a participação voluntária de 67 profissionais do Laboratório de Herpetologia, Museu Biológico e da Divisão de Produção e Desenvolvimento Tecnológico do Instituto Butantan. A amostra deve ser considerada representativa, pois incluiu 95,7 % dos trabalhadores dessas unidades que cotidianamente tinham contato com a serpente *Bothrops jararaca* ou com o seu veneno. A maioria desses trabalhadores tinha alto grau de escolaridade (67,2 % possuíam nível superior ou pós-graduação), era composta por especialistas (biólogos, médicos veterinários, farmacêuticos, químicos e técnicos de laboratórios compunham 74,4 % dos trabalhadores) e atuava na área de pesquisa (29,5 % dos 67 profissionais tinham carreira de pesquisadores e 35,8 % eram estagiários ou bolsistas ligados às diversas agências de fomento à pesquisa).

Um leve predomínio do sexo feminino (55,2 %) foi observado no grupo. A média das idades de 37,3 anos ($\pm$ 12,3 anos) foi deslocada para baixo devido à presença de um grande número de jovens estagiários (35,8 %) em início de carreira. O mesmo ocorreu com a variável tempo de atividade que teve mediana de 6 anos e intervalo interquartil de 2 a 17 anos. Ao considerar somente os funcionários com vínculo empregatício com a instituição, esses valores se elevam para 44,3 anos ($\pm$ 9,7 anos) e 14 anos (intervalo

interquartil de 7 a 18 anos), respectivamente, o que denota uma baixa rotatividade desses profissionais.

Vinte (29,9 %) dos 67 trabalhadores estudados referiram sintomas alérgicos (e.g., urticária, rinite, conjuntivite, asma ou anafilaxia) quando expostos aos venenos ofídicos. Doze (17,9 %) apresentaram sintomas alérgicos desencadeados pelo veneno de serpente do gênero *Bothrops* (jararacas), nove (13,4 %) pelo veneno de serpente do gênero *Crotalus* (cascavéis), e nove (13,4 %) pelo veneno de serpente do gênero *Micrurus* (corais). A análise destes dados sugere a possibilidade de que alguns trabalhadores possam apresentar hipersensibilidade aos venenos de mais de um gênero de serpente. Isto pode ser o resultado de co-sensibilização (i.e., sensibilização paralela a alérgenos distintos) ou de co-reconhecimento (i.e., sensibilização a moléculas alergênicas oriundas de distintas fontes de alérgenos) (Asero et. al, 2006).

Alguns autores já haviam documentado a possibilidade de haver reação cruzada entre os venenos de diferentes espécies de serpentes. Weiss (1924) observou que cobaias sensibilizadas com venenos de serpentes sul-americanas apresentavam hipersensibilidade aos venenos de espécies relacionadas. Parrish e Pollard (1959) ao realizarem testes alérgicos cutâneos com os venenos de *A. piscivorus* e de *C. adamanteus* em 14 pacientes com história prévia de picada de serpentes da família Viperidae, verificaram que três pacientes com testes alérgicos positivos tinham sido picados por serpentes de espécies diferentes das que foram utilizadas nos testes alérgicos. Mendes e colaboradores (1960), relatando seis casos de

pacientes que se tornaram alérgicos ao veneno botrópico através do manuseio do veneno, observaram um caso com teste cutâneo positivo para o veneno de serpente do gênero *Crotalus* e outro com testes positivos para os venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Lachesis*, sem nunca terem entrado em contato com tais venenos. Alonso e colaboradores (1995) demonstraram parcial inibição do RAST em soro de paciente sensibilizado ao veneno de *Bothrops alternata*, com veneno de *C. durissus terrificus*.

Dos trabalhadores que referiram sintomas alérgicos relacionados com a exposição ao veneno botrópico, nove tinham os seus sintomas desencadeados pela exposição ao veneno em pó. Este é um primeiro indício de que a inalação do veneno liofilizado possa ser uma importante via de sensibilização para esses trabalhadores, além de desencadeante dos sintomas, como veremos mais adiante.

Dos 67 trabalhadores expostos às serpentes do gênero *Bothrops* ou aos seus venenos, em sete foi constatada a presença de anticorpos da classe IgE veneno-específicos através do teste sorológico *ImmunoCAP*, o que resultou numa prevalência de 10,4 % de sensibilização nesse grupo. No entanto, esse valor encontrado pode estar subestimado, não denotando a real dimensão do problema. Uma vez que se trata de um estudo de delineamento transversal, há possibilidade de que alguns trabalhadores sensibilizados não tenham feito parte da amostra por já terem abandonado a atividade devido à gravidade dos sintomas alérgicos relacionados ao trabalho. É o que se denomina de viés de prevalência (Pereira, 1995).

Seis, dos sete trabalhadores sensibilizados, referiram sintomas típicos de reações alérgicas IgE-mediadas quando expostos ao veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, o que estabeleceu o diagnóstico de alergia ao veneno nesses indivíduos. O único que não referiu sintomas desencadeados pela exposição ao veneno botrópico, no entanto, referiu sintomatologia alérgica quando exposto ao veneno de serpente cascavel (gênero *Crotalus*). Este fato sugere a presença de alérgenos comuns aos venenos dos dois gêneros de serpentes, acarretando reações alérgicas cruzadas, hipótese já levantada pelos trabalhos de Mendes e colaboradores (1960) e de Alonso e colaboradores (1995).

Uma associação positiva e significativa foi demonstrada entre a presença de sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno botrópico e a detecção de anticorpos da classe IgE veneno-específicos no soro dos trabalhadores pelo teste *ImmunoCAP* ($p < 0,001$, V de Cramér = 0,60). O nível de significância e o tamanho do efeito obtidos sugerem que este teste, altamente reprodutível e facilmente disponível para uso clínico, possa ser utilizado rotineiramente no diagnóstico de sensibilização e para a monitorização de indivíduos expostos ao veneno de *Bothrops jararaca*.

Foi verificada uma associação positiva e significativa entre o teste *ImmunoCAP* positivo para IgE específica ao veneno de *Bothrops jararaca* e a presença de sintomas alérgicos desencadeados pela exposição ao veneno das serpentes cascavéis ($p = 0,005$, V de Cramér = 0,44), mas não com os sintomas alérgicos desencadeados pelo veneno das serpentes corais ($p =$

0,235, V de Cramér = 0,15). Estes dados novamente sugerem a presença de alérgenos comuns aos venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, ambos pertencentes à família Viperidae, mas não entre os venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Micrurus*, pertencentes às famílias Viperidae e Elapidae, respectivamente.

Os testes alérgicos têm um papel fundamental no diagnóstico das doenças alérgicas. Sem estes testes, o diagnóstico estaria baseado unicamente na história clínica, portanto sujeito à considerável imprecisão, uma vez que muitas outras causas podem explicar os sintomas de rinite, rinoconjuntivite, asma e urticária (Booth, 1997; Johansson, 2002). Os testes cutâneos (teste de puntura e intradérmico) e os testes sorológicos (RAST e testes correlatos) são os mais utilizados na prática clínica. Entretanto, estes testes são capazes unicamente de mostrar que existe a sensibilização ao alérgeno e não provam que este é a causa dos sintomas do paciente. O diagnóstico é estabelecido baseado na associação da história clínica e o resultado do teste alérgico. Os únicos testes que, de forma isolada, definitivamente comprovam o diagnóstico de doença alérgica, são os testes de provocação, não utilizados rotineiramente devido à complexidade de realização e risco de desencadeamento de sintomas alérgicos graves (Johansson, 2002).

Seis dos doze indivíduos que referiram sintomas alérgicos desencadeados pelo contato com a serpente jararaca ou com o seu veneno, apresentaram o teste *ImmunoCAP* negativo. Ou os sintomas apresentados

por estes trabalhadores não tinham origem na hipersensibilidade ao veneno da serpente *Bothrops jararaca* (teste verdadeiramente negativo) ou então, apesar de alérgicos, o teste não foi capaz de realizar o diagnóstico de sensibilização ao veneno (teste falso negativo). A inerente toxicidade do veneno botrópico descartou a possibilidade da realização de um teste de provocação como um meio de saber realmente se a doença alérgica estava ou não presente. Esta ausência de um “padrão ouro” tornou impossível avaliar a exatidão do teste *ImmunoCAP*.

Uma associação positiva e estatisticamente significativa foi observada entre a sensibilização ao veneno de *Bothrops jararaca*, traduzida pela detecção sérica de IgE específica ao veneno pelo teste *ImmunoCAP*, e a referência de sintomas alérgicos de rinite ($p < 0,001$, V de Cramér = 0,54), urticária ($p < 0,001$, V de Cramér = 0,58), conjuntivite ($p = 0,021$, V de Cramér = 0,36), e sintomas asmáticos ($p = 0,003$, V de Cramér = 0,53). Observa-se que, embora significativa, a associação teve um tamanho do efeito menor para o sintoma de conjuntivite, traduzido pelo menor valor do V de Cramér. É provável que em alguns trabalhadores os sintomas de conjuntivite relatados tenham sido provocados pela ação inflamatória local do veneno botrópico (Rosenfeld, 1971; Cardoso et al., 1993) e não por mecanismos IgE-mediados.

A atopia é uma condição caracterizada por uma predisposição hereditária a produzir anticorpos da classe IgE contra alérgenos ambientais comuns e apresentar uma ou mais doenças atópicas (i.e., rinite alérgica, asma e dermatite atópica) (Kay, 2001). Os resultados dos estudos da sua

relação com o risco de desenvolvimento de alergias ocupacionais tem sido conflitantes, talvez devido às diferentes metodologias utilizadas para demonstrar a sua presença (Mapp, 2005). No entanto, ela tem se mostrado um fator predisponente de sensibilização em algumas doenças alérgicas ocupacionais como a sensibilização alérgica ao veneno de himenópteros em apicultores (Anila et al., 1996) e a hipersensibilidade às proteínas de alto peso molecular em trabalhadores expostos aos animais de laboratório e padeiros (Houba et al., 1998; Meijer et al., 2004; Suarthana et al., 2005; Mapp, 2005). A relação entre atopia e a alergia ao veneno botrópico mostrou um nível de significância “*borderline*”, com $p = 0,051$ e V de Cramér = 0,25.

De maneira semelhante, níveis séricos elevados dos anticorpos da classe IgE totais têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento de outros tipos de alergias ocupacionais (Suarthana et al., 2005). A relação entre os níveis séricos dos anticorpos da classe IgE totais maiores que 100 kU/L e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico no grupo de trabalhadores estudados foi significativa ($p = 0,034$), embora com baixo tamanho do efeito (V de Cramér = 0,27).

Utilizando um teste paramétrico de análise de variância de um fator (ANOVA), foi possível demonstrar uma associação entre a presença de sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca* e o tempo total de trabalho na atividade ($p = 0,042$). O tempo total de trabalho pode ser considerado um indicador simples do nível acumulativo de exposição aos alérgenos presentes no ambiente de trabalho. O tempo de exposição tem sido referido como um importante fator predisponente de sensibilização em

outras doenças alérgicas ocupacionais como na hipersensibilidade a proteínas de alto peso molecular em trabalhadores expostos aos animais de laboratório e padeiros (Houba et al., 1998; Suarthana et al., 2005).

Os acidentes decorrentes de picadas de serpentes e os desencadeados pelo contato do veneno com as membranas mucosas se constituem riscos inerentes à atividade dos profissionais que manuseiam serpentes peçonhentas (Pearn et al., 1994; Nishioka et al., 2000). As prevalências destes tipos de acidentes no grupo de trabalhadores estudado foram, respectivamente, 20,9 % e 22,4 % (16,4 % e 11,9 %, ao se considerar somente as serpentes do gênero *Bothrops*). Por outro lado, tais acidentes têm sido apontados como possíveis fatores de riscos para o desenvolvimento da alergia aos venenos ofídicos em algumas descrições de casos clínicos encontradas na literatura (Lounsberry, 1934; Parrish; Pollard, 1959; Hogan; Dire, 1990; Ryan; Caravati, 1994; Alonso et al., 1995; Reimers et al., 2000; Brooks; Graeme, 2004; Prescott; Potter, 2005). Contudo, no presente estudo, não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a ocorrência de acidentes provocados pelas picadas das serpentes do gênero *Bothrops* ($p = 0,323$, V de Cramér = 0,11) ou pelos contatos dos seus venenos com membranas mucosas ($p = 0,193$, V de Cramér = 0,17) e o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico.

A aplicação da técnica de ELISA no estudo de venenos ofídicos tem permitido a identificação e a quantificação de anticorpos anti-veneno da classe IgG nos soros dos pacientes picados pelas serpentes peçonhentas

(Theakston et al., 1977; Theakston, 1983). Os níveis séricos destes anticorpos têm sido detectados a partir de uma semana após o envenenamento, atingindo um pico máximo ao redor de um ano, e sofrendo queda progressiva em cerca de três anos, embora já tenham sido detectados 40 anos após a picada (Reid; Theakston, 1983). Dos dez trabalhadores nos quais foram detectados a presença no soro de anticorpos da classe IgG específicos ao veneno botrópico, apenas quatro tinham sofrido acidentes devido a picadas de serpentes peçonhentas e dois tinham sido vítimas de acidentes provocados pelo contato do veneno com as membranas mucosas, não sendo verificadas associações estatisticamente significativas entre a ocorrência desses acidentes e a presença de títulos séricos de IgG específica ao veneno ($p = 0,091$, V de Cramér = 0,23, e $p = 0,193$, V de Cramér = 0,17, respectivamente). Certamente outras vias de sensibilização, como a via inalatória, devem estar envolvidas no aparecimento desses anticorpos anti-veneno nos soros desses trabalhadores.

Por outro lado, em seis dos sete trabalhadores com teste *ImmunoCAP* positivo ao veneno botrópico, foram detectados a presença de IgG sérica específica ao veneno. Uma correlação positiva e significativa foi observada entre os níveis séricos dos anticorpos IgG (ELISA) e IgE (*ImmunoCAP*) específicos ao veneno botrópico (coeficiente de correlação de Spearman $r_s = 0,70$; $p < 0,001$). Correlações entre os níveis séricos de anticorpos IgG e IgE específicos a venenos ofídicos já tinham sido observados em outros estudos (Wadee et al., 1987; Kopp et al., 1993; Alonso et al., 1995).

A possibilidade de reação alérgica cruzada entre venenos de *Hymenoptera* e venenos ofídicos já foi descrita na literatura. Em um estudo publicado por Reimers e colaboradores (2000), de oito pacientes com histórias de reações alérgicas sistêmicas desencadeadas por picadas de serpentes do gênero *Vipera*, quatro tinham história de reações alérgicas às picadas de *Hymenoptera* e, com uma amostra de soro de um destes, foi comprovada reação cruzada parcial entre os venenos de *Vipera* e de abelha através de ensaios de inibição do RAST. No presente estudo, não foi demonstrado a associação entre a sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca* e IgE sérica positiva específica para venenos de *Hymenoptera* ($p = 0,594$, V de Cramér = 0,018).

A análise das atividades ocupacionais desenvolvidas pelos trabalhadores estudados mostrou que elas podiam ser divididas em 12 tarefas específicas que envolviam o contato direto com a serpente ou com o seu veneno: limpeza de caixa de serpente, alimentação de serpente, manuseio de serpente, extração de veneno, manuseio de veneno líquido, manuseio de veneno em pó, limpeza de sala de cativeiro, fixação de serpente, trabalho de campo, recepção de serpente, limpeza de terrário, e dissecação de serpente. O teste exato de Fisher foi aplicado para determinar se o exercício de alguma dessas tarefas estava relacionada com o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico, mas nenhuma associação significativa foi encontrada.

O próximo passo foi verificar se havia relação entre o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico e a intensidade com que

essas tarefas eram executadas pelos trabalhadores e não simplesmente com o exercício das mesmas, ou seja, os níveis de exposições à serpente ou ao seu veneno, decorrentes do desempenho dessas tarefas. Para tanto foram criados índices de exposições, obtidos pelo produto da frequência pelo tempo de exercício de cada tarefa. Não há estudos na literatura relacionando o desenvolvimento de sensibilização ao veneno ofídico com níveis de exposição às serpentes ou aos seus venenos.

A aplicação do teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney mostrou que os índices de exposições relacionados às tarefas “limpeza de caixa de serpente” ($z = -2,27, p = 0,023$), “manuseio de serpente” ($z = -2,16, p = 0,031$), “extração de veneno” ($z = -1,96, p = 0,049$) e “manuseio de veneno em pó” ($z = -2,45, p = 0,014$) apresentaram associações estatisticamente significativas com o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno botrópico. Observa-se, no entanto, que o índice de exposição relacionado com a tarefa “manuseio de veneno em pó” apresentou maior significância. Este dado está de acordo com alguns casos clínicos descritos na literatura que sugerem o contato direto com o veneno em pó como uma possível via de sensibilização alérgica ao veneno (Barros, 1936; Mendes, 1950, 1952; Stanic, 1956; Parrish; Pollard, 1959; Mendes et al., 1960; Ellis; Smith, 1965; Kelly; Patterson, 1973; Wadee et al., 1987).

Por outro lado, como as doze tarefas ligadas à exposição ocupacional à serpente *Bothrops jararaca* ou ao seu veneno tinham em comum o contato ou o manuseio da serpente, ou então, o contato ou o manuseio de seu veneno, era possível que algumas das variáveis índices de exposições

estivessem relacionadas entre si. Uma análise de componentes principais foi aplicada com o objetivo de obter um número menor de combinações de variáveis, que retivessem o máximo possível das informações contidas nas variáveis originais. Os componentes extraídos foram denominados: “manutenção de serpente em cativeiro”, “manuseio de veneno”, “captura e classificação de serpente”, e “dissecção de serpente”.

Uma análise múltipla de regressão logística foi realizada a partir de um modelo incluindo os quatro componentes obtidos da análise de componentes principais, em lugar das doze variáveis de índices de exposições originais. Ao final do procedimento, o componente de exposição “manuseio de veneno” foi o único que permaneceu no modelo, com significância 0,038 e com estimativa da razão de chances (*Odds Ratio*) = 1,804 (1,032 – 3,153), considerando o intervalo de confiança de 95 %. Este componente havia sido obtido a partir do agrupamento das variáveis originais: “extração de veneno”, “manuseio de veneno líquido”, “manuseio de veneno em pó”, e “manuseio de serpente”. Este modelo sugere, portanto, que as tarefas relacionadas com o contato direto com o veneno da serpente são as que melhor se associaram com o desenvolvimento de sensibilização alérgica ao veneno, no grupo de trabalhadores estudado.

Como este estudo possui delineamento transversal, ou seccional, as análises restringem-se a relações de associações, e não de causalidade (Almeida Filho; Rouquayrol, 1999). Sendo assim, este trabalho permite apenas afirmar que existe uma associação positiva entre o nível de exposição em decorrência do exercício das tarefas relacionadas com o

contato direto com o veneno botrópico, sobretudo o manuseio do veneno em pó, e o desenvolvimento da sensibilização alérgica ao veneno. Para o estabelecimento de relações de causalidade entre possíveis fatores de risco e o desenvolvimento dessa sensibilização alérgica, serão necessários novos estudos do tipo caso-controle ou de coorte.

Após a realização do *Western blotting*, utilizando-se amostras dos soros dos trabalhadores sensibilizados ao veneno de *Bothrops jararaca* (i.e., com teste *ImmunoCAP* positivo para o veneno), observou-se que os anticorpos da classe IgE presentes nos soros dos trabalhadores nº 18 e nº 50 (ambos com *ImmunoCAP* > 100 kU/L) reconheceram diversos componentes do veneno. No entanto, um componente de aproximadamente 32 kDa foi reconhecido com maior intensidade pelas amostras dos dois trabalhadores, podendo ser um dos alérgenos principais presentes no veneno de *Bothrops jararaca*. Naturalmente, isto precisará ser demonstrado num maior número de amostras de soros de trabalhadores sensibilizados.

Diversos componentes do veneno também foram reconhecidos pelos anticorpos da classe IgG presentes nos soros dos trabalhadores números 5, 18, 45, 50 e 60. Estes dados confirmam a existência de diferentes componentes imunogênicos no veneno de *Bothrops jararaca*, conforme já descrito na literatura (Theakston et al., 1977; Theakston, 1983). No entanto, uma vez que somente o trabalhador nº 50 havia sido picado por serpente peçonhenta, novamente fica clara a possibilidade de ocorrência de sensibilização ao veneno através de outras vias, como a inalatória ou a cutâneo-mucosa.

Recentemente, técnicas de análises proteômicas têm sido empregadas no estudo da complexidade e diversidade dos venenos ofídicos através de eletroforese bidimensional seguida de identificação das proteínas pela análise dos aminoácidos e/ou seqüenciamento de Edman (Serrano et al., 2005). Por outro lado, a aplicação destas técnicas na pesquisa em alergia tem permitido a rápida identificação de novas moléculas alergênicas (Crameri, 2005). Portanto, a análise proteômica poderá ser uma alternativa interessante para a identificação dos alérgenos presentes no veneno de *Bothrops jararaca*.

Utilizando-se amostras dos soros dos trabalhadores nº 18 e nº 50, foram realizados os ensaios de inibição do *ImmunoCAP* com os venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus durissus*. As curvas de inibições obtidas com o veneno botrópico confirmaram a especificidade do teste *ImmunoCAP*. Já as curvas obtidas com a inibição do teste com o veneno crotálico, que mostraram uma inibição parcial do teste *ImmunoCAP* para o veneno botrópico pelo veneno crotálico, sugerem a existência de uma reação cruzada entre os venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus durissus*, ambas pertencentes à família Viperidae. Estes resultados novamente reforçam os achados de Mendes e colaboradores (1960) e de Alonso e colaboradores (1995), que levantaram a possibilidade de reações alérgicas cruzadas entre os venenos desses dois gêneros de serpentes.

Finalmente, a extrema toxicidade do veneno botrópico provavelmente torna inviável o tratamento dos trabalhadores sensibilizados através da

imunoterapia, da forma como é realizada para o tratamento dos pacientes alérgicos às picadas de *Hymenoptera* (Wadee et al., 1987; Kopp et al., 1993; Golden, 2005). Sendo assim, a inexistência de um tratamento de dessensibilização eficaz e seguro deixa clara a importância das medidas de vigilância médica e de prevenção à exposição ocupacional aos venenos ofídicos no ambiente de trabalho. Os trabalhadores reconhecidamente portadores de alergia aos venenos ofídicos devem ser encorajados a evitar qualquer futuro contato com as serpentes ou os seus venenos. Caso isto não seja possível, eles devem ser orientados quanto às medidas preventivas de exposição (uso de equipamentos de proteção individual como luvas, botas, aventais, gorros, óculos e máscaras apropriadas), conscientizados quanto à possibilidade de reações alérgicas graves, como a anafilaxia, e treinados a utilizar kits de auto-administração de adrenalina (Brooks; Graeme, 2004).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Este estudo sugere que:

- 1) O veneno de *Bothrops jararaca* pode ser considerado uma fonte potencial de alérgenos para o desenvolvimento de alergia ocupacional em trabalhadores que manuseiam a serpente ou o seu veneno;
- 2) A prevalência da sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca*, neste grupo de trabalhadores, é da ordem de 10,4 %;
- 3) Os níveis séricos elevados de IgE total (> 100 kU/L), o tempo de exposição ocupacional à serpente ou ao seu veneno, o exercício de tarefas relacionadas com o manuseio do veneno, sobretudo o manuseio do veneno em pó, e, provavelmente, a história pessoal de atopia, são fatores preditores associados ao desenvolvimento da sensibilização alérgica ao veneno de *Bothrops jararaca*;
- 4) Um mecanismo de hipersensibilidade IgE-mediado está envolvido na gênese dessa sensibilização ao veneno botrópico;
- 5) A sensibilização alérgica ao veneno botrópico potencialmente pode induzir reações alérgicas cruzadas com o veneno crotálico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Hipersensibilidade imediata. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Imunologia celular e molecular*. 5a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.445-65.

Ahern DJ, Robinson DS. Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:531-6.

Ahlstedt S. Understanding the usefulness of IgE blood tests in allergy. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:11-6.

Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. Elementos de metodologia epidemiológica. In: Almeida Filho N, Rouquayrol MZ. *Epidemiologia e Saúde*. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 149-177.

Alonso A, Scavini LM, Marino GA, Rodríguez SM. IgE antibodies against snake venoms. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1995;5:31-4.

Annala IT, Karjalainen ES, Annala PA, Kuusisto PA. Bee and wasp reactions in current beekeepers. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1996;77:423-7.

Asero R, Wopfner N, Gruber P, Gadermaier G, Ferreira F. *Artemísia* and *Ambrósia* hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? *Clin Exp Allergy*. 2006;36:658-65.

Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. 1986;24:943-6.

Bardana EJ. Occupational asthma and allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:S503-39.

Barros EF. Contribuição ao conhecimento da hyper-sensibilidade ao veneno ophidico. *Bras Med*. 1936;50:243-6.

Bennich H, Ishizaka K, Johansson SGO, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull World Health Organ*. 1968;38:151-2.

Bieber AL. Metal and. nonprotein constituents in snake venoms. In: Lee CY, editor. *Snake venoms*. Berlin: Springer; 1979. p.295-306.

Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:93-104.

Booth BH. Diagnosis of immediate hypersensitivity. In: Patterson R, Grammer LC, Greenberger PA, editores. *Allergy Diseases*. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p.167-81.

Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8:93-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Brooks DE, Graeme KA. Airway compromise after first rattlesnake envenomation. *Wilderness Environ Med*. 2004;15:188-93.

Cardoso JLC, Fan HW, Franca FOS, Jorge MTS, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, Chudzinski AM, Castro SCB, Kamiguti AS, Kelen EM, Hirata MH, Mirandola RM, Theakston RD, Warrell DA. Randomised comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bohrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med*. 1993;86:315-25.

Cohen SG. The pharaoh and the wasp. *Allergy Proc*. 1989;10:149-51.

Cohen SG, Zelaya-Quesada M. Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:331-6.

Cohen SG, Zelaya-Quesada M. Prausnitz and Küstner phenomenon: The P-K reaction. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:705-10.

Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ*. 1998;75:515-24.

Chippaux JP, Williams V, With J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29:1279-303.

Cramer R. The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. *Allergy*. 2005;60:1227-37.

Cury Y, Teixeira CF, Sudo LS. Edematogenic responses induced by Bothrops jararaca venom in rats: role of lymphocytes. *Toxicon*. 1994;32:1425-31.

Daltry JC, Wüster W, Thorpe D. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 1996;379:537-40.

Dolen WK. IgE antibody in the serum – detection and diagnostic significance. *Allergy*. 2003;58:717-23.

Elliott L, Heederik D, Marshall S, Peden D, Loomis D. Incidence of allergy and allergy symptoms among workers exposed to laboratory animals. *Occup Environ Med.* 2005;62:766-71.

Ellis EF, Smith RT. Systemic anaphylaxis after rattlesnake bite. *JAMA.* 1965;193:151-2.

Erwin EA, Custis NJ, Satinover SM, Perzanowski MS, Woodfolk JA, Crane J, Wickens K, Platts-Mills TAE. Quantitative measurement of IgE antibodies to purified allergens using streptavidin linked to a high-capacity solid phase. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1029-35.

Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meir J, White J, editores. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons.* Florida: CRC Press; 1995. p.667-88.

Farsky SHP, Antunes E, Mello SBV. Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4:401-11.

Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Curry Y, Teixeira CF. Leucocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon.* 1997;35:185-93.

França FOS, Barbaro KC, Fan HW, Cardoso JLC, Sano-Martins IS, Tomy SC, Lopes MH, Warrell DA, Theakston RDG & Butantan Institute Antivenom Study Group. Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity on admission to hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:312-7.

Frangides C, Kouni S, Niarchos C, Koutsojannis C. Hypersensitivity and Kounis syndrome due to viper bite. *Eur J Intern Med.* 2006;17:215-6.

Gautrin D, Desrosiers M, Castano R. Occupational rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6:77-84.

Gold BS, Dart RC, Barish RA. Bites of venomous snakes. *N Engl J Med.* 2002;347:347-56.

Golden DBK. Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:439-47.

Gutiérrez JM. Clinical toxicology of snakebites in Central America. In: Meir J, White J, editores. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons.* Florida: CRC Press; 1995. p.645-65.

Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PloS Med.* 2006;3:727-31.

Hamilton RG. Diagnostic methods for insect sting allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4:297-306.

Hamilton RG, Adkinson NF. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:S687-701.

Hamilton RG, Adkinson NF. *In vitro* assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:213-25.

Heederik D, Venables KM, Malmberg P, Hollander A, Karlsson AS, Renstrom A, Doekes G, Nieuwenhijzen M, Gordon S. Exposure-response relationship for work-related sensitization in workers exposed to rat urinary allergens: results a pooled study. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:678-84.

Hogan DE, Dire DJ. Anafilactic shock secondary to rattlesnake bite. *Ann Emerg Med.* 1990;19(7):814-6.

Houba R, Doekes G, Heederik D. Occupational respiratory allergy in bakery workers: a review of the literature. *Am J Ind Med.* 1998;34:529-46.

Instituto Butantan [página da Internet]. São Paulo: Instituto Butantan. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2006 [citado 6 mar 2007]. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br>.

Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*. 1967;99:1187.

Jeebhay MF, Quirce S. Occupational asthma in the developing and industrialized world: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:122-33.

Johansson SG, Bennich H. Immunoglobulin studies of atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*. 1967;13:381-94.

Johansson SG. Milestones in understanding allergy and its diagnosis. *Clin Exp All Rev*. 2002;2:2-7.

Johansson SG. ImmunoCAP® Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(3):273-9.

Johansson SG. The discovery of immunoglobulin E. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27(2Suppl1):53-6.

Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45:1041-9.

Kamiguti AS, Sano-Martins IL. South American snake venoms affecting haemostasis. *J Toxicol-Toxin Rev.* 1995;14:359-74.

Kamiguti AS, Theakston RDG, Desmond H, Hutton H. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* 1991;29:1097-105.

Kay AB. Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2001;344:30-7.

Kay AB. The cells and mediators of allergic inflammation. *Clin Exp All Rev.* 2002;2:8-12.

Kay AB. 100 years of 'Allergy': can von Pirquet's word be rescued? *Clin Exp Allergy.* 2006;36(5):555-9.

Kelly JF, Patterson R. Allergy to snake venom: the use of radioimmunoassay for the detection of IgE antibodies against not suitable for cutaneous tests. *Clin Allergy.* 1973;3:385-8.

Kirkland G. Snake venom allergy. *Med J Aust.* 1990;153:570-1.

Kopp P, Dahinden CA, Müllner G. Allergic reaction to snake venom after repeated bites of *Vipera aspis*. *Clin Exp Allergy.* 1993;23:231-2.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Lafaille MAC, Lafaille JJ. The role of regulatory T cells in allergy. *Springer Semin Immunopathol*. 2004;25:295-310.

Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:761-71.

Liccardi G, D'Amato G, Canonica GW, Salzillo A, Piccolo A, Passalacqua G. Systemic reactions from skin testing: literature review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006;16:75-8.

Lounsberry CR. Rattlesnake anaphylaxis associated with dermatitis. *Arch Derm Syphilol*. 1934;29:658-67.

Ludy JM. Allergy from animal emanations. *Wekly Roster Med Dig*. 1926;22:28.

Mapp CE. Genetics and the occupational environment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:113-8.

Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:280-305.

Mebis D. *Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists, physicians and pharmacists*. New York: CRC Press; 2002. p.1-18: An introduction to toxinology.

Meijer E, Grobbee DE, Heederik D. A strategy for surveillance in laboratory animal workers exposed to high molecular weight allergens. *Occup Environ Med*. 2004;61:831-7.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Malaque CMS, Haddad V, organizadores. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.33-61.

Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo ACM, Serrano SMT. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen othrops *jararaca* siblings. *Toxicon*. 2006;47:304-12.

Mendes E. Alergia ao veneno botrópico e crotálico. *Hospital (Rio J)*. 1950;38:175-7.

Mendes E. Snake venom Allergy. *JAMA*. 1952;29:1328.

Mendes E, Cintra AU, Corrêa A. Allergy to snake venoms. *J Allergy*. 1960;31:68-73.

Mendes R. Aspectos históricos da patologia do trabalho. In: Mendes R, organizador. *Patologia do trabalho*. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 1995. p.3-31.

Monteiro RQ, Yamanouye N, Carlini CR, Guimarães JÁ, Bom C, Zingai RB. Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual *jararaca* (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. *Toxicon*. 1998;36:153.

Moura-da-Silva AM, Della-Casa MS, David AS, Assakura MT, Butera D, Lebrun I, Shannon JD, Serrano SMT, Fox JW. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem*. 2003;409:395-401.

Müller UR. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:299-303.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost*. 1979;41:314-28.

Nieuwenhuijsen MJ, Heederik D, Doekes G, Venables KM, Newman Taylor AJ. Exposure-response relations of alpha-amylase sensitisation in British bakeries and flour mills. *Occup Environ Med*. 1999;56:197-201.

Nieuwenhuijsen MJ, Putcha V, Gordon S, Heederik D, Venables KM, Cullinan P, Newman-Taylor AJ. Exposure-response relations among laboratory animal workers exposed to rats. *Occup Environ Med*. 2003;60:104-8.

Nishioka SA, Silveira PVP, Peixoto-Filho FM, Jorge MT, Sandoz A. Occupational injuries with captive lance-headed vipers (*Bothrops moojeni*): experience from a snake farm in Brazil. *Trop Med Int Health*. 2000;5:507-10.

Oppenheimer J, Nelson HS. Skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96:S6-12.

Parrish HM, Pollard CB. Effects of repeated poisonous snakebites in man. *Am J Med Sci*. 1959;20:257-86.

Phadia AB [homepage on the Internet]. Portage: Phadia US Inc.; c 2006 [updated 2006 Feb 23; cited 2007 Jul 12]. ImmunoCAP® Specific IgE Methodology; Available from: http://www.phadia.us/dia_templates/page_2698.aspx#.

Pearn JH, Covacevich J, Charles N, Richardson P. Snakebite in herpetologists. *Med J Aust.* 1994;161:706-8.

Peck SM. Sensitization and desensitization in man with snake venom (*Ancistrodon piscivorus*). *Arch Derm Syphilol.* 1993;27:312-5.

Pereira MG. Estrutura, vantagens e limitações dos principais métodos. In: Pereira MG. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1995. p. 289-306.

Prausnitz C, Küstner H. Studies on hypersensitivity. In: Gell PGH, Coombs RRA, editors. *Clinical aspects of immunology*. 2a. ed. Oxford, England: Blackwell Scientific; 1963. p. 1298-306.

Prescott RA, Potter PC. Hypersensitivity to airborne spitting cobra snake venom. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;94:600-3.

Rage JC. Origin and evolution of snakes. In: Bauchot R, editor. *Snakes, A Natural History*. New York: Sterling Publishing Co. Inc.; 1994. p.193-237.

Ramirez MA. Horse asthma following blood transfusion. Report of a case. *JAMA.* 1919;73:984.

Reid HA, Theakston RDG. The management of snake bite. *Bull World Health Organ.* 1983;61:885-95.

Reimers AR, Weber M, Müller UR. Are anaphylactic reactions to snake bites immunoglobulin E-mediated? *Clin Exp Allergy.* 2000;30:276-82.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Burchel W, Buckley EE, Deulofeu V, editores. *Venomous animals and their venoms.* New York: Academic Press; 1971. p.345-84.

Russel FE. Toxic effects of terrestrial animal venoms and poisons. In: Klaassen CD, editor. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* 6a. edição. New York: McGraw-Hill Co. Inc.; 2001. p.945-64.

Ryan KC, Caravati EM. Life-threatening anaphylaxis following envenomation by two different species of Crotalidae. *J Wilderness Med.* 1994;5:263-8.

Saldarriaga M, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon.* 2003;42:405-11.

Sarti W. Asma ocupacional. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1997;30:383-91.

Schmutz J, Stahel E. Anaphylactoid reactions to snakebite. *Lancet*, 1985;7:1306.

Serrano SMT, Shannon JD, Wang D, Camargo ACM, Fox JW. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*. 2005;5:501-10.

Slavin RG. The allergist and the workplace: occupational asthma and rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2005;26:255-61.

Stanic M. Allergenic properties of venom hypersensitiveness in man and animals. In: Buckley E, Pargès N, editores. *Venoms*. Washington: American Association for the Advancement of Science; 1956. p.181-8.

Stock P, DeKruyff H, Umetsu D. Inhibition of allergic response by regulatory T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6:12-16.

Suarthana E, Vergouwe Y, Nieuwenhuijsen M, Heederik D, Grobbee DE, Meijer E. Diagnostic model for sensitization in workers exposed to occupational high molecular weight allergens. *Am J Ind Med*. 2005;48:168-74.

Swinny B. Hypersensitiveness to cobra venom. *Urol Cutaneous Rev*. 1941;45:200-1.

Theakston RDG. The application of immunoassay techniques, including enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*. 1983;21:341-52.

Theakston RDG, Lloyd-Jones MJ, Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody. *Lancet*. 1977;24:639-41.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:4350-4.

Vital Brazil. A defesa contra o ophidismo. 1a. ed. São Paulo: Pocai & Weiss; 1911.

Vital Brazil O. Peçonhas. In: Corbett CE, organizador. *Farmacodinâmica*; 1982. p.1044-74.

Von Pirquet C. Allergy. In: Gell PGH, Coombs RRA, editores. *Clinical aspects of immunology*. 2a. ed. Oxford, England: Blackwell Scientific; 1963. p. 1295-7.

Wadee AA, Rabson AR, Path MCR. Development of specific IgE antibodies after repeated exposure to snake venom. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;80:695-8.

Walusiak J. Occupational upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006;6:1-6.

Warrell DA. Snake bite in five continents. In: Bunch C, editor. *Horizons in Medicine.* London, England: Baillière Trindall; 1989. p.106-14.

Warrell DA. Venomous bites and stings in the tropical world. *Med J Aust.* 1993;159:773-9.

Weiss VN. Anaphylaxie par les venins serpents sud-américains. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1924;91:24-5.

Wide L, Bennich H, Johansson SGO. Diagnosis of allergy by an *in vitro* test for allergenic antibodies. *Lancet.* 1967;2:1105.

Williams BB, Barnes JH, Szeinbach SL, Sullivan T. Analytical precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:1221-30.

WHO. Progress in the characterization of venoms and standartization of antivenoms. *WHO Offset Publication*. Geneva: WHO; 1981.

Yunginger JW, Adolphson CR, Gleich GJ. Technical performance and clinical use of the RAST inhibition assay. *J Clin Immunoassay*. 1983;6:155-9.

Zeiss R, Pruzansky JJ. Immunology of IgE-mediated and other hypersensitivity states. In: Patterson R, Grammer LC, Greenberger PA, editores. *Allergy Diseases*. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p.27-39.

Zingali RB, Carlini CR, Franscischetti IM, Guimarães JA. Bothrops jararaca snake venom: effects on platelet aggregation. *Thromb Res*. 1990;58:303-16.

Zozaya J, Stadelman RE. Hypersensitiveness to snake venom proteins. A case report. *Bull Antivenin Inst Am*. 1930;3:93-5.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ RG nº _____ ,
convidado a participar do estudo “*MANIFESTAÇÕES ALÉRGICAS AOS VENENOS OFÍDICOS COMO MOLÉSTIA OCUPACIONAL EM HERPETOLOGISTAS*”, fui informado que:

- O estudo tem por objetivo caracterizar os quadros de alergia aos venenos ofídicos que ocorrem entre os trabalhadores que estão expostos às serpentes peçonhentas e/ou aos seus venenos, durante sua atividade laboral, tentando esclarecer quais os fatores de risco que estão envolvidos no aparecimento deste tipo de alergia;
- Será coletado sangue em quantidade de, no máximo, 20 ml. O material será utilizado para avaliar a existência de sensibilidade aos venenos ofídicos e a outros alérgenos comuns que podem causar alergia como ácaros, fungos, polens, epitélios de animais (gato e cão) e venenos de insetos (abelha, vespa e formiga). Serei devidamente informado dos resultados dos exames e o material não deverá ser utilizado para outra finalidade que não seja exclusivamente desta pesquisa;
- Meu nome e meus dados pessoais somente serão utilizados com finalidade de pesquisa, não sendo permitida minha identificação em nenhuma publicação ou encontro científico;
- Caso decida abandonar o estudo, nenhuma penalidade será aplicada pois minha participação é totalmente voluntária.

Assim sendo, concordo em participar do estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____

ANEXO II

A Imunologia
17 / 03 / 2004
Eliana Costa Ponte
.....
ELIANA COSTA PONTE
Secretária do Departamento de Clínica
Médica da FMUSP

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.03.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1039/03, intitulado: "Manifestações alérgicas aos venenos ofídicos como moléstia ocupacional em herpetologistas" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro

Pesquisador(a) Executante: Dr. Carlos Roberto de Medeiros

CAPPesq, 10 de Março de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

QUESTIONÁRIO

[illegible]

1. Identificação		
Nome:		
Data de Nascimento:	Idade: anos	
Sexo: [] feminino [] masculino		
Profissão:		
Escolaridade:	[] 1º grau incompleto	[] 1º grau completo
	[] 2º grau incompleto	[] 2º grau completo
	[] superior incompleto	[] superior incompleto
	[] pós-graduando	[] pós-graduado

2. Dados funcionais	
Cargo (ou função):	
Data de admissão:	Tempo de atividade: anos
Local de trabalho:	☐ Laboratório de Herpetologia – Venenos
	☐ Laboratório de Herpetologia – Coleção
	☐ Museu Biológico
	☐ Produção

3. História pessoal de atopias	
(1) Você tem/teve rinoconjuntivite alérgica?	[] Sim [] Não
(2) Você tem/teve asma?	[] Sim [] Não
(3) Você tem/teve dermatite atópica?	[] Sim [] Não

4. História ocupacional		
Tarefa específica	Frequência (/sem)	Tempo total (anos)
Limpeza de caixa de serpente		
Alimentação de serpente		
Manuseio de serpente		
Extração de veneno		
Manuseio de veneno líquido		
Manuseio de veneno em pó		
Limpeza de sala de cativieiro		
Fixação de serpente		
Trabalho de campo		
Recepção de serpente		
Limpeza de terrário		
Dissecção de serpente		

5. Acidentes por picadas ou espirrar veneno em mucosas	
(1) Picada de serpente peçonhenta	[] <i>Bothrops</i>
	[] <i>Cotralus</i>
	[] <i>Micrurus</i>
	[] outras
(2) Espirrar veneno em mucosas	[] <i>Bothrops</i>
	[] <i>Cotralus</i>
	[] <i>Micrurus</i>
	[] outras

6. Sintomas alérgicos relacionados à exposição ao veneno ofídico																				
Sintoma	Tipo de exposição																			
	Contato com mucosas				Contato com a pele				Inalação do veneno em pó				Inalação do veneno líquido				Picada de serpente			
	veneno				veneno				veneno				veneno				veneno			
	B	C	M	O	B	C	M	O	B	C	M	O	B	C	M	O	B	C	M	O
A																				
B																				
C																				
D																				
E																				

Sintomas: (A) Rinite; (B) Conjuntivite; (C) Asmáticos; (D) Cutâneos;

(E) Anafilaxia.

Veneno: (B) *Bothrops*; (C) *Cotralus*; (M) *Micrurus*; (O) outras.

7. Resultados dos exames laboratoriais			
IgE total =		IgG total =	
<i>ImmunoCAP</i>	Alérgeno	kU/L	Classe
	Hx2		
	Ex1		
	Mx1		
	RD201		
	K82		
	I1		
	I4		
	I70		
	<i>Bothrops jararaca</i>		
ELISA para IgG		<i>Bothrops jararaca</i>	Título =