

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA OFICIAL
IN VIVO E DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA DE INIBIÇÃO DA
CITOTOXICIDADE *IN VITRO* PARA A
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO SORO
ANTIBOTRÓPICO**

HUMBERTO PINHEIRO DE ARAÚJO

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr^a Isabella Fernandes Delgado
Dr. Saulo Cabral Bourguignon

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Avaliação da metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade *in vitro* para a determinação da potência do soro antibotrópico.

Autor: Humberto Pinheiro de Araújo

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado:

Prof. _____ (INMETRO)
Dr Elói de Souza Garcia

Prof. _____ (UFF)
Dr Marcelo Salabert Gonzáles

Prof. _____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dr^a Isabella Fernandes Delgado (INCQS)

Orientadores: _____ (INCQS)
Dr^a Isabella Fernandes Delgado

_____ (UFF)
Dr. Saulo Cabral Bourguignon

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Humberto Pinheiro de.

Avaliação da metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade *in vitro* para a determinação da potência do soro antibotrópico. / Humberto Pinheiro de Araújo. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008.

Xviii 211p.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientadores: Isabella Fernandes Delgado e Saulo Cabral Bourguignon.

1. soro antibotrópico. 2. soro anticrotálico. 3. determinação da potência. 3. padrões de referência. 4. potência *in vitro*. 5. inibição da citotoxicidade. I. Título

*Tissue and cell
Do very well
When we are asking what a trace meant;
Often we find
Tests are designed
Better than ever with replacement
Never, never, never, never,
Never forget **replacement**.*

*Where a will is there's a way,
Every rat can have his day,
New discoveries every week
Serve to promote humane technique.*

*No heedless waste
If we've embraced
Proper statistical construction;
When we prepare
Optimum care,
We can achieve the most reduction.
Never, never, never, never,
Never forget **reduction**.*

*Take statistics in your stride,
Waste not want not be your guide,
Minimum numbers always seek;
Thriftiness means humane technique.*

*Science's gain,
Objects humane,
Always are in complete alignment.
Both for success
Must avoid stress,
Both of them benefit from refinement.
Never, never, never, never,
Never forget **refinement** .*

*When conditions are most refined,
Healthy body and healthy mind,
That is when science is at its peak,
Building upon humane technique.*

William M. S. Russel, Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Bologna, 1999.

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas do INCQS que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Soros Antipeçonhentos do Laboratório de Vacinas Bacterianas e Soros Hiperimunes do Departamento de Imunologia, Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias, Carlyne Dias Campos (PROVOC), Dalvim Pereira dos Anjos, Elizabeth Porto Reis Lucas, Ivani Cútis dos Santos, Maria Aparecida Affonso Boller e Tainá Martins Cunha (PROVOC), cuja participação, como amigos e profissionais, foi fundamental para realização deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Cultura de Células, do Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, Anna Christina Rosa Guimarães, Dário Freitas da Silva, Deuse de Fátima Dionísio Araújo, Patrícia dos Santos Alves, pela constante colaboração e fornecimento de células de altíssima qualidade.

Aos Doutores Isabella Fernandes Delgado e Saulo Cabral Bourguignon, pela amizade, comentários, críticas e sugestões que tanto enriqueceram este trabalho.

Ao colega Wlamir Correa de Moura, pela elaboração da planilha de cálculos para o teste de Probitos, assim como pelas estimulantes discussões e troca de informações, principalmente sobre avaliações estatísticas, validações, estabelecimento e avaliação de padrões de referência.

RESUMO

Este estudo buscou fazer um diagnóstico da situação atual da determinação da potência do soro antiofídico e anticrotálico no Brasil, assim como propor e avaliar materiais de referência e metodologias alternativas (potência relativa e inibição da citotoxicidade *in vitro*) à metodologia oficial, com o objetivo de melhor avaliar a qualidade do soro antiofídico utilizado no Brasil.

Entre os anos de 2000 e 2006 o INCQS analisou 619 lotes de soros antiofídicos. Neste período, oito lotes foram considerados insatisfatórios (1,29%). O desempenho dos Padrões de Referência foi avaliado pela determinação da repetibilidade e da reprodutibilidade através do Coeficiente de Variação (CV). A repetibilidade para o lote BRA/BOT/04 foi de 16,57%, para BRA/BOT/05 de 13,17%, para BRA/CROT/01 de 31,82% e para BRA/CROT/02 de 17,36%. Em um estudo interlaboratorial foi avaliada a reprodutibilidade da DL₅₀ do lote BRA/BOT/05 (CV = 16,76%) e a repetibilidade, que variou entre 7,48% e 10,88% nos diferentes laboratórios. A correlação de Pearson entre as determinações da potência dos soros antiofídicos feitas pelo INCQS e laboratórios produtores foi de 0,286 o que é considerada uma correlação regular, a correlação das determinações da potência dos soros anticrotálicos foi de 0,002 o que é considerado insatisfatório. Nenhum dos venenos de referência apresentou perda de potência significativa nas condições ideais de armazenamento, demonstrando a boa estabilidade destas preparações. O soro BRAantiBot/01 apresentou uma potência de 6,62 mg/mL, com CV de 11%. A correlação de Pearson entre os valores obtidos pelas metodologias de potência relativa e absoluta foi de 0,785, o que é considerado como uma boa correlação.

Foi desenvolvida uma metodologia *in vitro* para a determinação da atividade citotóxica do veneno de *B. jararaca* e do soro antiofídico em células VERO. Esta metodologia se propõe como uma alternativa ao ensaio de letalidade em camundongos, metodologia oficial vigente.

O valor da DC_{t50} do veneno BRABOT/05 foi de 2,92 ug/mL. A precisão interensaios para as determinações da DL₅₀ pelo método dose Citotóxica 50% *in vivo* apresentou um CV de 12,27% enquanto que para as determinações *in vitro* da DC_{t50} o CV foi de 7,19%. A correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelas duas metodologias foi de 0,96, o que é considerado uma correlação excelente. A potência de BRAantiBOT/01 pelo método *in vitro* foi de 3.092,6 mg/mL. A repetibilidade apresentou um CV de 56,81%.

Neste trabalho foi proposto que a potência do soro antiofídico seja expressa em Unidades Neutralizantes (UN) e que cada UN corresponda à capacidade de 1 mL de soro antiofídico neutralizar 1 mg de Veneno Botrópico de Referência.

ABSTRACT

This study aims to make a diagnosis of the potency evaluation of bothropic and crotalic antivenoms in Brazil, as well as evaluate the performance of reference materials and alternatives (relative potency and *in vitro* cytotoxicity inhibition) to the pharmacopeic methods trying to improve the quality of antivenoms used in Brazil.

Between 2000 and 2006, 619 lots of antivenoms were tested at INCQS. In this period, eight lots were unsatisfactory (1.29%). The Reference Standards performance was evaluated through the Coefficient of Variation (CV). The repeatability for the lot BRA/BOT/04 was 16.7%, for BRA/BOT/05 was 13.7%, for BRA/CROT/01 was 31.2% and for BRA/CROT/02 was 17.36%. The reproducibility for LD₅₀ determinations of BRABOT/05 was evaluated through an interlaboratorial study and the CV was 16.76%, the repeatability varied between 7.48% and 10.88% in the participant laboratories.

The correlation between the potency determinations for bothropic antiserum done by INCQS and manufacturers was 0.286, which is considered fair. The correlation for crotalic antiserum was 0.002 what is considered unsatisfactory. No one of the Reference Venoms lose potency significantly, giving evidence of a good stability profile in shelf conditions. The antiserum BRAantiBot/01 had a potency of 6.62 mg/mL, with a CV of 11%. The correlation between the values obtained through the methodologies of relative and absolute potency was 0.785, which is considered a good correlation.

We also developed an *in vitro* methodology for the determination of the cytotoxic activity of *B. jararaca* venom and bothropic antivenom on VERO cells. This method is proposed as an alternative to the mice lethality test, the official methodology in vigour.

The CtD₅₀ of the reference venom BRABOT/05 was 2,92 ug/mL. The inter-assay precision for the LD₅₀ (*in vivo* method) had a CV of 12.27%, while for the *in vitro* method (CtD₅₀) the CV was 7.19%. The correlation between the results obtained by the two methods was 0.96, which is considered an excellent correlation. The potency of BRAantiBOT/01 obtained through the *in vitro* method was 3,092.6 mg/mL. The repeatability of this method has a CV of 56.81%.

In this work, we propose that the bothropic antivenom potency should be expressed in Neutralizing Units (NU) and that each NU correspond to the ability of 1 mL of antivenom to neutralize 1 mg of Bothropic Reference Venom.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BRABOT – Veneno Botrópico de Referência Nacional
BRAantiBOT – Soro Antibotrópico de Referência Nacional
CGPNI – Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
CBB R-250 - Coomassie Brilliant Blue R-250 (Corante Azul de Coomassie)
CPPI – Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos
CtD₅₀ – Cytotoxic Dose 50%
CV – Coeficiente de Variação
DCt₅₀ – Dose Citotóxica 50%
DE₅₀ – Dose Efetiva 50%
DI₅₀ – Dose Inibitória 50%
DL₅₀ – Dose Letal 50%
DO – Densidade Ótica
ECVAM – European Centre for the Validation of Alternative Methods (Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos)
Fab – Antigen Binding Fragment (Fragmento de Ligação ao Antígeno)
F(ab')₂ – Bivalent Antigen Binding Fragment (Fragmento de Ligação ao Antígeno Bivalente)
Fc – Fração Cristalizável (imunoglobulina)
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
FUNED – Fundação Ezequiel Dias
gCV – Coeficiente de Variação Geométrico
Hab - Habitantes
IB – Instituto Butantan
IBEx – Instituto de Biologia do Exército
ID₅₀ – Inhibitory Dose 50%
IgG – Imunoglobulina G
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP - Intraperitoneal
IQUIGO – Indústria Química do Estado de Goiás
IVB – Instituto Vital Brazil

K-S – Teste de Kolmogorov-Smirnov
LAL – Limulus Amebocyte Lisate
LD₅₀ – Lethal dose 50%
MS – Ministério da Saúde do Brasil
OECD - Organization for Economic Cooperation and Development
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS – Organização Pan Americana de Saúde
PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
PL – Projeto de Lei
POP – Procedimento Operacional Padronizado
SAB – Soro Antibotrópico
SABC – Soro Antibotrópico-crotálico
SABL – Soro Antibotrópico –laquélico
SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia
SE-HPLC – Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Exclusão Molecular)
SFB – Soro Fetal Bovino
SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade
SINITOX – Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
SNABS – Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde
SUS – Sistema Único de Saúde
SVMP – Snake Venom Metalloproteinases (Metaloproteinases de Venenos de Serpentes)
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil
TC – Tempo de Coagulação
TNF – Fator de Necrose Tumoral
UN - Unidades Neutralizantes
WHO – World Health Organization

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
Introdução	01
1. Epidemiologia	01
2. Clínica do envenenamento Botrópico	08
3. Soroterapia	12
4. Produção de Soros Antiofídicos	16
5. Controle da Qualidade dos Soros Antiofídicos	20
6. Progressos no Controle da Qualidade de Soros Antiofídicos	24
7. Métodos alternativos <i>in vitro</i> para a determinação da potência de Imunobiológicos	26
Justificativa	34
Objetivos	35
Primeira Etapa: Avaliação da metodologia analítica oficial para a determinação da potência dos venenos botrópico e crotálico e dos soros antibotrópico e anticrotálico ..	36
Métodos	36
1. Controle da Qualidade de Soros Antipeçonhentos	36
2. Monografias da Farmacopéia Brasileira para o Soro Antibotrópico e Soro Anticrotálico (4ª edição, fascículo 5, parte II)	36
2.1. Soros Hiperimunes Para Uso Humano (<i>Immunosera ad usum humanum</i>)	36
2.1.1. Identificação	37
2.1.2. Testes de segurança biológica	37
2.1.3. Determinação da potência	38
2.2. Soro Antibotrópico (<i>Immunoserum bothropicum</i>)	38
2.2.1. Determinação da potência	38
2.3 Soro Anticrotálico (<i>immunoserum crotalicum</i>)	39

2. Procedimentos Operacionais Padronizados para a determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀) e da Dose Efetiva 50% (DE ₅₀)	40
3.1. Determinação da Dose Letal 50% do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Bothrops jararaca</i> – <i>in vivo</i>	40
3.1.1. Procedimentos	40
3.1.2. Critérios para validação do ensaio	41
3.1.3. Cálculos	41
3.2. Ensaio de Potência para o Soro Antibotrópico – <i>in vivo</i>	41
3.2.1. Procedimentos	41
3.2.2. Critérios para validação do ensaio	42
3.2.3. Cálculo da DE ₅₀	43
3.2.4. Interpretação dos resultados	43
3.2.5. Critérios para repetição de ensaios	43
3.3. Ensaio de Potência para o Soro Anticrotálico – <i>in vivo</i>	44
3.3.1. Procedimentos	44
3.3.2. Critérios para validação do ensaio; cálculo da DE ₅₀ ; interpretação dos resultados e critérios para repetição de ensaios	45
3.4. Avaliação da precisão inter ensaios (repetibilidade) das determinações de DL ₅₀	45
3.5. Avaliação da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) das determinações de DL ₅₀ do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05	46
3.6. Avaliação da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) das determinações de potência de lotes comerciais de soros antibotrópico e anticrotálico	46
3.7. Frequência de ensaios inválidos	47
Resultados	48
1. Reprovação de amostras analisadas	48
2. Avaliação da precisão interensaios (repetibilidade) das determinações de DL ₅₀	48
3. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05	52
3.3. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais de soros antibotrópicos e anticrotálicos	53
5. Incidência de ensaios inválidos	59

Discussão	62
Segunda Etapa:	
Estabelecimento e determinação da estabilidade de padrões de referência nacionais para veneno botrópico, crotálico e soro antibotrópico e avaliação preliminar do método da potência relativa	67
Métodos	67
1. Avaliação dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência	67
1.1. Estabelecimento dos venenos de referência	67
1.2. Determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀) e da Dose Efetiva 50% (DE ₅₀)	68
1.3. Estabilidade dos venenos botrópico e crotálico de Referência	68
1.4. Estudo colaborativo para a determinação da potência “in vivo” do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência	69
1.5. Produção do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01	69
1.6. Determinação da potência “in vivo” do candidato a Soro Antibotrópico de Referência	70
1.7. Comparação intralaboratorial entre potência relativa e potência absoluta	71
Resultados	72
1. Estabilidade dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência	72
2. Estudo colaborativo para a determinação da potência “in vivo” do lote 005 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05)	75
3. Determinação da potência <i>in vivo</i> do candidato a Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01	77
4. Comparação intralaboratorial entre potência relativa e potência absoluta ..	80
Discussão	83
Terceira Etapa:	
Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> e sua inibição para a determinação da potência do veneno botrópico e do soro antibotrópico	90

Métodos	90
1. Fundamentos do método proposto	90
2. Células	90
3. Preparação de solução estoque de veneno de <i>B. jararaca</i> com 10 mg/mL	91
4. Determinação da potência (Dose Citotóxica 50% - DCt ₅₀) do veneno botrópico <i>in vitro</i>	92
4.1. Cálculos	94
5. Comparação entre os métodos “in vivo” e “in vitro” para a determinação da potência do Veneno Botrópico	96
6. Determinação da dose desafio de Veneno de Referência	96
7. Determinação da potência do Soro Antibotrópico (Dose Inibitória 50% - DI ₅₀) <i>in vitro</i>	96
8. Validação da planilha Excel, de cálculo da DE ₅₀ , e da potência do Soro Antibotrópico frente ao programa “WHOPROG”, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde	99
9. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência em Unidades Neutralizantes (UN)	99
 Resultados	 100
1. Validação da planilha Excel desenvolvida no INCQS para o cálculo da DE ₅₀ e da potência do Soro Antibotrópico frente ao programa “WHOPROG”, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde	100
2. Determinação da potência do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05) pelo método <i>in vitro</i>	100
3. Comparação entre a os métodos “in vivo” e “in vitro” para a determinação da potência do veneno botrópico	103
4. Determinação da dose desafio de Veneno de Referência	104
5. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01, pelo método <i>in vitro</i>	104
6. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência em Unidades Neutralizantes (UN)	105
7. Custos	105
 Discussão	 106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos de Intoxicação Humana em 2004 – Sinitox	4
Figura 2. Envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil de 1987 a 2005	5
Figura 3. Distribuição mensal dos acidentes ofídicos, por macro-região em 2005	6
Figura 4. Óbitos registrados por acidentes com animais peçonhentos segundo o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) Brasil, no período de 1979 a 1995	7
Figura 5. Taxa de caso-fatalidade de acidentes ofídicos de acordo com o tempo entre o acidente e o tratamento	7
Figura 6. Envenenamentos causados por animais peçonhentos no Brasil, 2005	8
Figura 7. Digestão enzimática de IgG	19
Figura 8. Processamento do Plasma para obtenção de Soro	20
Figura 9. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Botrópico de Referência lote 4 (BRABOT/04) entre 2000 e 2003	49
Figura 10. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Botrópico de Referência lote 5 (BRABOT/05) entre 2003 e 2006	50
Figura 11. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Crotálico de Referência lote 1 (BRACROT/01) entre 2000 e 2006	51
Figura 12. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Crotálico de Referência lote 2 (BRACROT/02) em 2006	52
Figura 13. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e os laboratórios produtores	55
Figura 14. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e o laboratório “A”	55
Figura 15. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e o laboratório “B”	56
Figura 16: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e o laboratório “C”	56

Figura 17: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotálicos entre o INCQS e os laboratórios produtores	57
Figura 18: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotálicos entre o INCQS e o laboratório “A”	58
Figura 19: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotálicos entre o INCQS e o laboratório “B”	58
Figura 20: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotálicos entre o INCQS e o laboratório “C”	59
Figura 21: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Botrópico de Referência lote 04 (BRABOT/04). Valores de 36 determinações individuais da DL ₅₀ realizadas entre 2000 e 2003	72
Figura 22: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Botrópico de Referência lote 05 (BRABOT/05). Valores de 52 determinações individuais da DL ₅₀ realizadas entre 2003 e 2006	73
Figura 23: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Crotálico de Referência lote 01 (BRACROT/01). Valores de 64 determinações individuais da DL ₅₀ realizadas entre 2000 e 2006	74
Figura 24: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Crotálico de Referência lote 02 (BRACROT/02). Valores de 11 determinações individuais da DL ₅₀ realizadas em 2006	74
Figura 25: Representação gráfica dos valores de potência obtidos para o lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01	78
Figura 26: Comparação intralaboratorial (INCQS) entre os resultados da potência relativa e potência absoluta para amostras de rotina	80
Figura 27: Esquema de diluição do Veneno Botrópico de Referência	93
Figura 28: Esquema de inoculação da microplaca de 24 poços	93
Figura 29: Planilha de cálculos para a determinação da DC _{t50} do Veneno Botrópico	95
Figura 30: Esquema de inoculação da microplaca de 24 poços para a determinação da DI ₅₀ do Soro Antibotrópico	97

Figura 31: Planilha de cálculos para a determinação da DI_{50} do soro antibotrópico	98
Figura 32: Comparação entre os resultados da potência de diferentes lotes de soro Antibotrópico, calculados pelo programa WHOPROG e pela planilha Excel desenvolvida no INCQS	100
Figura 33: Avaliação de custos do ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico pelos métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de acidentes ofídicos por região geográfica em 2005	6
Tabela 2: Classificação das manifestações clínicas do envenenamento botrópico	13
Tabela 3: Soros antipeçonhentos Produzidos no Brasil entre 2000 e 2006	18
Tabela 4: Quantidade de soros antiofídicos analisados anualmente pelo INCQS no período de 2000 a 2006	24
Tabela 5: Esquema de diluição do Veneno Botrópico	41
Tabela 6: Esquema de diluição do Veneno Crotálico	41
Tabela 7: Esquema de diluição do Soro Antibotrópico	42
Tabela 8: Esquema de diluição do Soro Anticrotálico	45
Tabela 9. Coeficiente de Variação Geométrico (gCV) para as determinações da Potência do Veneno Crotálico de Referência BRACROT/01 entre 2000 e 2006	51
Tabela 10: Valores de DL ₅₀ e Coeficiente de Variação para BRABOT/05, obtidos pelos diferentes laboratórios participantes do estudo colaborativo interlaboratorial	53
Tabela 11. Correlação de Pearson das determinações de potência para o soro antibotrópico entre o INCQS e os laboratórios produtores entre 2000 e 2006	54
Tabela 12: Correlação de Pearson das determinações de potência para o soro anticrotálico entre o INCQS e os laboratórios produtores entre 2000 e 2006	57
Tabela 13: Frequência de ensaios inválidos na determinação da potência de soro antibotrópico no INCQS	60
Tabela 14: Frequência de ensaios inválidos na determinação da potência de soro anticrotálico no INCQS	61
Tabela 15: Composição do Lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAAntiBOT/01	70
Tabela 16: Determinação do desvio padrão e coeficiente de variação para o Veneno Crotálico de Referência BRACROT/01 entre 2000 e 2006	73
Tabela 17: Valores de DL ₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo INCQS	75
Tabela 18: Valores de DL ₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “A”	76

Tabela 19: Valores de DL ₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “B”	76
Tabela 20: Valores de DL ₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “C”	76
Tabela 21: Valores médios de DL ₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelos laboratórios participantes	77
Tabela 22: Coeficiente de Variação das determinações de potência do Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelos laboratórios participantes ...	77
Tabela 23: Determinação da potência <i>in vivo</i> do lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01	78
Tabela 24: Determinação da DE ₅₀ do Soro Antibotrópico de Referência	79
Tabela 25: Comparação intralaboratorial (INCQS) entre os resultados da potência relativa e potência absoluta para amostras de rotina	81
Tabela 26: Comparação interlaboratorial dos resultados da potência absoluta com a potência relativa obtida no INCQS	82
Tabela 27: Comparação entre os resultados da potência de diferentes lotes de soro antibotrópico calculados pelo programa WHOPROG e pela planilha de Excel desenvolvida no INCQS	101
Tabela 28: Determinação da potência do lote 005 do Veneno Botrópico de Referência pelo método <i>in vitro</i>	102
Tabela 29: Determinação da potência média do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05	103
Tabela 30: Determinação da potência média do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01	104

I. INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia

Mundialmente, existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo cerca de 600 venenosas. Estas serpentes são mais freqüentemente encontradas nas regiões tropical e equatorial, mas podem ser encontradas em todas as regiões do planeta com exceção da Antártida (WHO, 2007). No Brasil foram descritas 326 espécies de serpentes, sendo 49 peçonhentas, 22 espécies da família Elapidae e 27 espécies da família Viperidae (SBH, 2005).

Apesar do grande número de espécies venenosas e da ampla distribuição geográfica destas serpentes, tanto a incidência global dos envenenamentos ofídicos quanto a sua severidade permanecem muito pouco conhecidas, com exceção de alguns países onde estes acidentes são corretamente notificados. Desde os estudos realizados por Swaroop e Grab em 1954, nenhum levantamento global sobre a epidemiologia dos envenenamentos ofídicos foi realizado. Estes estudos estimaram a ocorrência de pelo menos 50.000 mortes anualmente por acidentes ofídicos em nível mundial, mas tendo em vista que muitos dos acidentados não procuram atendimento médico hospitalar, principalmente em países menos desenvolvidos, e também que muitos países não notificam o atendimento a estes pacientes, acredita-se que a sub-notificação dos casos de envenenamentos ofídicos seja extremamente alta.

Estudos mais recentes realizados por Chipaux em 1998 sugerem a ocorrência de 2,5 milhões de envenenamentos e 125.000 mortes anuais e descrevem alguns aspectos importantes da epidemiologia dos acidentes ofídicos em nível mundial. Segundo Chipaux, a situação dos acidentes ofídicos é mais grave no Sudeste Asiático e na África. No Sudeste Asiático é estimada a ocorrência de 25.000 a 30.000 mortes/ano. Um estudo em Bangladesh sugere uma incidência anual de 4,3 acidentes por 100.000 habitantes, com uma letalidade de 20%. Na Índia estima-se a ocorrência de 10.000 mortes anuais. No Sri Lanka em 2000, mais de 37.000 pacientes foram tratados para picadas de serpentes em hospitais públicos. Estudos realizados no Nepal estimaram 162 mortes por 100.000 habitantes (WHO, 2007).

Na África a incidência de acidentes ofídicos varia grandemente, de 300 a 5.000 picadas por 100.000 habitantes nas regiões de florestas, até 50 a 100 picadas por 100.000 habitantes nas savanas e na região do deserto do Saara. A maioria dos países, porém possuem muito poucos dados epidemiológicos (CHIPAUX, 1998; WHO, 2007).

Na Austrália a incidência estimada varia entre 3 a 18 casos/100.000 habitantes, com a mortalidade de 4/100.000. A maioria das ilhas do pacífico está livre de serpentes venenosas, com exceção das serpentes marinhas, que possuem um potente veneno neurotóxico, mas são muito pouco agressivas. Em toda a Oceania 3.000 casos de envenenamento são notificados anualmente, com 200 óbitos.

Na Europa, acidentes ofídicos são relativamente raros e envolvem as serpentes do gênero *Vipera*, representadas neste continente por espécies pouco venenosas. Na Grã-Bretanha ocorrem cerca de 200 hospitalizações por ano, sem nenhum óbito notificado de 1975 a 1998. Na França o número de casos é maior, com uma incidência anual de aproximadamente 2,5 casos/100.000 habitantes. Nas áreas rurais do sul da Europa os índices são maiores, na Espanha e Itália a incidência alcança 5 casos/100.000 habitantes.

No Canadá e USA a incidência é bastante semelhante à observada na Europa, com cerca de 10.000 acidentes com serpentes peçonhentas/ano, com aproximadamente 15 óbitos/ano.

Nas Américas Central e do Sul a incidência de acidentes ofídicos é significativamente maior, com os acidentes predominantemente por serpentes da família Crotalidae, principalmente as do gênero *Bothrops* que causam caracteristicamente edema, necrose e hemorragias. As serpentes da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, presentes na América do Sul provocam acidentes predominantemente neurotóxicos, com rabdomiólise severa e falência renal com pouca reação inflamatória, enquanto na América Central e do Norte a subespécie *Crotalus durissus durissus* induz intensa reação local com edema e necrose, mas sem neurotoxicidade ou rabdomiólise. Estima-se que na região a morbidade seja em torno de 30/100.000 com uma mortalidade de 1,8/100.000 (CHIPAUX, 1998).

No Brasil os acidentes ofídicos são um importante agravo à saúde desde o período pré-colonial. Em 1560, José de Anchieta fez o primeiro registro sobre serpentes peçonhentas no Brasil com interessantes observações clínico-epidemiológicas, na célebre e sempre citada carta de São Vicente:

“[...] Até aqui tenho falado dos animais que vivem na água; tratarei agora dos terrestres, há os que são desconhecidos nesta parte do mundo. Primeiramente direi das diversas espécies de cobras venenosas. Algumas, chamadas jararacas abundam nos campos, nos matos e até mesmo nas casas, onde não raro as encontramos e cuja mordedura mata no espaço de

vinte e quatro horas, ainda que às vezes aplicando-se-lhe remédio se escapam à morte. Se forem mordidos uma só vez e escaparem à morte, mordidos daí por diante, não só não correm risco de vida, como até sentem menos dor, como mais de uma vez experimentamos.

Outro gênero se chama boicininga, isto é, ‘cobra que tine’ que tem na cauda um cascavel, que soa quando ataca alguém. Vivem nos campos, em cavidades debaixo da terra. No tempo da procriação atacam os homens, e rastejam pela erva com saltos tão rápidos que os índios dizem que voam. Quando mordem acabou-se: paralisam o ouvido, a vista, o andar e todos os movimentos, só fica a dor e o sentimento do veneno difundido por todo o corpo, até que no espaço de vinte e quatro horas se expira.

Há outras admiravelmente pintadas de diversas cores, negra, branca e vermelha, semelhante ao coral, que se chamam ibiboboca, que quer dizer ‘terra cavada’, por que rojando furam a terra como toupeiras. Estas são as mais peçonhentas de todas e, portanto as mais raras [...]” (CARDOSO, 2003).

As notificações de acidentes ofídicos no Brasil sempre foram feitas de maneira esporádica e não sistemática, até que em 1901, Vital Brazil ao iniciar a produção de soro antiofídico no Brasil e visando a coleta de informações sobre os acidentes ofídicos, introduziu os “Boletins para observação de accidentes ophidicos” que enviados juntamente com as ampolas de soro, deveriam ser preenchidos pelo usuário e devolvidos ao laboratório produtor. Esta estratégia foi adotada pelo Instituto Serumtherapico (hoje Butantan) e posteriormente pelo Instituto Vital Brazil. Os dados originados por estas notificações possibilitaram inúmeras publicações sobre ofidismo no Brasil (CARDOSO E WEN, 2003).

Atualmente, no Brasil os envenenamentos por animais peçonhentos são a segunda principal causa de intoxicações em humanos, com 24,75% dos casos notificados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Figura 1), só sendo superados pelas intoxicações provocadas por medicamentos com 28,95% dos casos notificados em 2004 (SINITOX, 2007).

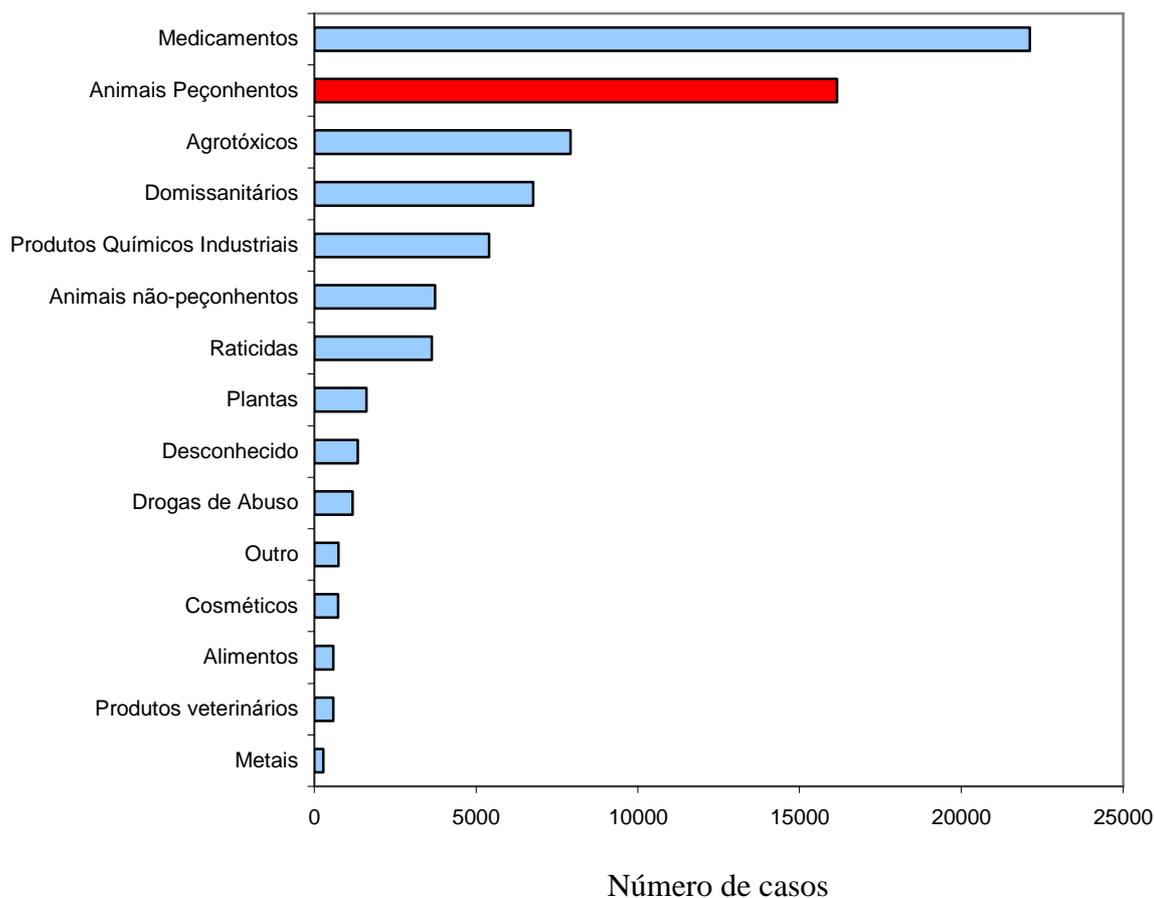


Figura 1. Casos de Intoxicação Humana em 2004 - Sinitox.

O número de notificações de ofidismo vem aumentando ano a ano, com o registro de 28.711 acidentes em 2005 (Figura 2), o que corresponde a uma incidência de 15 casos por 100.000 habitantes, com 114 mortes, o que corresponde a uma letalidade de 0,40%, (PORTAL DA SAÚDE, 2007). No período compreendido entre janeiro de 1990 e dezembro de 1993, foram notificados 81.611 acidentes, o que representava uma média de aproximadamente 20.000 casos por ano, correspondendo a uma incidência de 13 acidentes por 100.000 habitantes/ano, sendo mais de 90 % dos acidentes provocados por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2001).

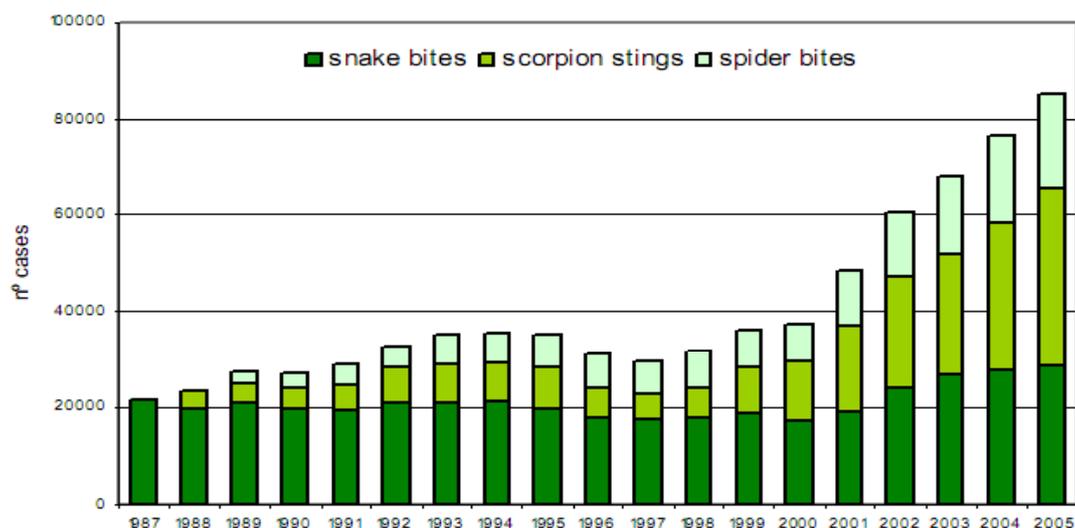


Figura 2. Envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil de 1987 a 2005. (Fonte: SVS – MS).

Os acidentes ofídicos no Brasil têm características sazonais, predominando nas estações quentes e úmidas, que coincidem com o período de maior atividade humana no campo, o que na maioria dos estados do Brasil corresponde ao período entre janeiro e abril (Figura 3). Os acidentes ofídicos acometem, com maior frequência, adultos jovens do sexo masculino durante o trabalho em áreas rurais (PORTAL DA SAÚDE, 2007).

Existe também uma variação significativa na incidência de acidentes ofídicos por região geográfica, com as incidências mais elevadas nas regiões Norte e Centro Oeste (Tabela 1).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por uma morbidade maior que qualquer outro grupo de serpentes venenosas no novo mundo. As espécies mais importantes são *B. asper* na América Central e *B. atrox* e *B. jararaca* na América do Sul.

Apesar dos acidentes botrópicos apresentarem uma baixa letalidade é grande a ocorrência de seqüelas anatômicas e funcionais, freqüentemente incapacitando para o trabalho, mesmo pacientes submetidos precocemente à soroterapia (BRASIL, 2001). É importante destacar que com a introdução do Programa Nacional de Ofidismo pelo Ministério da Saúde em 1986/87, o índice de letalidade por animais peçonhentos em geral caiu sensivelmente (Figura 4), assim como melhorou a qualidade da notificação e das informações epidemiológicas disponíveis.

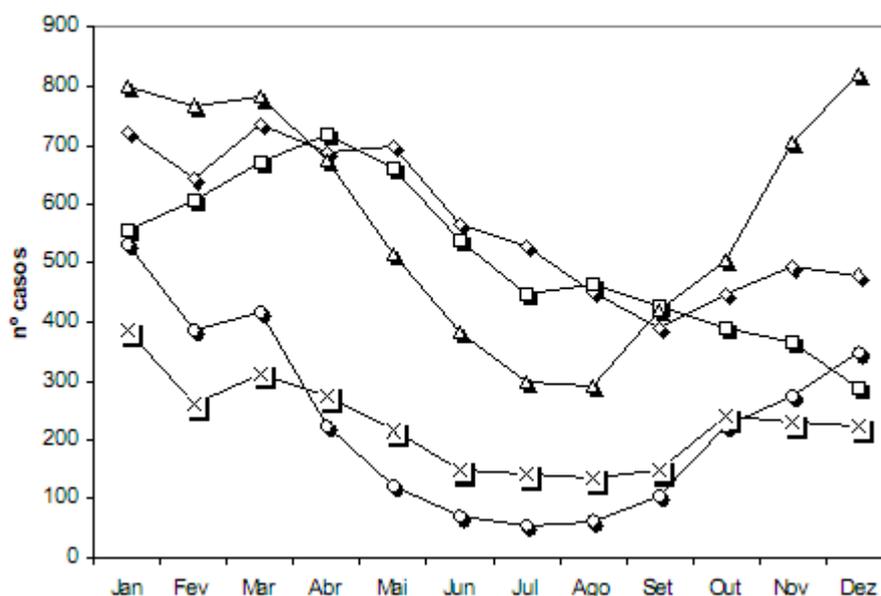


Figura 3. Distribuição mensal dos acidentes ofídicos, por macro-região em 2005 (PORTAL DA SAÚDE, 2007).

- ◇ - Região Norte
- - Região Nordeste
- Δ - Região Sudeste
- O - Região Sul
- X - Região Centro Oeste

Tabela 1. Incidência de acidentes ofídicos por região geográfica em 2005 (Fonte: Portal da Saúde, 2007).

Região Geográfica	Nº de casos	Incidência (casos/100.000 hab/ano)
Norte	8.463	54,8
Nordeste	6.767	12,8
Sudeste	7.635	9,5
Sul	2.741	10,9
Centro Oeste	2.991	22,6
Total/Brasil	28.597	15,0

No Brasil as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 87,5% dos casos de acidentes ofídicos notificados (letalidade de 0,31%), seguido por *Crotalus* com 9,2% (letalidade de 1,87%), *Lachesis* com 2,7% (letalidade de 0,95%) (Figura 5) e *Micrurus* com 0,6% (letalidade de 0,36%).

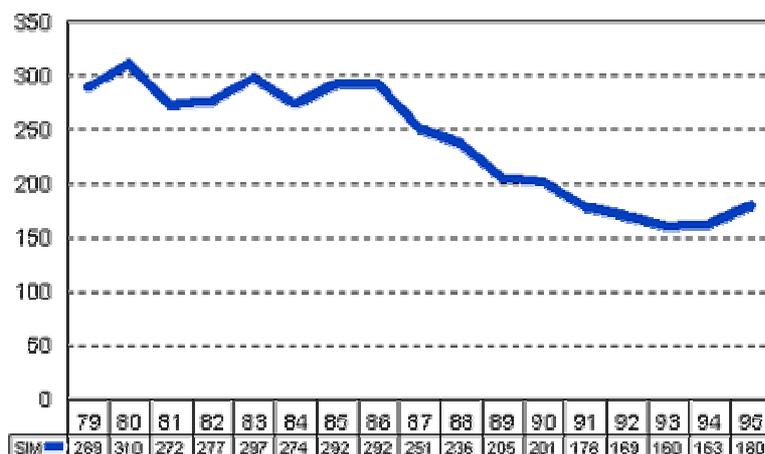


Figura 4. Óbitos registrados por acidentes com animais peçonhentos segundo o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) Brasil, no período de 1979 a 1995.

Outras espécies de animais peçonhentos também têm grande importância médica no Brasil (Figura 6), onde ocorrem anualmente 36.500 casos de acidentes com escorpiões (16 casos/100.000 habitantes) e letalidade de 0,14%, também ocorrem 19.600 casos de acidentes com aranhas (10 casos/100.000 habitantes) e letalidade de 0,05%, assim como acidentes com a lagarta *Lonomia obliqua* que provoca síndrome hemorrágica grave, porém não há dados epidemiológicos disponíveis (BRASIL, 2001; PORTAL DA SAÚDE, 2007).

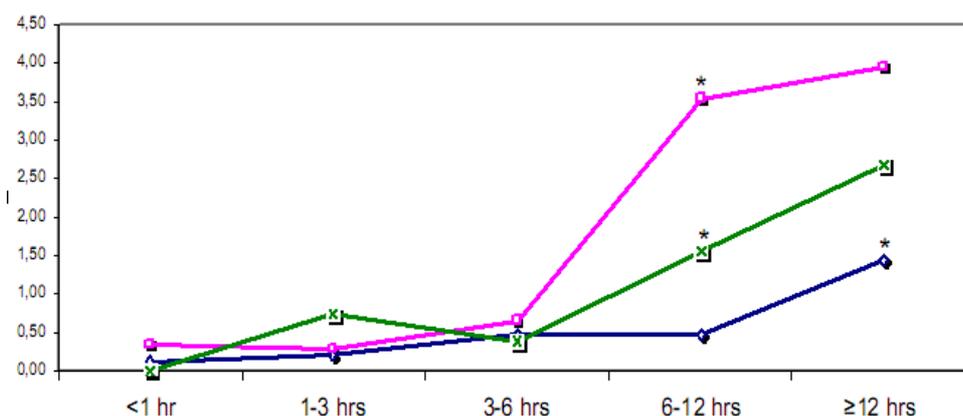


Figura 5. Taxa de caso-fatalidade de acidentes ofídicos de acordo com o tempo entre o acidente e o tratamento. (Fonte: MS – SVS, 2005).

◇ - *Bothrops*; □ - *Crotalus*; X - *Lachesis*

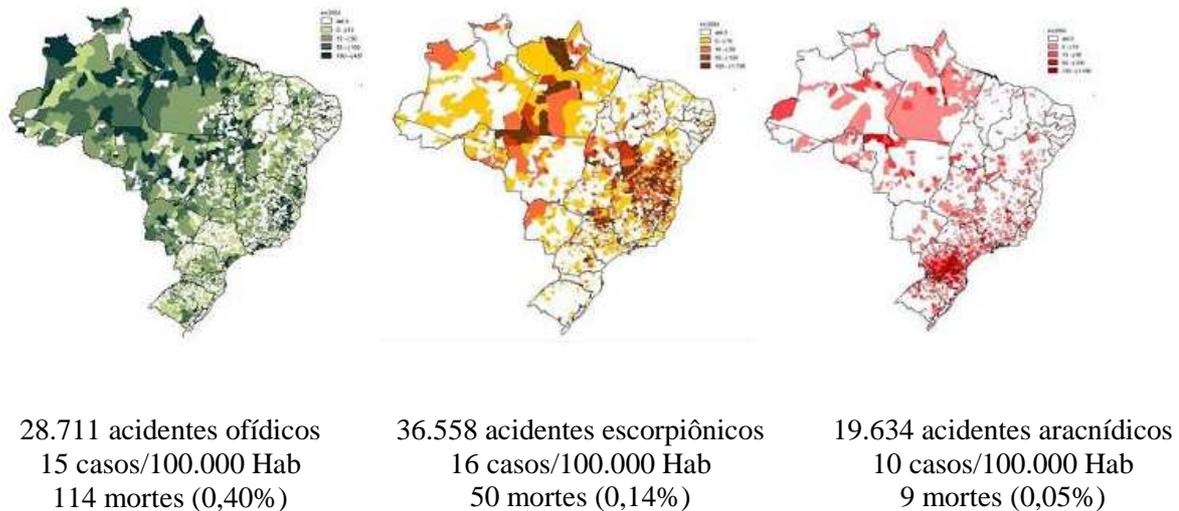


Figura 6: Envenenamentos causados por animais peçonhentos no Brasil, 2005.

2. Clínica do envenenamento Botrópico

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* são os mais complexos dos venenos ofídicos, com 90% do seu peso seco constituído por uma mistura de variados peptídeos e proteínas farmacologicamente ativas que induzem uma grande diversidade de sintomas nos pacientes acidentados. Também estão presentes nos venenos, proteínas não tóxicas. A fração não protéica é composta por carboidratos, lipídios, metais (freqüentemente associados a glicoproteínas e metaloproteinases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. A função de cada componente, assim como suas interações no envenenamento humano ainda não estão totalmente esclarecidas (HUANG *et al.*, 1987; LI-GUO *et al.*, 1997; BOURGUIGNON *et al.*, 2001).

Os estudos dos venenos de serpentes têm sido úteis, não só na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dos envenenamentos, mas também na elucidação de vários mecanismos fisiológicos envolvidos em ações metabólicas e farmacológicas como a neurotransmissão na junção neuromuscular, estrutura e a função dos receptores nicotínicos, “cascata de coagulação”, fibrinólise, sistema complemento e processo inflamatório (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

O estudo do veneno de *Bothrops jararaca* permitiu o descobrimento da bradicinina por Rocha e Silva e colaboradores em 1949 e do Captopril (inibidor da enzima conversora da angiotensina, largamente utilizada no controle da hipertensão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva e na doença arterial coronária) por Ferreira em 1965 (FERREIRA, 1965).

Os envenenamentos botrópicos são caracterizados por importantes lesões teciduais locais, como hemorragias, necrose e edema, assim como alterações sistêmicas, principalmente sobre o sistema de coagulação sanguínea. Esses complexos fenômenos fisiopatológicos são devidos a efeitos sinérgicos de enzimas ativas e toxinas presentes nos venenos (OWNBY, 1990; BJARNASON E FOX, 1994 e GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1995).

Entre os principais efeitos fisiológicos e patológicos do veneno botrópico destacam-se: lesões locais por danos capilares e necroses teciduais, ações coagulantes e anticoagulantes, hipotensão aguda e dor. A responsabilidade de vários efeitos biológicos tem sido creditada principalmente as metaloproteases e fosfolipases presentes nos venenos (REICHL *et al.*, 1993; SOARES *et al.*, 1998; FRANCISCHETTI *et al.*, 1998, BOURGUIGNON *et al.*, 2001).

As principais propriedades tóxico-farmacológicas presentes no veneno botrópico são as atividades inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica.

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

As toxinas com atividade procoagulante também participam na indução do processo inflamatório com a formação de trombos na corrente microcirculatória, provocando hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual. Os fenômenos hemorrágicos, determinados pelas hemorraginas, podem agravar o quadro inflamatório, através da ativação do Fator de Necrose Tumoral (TNF).

A atividade inflamatória aguda ocorre muito provavelmente devido à interação da ação de diversas toxinas, o que pode explicar a grande variação nos sintomas observados, tanto em estudos experimentais quanto em relatos clínicos (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; CASTRO, FERNANDES E ZINGALI, 1999; CAMEY, VELARDE E SÁNCHEZ, 2002; FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

O veneno botrópico também possui capacidade de ativar fatores de coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo freqüentemente a incoagulabilidade sanguínea. A grande maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui toxinas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X. São também descritos fatores com atividade sobre a agregação plaquetária. Pode ocorrer trombocitopenia nas primeiras horas, persistindo por até alguns dias (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

A atividade hemorrágica dos venenos botrópicos é atribuída principalmente a fatores conhecidos por hemorraginas, que são metaloproteases contendo zinco. Estas enzimas podem romper o endotélio vascular e têm atividade de desintegrina. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo 4, fibronectina e laminina. Além disso, estas metaloproteases são potentes inibidores da agregação plaquetária (LOMONTE, 1994). Têm como possíveis mecanismos de ação a digestão enzimática da lâmina basal dos microcapilares e a ruptura das células endoteliais ou a formação de solução de continuidade (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

O acidente botrópico caracteriza-se pela inoculação subcutânea ou intramuscular de veneno. O sangramento no local de inoculação é freqüentemente observado, porém sua presença nem sempre indica comprometimento sistêmico. Um dos primeiros sintomas observados no envenenamento botrópico é a presença de edema firme, freqüentemente com aspecto violáceo, decorrente de hemorragia subcutânea. Um quadro doloroso acomete na grande maioria dos casos a região ou o membro atingido. O edema inicialmente circunscrito pode em até 24 horas estender-se a todo o membro. Em poucas horas desenvolve-se linfadenomegalia regional, com gânglios aumentados e dolorosos, podendo apresentar equimose no trajeto dos vasos que drenam a região. Algumas horas após o acidente podem aparecer bolhas em quantidade e proporções variáveis, com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

As principais complicações locais são: abscesso, necrose e síndrome compartimental. Celulite e erisipela também podem ser observadas no local da inoculação. Estas infecções são freqüentes, devido às condições propícias ao crescimento bacteriano provocadas pela reação inflamatória aguda, assim como pela presença de abundante flora bucal nas serpentes (bactérias anaeróbicas e gram-negativas). A incidência de abscessos pode variar de 1 a 17,2% dos casos. Os fenômenos inflamatórios inerentes ao acidente botrópico dificultam a avaliação clínica

da presença de infecção. O edema, o eritema, a dor e o calor local podem tanto ser provocados pela ação do veneno, quanto pela infecção local.

Alguns aspectos, portanto são característicos de uma infecção secundária incipiente:

1. A reativação dos sinais inflamatórios em paciente com quadro local estabilizado ou em regressão, com ressurgimento ou acentuação da dor.
2. O início súbito de picos febris ou a presença de febre alta.
3. A acentuação do enfartamento ganglionar regional.
4. A presença de sinais de flutuação à palpação local.

A incidência de necrose é bastante variável (de 1 a 20,6%) geralmente limitada ao tecido subcutâneo, podendo comprometer estruturas mais profundas como tendões, músculos e ossos. A intensidade e a extensão da necrose estão intimamente ligadas à utilização de torniquetes e à demora entre o acidente e a administração da soroterapia. Em casos extremos pode ser necessária a amputação de parte do membro acometido (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

A síndrome compartimental é uma complicação pouco freqüente, porém quando ocorre tem evolução bastante rápida (nas primeiras 24 horas) necessitando de rápida intervenção. Tem sido observada em até 1,4% dos casos. É definida como o aumento da pressão dentro de um compartimento fechado por onde transcorrem músculos, nervos e vasos, comprometendo a circulação sanguínea regional e resultando em disfunções neuromusculares. Na maioria dos casos pode ser feito o diagnóstico clínico observando a dor desproporcional ao edema, parestesia e até paralisia dos músculos do compartimento, acentuação da dor à extensão passiva dos músculos envolvidos, hipoestesia que pode evoluir até para anestesia, e aumento acentuado da tensão dos envoltórios do compartimento afetado.

Lesões de nervos, tendões, músculos e ossos podem ocorrer em consequência da isquemia e da necrose tecidual, podendo acarretar alterações de sensibilidade e motricidade no membro atingido.

Além do quadro de envenenamento local, o quadro sistêmico é extremamente importante. Pequenos sangramentos como gengivorragias, microhematúria, púrpuras (equimoses em locais longe das picadas, devido a injeções intramusculares ou pequenos traumatismos) e sangramentos em feridas recentes podem ocorrer nos casos leves e moderados. Com menor freqüência pode ocorrer hematúria macroscópica, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival, hipermenorragia e hematêmese (KAMIGUTI E

SANO-MARTINS, 1995). Em casos graves são observadas hemorragias intensas podendo acometer órgãos vitais, choque e insuficiência renal. São relatadas como causas de óbito, hemorragia digestiva e do sistema nervoso central. A principal complicação sistêmica do acidente botrópico são as insuficiências renais agudas, que podem ser provocadas por coagulação intravascular disseminada e hipotensão.

Manifestações sistêmicas como hipotensão arterial, choque, oligúria ou hemorragias intensas, definem o caso como grave, independentemente do quadro local (FRANÇA E MÁLAQUE, 2003).

Com base nas manifestações clínicas o acidente botrópico pode ser classificado como descrito na Tabela 2.

A incidência de reações adversas precoces (anafilactóides) posteriores a soroterapia tem se demonstrado surpreendentemente alta, variando entre 37 e 87% dos pacientes. Os principais sintomas precoces observados são calafrios, náusea, vômitos e urticária generalizada provavelmente devido a reações de ativação do sistema complemento pela presença de agregados de IgG (MALASIT, WARRELL E CHANTAVANICH, 1986) e pelo teor de proteína total presente nos soros (SUTHERLAND E LOVERING, 1979). Estas reações freqüentemente requerem o tratamento dos pacientes com adrenalina e anti-histamínicos (até 86 % dos casos), o que certamente ajuda a prevenir as principais reações precoces não pirogênicas e provavelmente seja o responsável pela baixa incidência de reações tardias como a doença do soro (CARDOSO *et al.*, 1993).

3. Soroterapia

No final do século XIX, a descoberta dos agentes causadores de doenças infecciosas representou um passo fundamental no avanço da medicina experimental, através do desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento de doenças como a difteria, tétano e cólera.

Um dos principais aspectos desse avanço foi o desenvolvimento da soroterapia, que consiste na aplicação nos pacientes de um soro constituído por um concentrado de anticorpos. A soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica (no caso de doenças infecciosas) ou um agente tóxico específico (venenos ou toxinas).

No Brasil já em 1867, os trabalhos de Wücherer permitiram que o envenenamento ofídico transpusesse os limites da credence popular e da farmacopéia de botica e tivesse uma abordagem acadêmica. Após estudos sobre a imunidade advinda dos envenenamentos ofídicos, ele acreditava que era possível uma abordagem

profilática semelhante à da varíola. Esta teoria não foi comprovada, porém deu início a diversas pesquisas e questionamentos sobre os envenenamentos ofídicos.

Tabela 2: Classificação das manifestações clínicas do envenenamento botrópico.

Manifestações e tratamento	Classificação		
	Leve	Moderada	Grave
Locais ▪ Dor ▪ Edema ▪ Equimose	Ausentes ou discretos	Evidentes	Intensas**
Sistêmicos ▪ Hemorragia grave ▪ Choque ▪ Anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de Coagulação (TC*)	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (n° ampolas) SAB/SABC/SABL***	2-4	4-8	12

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

** Manifestações locais intensas pode ser o único critério para a classificação da gravidade.

*** SAB – Soro Antibotrópico (pentavalente); SABC – Soro Antibotrópico (pentavalente) e Anticrotálico; SABL – Soro Antibotrópico (pentavalente) e Antilaquéutico.

Fonte: Ministério da Saúde.

Com a descoberta do princípio da imunização ativa artificialmente induzida e com a evidência que o sangue dos animais imunizados continha anticorpos, que não só destruía os agentes invasores, como apresentavam poder terapêutico e profilático, teve início a soroterapia antiofídica.

Sewall em 1887 demonstrou em pombos que a inoculação repetida, com doses altamente diluídas de venenos de *Sistrurus* (um tipo de cascavel norte-americana), induzia um estado de resistência contra os efeitos da peçonha, sem aparente influência sobre o estado de saúde dos animais.

Em 1890, Emil Behring trabalhando com toxina diftérica em Berlim e Shibasaburo Kitasato em Tóquio, trabalhando com toxina tetânica, relataram que coelhos e camundongos poderiam ser imunizados contra difteria e tétano. Eles também afirmaram que usando o soro imune podiam curar animais infectados, assim como prevenir animais saudáveis inoculados com as respectivas toxinas (WEN, 2003).

Em 1894, Albert Calmette após várias tentativas infrutíferas, conseguiu imunizar coelhos contra o veneno de cobra (*Naja*) após sucessivas inoculações subcutâneas com

doses crescentes de veneno misturado com doses decrescentes de uma solução de hipoclorito de cálcio ou de sódio. Após oito meses alguns dos coelhos eram capazes de sobreviver a doses de 30 a 35 mg de veneno/animal. Além disso, o soro dos animais imunizados era capaz de neutralizar a atividade tóxica do veneno *in vitro*, assim como tinha efeito preventivo e terapêutico contra a intoxicação *in vivo*. Ao inocular coelhos com o dobro da dose letal (o que mata um coelho em aproximadamente 3 horas) e aplicar o soro imune por via intraperitoneal ou subcutânea após o aparecimento dos sintomas (regurgitações, taquicardia, dispnéia, paresia dos membros), os animais permaneceram gravemente envenenados por um período de tempo relativamente longo, porém gradualmente retornaram ao normal (HAWGOOD, 1999).

No mesmo ano, Phisalix e Bertrand anunciaram a presença de uma substância antitóxica no sangue de animais vacinados com veneno de víboras. Neste experimento, inocularam cobaias, que foram desafiados 24, 36 e 48 horas depois. Somente o animal desafiado 48 horas pós-vacinação sobreviveu, levando os autores a concluir que “a imunização não é produzida diretamente pelo material vacinante, ela resulta de uma reação do organismo”. Também demonstraram a atividade neutralizante do sangue desfibrinado de cobaias imunizados, que incubado com veneno bruto e inoculado intraperitonealmente, se mostrou capaz de neutralizar o efeito tóxico do veneno, o que os levou a sugerir a possibilidade da soroterapia antiveneno em humanos (HAWGOOD, 1999).

Vital Brazil, médico sanitaria, residindo em Botucatu em 1895, consciente do grande número de acidentes com serpentes peçonhentas no estado de São Paulo começou a realizar experimentos com venenos ofídicos. Baseando-se nos primeiros trabalhos com soroterapia, realizados por Calmette, (que iniciou a produção do primeiro soro antiofídico em 1894 na França, em Lille), desenvolveu estudos sobre soros contra o veneno de serpentes, descobrindo a sua especificidade, ou seja, que cada tipo de veneno ofídico requer soros específicos, preparados com o veneno obtido do mesmo gênero de serpente que causou o acidente.

Em 1901, Vital Brazil começou a produzir antivenenos mono e poli específicos (soro antibotrópico, anticrotálico e antiofídico) no Instituto Soroterapêutico, localizado na Fazenda Butantan (BRAZIL, 1987). Em 1903, Vital Brazil publica um trabalho (“Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobras”), onde resume suas pesquisas na imunologia dos envenenamentos por serpentes (BRAZIL, 1903). Neste trabalho, não somente demonstra exaustivamente a especificidade dos antivenenos, como também a existência, em certos casos, de uma

ação paraespecífica, conferindo alguma imunidade cruzada entre espécies filogeneticamente próximas. Também apresenta observações sobre vinte e um pacientes tratados com soros antipeçonhentos produzidos no Instituto Butantan. Atualmente, mais de um século depois, com algumas poucas modificações, a soroterapia como proposta por Calmette e Vital Brazil, ainda é o único tratamento específico contra os acidentes ofídicos.

O soro antitoxínico (pentavalente) atualmente utilizado no Brasil é produzido pelo Instituto Butantan – IB - (SP), Instituto Vital Brazil – IVB - (RJ) e Fundação Ezequiel Dias - FUNED - (MG), através da imunização de cavalos com venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50 %, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* - 12,5 % cada. Esta composição antigênica foi definida após os estudos pré-clínicos realizados por Dias da Silva e colaboradores em 1989, que avaliaram a reatividade cruzada dos soros de cavalos imunizados com venenos de serpentes de 10 espécies do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neumiedi* e *B. pradoi*). Anticorpos específicos foram detectados imunologicamente (ELISA, imunodifusão dupla e métodos quantitativos de precipitação) ou por provas biológicas (atividade hemolítica indireta e letalidade).

Os venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi* se mostraram bons imunógenos, capazes de induzir a formação de anticorpos com atividade antiletal para os demais venenos estudados com exceção de *B. jararacussu*, cuja atividade letal era apenas parcialmente neutralizada pelos demais soros, sendo assim, também foi incluído na formulação do soro antitoxínico pentavalente (DIAS DA SILVA *et al.*, 1989).

Apesar da reconhecida importância epidemiológica da espécie *Bothrops atrox* para a região amazônica, devido à dificuldade de obtenção de veneno e considerando os altos níveis de reação cruzada em ensaios pré-clínicos, este veneno não foi incluído na composição do soro antitoxínico (pentavalente). Esta proteção cruzada foi demonstrada com sucesso por um estudo clínico conduzido na região amazônica que comparou a eficácia do soro antitoxínico (pentavalente) nacional, com um soro específico para *B. atrox*. Este estudo demonstrou que ambos os soros foram capazes de reverter os sintomas do envenenamento. Esta proteção foi detectada tanto clinicamente quanto laboratorialmente, demonstrando que não há necessidade de incluir o componente *B. atrox* na formulação do soro antitoxínico brasileiro (PARDAL *et al.*, 2004).

Embora na década de 70 o Brasil ocupasse posição de destaque na luta contra o ofidismo, verificava-se uma grande desorganização deste tipo de ação em saúde. A crise envolvendo a produção e distribuição de antivenenos já vinha sendo divulgada pela imprensa leiga. Oficialmente, entretanto, divulgava-se a informação de que “a produção de soros estaria absolutamente dentro dos padrões de produção” (CARDOSO E WEN, 2003). Além do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias o Laboratório Syntex do Brasil também produzia antivenenos no Brasil.

Até 1985 os soros antiofídicos para uso humano não faziam parte do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde. A comercialização se dava mediante as regras comuns do mercado, cabendo à Central de Medicamentos a tarefa de adquirir uma parcela da produção e distribuí-la aos órgãos governamentais, enquanto que o restante era vendido diretamente pelos laboratórios aos interessados. Em 1983 quando o laboratório privado Syntex do Brasil resolveu desativar a área de produção de biológicos, o setor entrou em crise, ficando a produção restrita aos três laboratórios oficiais que naquele momento não tinham condições operacionais para suprir a demanda nacional.

A falência do sistema de produção de antivenenos no país culminou em maio de 1986, com a morte de uma criança em Brasília, sendo o óbito atribuído à falta de soro. Este fato foi o desencadeante “político-emocional” que levou o Ministério da Saúde, já em junho do mesmo ano, a implantar o Programa Nacional de Ofidismo na antiga Secretaria Nacional de Ações Básicas em Saúde (SNABS/MS).

O Ministério da Saúde então se propôs a adquirir integralmente a produção de soros, estabelecendo cotas mensais de cada tipo, a serem remetidas as Secretarias Estaduais de Saúde que se encarregaram do recebimento, armazenamento e distribuição dos soros, em caráter exclusivo (CARDOSO E WEN, 2003).

Atualmente, os soros antiofídicos são distribuídos, com periodicidade mensal, para 3.156 pontos de atendimento de acidentes ofídicos nos Estados, a partir das solicitações encaminhadas à Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações - CGPNI, conforme a disponibilidades dos estoques e o perfil epidemiológico dos acidentes, sendo esta sistemática de trabalho adotada a partir de março de 2004.

Os soros antiofídicos são disponibilizados gratuitamente a população através do Sistema Único de Saúde – SUS, não sendo comercializados nem disponíveis na rede de hospitais privados.

4. Produção de Soros Antiofídicos

No Brasil os soros antiofídicos são constituídos por fragmentos F(ab')₂ de IgG equina (Figura 7), mundialmente também são utilizadas preparações contendo fragmentos Fab ou a molécula inteira de IgG (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

Atualmente os soros antipeçonhentos são produzidos no Brasil por quatro laboratórios públicos estaduais: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Fundação Ezequiel Dias, Instituto Butantan e Instituto Vital Brazil (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). Estes laboratórios produzem várias formulações de soros antipeçonhentos (Tabela 3): antibotrópico (pentavalente) - *B. jararaca* 50%, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* and *B. neuwedii*, 12,5% cada, anticrotálico (*C. durissus terrificus*), antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquéutico (*L. muta*), antibotrópico-laquéutico-crotálico, anti-elapídico (*M. frontalis*), antiescorpiônico (*T. serrulatus*), anti-aracnídico-polivalente (*Tityus* spp., *Phoneutria* spp. e *Loxosceles* spp.), anti-loxoscélico (*L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*) anti-latrodéctico (*L. curacaviensis*) e anti-lonômico (*L. obliqua*), perfazendo um total de 619 lotes e 2.513.690 ampolas de 2000 a 2006 (ARAÚJO *et al.*, 2008).

A produção de soros antiofídicos no Brasil, ainda hoje é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil em 1903. Animais de grande porte (cavalos) são imunizados com venenos na presença de adjuvantes. Os animais podem ser inoculados com venenos de uma ou mais espécies de serpentes, originando soros mono ou poliespecíficos. Os soros poliespecíficos podem ser obtidos tanto pela imunização dos animais com uma mistura de venenos, quanto pela imunização dos animais com veneno de uma única espécie de serpente e posterior mistura de diferentes soros monoespecíficos, o que é mais utilizado.

Devido à sua complexidade antigênica, a imunização de equídeos com venenos de várias espécies de serpentes pode induzir a produção de um soro com altos títulos somente para as toxinas mais imunogênicas e com baixa potência contra toxinas com menor poder imunogênico.

Outro aspecto a ser levado em conta é a grande variabilidade na composição dos venenos, existente entre animais da mesma espécie. Esta variação está relacionada com a distribuição geográfica, idade da serpente e época do ano em que é feita a coleta. Portanto a mistura de imunização deve incluir venenos de vários animais, procurando respeitar estas variações (CARDOSO, YAMAGUCHI E MOURA DA SILVA, 2003).

Tabela 3: Soros antipeçonhentos produzidos no Brasil entre 2000 e 2006

	Total	Lab A	Lab B	Lab C	Lab D
Botrópico (pentavalente)	295* (1.188.980)	186 (596.418)	40 (409.909)	66 (178.637)	3 (4.016)
Crotálico	109 (435.545)	72 (213.580)	20 (165.493)	17 (56.472)	---
Bot-Crot	43 (138.525)	28 (77.089)	11 (48.248)	4 (13.188)	---
Bot-Laq	35 (102.284)	20 (53.093)	7 (32.971)	8 (16.220)	---
Bot-Laq-Crot	3 (1.392)	3 (1.392)	---	---	---
Elapídico	32 (107.034)	20 (57.347)	12 (49.687)	---	---
Escorpiônico	48 (345.630)	29 (182.420)	16 (140.675)	3 (22.535)	---
Aracnídeo (polivalente)	30 (134.650)	30 (134.650)	---	---	---
Loxoscélico	7 (12.618)	---	---	---	7 (12.618)
Latrodéctico	1 (407)	---	---	1 (407)	---
Lonômico	16 (46.625)	16 (46.625)	---	---	---
Total	619 (2.513.690)	404 (1.362.614)	106 (846.983)	99 (287.459)	10 (16.634)

* = Número de lotes

() = Número de ampolas

Bot-Crot = Soro Polivalente Antibotrópico-crotálico

Bot-Laq = Soro Polivalente Antibotrópico-laquélico

Bot-Laq-Crot = Soro Polivalente Antibotrópico-laquélico-crotálico

O antígeno é preparado pela dissolução do veneno em solução salina. No esquema de imunização básica, na primeira dose é adicionado o Adjuvante Completo de Freund e na segunda dose o Adjuvante Incompleto de Freund (que além de potencializar a resposta imune, promove uma liberação mais lenta do veneno, reduzindo sua atividade tóxica). As doses de reforço subsequentes são diluídas apenas em salina. O intervalo entre as inoculações variam de 21 dias (com adjuvante) a 7 dias (sem adjuvante). O esquema de re-imunização se inicia 30 dias após a última sangria do animal. Os animais que apresentarem títulos adequados são sangrados em 3 dias consecutivos, com um volume total de sangue entre 15 a 18 litros por animal. O sangue é coletado em um sistema extrator fechado, na presença de anticoagulante. Após a separação do plasma as hemácias são ressuspensas em solução salina e reinfundidas no animal (plasmaferese).

Os métodos atualmente utilizados por praticamente todos os produtores de soros antipecoñentos para o isolamento e concentração dos anticorpos (IgG) e seus fragmentos derivados enzimaticamente (Fab ou Fab'2) são aperfeiçoamentos da técnica originalmente descrita por Pope em 1938, e modificada por Harms em 1948 e Pope e Stevens em 1951.

O soro é purificado pela precipitação do plasma hiperimune por sulfato de amônio, que separa as imunoglobulinas da albumina e das demais proteínas séricas, seguido por fracionamento enzimático, onde a digestão pela pepsina cliva a IgG em fragmentos, F(ab')₂ e Fc (Figura 7) e pela termocoagulação onde ocorre a eliminação do Fc e separação de proteínas termolábeis como o fibrinogênio pela incubação a 56 °C. O sulfato de amônio é removido do soro por diálise.

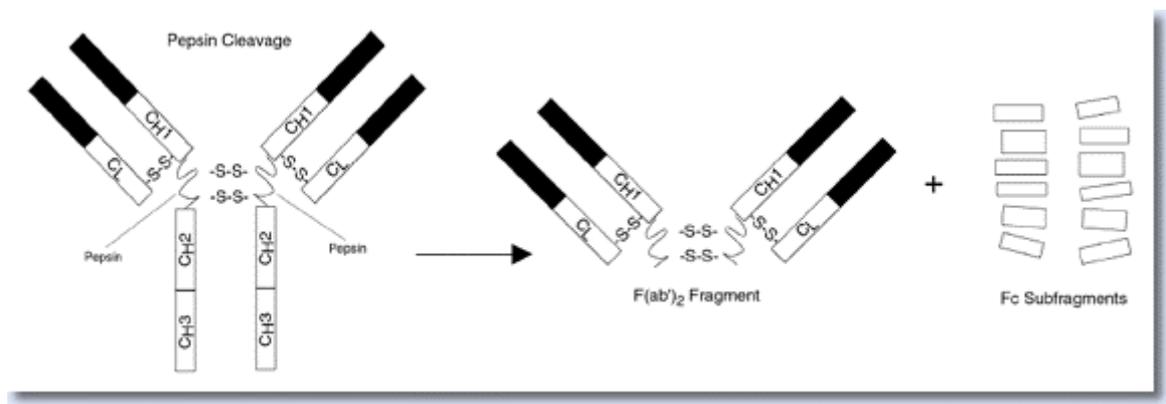


Figura 7: Digestão enzimática de IgG.

O soro purificado é concentrado através de ultrafiltração molecular, submetido à filtração clarificante e esterilizante (Figura 8). O soro é estocado entre 2 e 8 °C e submetido aos testes de controle da qualidade. Após a liberação pelo controle da qualidade, o soro é formulado: diluído para alcançar o título desejado, adicionado o conservante (fenol), isotonicado e tem o pH ajustado na faixa entre 6 e 7. Novamente é submetido a uma filtração esterilizante.

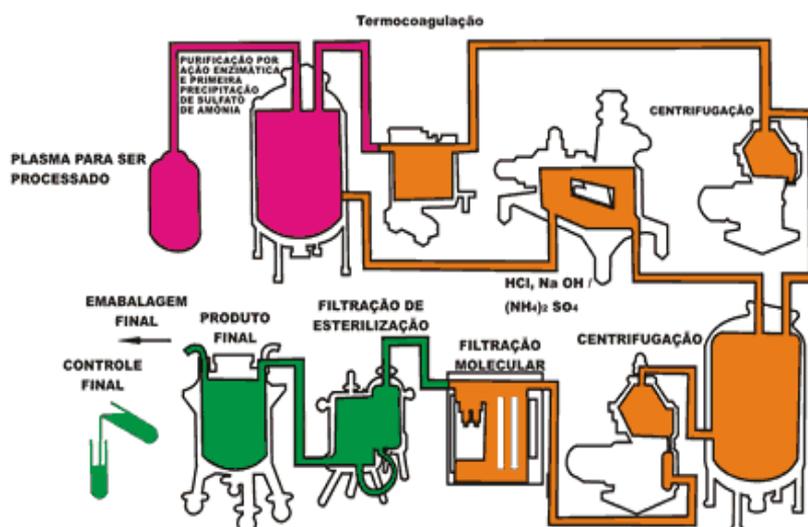


Figura 8: Processamento do Plasma para obtenção de Soro.

O soro terminado a granel (“bulk”), é novamente submetido a diversos testes de controle da qualidade previstos na Farmacopéia Brasileira – Teor de: Cloreto de sódio, fenol, nitrogênio, proteínas, sólidos totais, sulfato de amônio, teste de esterilidade e potência (BRASIL, 2004). Após a liberação do produto terminado a granel é procedido o envase. Após o envase o lote (produto final) é novamente submetido aos mesmos testes de controle da qualidade realizados no produto terminado a granel antes da liberação do lote (CARDOSO, YAMAGUCHI E MOURA DA SILVA, 2003).

Um soro antiveneno ideal deve ser seguro e eficaz, portanto não deve provocar efeitos adversos quando administrado por via sistêmica, além de ter baixo custo. Bioquimicamente, o melhor soro deve apresentar uma alta pureza e potência, com um mínimo de conteúdo de proteínas totais. Clinicamente, é aquele que apresente a melhor eficiência terapêutica com a menor dose e sem efeitos colaterais, e economicamente falando, é aquele que oferece o melhor balanço entre eficácia terapêutica e custos.

A segurança e eficácia da imunoterapia anti-venenamento estão intimamente relacionadas à pureza e à uma cuidadosa determinação da potência do soro (WHO, 1969).

5. Controle da Qualidade dos Soros Antiofídicos

Os métodos descritos por Vital Brazil foram empregados durante muitos anos para a determinação da atividade tóxica dos venenos botrópico e crotálico e da potência

dos soros antibotrópico e anticrotálico. Inicialmente a potência era determinada através da inoculação da mistura veneno-antiveneno pela via endovenosa em coelhos.

Em 1906, este método foi substituído pela inoculação endovenosa em pombos. Para a avaliação da potência do soro, o procedimento se fundamentava na incubação da mistura veneno-antiveneno a 37 °C, durante 30 minutos e posterior inoculação por via endovenosa em pombos (BRAZIL, 1907). O período de observação de 20 a 30 minutos, não possibilitava a quantificação da atividade dos diversos anticorpos antitóxicos, avaliando somente aqueles relacionados à atividade do sistema de coagulação sanguínea (SILES VILLARROEL *et al.*, 1978/79). Como o número de resposta para cada nível de diluição era pequeno, a análise estatística ficava prejudicada, influenciando assim a precisão das estimativas de potência (DALMORA, 1992), este método foi oficializado pela Farmacopéia Brasileira em 1959 (BRASIL, 1959).

Em 1937, Slotta e Syska realizaram experimentos sobre a padronização de métodos para a determinação das atividades tóxicas dos venenos de serpentes em camundongos. Kocholaty e colaboradores testaram, em 1968, diferentes rotas de inoculação em camundongos, demonstrando que as vias endovenosas e intraperitoneal eram capazes de fornecer resultados adequados e reprodutíveis na titulação de antivenenos. Siles Villarroel e colaboradores padronizaram em 1979/80 um ensaio para a determinação da potência dos soros Antibotrópico e Anticrotálico em camundongos, demonstrando que a via intraperitoneal é capaz de prover resultados bastante satisfatórios e reprodutíveis.

Após diversas avaliações experimentais foi padronizada metodologia de titulação da potência do soro antibotrópico, através da inoculação de camundongos pela via intraperitoneal (DALMORA, 1992).

Esta metodologia foi adotada em 1996, quando o Ministério da Saúde do Brasil editou a Portaria nº 174. Esta portaria aprovou as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, detalhando os procedimentos analíticos a serem executados pelos laboratórios produtores e pelo INCQS (BRASIL, 1996). Esta é a metodologia oficial vigente, preconizada pela 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira, parte II, 2004 (BRASIL, 2004).

Uma revisão dos ensaios de potência para soros antiofídicos utilizados em diferentes países demonstrou que a maioria adota o ensaio padrão de letalidade murina (DL₅₀ para o veneno e DE₅₀ para os antivenenos) como metodologia oficial para a liberação dos lotes de antivenenos. Porém, existem consideráveis variações entre as metodologias murinas adotadas como: diferentes vias de inoculação, diferentes volumes

injetados, diferentes números de DL₅₀, peso dos animais e cepas de camundongos utilizados. Testes adicionais para a neutralização de outras atividades específicas dos venenos como: hemorragia, edema, atividade pró-coagulante, defibrinogenação, necrose, etc. não são realizados rotineiramente (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

Para a determinação da potência de venenos e antivenenos, a Organização Mundial da Saúde recomenda a utilização de metodologia de determinação da dose letal média (DL₅₀) e sua inibição (DE₅₀) em camundongos pela via endovenosa (WHO, 1981). Todavia o Brasil e vários países, principalmente Latino-Americanos, utilizam metodologias que prescrevem a via de inoculação intraperitoneal (BRASIL, 2001).

A utilização de preparações locais de venenos e antivenenos de referência é recomendada como essencial para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação lote a lote, assim como, para a comparação dos resultados obtidos entre diferentes laboratórios. Idealmente as atividades dos antivenenos devem ser expressas em unidades neutralizantes de toxinas, baseadas em padrões nacionais ou regionais (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

A pesquisa de métodos ideais para o doseamento dos antivenenos ofídicos tem sido uma constante, desde o advento da soroterapia antiofídica. Em 1907, Vital Brazil já demonstrava preocupação com as metodologias analíticas para a determinação da atividade antitóxica dos soros antiofídicos:

“Desde 1901 prepara o Instituto Butantan seruns antitóxicos em relação à peçonha das cobras que mais freqüentemente determinam acidentes em nosso Paiz, e desde aquella epocha se tem preocupado seriamente com o estudo do método de dosagem dos referidos seruns. Não basta, com effeito preparar un soro activo contra tal ou tal veneno, e saber que elle é activo ou antitóxico, é preciso mais do que isso, é preciso medir do modo o mais exacto possível essa actividade ou, na linguagem technica, medir o poder antitóxico do mesmo serum” (BRAZIL, 1907).

Schöttler em 1954 afirmou que “por mais laboriosa e custosa que esta tarefa possa parecer, ela deve ser atacada com o objetivo de transformar o atual mistério que cerca a titulação dos soros antipeçonhentos em método prático, acessível e cientificamente fundado”. Theakston e colaboradores, afirmaram em 2003 que:

“... é consensual que os testes murinos in vivo possuem pouca ou nenhuma correlação com o envenenamento e terapia em humanos, mas continuam sendo os testes padrão para a determinação da potencia de antivenenos”.

E também que:

“Os testes de rotina para a liberação de lotes de soros antipeçonhentos também devem ser novamente estabelecidos e padronizados utilizando-se ensaios validados”.

A metodologia de inoculação intraperitoneal em camundongos, apesar de apresentar significativo avanço em relação à inoculação endovenosa em pombos, ainda apresenta importantes limitações. Esta técnica, apesar de adotada como metodologia farmacopéica oficial, não é uma metodologia formalmente validada. Até hoje não são bem conhecidos os eventos fisiopatológicos e toxicológicos envolvidos na mortalidade dos camundongos inoculados com veneno botrópico pelas vias endovenosa e intraperitoneal, informações fundamentais para a validação formal da metodologia de determinação da potência do soro antibotrópico.

O cálculo da DL₅₀ para a quantificação da toxicidade aguda foi introduzido em 1927 por Trevan. Ele e seus contemporâneos sabiam que a DL₅₀ de uma droga não era uma constante biológica, pois depende de vários fatores extrínsecos e pode apresentar grandes variações tanto intra quanto inter laboratorialmente . Apesar de 80 anos em uso para fins regulatórios, testes de toxicidade aguda nunca foram propriamente validados segundo padrões atuais, apesar de existirem inúmeras evidências que estudos em animais são altamente variáveis, de limitada confiabilidade e geralmente maus reprodutores de toxicidade aguda em humanos (OECD, 1996).

É sabido que o valor numérico da DL₅₀ é influenciado por vários fatores como: espécie e cepa animal, idade, sexo, dieta, jejum prévio à experimentação, temperatura ambiente, método de confinamento, estação do ano, procedimentos experimentais, etc. Portanto o valor da DL₅₀ não pode ser considerado como uma constante biológica. Através da padronização dos animais de experimentação e das condições experimentais, a variabilidade das determinações de DL₅₀ pode ser reduzida, mas nunca completamente eliminada (ZBINDEN E FLURY-ROVERSI, 1981).

A partir de 1987 o INCQS passou a testar todos os lotes de soros antipeçonhentos antes da liberação para a distribuição pelo Ministério da Saúde. Desde

a implantação das metodologias analíticas para a liberação dos lotes, o INCQS, visando uma padronização dos ensaios de potência, estabeleceu venenos botrópico e crotálico de referência. Estes lotes de veneno são produzidos pelo Instituto Butantan e tem sua potência (DL₅₀) estabelecida pelo INCQS, que é responsável pela sua guarda e distribuição. Estes venenos de referência são utilizados por todos os laboratórios brasileiros na realização dos ensaios de potência tanto para produtos intermediários quanto para produto final.

Entre os anos de 2000 e 2006 o INCQS analisou 619 lotes de soros antiofídicos, o que corresponde a um total de 2.513.690 ampolas. Os ensaios de potência somente são realizados para os Soros Antibotrópico e Anticrotálico, (o que corresponde a 485 lotes e 1.866.726 ampolas), devido à indisponibilidade de venenos de referência para as outras formulações (tabela 4).

Tabela 4: Total de soros antiofídicos analisados anualmente pelo INCQS no período de 2000 a 2006.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Número de lotes	72	88	71	73	88	145	80	617
Total de ampolas	280.757	304.355	281.046	312.541	430.436	554.381	344.937	2.508.453

6. Progressos no Controle da Qualidade de Soros Antiofídicos

As últimas recomendações do Comitê de Padronização Biológica da OMS para a produção e controle de antivenenos datavam de 1969 e 1971. Com o objetivo de discutir os progressos na padronização e controle de antivenenos, foi realizada na Inglaterra em 2001 uma oficina sobre a padronização e controle de antivenenos (“Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms”) organizada pela Unidade de Garantia da Qualidade e Segurança de Biológicos (“Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit”) da OMS (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

O Comitê de Especialistas em Padronização Biológica (“WHO Expert Committee on Biological Standardization”) reunido em Genebra de 26 a 30 de Novembro de 2001, seguindo as recomendações emanadas desta oficina de trabalho, e levando em conta a idade destes documentos e do progresso que tem sido feito no controle da qualidade de produtos biológicos nos últimos anos, decidiu revogar os Requisitos para Soros Imunes de Origem Animal (“Requirements for Immune Sera of Animal Origin”) (WHO, 1969) assim como os Requisitos para Antivenenos de Serpentes (“Requirements for Snake Antivenins”) (WHO, 1971). Estas recomendações

deverão ser substituídas em ocasião oportuna, por um novo documento sobre a produção e controle de antivenenos.

Pelo exposto, as conclusões emanadas desta oficina de trabalho, apesar de não terem o status de recomendações oficiais, devem ser consideradas como o estado da arte na produção e controle de soros anti-teçoehentos.

Dentre várias recomendações desta oficina de trabalho, podemos destacar a necessidade de realizar:

1. A revisão da eficácia dos antivenenos. “Maior atenção deve ser dada à realização de estudos clínicos como meio de avaliar a eficácia e segurança dos antivenenos, definindo a dose média inicial”.
2. A padronização do teste de letalidade em camundongos. “É fortemente recomendado que o teste de letalidade em camundongos seja padronizado”. “Os testes de rotina para liberação de lote, devem também ser novamente estabelecidos e padronizados usando ensaios validados”.
3. A necessidade de padrões nacionais ou regionais e materiais de referência. “Preparações nacionais ou regionais de referência para venenos e antivenenos são essenciais para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação entre lotes, assim como comparações entre diferentes laboratórios. Idealmente as atividades dos antivenenos devem ser expressas em “Unidades Neutralizantes de Toxinas”, baseadas em padrões nacionais ou regionais”.
4. O desenvolvimento de métodos alternativos ao modelo de letalidade murina. “Foi consenso que os ensaios murinos *in vivo* atualmente utilizados causam considerável sofrimento, são caros e mostram pequena ou nenhuma correlação com o envenenamento e terapia em humanos. Certamente, nos últimos anos o uso do ensaio de letalidade murina (DL₅₀ e DE₅₀) assim como outros testes *in vivo* têm sido questionados na Europa e EUA. O “UK Home Office”, por exemplo, solicitou que ensaios alternativos sejam desenvolvidos para a substituição destes testes. A oficina de trabalho concordou que esforços devem ser direcionados para o desenvolvimento de métodos alternativos para a substituição de ensaios em roedores para a determinação da potência de antivenenos”.

Com o objetivo de discutir as questões relacionadas à produção e controle da qualidade dos soros anti-teçoehentos produzidos no país, o INCQS convocou uma

oficina de trabalho nos dias 22 e 23 de maio de 2002, intitulada: Situação atual e perspectivas para a produção e controle de soros antipeçonhentos utilizados no Brasil. Esta reunião contou com a participação das seguintes entidades: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO, Instituto de Biologia do Exército – IBEx, Instituto Butantan – IB e Instituto Vital Brazil – IVB. Dentre várias deliberações resultantes da reunião, podemos destacar a disposição de todos os envolvidos em trabalhar conjuntamente na avaliação e implementação de melhorias nas metodologias analíticas para o controle da qualidade destes produtos. Foi ponto consensual que o desenvolvimento e validação de uma metodologia de avaliação da “potência relativa” do soro antibotrópico frente a um soro padrão de referência nacional, a ser estabelecido, possivelmente seja a estratégia mais adequada no sentido de se obter resultados mais confiáveis, em curto prazo. Foi também sugerido que o desenvolvimento de metodologias utilizando sistemas analíticos *in vitro* possivelmente possa apresentar uma solução definitiva frente aos problemas metodológicos evidenciados atualmente.

A íntegra do informe desta oficina de trabalho está no Anexo I.

7. Métodos alternativos *in vitro* para a determinação da potência de Imunobiológicos

Inicialmente quando foram desenvolvidos os primeiros medicamentos imunobiológicos como a vacina de Jenner contra a Varíola, as vacinas de Pasteur ou os soros contra a erisipela, há mais de um século atrás, estes produtos não eram submetidos a nenhum tipo de controle de qualidade. Conseqüentemente com freqüência as vacinas continham microorganismos virulentos insuficientemente inativados, estavam contaminadas por outros patógenos ou possuíam potência insuficiente.

Logo ficou evidente que ocorriam grandes diferenças na qualidade entre diferentes lotes de um mesmo produto e conseqüentemente as primeiras regulamentações para o controle da qualidade dos lotes foram introduzidas. Historicamente grande parte destes testes utilizava, e utiliza até hoje, um grande número de animais. Porém, indubitavelmente, sem a utilização de experimentos com animais, estes produtos jamais teriam a qualidade que têm hoje e sua tão bem sucedida utilização e difusão em nível mundial jamais teria sido possível (HALDER, 2001).

Estima-se, mundialmente, que mais de 10 milhões de animais sejam utilizados anualmente no desenvolvimento, produção e controle da qualidade de imunobiológicos, sendo cerca de 80% em testes rotineiros de controle da qualidade para liberação de lotes (HENDRIKSEN, 2000). Estes testes podem ser divididos em duas categorias:

1. Os testes de segurança e eficácia, para efeito de registro, que assegurem que o imunobiológico induza uma imunidade protetora após a sua administração e garantam que o produto não provoque reações adversas inesperadas.
2. Ensaio de segurança e potência para o controle da qualidade e liberação dos lotes (HALDER, 2001).

Somente para a realização do ensaio de potencia dos soros antibotrópico e anticrotático (produto final), são utilizados no INCQS, aproximadamente 5.500 camundongos por ano.

A regulamentação dos estudos utilizando animais teve início em 1876 no Reino Unido, com a publicação do “British Cruelty to Animals Act”, segundo o qual, pesquisadores deviam requerer licenças anualmente e previa que qualquer experimento que provocasse dor nos animais necessitava de autorização especial (SELLS, 2003).

Em 1959, William Russell e Rex Burch, introduziram o conceito dos 3Rs, a saber, “Replacement, Reduction and Refinement” (Substituição, Redução e Refinamento), a partir de um projeto iniciado em 1954 pela Federação de Universidades pelo Bem Estar Animal (“Universities Federation for Animal Welfare - UFAW) que levou à publicação: Princípios da técnica experimental humanitária (“The principles of humane experimental technique”). Russell e Burch definiram **redução**, como um meio de diminuir o número de animais usados para obter a mesma quantidade de informação com a mesma precisão; **refinamento**, como qualquer desenvolvimento que leve à diminuição na incidência ou severidade de procedimentos não humanitários aplicados aos animais que necessariamente devam ser utilizados e **substituição** como qualquer método científico empregando matriz não sensível, que possa substituir métodos que utilizem vertebrados vivos e conscientes (RUSSELL E BURCH, 1959).

Este trabalho foi o ponto de partida para um tratamento humanitário aos animais de experimentação sem abrir mão da qualidade científica das pesquisas. Porém, pouca atenção foi dedicada ao conceito dos 3Rs nos anos 1960. Somente na década de 1970 ocorreram avanços significativos na área, principalmente após a publicação por David Smyth em 1978 do livro “Alternatives to animal experiments”, onde ele estabelece a

definição de alternativas sob a ótica dos 3Rs: “Todos os procedimentos que possam substituir completamente a necessidade de experimentação animal, reduzir o número de animais utilizados ou diminuir a intensidade de dor ou sofrimento ao qual os animais são submetidos”.

A década de 1980 foi marcada pela introdução de inúmeras leis e convenções baseadas no princípio dos 3Rs, principalmente na Europa. Nos EUA foi publicado um relatório em 1986 pelo “Office of Technology Assessment” do Congresso Norte Americano, intitulado “Alternatives to animal use in research, testing and education”.

No final dos anos 1980 até os dias de hoje, uma série de novas leis e recomendações, foram publicadas em diversas partes do mundo, tornando cada vez mais restrita a utilização de animais na experimentação biomédica.

No Brasil apesar de grande pressão de organizações ligadas ao bem estar animal e de iniciativas em nível estadual e municipal no sentido de regulamentar a utilização de animais no ensino e na experimentação biomédica, até hoje não existe regulamentação em nível federal.

Apesar do grande avanço técnico-científico alcançado na produção de medicamentos imunobiológicos, como antitoxinas e vacinas, os testes de segurança e eficácia ainda requerem um grande número de animais. Porém os recentes progressos tecnológicos alcançados no desenvolvimento e validação de metodologias *in vitro* assim como as crescentes pressões de entidades em defesa do bem estar animal e uma regulamentação nacional e internacional cada vez mais restritiva ao uso de animais para experimentação biológica fazem com que a tendência mundial seja substituir os ensaios em animais por metodologias que utilizem sistemas *in vitro*. Desta forma, buscam-se técnicas alternativas que minimizem ou substituam o uso de animais, mas que também forneçam análises precisas, rápidas e com reprodutibilidade de resultados. O estabelecimento e validação de metodologias alternativas ao uso de animais trariam ainda vantagens adicionais como a redução de custos e tempo de análise (PURCHASE *et al.*, 1998).

A mudança no conceito de controle da qualidade de medicamentos biológicos, da confiança nos testes de produto final, avaliados lote a lote, para o conceito de consistência de produção oferece a oportunidade para a redução do número de animais utilizados, assim como para a promoção de métodos alternativos. A ênfase está sendo posta na combinação de testes *in vitro* que possibilitem a monitoração da consistência entre os lotes produzidos e os lotes submetidos aos estudos clínicos em humanos. Este novo conceito de controle da qualidade, já vem sendo posto em prática no controle da

qualidade de novas vacinas bem definidas bioquimicamente. Porém, a possibilidade deste novo conceito de consistência de produção ser aplicado a produtos convencionais pouco definidos, ainda deve ser investigada (HALDER, 2001).

A validação e conseqüente aprovação de métodos analíticos alternativos para fins regulatórios apresenta alguns desafios e dificuldades. Existem estudos que indicam que são necessários aproximadamente entre 9,5 a 11,5 anos entre o desenvolvimento de um método até a sua aprovação e publicação em monografias farmacopéicas ou recomendações oficiais (HENDRIKSEN, SPIESSER E AKKERMANS 1998). Particularmente o período entre o término de um processo de validação bem sucedido e sua implantação como metodologia oficial é de cerca de 3,5 anos.

A validação de um método alternativo é um processo gradual, posterior a padronização, pelo qual a confiabilidade e a relevância de um teste são estabelecidas para um determinado fim (BALLS *et al.*, 1990). Nos últimos anos o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM) em cooperação com diversos especialistas, têm publicado recomendações para a validação de métodos alternativos.

O processo de validação de um método consiste de um modo geral em cinco etapas. Estas etapas refletem a seqüência de atividades a serem realizadas em um estudo de validação prospectivo (BALLS *et al.*, 1990; CURREN *et al.*, 1995; BALLS *et al.*, 1995; BALLS E KARCHER, 1995; WORTH E BALLS, 2001).

1. Desenvolvimento – Envolve a descrição dos fundamentos do método e a definição do seu objetivo científico, assim como uma justificativa da sua importância e necessidade, o tipo de avaliação, o espectro químico dos produtos ao qual o método pode ser aplicado e a disponibilidade de outros testes com características semelhantes. Um exemplo que justifique o teste em termos de sua potencial confiabilidade e relevância deve ser estabelecido. Finalmente um protocolo compreensivo e suficientemente detalhado, adequado para as avaliações preliminares sobre a transferibilidade entre laboratórios deve ser realizado.
2. Pré-validação – A etapa da pré-validação é muito importante antes de se realizar um estudo de validação formal em larga escala. Esta etapa deve envolver toda otimização e padronização no protocolo que seja considerada necessária, a identificação de qualquer problema inesperado incluindo aqueles relacionados

com a análise dos resultados, assim como uma avaliação inicial da transferibilidade interlaboratorial do método.

3. Validação – O principal objetivo de um protocolo de validação é conduzir um estudo cego interlaboratorial, como instrumento para avaliar se o método é relevante e confiável para um ou mais objetivos específicos, de acordo com critérios de desempenho previamente estabelecidos. Um estudo de validação formal deve compreender uma fase preliminar (na qual um pequeno número de amostras codificadas é testado) e uma fase definitiva (com uma amostragem maior).
4. Avaliação independente – Antes de submeter qualquer resultado à apreciação das autoridades regulatórias, os resultados devem ser publicados e avaliados por um ou mais grupos de discussão científica independentes, sob a coordenação de organizações nacionais ou internacionais. Os membros destes painéis devem ser independentes do estudo de validação sob consideração e devem ser representativos das comunidades: científica, toxicológica, industrial, regulatória e do bem estar animal. A avaliação dos resultados de um estudo de validação deve envolver uma avaliação minuciosa de todos os aspectos do programa, incluindo todas as afirmações sobre a validade dos procedimentos alternativos propostos. O principal objetivo da avaliação independente deve ser considerar se os propósitos e objetivos do estudo de validação foram alcançados. A avaliação independente deve avaliar o valor científico dos procedimentos alternativos em comparação com outros métodos tradicionais, principalmente com as metodologias oficiais. Deve também avaliar a necessidade de um método alternativo e a aplicabilidade deste método como parte do processo regulatório.
5. Aceitação regulatória – É essencial que qualquer método que seja considerado adequadamente validado como substituto de um método em utilização receba o reconhecimento, se possível difundido internacionalmente. Após os coordenadores e participantes do estudo, conjuntamente com a avaliação independente considerarem que o método alternativo é válido para a finalidade a que se propõe, uma proposta deve ser encaminhada às autoridades regulatórias competentes, no caso do Brasil, à Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira.

O desenvolvimento e a validação de metodologias alternativas *in vitro*, para a determinação da potência de venenos de serpentes e soros antiofídicos, possui um

complicador a mais, devido à complexidade e variabilidade na composição destes venenos. Alguns destes componentes ativos dos venenos podem agir sinergisticamente *in vivo*, inclusive levando à liberação de diversos autacóides.

A composição dos venenos de serpentes é extremamente heterogênea. A eletroforese bidimensional do veneno de *B. asper* revela mais de 140 bandas (spots) de proteínas (SARAVIA *et al.*, 2001). Os efeitos tóxicos destes venenos são atribuídos a um grande número de componentes, entretanto os principais eventos fisiopatológicos associados ao envenenamento por serpentes da subfamília Crotalinae, muito provavelmente são dependentes de um limitado número de componentes. Portanto a identificação das principais proteínas tóxicas envolvidas no processo de envenenamento por este grupo de serpentes é fundamental tanto para o desenvolvimento de quimioterapias específicas (RUCAVADO, ESCALANTE E GUTIÉRREZ, 2004), quanto para o desenvolvimento e validação de métodos alternativos *in vitro* para a determinação da potência dos antivenenos. Portanto, pelo exposto, o desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro* para a avaliação da potência de venenos e antivenenos é particularmente um grande desafio.

Alguns métodos alternativos têm sido desenvolvidos para a determinação da atividade biológica dos venenos de serpentes, assim como para a avaliação da potência de soros antiofídicos, a maioria baseada na neutralização *in vitro* de efeitos específicos dos venenos, como por exemplo, antiprocoagulante, mionecrótico, hemolítico ou efeitos proteolíticos e citotóxicos em cultivos celulares (da SILVA E BIER, 1982; WARRELL *et al.*, 1986; GUTIÉRREZ *et al.*, 1988; LAING *et al.*, 1992; GOWDA E MIDDLEBROOK, 1993; GOÑI, VAISBERG E ZAVALETA, 1992; ARAÚJO *et al.*, 1999; GIRÓN *et al.*, 2005).

Também foram propostos métodos utilizando ovos embrionados (SELLS, LAING E THEAKSTON, 2001), degradação da gelatina (CLEGG *et al.*, 1997), hemaglutinação passiva e inibição da hemaglutinação (PRADHAN *et al.*, 2007), ELISA (THEAKSTON, 1983; RIAL *et al.*, 2006), SE-HPLC (PRICE III E SANNY, 2007), determinação e neutralização da atividade enzimática para o soro antiloxoscélico (BARBARO *et al.*, 2005; OLVERA *et al.*, 2006).

Estas metodologias *in vitro* podem ser classificadas em dois grupos:

1. Metodologias utilizadas para a pesquisa: têm como objetivo, investigar mecanismos fisiopatológicos relacionados ao envenenamento.
2. Metodologias utilizadas para fins regulatórios: estas metodologias devem ser relativamente simples e baseadas em reações específicas e bem conhecidas que

sejam apropriadas para uso em ensaios de rotina tanto durante o processo de produção, quanto para a liberação de lotes, ou outras ações relacionadas à Vigilância Sanitária.

Apesar da grande diversidade de metodologias propostas, nenhum destes métodos foi submetido a um estudo de validação frente ao modelo murino de determinação da potência de antivenenos.

Ensaios *in vitro* são mais convenientes para a investigação de frações de venenos com mecanismos de ação específicos do que os modelos com animais inteiros. Um ensaio *in vitro* pode avaliar um processo fisiológico específico, mas a obrigatoriedade de realizar ensaios em animais inteiros é baseada na necessidade de quantificar o efeito fisiopatológico total *in vivo* de um veneno ou a capacidade de um antiveneno em neutralizar o efeito total do veneno. A farmacologia dos venenos, assim como atividade dos antivenenos, ainda não é suficientemente conhecida para permitir ensaios *in vitro* precisos o bastante para serem aceitos como alternativos (SELLS, 2003).

Os venenos das serpentes da família Viperidae são ricos em metaloproteinasas, uma família numerosa de enzimas proteolíticas dependentes de zinco que exercem múltiplos efeitos deletérios, em nível local, como hemorragias (BORKOW, GUTIÉRREZ E OVADIA, 1993; FRANCESCHI *et al.*, 2000), mionecrose (RUCAVADO *et al.*, 1995), edema (GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1995), formação de bolhas (RUCAVADO, NÚÑEZ E GUTIÉRREZ, 1998), ativação do complemento (FARSKY *et al.*, 2000), dermonecrose (GUTIÉRREZ E RUCAVADO, 2000), e atividades pró-inflamatórias (RUCAVADO *et al.*, 2002). As metaloproteinasas também atuam no nível sistêmico, provocando hemorragia, coagulação, defibrinogenação, e inibição da agregação plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1996). Estas enzimas também facilitam a dispersão de outros componentes do veneno do local da picada (GUTIÉRREZ E RUCAVADO, 2000; COSTA *et al.*, 2002).

Um importante inibidor das metaloproteinasas é o Batimastat, um peptídeo mimético de baixo peso molecular, contendo um grupo hidroxamato responsável pela quelação do átomo de zinco no sítio ativo das metaloproteinasas, assim inibindo a ação destas enzimas. Estudos de inibição das metaloproteinasas de venenos de cobras (SVMP, do inglês, Snake Venoms Metalloproteinases) com Batimastat evidenciam que as SVMP são os componentes mais importantes responsáveis pela atividade procoagulante do veneno de *B. asper*. Os efeitos locais induzidos pela metaloproteinase hemorrágica BaP1, do veneno de *B. asper* foram completamente anulados pelo Batismatat (ESCALANTE *et al.*, 2000), assim como a extensão do dano tecidual local

induzido pelo veneno total de *B. asper*, evidenciando a significância do papel das SVMP na patogenia da lesão local por este veneno (RUCAVADO *et al.*, 2000).

Estes resultados sugerem fortemente que um ensaio *in vitro* que seja capaz de quantificar a atividade proteolítica do veneno botrópico e a capacidade do antiveneno em neutralizá-lo, possa correlacionar com a determinação da potência *in vivo* em camundongos, portanto, ser um forte candidato a método alternativo *in vitro* para a substituição dos ensaios murinos.

JUSTIFICATIVA

O presente estudo está dividido em três etapas:

I. A primeira se propõe a avaliar o desempenho dos ensaios para a determinação da potência dos venenos botrópico e crotálico pela determinação da DL_{50} e da potência dos soros antibotrópico e anticrotálico pela determinação da DE_{50} , comparando os resultados obtidos pelo INCQS com os obtidos pelos laboratórios produtores, visando um diagnóstico da situação atual das determinações da potência dos soros antibotrópico e anticrotálico utilizados no Brasil.

II. A segunda se dedica ao estabelecimento de Padrões de Referência Nacionais (veneno botrópico e crotálico e soro antibotrópico) e a determinação do seu perfil de estabilidade. Tendo em vista que o estabelecimento destes materiais de referência para o controle da qualidade de soros antipeçonhentos é reconhecidamente um instrumento fundamental para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação entre lotes assim como comparações entre diferentes laboratórios. A disponibilidade de um soro antibotrópico de referência nacional, que expresse a potência relativa em unidades neutralizantes, será importante na redução da variação entre os resultados obtidos em diversos laboratórios, assim como será fundamental na avaliação comparativa de metodologias *in vitro* alternativas aos ensaios em camundongos, permitindo a expressão dos resultados obtidos por diferentes metodologias em uma mesma unidade de medida mantendo os mesmos valores mínimos para a liberação dos lotes.

III. A terceira visa o desenvolvimento de uma metodologia *in vitro* para a determinação colorimétrica da atividade citotóxica do veneno de *B. jararaca* em células VERO, assim como para a determinação da potência do soro antibotrópico pela inibição do efeito citotóxico em cultivos celulares. A obtenção de métodos *in vitro* para a avaliação da potência de soros antipeçonhentos, é uma recomendação da OMS, com o objetivo de obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis, redução de custos e bem estar animal.

Este estudo busca fazer um diagnóstico da situação atual da determinação da potência do soro antibotrópico e anticrotálico no Brasil, assim como propor e avaliar materiais de referência e metodologias alternativas à oficial (potência relativa *in vivo* e inibição da citotoxicidade *in vitro*), com o objetivo de melhor avaliar a qualidade dos soros antipeçonhentos utilizados no Brasil.

II. OBJETIVOS

1. Avaliar a metodologia analítica oficial para a determinação da potência dos venenos botrópico e crotálico e dos soros antibotrópico e anticrotálico.
2. Estabelecer e determinar a estabilidade de padrões de referência nacionais para veneno botrópico, crotálico e soro antibotrópico e fazer uma avaliação preliminar do método da potência relativa.
3. Desenvolver metodologia analítica *in vitro* para a determinação da potência do veneno botrópico e do soro antibotrópico, através do método de inibição da citotoxicidade.

III. PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA OFICIAL PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DOS VENENOS BOTRÓPICO E CROTÁLICO E DOS SOROS ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO

III.1. MÉTODOS

1. Controle da Qualidade de Soros Antipeçonhentos.

Todas as metodologias analíticas utilizadas para o controle da qualidade e conseqüente liberação dos lotes de soros antiofídicos foram realizadas de acordo com as Normas Oficiais Brasileiras, *Immunosera ad usum humanum* e *Immunoserum bothropicum*, publicadas pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, fascículo 5, parte II (BRASIL, 2004), detalhadas na Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996 do Ministério da Saúde, que aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico (BRASIL, 1996).

Os protocolos de determinação da DL₅₀ e da DE₅₀ foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA), através do protocolo nº 0135/02.

2. Monografias da 4ª edição, fascículo 5, parte II da Farmacopéia Brasileira para o Soro Antibotrópico e Soro Anticrotálico.

2.1. Soros Hiperimunes Para Uso Humano (*Immunosera ad usum humanum*).

Os soros hiperimunes são preparações contendo imunoglobulinas purificadas, de origem animal, que neutralizam especificamente toxinas bacterianas, bactérias, vírus ou componentes tóxicos do veneno de uma ou mais espécies de animais peçonhentos. Um conservante adequado pode ser adicionado e o produto final é apresentado sob forma líquida ou liofilizada. O produto líquido é límpido, incolor ou ligeiramente amarelado, não apresentando grumos ou partículas. O soro liofilizado consiste de pó branco ou ligeiramente amarelado que, uma vez reconstituído, apresenta as mesmas características das preparações líquidas. As imunoglobulinas purificadas são obtidas por tratamento enzimático e precipitação fracionada, ou por outros procedimentos químicos ou físicos, de plasmas de animais sadios imunizados com os antígenos específicos. Durante o

processo de imunização, os animais não devem ser tratados com penicilina ou estreptomicina.

Para assegurar a qualidade do produto nas diversas fases de processamento, devem ser realizadas as seguintes determinações:

- Cloreto de sódio - 0,70% a 0,90% (p/V).
- Fenol - No máximo 0,35% (p/V).
- Nitrogênio e proteínas - No máximo 0,3% (p/V) de nitrogênio não protéico. No máximo 15% (p/V) de proteínas.
- pH - 6,0 a 7,0
- Determinação de volume - Cumpre o teste.
- Sólidos totais - No máximo 20%.
- Sulfato de amônio. No máximo 0,2% (p/V).
- Umidade residual (determinada quando o produto é apresentado sob a forma liofilizada).
- Potência - É determinada de acordo com os procedimentos indicados nas monografias respectivas.
- Pirogênio.
- Esterilidade.

A preparação é distribuída assepticamente em ampolas ou frascos-ampola. A liofilização do produto quando requerida deve assegurar concentração de água não superior a 3% do produto final.

2.1.1. Identificação.

Baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por imunodifusão dupla radial (*Ouchterlony*). Observar a presença de linha de precipitação, característica da reação de identidade entre os componentes analisados.

- a) A determinação da potência em animais suscetíveis pode ser utilizada para identificação do produto, conforme descrito na monografia da amostra correspondente.

2.1.2. Testes de segurança biológica.

Esterilidade: Cumpre o teste. Utilizar somente o método de filtração por membrana, que deve ter porosidade nominal não maior do que 0,45 µm.

Pirogênios: Cumpre o teste. Injetar 1 mL/kg e não reutilizar os animais usados no teste. Não é permitida pela Farmacopéia Brasileira, a determinação de endotoxinas *in vitro*, por testes como o LAL.

2.1.3. Determinação da potência.

Proceder conforme descrito na monografia específica. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

2.2. Soro Antibotrópico (*Immunoserum bothropicum*).

O soro antibotrópico é solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar, no mínimo, 5 mg de veneno de referência de *B. jararaca*.

2.2.1. Determinação da potência.

O ensaio de potência da amostra tem como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa de veneno de referência.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *B. jararaca*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ de veneno: reconstituir a preparação liofilizada de veneno para determinada concentração p/V, com solução fisiológica 0,85% (p/V). Efetuar diluições em progressão geométrica com o mesmo diluente, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, e igualando os volumes finais.

Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos suíços albinos (machos ou fêmeas) de 18 a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Calcular a DL₅₀ utilizando métodos estatísticos comprovados (probitos, Spearman & Karber, transformação angular ou logitos). A faixa

de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições progressivas da amostra em solução fisiológica a 0,85% (p/V), utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5 de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno seja idêntico em todos os tubos de ensaio. Reconstituir e diluir o veneno de referência com solução fisiológica 0,85% (p/V) e adicionar em cada tubo volume constante, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contenha 5 DL₅₀. Homogeneizar e incubar a mistura a 37 °C por 60 minutos. Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo, de cada mistura, em grupos de pelo menos oito camundongos albinos suíços de 18 a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada mistura. Calcular a Dose Efetiva 50% (DE₅₀) em microlitros, utilizando métodos estatísticos já citados anteriormente. A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem seus limites. Calcular a potência em miligramas por mililitro, utilizando a equação:

$$\text{Potência (mg/mL)} = \frac{\text{Tv}-1 \times \text{DL}_{50} \text{ do veneno}}{\text{DE}_{50}}$$

Onde: Tv = número de DL₅₀ utilizadas por camundongo na dose teste de veneno.

O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 mL da amostra.

2.3. Soro Anticrotálico (*immunoserum crotalicum*).

O soro anticrotálico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus*. Cumpre com as especificações e testes prescritos na monografia de Soros Hiperimunes para uso humano. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar, no mínimo, 1,5 mg de veneno de referência de *C. durissus terrificus*.

Os testes para identificação, características, ensaios físico-químicos, testes de segurança biológica, determinação da DL₅₀ de veneno e determinação da potência do soro anticrotálico devem ser executados conforme descrito em “*Características*” na monografia de Soros hiperimunes para uso humano e em “*Determinação da potência do soro*” na monografia de soro antibotrópico.

3. Procedimentos Operacionais Padronizados para a determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) e da Dose Efetiva 50% (DE₅₀).

Todas as determinações da DL₅₀ e da DE₅₀ foram realizadas de acordo com os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's): INCQS nº 65.3440-006 - Determinação da dose letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus* e de *Bothrops jararaca* – in vivo, nº 65.3440-004 - Ensaio de potência para o soro antibotrópico - in vivo e nº 65.3440-004 - Ensaio de potência para o soro anticrotálico-in vivo.

Estes POP's descrevem minuciosamente todas as etapas da execução, interpretação e registro dos resultados e estão de acordo com o descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004).

3.1. Determinação da Dose Letal 50% do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* – in vivo.

3.1.1. Procedimentos.

a) Utilizar camundongos suíços albinos de qualquer sexo, pesando entre 18 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRZ. Os animais foram abrigados em gaiolas plásticas com tampas de aço inoxidável e cama de maravalha autoclavada, os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura de 23 °C ± 2 °C, umidade relativa de aproximadamente 70% e fotoperíodo com ciclos de oito horas.

b) O veneno de referência BRABOT, que é fornecido pelo Instituto Butantan em frascos com aproximadamente 30 mg de veneno liofilizado foi reconstituído com 30 mL de salina a 0,85% e homogeneizado, evitando a formação de espuma.

c) Todo o procedimento de diluição de veneno foi realizado em capela de exaustão.

d) Foram feitas cinco diluições do veneno com salina a 0,85%, utilizando um fator de diluição constante de 1,2 (Tabelas 5 e 6).

e) De cada diluição foram inoculados 10 camundongos de 18 a 22 g com 0,5 mL por via intraperitoneal (IP).

f) Os camundongos inoculados foram colocados em caixas adequadas, identificadas conforme fichas padronizadas.

g) Os camundongos foram observados com 24 h e 48 h. Todos os procedimentos e o número de animais vivos sobre o total de inoculados foram anotados em protocolo padronizado.

h) Os animais sobreviventes foram sacrificados em câmara de CO₂.

Tabela 5: Esquema de diluição do veneno botrópico.

Tubo	µg de veneno por camundongo	Solução de veneno (1mg/mL)	Salina (mL)
1	62,2	0,74 mL	5,26
2	51,8	0,43 mL	5,38
3	43,2	0,51 mL	5,49
4	36,0	0,43 mL	5,57
5	30,0	0,36 mL	5,64

Tabela 6: Esquema de diluição do veneno crotálico.

Tubo	µg de veneno por camundongo	Solução de veneno (10µg/mL)	Salina (mL)
1	3,37	4,05 mL	1,95
2	2,25	2,70 mL	3,30
3	1,50	1,80 mL	4,20
4	1,00	1,20 mL	4,80
5	0,67	0,80 mL	5,20

3.1.2. Critérios para aceitação do ensaio.

a) A DL₅₀ do veneno deve estar dentro dos limites de confiança ($p = 0,95$) compreendidos entre 50 e 200% do valor nominal do veneno de referência.

b) Os animais utilizados no ensaio devem sobreviver proporcionalmente à quantidade de veneno presente na diluição.

c) A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10 e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear ($p > 0,05$).

3.1.3. Cálculos.

A determinação da DL₅₀ do veneno botrópico foi realizada pelo teste estatístico de Probitos (FINNEY, 1971) utilizando programa fornecido pela OMS (WHOPROG).

3.2. Ensaio de potência para o soro antibotrópico – *in vivo*.

3.2.1. Procedimentos.

a) Foi feita uma mistura da amostra a ser testada, juntando três ampolas do mesmo lote. Quando diferentes lotes foram provenientes do mesmo granel (sub lotes), foi realizada uma mistura representativa de todos os sub lotes. Quando o lote era composto por até três sub lotes, foi feita uma mistura com duas ampolas de cada sub lote e quando o lote era composto por mais de três sub lotes a mistura foi realizada com uma ampola de cada sub lote.

b) O Veneno Botrópico de Referência foi ressuspendido, adicionando-se 1 mL de salina ao frasco original do veneno, aguardou-se cinco minutos a temperatura ambiente e homogeneizou-se até a completa dissolução do líófilo. O volume final da solução foi então ajustado para 30 mL (1mg/mL).

c) Foram adicionados em tubos de ensaio a salina, a mistura do soro e o veneno de referência de acordo com o esquema de diluição a seguir (fator de diluição 1:1,3). Cada animal recebeu 5 DL₅₀ do veneno de referência (Tabela 7).

d) A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 60 minutos.

e) Os camundongos foram pesados e utilizados somente aqueles com o peso entre 18 e 22 gramas.

f) Os animais foram inoculados com 0,5 mL pela via IP em grupos de oito camundongos.

g) Os animais foram acomodados em gaiolas identificadas com fichas padronizadas.

h) A leitura foi realizada com 24 e 48 horas, anotando-se o número de animais vivos sobre o total de animais inoculados.

i) Os animais sobreviventes foram sacrificados em câmara de CO₂.

Tabela 7: Esquema de diluição do soro antibotrópico.

Salina	Soro	Veneno (1 mg/mL)
2,70 mL	0,50 mL	2,8 mL
2,82 mL	0,38 mL	2,8 mL
2,91 mL	0,29 mL	2,8 mL
2,98 mL	0,22 mL	2,8 mL

Observação: para cada ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico foi realizada em paralelo uma determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência. Todo o procedimento de diluição de veneno foi realizado em capela de exaustão.

3.2.2. Critérios para aceitação do ensaio.

a) A DL₅₀ do veneno de referência deve estar dentro dos limites de confiança, estabelecidos quando da determinação da DL₅₀ do veneno de referência.

b) O limite de confiança ($p = 0,95$) deve estar compreendido entre 50% e 200% da potência estimada.

c) Os animais utilizados no ensaio de soroneutralização devem sobreviver proporcionalmente à quantidade de soro presente nas diluições.

d) A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10 e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear ($p > 0,05$).

e) Para a realização do cálculo da DE₅₀ deve ser utilizado o cálculo de, pelo menos, três diluições consecutivas, sendo que a dose que protege 50% deve estar no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio.

3.2.3. Cálculo da DE₅₀.

O valor da DE₅₀ foi calculado utilizando-se o método estatístico Probitos (FINNEY, 1971).

A potência do soro foi expressa em mg de veneno neutralizado por 1 mL de soro, segundo a fórmula preconizada pela Farmacopéia Brasileira.

$$\text{Potência (mg/mL)} = \frac{(TV-1) (DL_{50})}{DE_{50}}$$

Onde: TV = Número de DL₅₀ inoculadas por animal.

3.2.4. Interpretação dos resultados.

O produto foi considerado satisfatório quando a potência foi, no mínimo, igual a 1,5 mg/mL.

3.2.5. Critérios para repetição de ensaios.

- a) Em caso de ensaio inválido, o ensaio foi repetido até se obter um resultado válido.
- b) Em caso de amostra com resultado insatisfatório, o ensaio foi repetido por no máximo mais duas vezes. Foi considerado como resultado final, a média ponderada dos dois ou três ensaios realizados.
- c) Caso os resultados mais próximos não tenham diferido mais do que 25%, os resultados foram aceitos. Caso os resultados mais próximos tenham diferido mais do que 25%, os resultados não foram aceitos e foi iniciada uma investigação sobre o ocorrido. Após a conclusão da investigação e da implementação das ações corretivas necessárias o ensaio foi novamente repetido.

3.3. Ensaio de potência para o soro anticrotálico – *in vivo*.

3.3.1. Procedimentos.

- a) Foi feita uma mistura da amostra a ser testada, juntando três ampolas do mesmo lote. Quando diferentes lotes foram provenientes do mesmo granel (sub lotes), foi realizada uma mistura representativa de todos os sub lotes. Quando o lote era composto por até três sub lotes, foi feita uma mistura com duas ampolas de cada sub lote e quando o lote era composto por mais de três sub lotes a mistura foi realizada com uma ampola de cada sub lote.
- b) A mistura de soros foi diluída a 1:10 em salina (1 mL de soro + 9 mL de salina).
- c) O Veneno Crotálico de Referência foi ressuspendido, adicionando-se 1 mL de salina ao frasco original do veneno (10 mg/mL), aguardou-se cinco minutos a temperatura ambiente e homogeneizou-se até a completa dissolução do líofilo. A solução do veneno de referência (10 mg/mL) foi então diluído a 1:100 (0,1 mL/ de veneno + 9,9 mL de salina).
- d) Foram adicionados em tubos de ensaio a salina, a mistura do soro e o veneno de referência de acordo com o esquema de diluição a seguir (fator de diluição 1:1,5). Cada animal recebeu 5 DL₅₀ do veneno de referência.

- e) A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 60 minutos.
- f) Os camundongos foram pesados e utilizados somente aqueles com o peso entre 18 e 22 gramas.
- g) Os animais foram inoculados com 0,5 mL pela via IP em grupos de oito camundongos.
- h) Os animais foram acomodados em gaiolas identificadas com fichas padronizadas.
- i) A leitura foi realizada com 24 e 48 horas, anotando-se o número de animais vivos sobre o total de animais inoculados.
- j) Os animais sobreviventes foram sacrificados em câmara de CO₂.

Tabela 8: Esquema de diluição do soro anticrotálico.

Salina	Soro	Veneno (1 mg/mL)
4,59 mL	0,53 mL	0,88 mL
4,77 mL	0,35 mL	0,88 mL
4,89 mL	0,23 mL	0,88 mL
4,96 mL	0,16 mL	0,88 mL
5,02 mL	0,10 mL	0,88 mL

Observação: para cada ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico foi realizada em paralelo uma determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência. Todo o procedimento de diluição de veneno foi realizado em capela de exaustão

3.3.2. Critérios para validação do ensaio; cálculo da DE₅₀; interpretação dos resultados e critérios para repetição de ensaios.

Os procedimentos para todos estes itens foram realizados como descrito em 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4 e 3.2.5.

3.4. Avaliação da precisão inter ensaios (repetibilidade) das determinações de DL₅₀ dos venenos botrópico e crotálico.

Para cada ensaio de potência rotineiro, um ensaio de DL₅₀ foi realizado em paralelo como um controle positivo para as determinações de DE₅₀.

A precisão interensaios (repetibilidade) das determinações da DL₅₀ dos venenos botrópico e crotálico foi avaliada através da determinação do Coeficiente de Variação (CV) entre uma série de determinações independentes da DL₅₀ dos venenos de referência realizadas no INCQS, e refletem as diferentes condições do laboratório (dias,

técnicos, etc.) durante a realização dos ensaios. O CV foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{CV} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100$$

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) foi aplicado para testar se a característica estudada da amostra é oriunda de uma população com distribuição normal. O teste é baseado na maior diferença absoluta entre a frequência acumulada observada e a estimada pela distribuição normal. Um K-S = 1 corresponde a uma distribuição perfeitamente normal (SOKAL E ROHLF, 1997).

3.5. Avaliação da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) das determinações de DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05.

A precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) expressa a variação entre laboratórios através de estudos colaborativos interlaboratoriais e foi avaliada pelo CV.

Todos os três laboratórios produtores nacionais e o INCQS participaram deste estudo.

Cada laboratório realizou pelo menos cinco determinações válidas da DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05 de acordo com as recomendações da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004). Cada laboratório seguiu o seu próprio POP. Os dados brutos foram enviados para o INCQS para a análise estatística. O método de Probitos foi utilizado para a determinação dos valores de DL₅₀.

3.6. Avaliação da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) das determinações de potência de lotes comerciais de Soros Antibotrópico e Anticrotálico.

Os resultados da potência dos soros antibotrópico e anticrotálico obtidos no INCQS foram comparados com os resultados obtidos pelos laboratórios produtores, conforme o valor declarado no protocolo de produção e controle.

Os resultados obtidos pelo INCQS e pelos produtores foram comparados, com o objetivo de avaliar tanto a diferença absoluta quanto a correlação de Pearson. O coeficiente de correlação produto-momento (mais conhecido como correlação de Pearson) é a medida de correlação mais comumente utilizada, ela reflete o grau de

relação linear entre duas variáveis. Ela varia de + 1 a - 1. Uma correlação de + 1 significa que existe uma relação linear positiva perfeita entre as variáveis.

A reprodutibilidade dos valores da potência obtidos pelo INCQS e pelos produtores foi avaliada comparando-se somente uma titulação realizada por cada laboratório pela correlação de Pearson, porém também levando em conta que para ensaios sorológicos uma diferença de até o dobro em avaliações interlaboratoriais para uma mesma amostra tem sido amplamente aceita (WOOD E DURHAM, 1980; REED, LYNN E MEADE, 2002).

Durante este trabalho cada laboratório foi identificado por um código randomicamente estabelecido.

3.7. Freqüência de ensaios inválidos.

Os ensaios foram considerados válidos quando cumpriam com os requisitos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004) que estabelece: “Calcular a DL50 utilizando métodos estatísticos comprovados (probitos, Spearman & Karber, transformação angular ou logitos). A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL. Os critérios para a invalidação dos ensaios de potência dos venenos botrópico e crotálico estão descritos em 3.1.2 e para os soros antibotrópico e anticrotálico estão descritos em 3.2.2.

III.2. RESULTADOS

1. Reprovação de amostras analisadas.

No período compreendido entre janeiro de 2000 e dezembro de 2006 foram analisados 619 lotes de antivenenos, sendo oito lotes reprovados (1,29%). Quatro Antibotrópicos, três por pirogênio e um por análise de protocolo (concentração de NaCl), três Antibotrópico-Laquétrico-Crotálico por análise de protocolo (amostragem para o teste de esterilidade $< 0,4\sqrt{n}$) e um Antiloxoscélico também por análise de protocolo (falta de informações no protocolo do ensaio de esterilidade). Destes oito lotes considerados insatisfatórios os três lotes reprovados por pirogênio (0,48%) foram recolhidos, destruídos e repostos pelos produtores.

Devido à indisponibilidade de venenos de referência o INCQS somente realizou os ensaios de potência para os soros antibotrópico e anticrotálico, o que corresponde a 485 lotes, ou seja, 78,23% de todos os lotes analisados.

Durante este período, nenhum lote de soro antibotrópico ou anticrotálico foi reprovado pelo ensaio de potência.

2. Avaliação da precisão interensaios (repetibilidade) das determinações de DL_{50} .

O veneno botrópico de referência BRABOT/04 foi titulado 36 vezes entre 2000 e 2003 apresentando um CV geométrico (gCV) de 16,57%, os resultados obtidos apresentaram uma distribuição normal, com um K-S = 0,991 (Figura 9).

O veneno botrópico de referência BRABOT/05 foi titulado 52 vezes entre 2003 e 2006 apresentando um CV geométrico (gCV) de 13,17%, os resultados obtidos apresentaram uma distribuição normal, com um K-S = 0,717 (Figura 10).

O veneno crotálico de referência BRACROT/01 foi titulado 64 vezes entre 2000 e 2006 apresentando um CV geométrico (gCV) de 30,32%, variando de 13,86% em 2000 para 38,41% em 2006, possivelmente devido a uma perda de estabilidade durante este período. Os resultados obtidos apresentaram uma distribuição normal, com um K-S = 0,768 (Figura 11 e Tabela 9).

O veneno crotálico de referência BRACROT/02 foi titulado 11 vezes em 2006 apresentando um CV geométrico (gCV) de 17,36%, os resultados obtidos apresentaram uma distribuição normal, com um K-S = 0,996 (Figura 12).

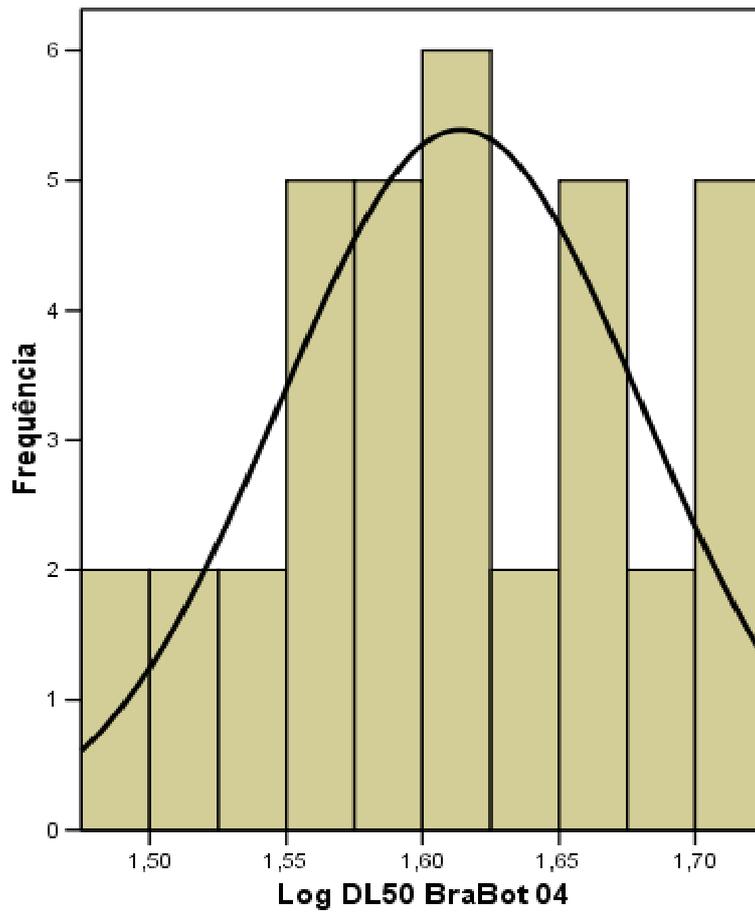


Figura 9. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Botrópico de Referência lote 4 (BRABOT/04) entre 2000 e 2003. gCV = 16,57% e K-S = 0,991.

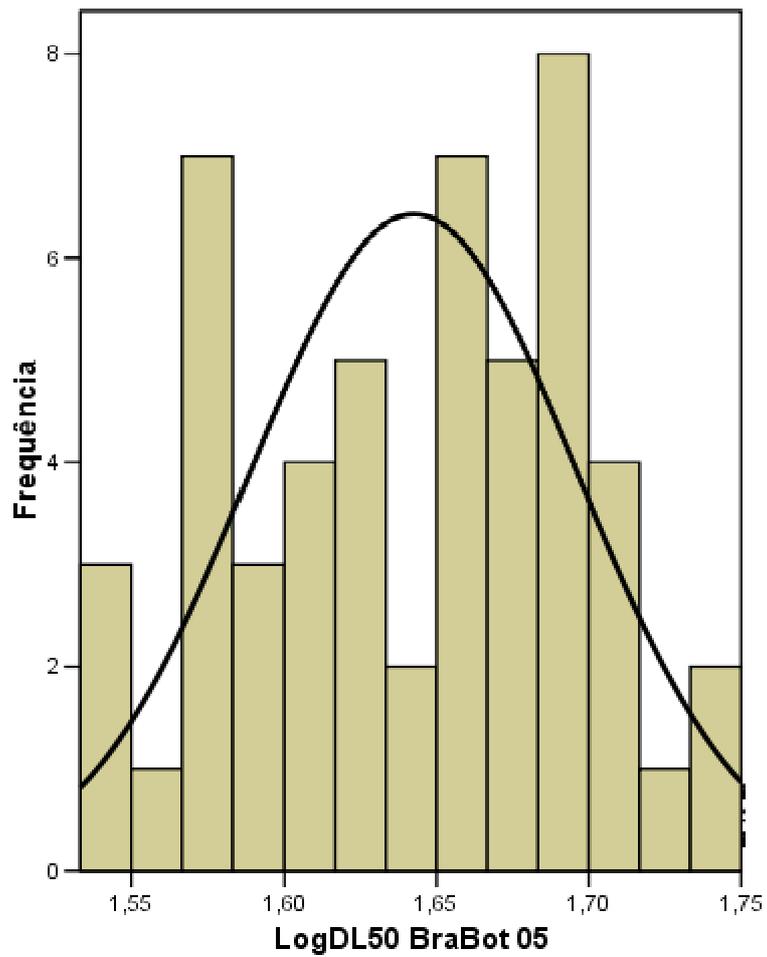


Figura 10. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Botrópico de Referência lote 5 (BRABOT/05) entre 2003 e 2006. $gCV = 13,17\%$ e $K-S = 0,717$.

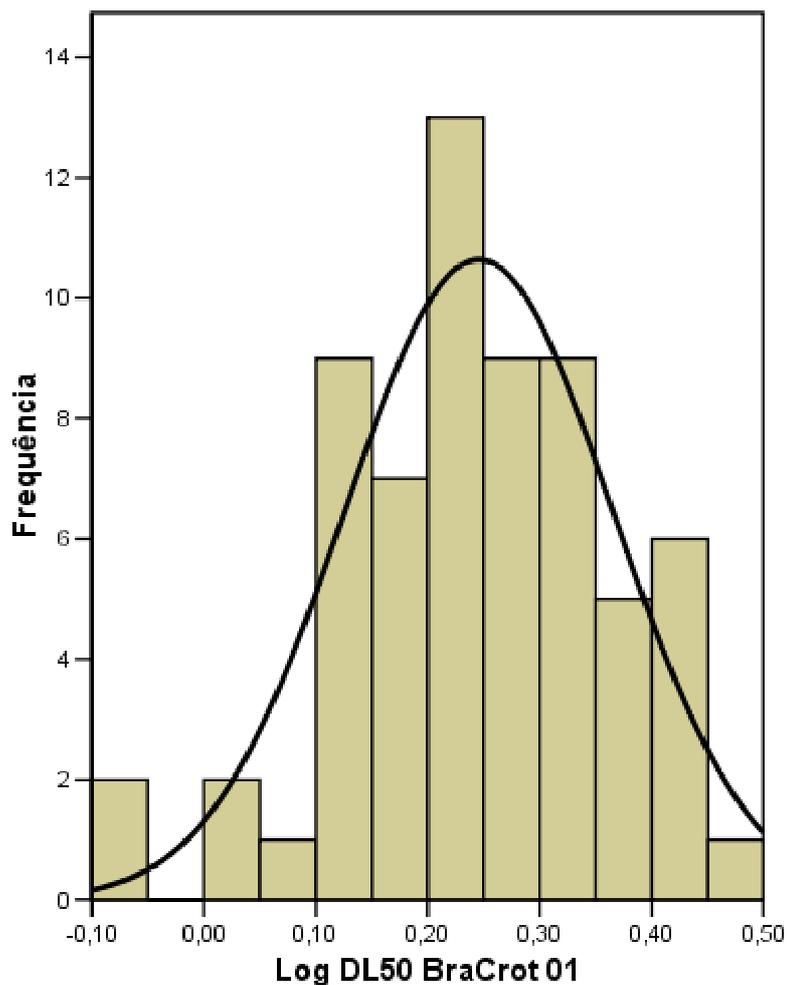


Figura 11. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Crotálico de Referência lote 1 (BRACROT/01) entre 2000 e 2006. gCV = 31,82% e K-S = 0,768.

Tabela 9. Coeficiente de Variação Geométrico (gCV) para as determinações da potência do Veneno Crotálico de Referência BRACROT/01 entre 2000 e 2006.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Título Médio	1,66	1,71	1,52	2,23	2,02	2,02	1,51
Desvio Padrão	0,23	0,38	0,49	0,36	0,53	0,52	0,58
gCV	13,86	22,22	32,24	16,14	26,24	25,74	38,41

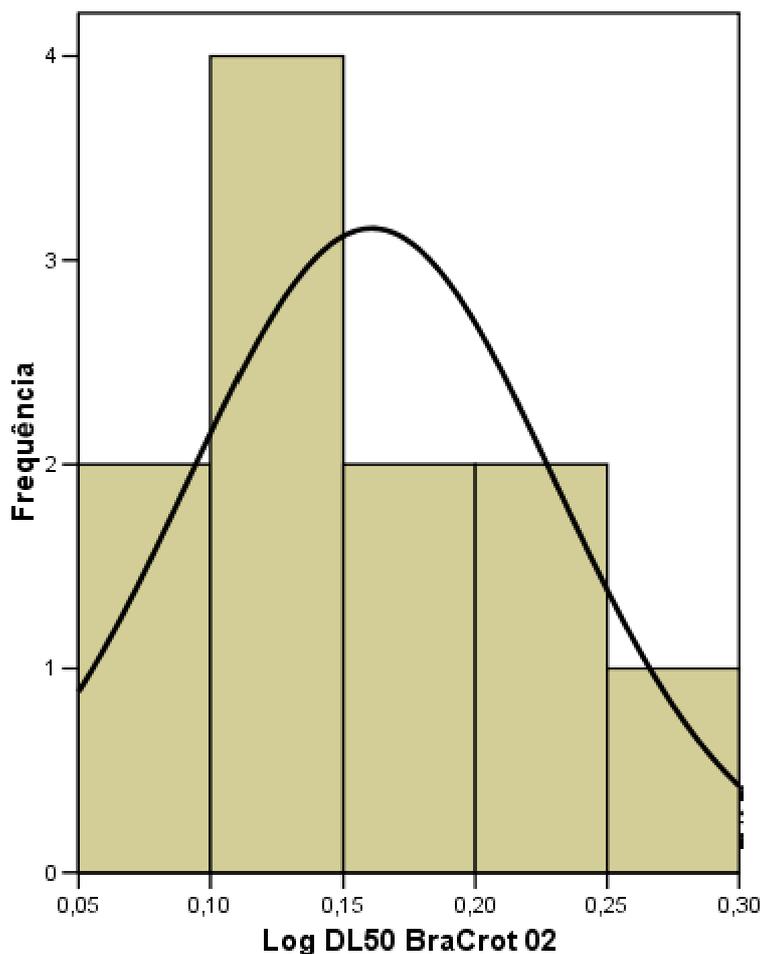


Figura 12. Representação gráfica da avaliação da potência do Veneno Crotálico de Referência lote 2 (BRACROT/02) em 2006. $gCV = 17,36\%$ e $K-S = 0,996$.

Estes resultados representam, em termos de ensaios biológicos, um desempenho muito bom, considerando-se que um CV de até 20% para imunoenaios como ELISA é um valor aceitável (van der ARK *et al.*, 2000) e um CV maior de 50% pode ser obtido em ensaios com o uso de animais e células como substrato (WHO, 1997).

3. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05.

O INCQS realizou cinco determinações (consideradas como válidas) da potência do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05, obtendo uma potência média de $47,85 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$ e um CV intralaboratorial de 7,96%.

O laboratório “A” realizou oito determinações válidas para BRABOT/05, obtendo uma potência média de 33,20 µg/0,5mL e um CV intralaboratorial de 7,48%.

O laboratório “B” realizou oito determinações válidas para BRABOT/05, obtendo uma potência média de 33,67 µg/0,5mL e um CV intralaboratorial de 10,88%.

O laboratório “C” realizou cinco determinações válidas para BRABOT/05, obtendo uma potência média de 41,85 µg/0,5mL e um CV intralaboratorial de 10,71%.

Os resultados obtidos pelos laboratórios participantes mostraram uma boa precisão das determinações de DL₅₀ com um CV de 16,76% entre os diferentes laboratórios, que também apresentaram uma boa precisão interensaios (repetibilidade) que variou entre 7,48% e 10,88% (Tabela 10). Os resultados detalhados deste estudo estão apresentados no anexo II (relatório final do estudo colaborativo para o estabelecimento do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência Nacional).

Tabela 10: Valores de DL₅₀ e Coeficiente de Variação para BRABOT/05, obtidos pelos diferentes laboratórios participantes do estudo colaborativo interlaboratorial:

Laboratório	Média das DL ₅₀ µg/0,5mL (desvio padrão)	CV
A (n = 8)	33,20 (± 2.49)	7,48%
B (n = 8)	33,67 (± 3.75)	10,88%
C (n = 5)	41,37 (± 4.90)	10,71%
INCQS (n = 5)	47,85 (± 4.09)	7,96%
Interlaboratorial	39,07 (± 6,29)	16,76%

4. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais de Soros Antibotrópicos e Anticrotáticos.

Todas as amostras de soros antibotrópico e anticrotático avaliadas apresentaram uma variação entre laboratórios menor do que o dobro, entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelos produtores (dados não apresentados), o que é considerado como aceitável. (WOOD e DURHAM, 1980; REED, LYNN E MEADE, 2002).

Apesar do fato de nenhuma das amostras de soro antibotrópico e de soro anticrotático ter apresentado uma diferença maior que o dobro, a correlação de Pearson entre o INCQS e os laboratórios produtores, de um modo geral, foi bastante baixa.

Os resultados da correlação de Pearson podem ser interpretados como fraca ($r < 0,20$), regular ($r = 0,21 - 0,40$), moderada ($r = 0,41 - 0,60$), boa ($r = 0,61 - 0,80$), muito boa ($r = 0,81 - 0,90$) ou excelente ($r = 0,91 - 1,00$) (HERZOG, *et al.*, 2004).

Para as determinações da potência do soro antibotrópico, no período de 2000 a 2006, a correlação entre o INCQS e todos os laboratórios produtores foi de 0,286 o que é considerada uma correlação regular (HERZOG, *et al.*, 2004) (Tabela 11, Figura 13). Entre o INCQS e os laboratórios “A” e “C” foi de 0,14 o que é considerada uma correlação fraca (Figuras 14 e 16). Porém a correlação entre o INCQS e o laboratório “B” foi de 0,516 o que pode ser considerada uma correlação moderada. (Figura 15).

Também podemos observar que estas correlações variaram de ano para ano. Para o laboratório “A”, que durante o período de 2000 a 2006 apresentou uma correlação fraca (0,140), no ano de 2002 apresentou uma correlação boa (0,782) e logo no ano seguinte (2003) uma correlação negativa (- 0,101) e no último ano do estudo, apresentou uma correlação regular (0,314).

O laboratório “B” que apresentou uma correlação considerada moderada (0,516) no período de 2000 a 2006, apresentou uma correlação fraca em 2001 (0,175), regular em 2003 (0,293), moderada em 2000 e 2002 (0,429 e 0,517 respectivamente), boa em 2006 (0,779) e muito boa em 2004 e 2005 (0,818 e 0,823 respectivamente).

O laboratório “C” que durante o período de 2000 a 2006 apresentou uma correlação fraca (0,140), apresentou uma correlação fraca no ano de 2001 (0,014), uma correlação negativa em 2002/03 (-0,176), regular em 2004 e 2005 (0,372 e 0,337 respectivamente) e moderada (0,502) em 2000 (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação de Pearson das determinações de potência para o soro antibotrópico entre o INCQS e os laboratórios produtores entre 2000 e 2006.

Laboratório	2000/06	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
A	0,140	0,018	0,395	0,782	- 0,101	0,251	0,126	0,314
B	0,516	0,429	0,175	0,517	0,293	0,823	0,818	0,779
C	0,141	0,502	0,014	- 0,176*	0,372	0,337	---	
Total	0,286	0,160	0,084	0,545	0,106	0,370	0,518	0,474

* = Devido ao pequeno número de amostras do laboratório “C” em 2000 e 2003, um único valor de correlação foi calculado para este período.

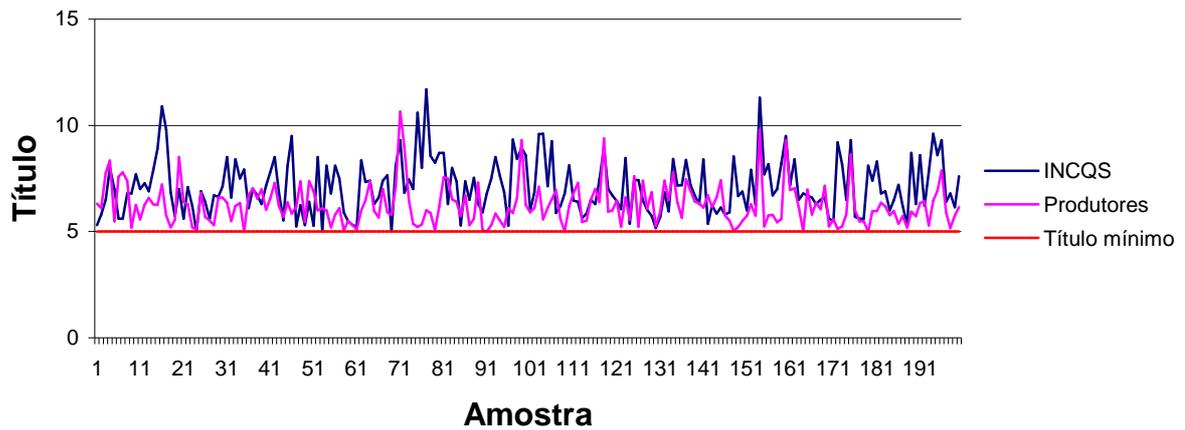


Figura 13. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antitoxínicos entre o INCQS e os Laboratórios Produtores. Apresenta uma correlação de Pearson igual a 0,286 o que é considerada uma correlação regular.

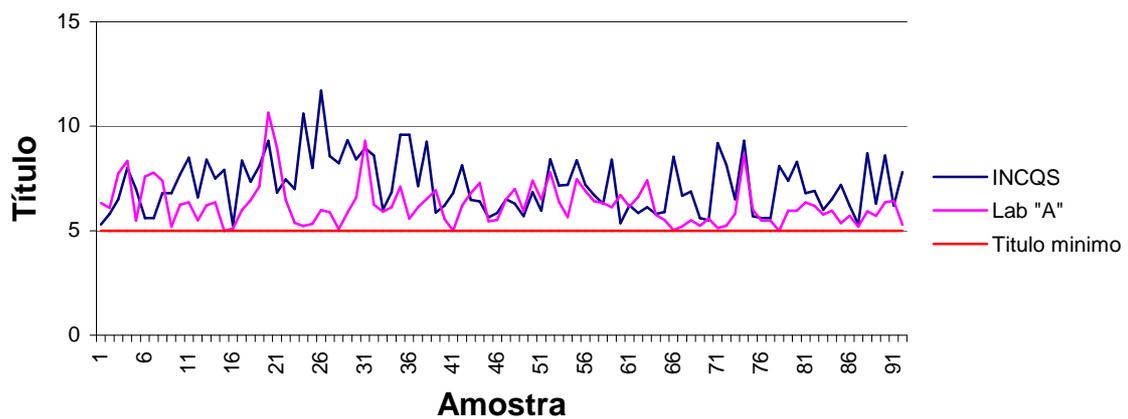


Figura 14. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antitoxínicos entre o INCQS e o Laboratório “A”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a 0,14 o que é considerada uma correlação fraca.

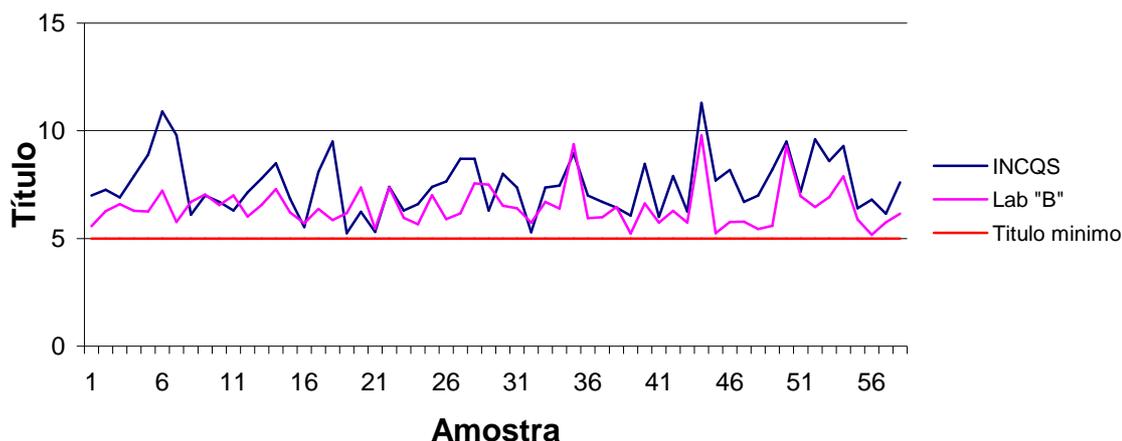


Figura 15. Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e o Laboratório “B”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a 0,516 o que é considerada uma correlação moderada.

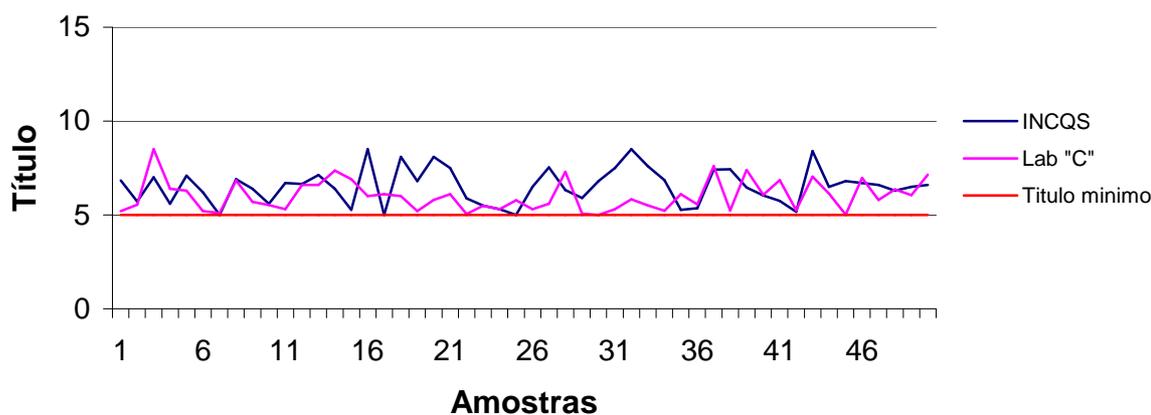


Figura 16: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros antibotrópicos entre o INCQS e o Laboratório “C”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a 0,14 o que é considerada uma correlação fraca.

Para o soro anticrotálico foi observada uma correlação fraca (-0,003) entre o INCQS e os laboratórios produtores (Tabela 12 e Figura 17). Entre os laboratórios “A” e “B” (Figura 18 e 19) foi determinada uma correlação fraca (-0,077 e 0,004 respectivamente) e uma correlação regular (0,235) com o laboratório “C” (Figura 20).

Para o laboratório "A" foi encontrada uma correlação negativa nos anos de 2000 (-0,036), 2001 (-0,091), 2002 (-0,118) e 2003 (-0,230), passando a regular em 2004 (0,384), 2005 (0,325) e 2006 (0,249).

O laboratório "B" apresentou uma correlação regular em 2000 (0,343), negativa em 2001 (-0,091), 2002 (-0,385) e 2003 (-0,400) e fraca no período de 2004 a 2006 (0,062).

O laboratório "C" apresentou uma correlação negativa em 2000 (-0,657) e 2002 (-0,170), uma correlação fraca em 2003/04 (0,085) e uma correlação muito boa em 2001 (0,831) (Tabela 12).

Tabela 12: Correlação de Pearson das determinações de potência para o soro anticrotático entre o INCQS e os laboratórios produtores entre 2000 e 2006.

Laboratório	2000/06	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
A	-0,077	-0,036	-0,554	-0,118	-0,230	0,384	0,325	0,249
B	0,004	0,343	-0,091	-0,385	-0,400	0,062*		
C	0,235	-0,657	0,831	-0,170	0,085*		---	---
Total	0,002	0,071	0,150	0,106	-0,014	-0,073	0,074	0,744

* = Devido ao pequeno número de amostras do laboratório "B" em 2004, 2005 e 2006 e para o laboratório "C" em 2003 e 2004, um único valor de correlação foi calculado para estes períodos.

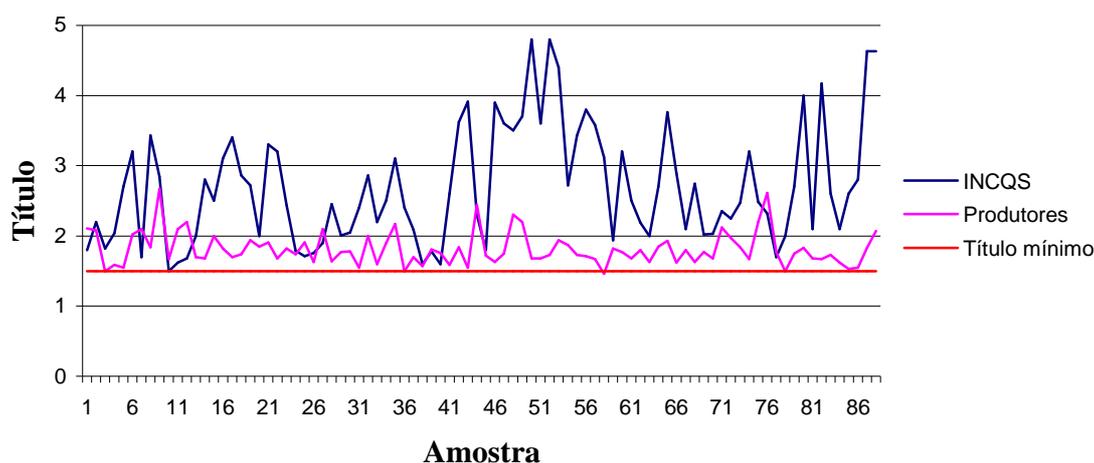


Figura 17: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotáticos entre o INCQS e os Laboratórios Produtores. Apresenta uma correlação de Pearson igual a -0,003 o que é considerada uma correlação fraca.

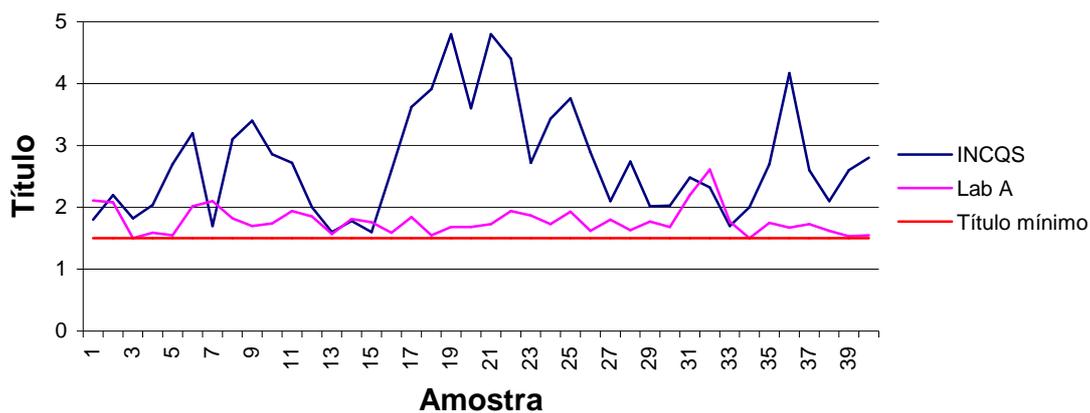


Figura 18: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotáticos entre o INCQS e o Laboratório “A”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a $-0,077$ o que é considerada uma correlação fraca.

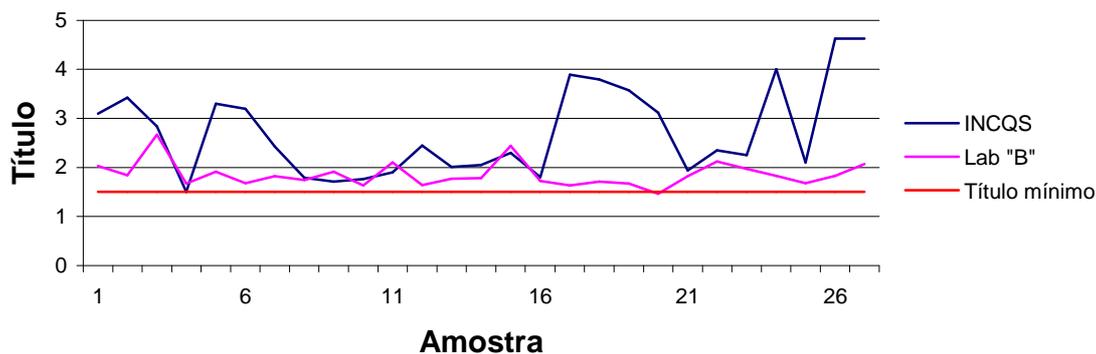


Figura 19: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotáticos entre o INCQS e o Laboratório “B”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a $0,004$ o que é considerada uma correlação fraca.

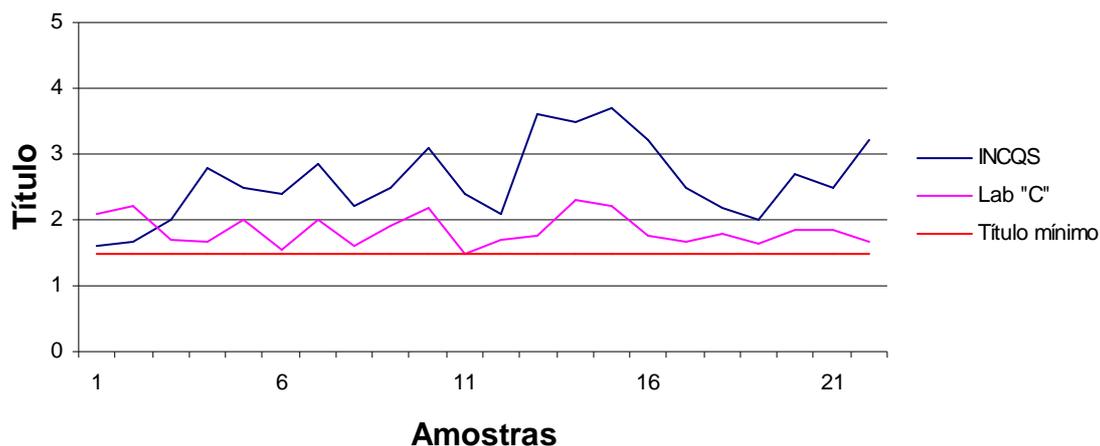


Figura 20: Avaliação da precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) das determinações da potência de formulações comerciais dos soros anticrotáticos entre o INCQS e o Laboratório “C”. Apresenta uma correlação de Pearson igual a 0,235 o que é considerada uma correlação regular.

5. Incidência de ensaios inválidos.

Os ensaios para a determinação da potência dos venenos de referência (DL₅₀) e dos soros antitoxotrópico e anticrotático (DE₅₀), são considerados válidos quando estão de acordo com os parâmetros descritos na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004). De acordo com estes critérios, um número significativo de determinações de DL₅₀ e DE₅₀ foi considerado inválido no INCQS, principalmente devido à falta de linearidade, que ocorre quando não existe relação direta entre a dose de veneno ou de antiveneno e os índices de letalidade ou sobrevivência. Outra causa importante de invalidação de ensaios é quando os valores de 50% de morte ou proteção não estão presentes entre a menor e a maior dose utilizada.

A incidência de ensaios de DL₅₀ inválidos variou entre 19% para BRACROT/01, 21,7% para BRABOT/04 e 22,7% para BRABOT/05 (dados não mostrados). A incidência de ensaios de DE₅₀ inválidos no INCQS foi extremamente alta alcançando 45% para o soro antitoxotrópico e 43,8% para o soro anticrotático. Considerando que o INCQS realiza uma determinação de DL₅₀, como controle positivo em todos os testes, várias determinações de DE₅₀ foram invalidadas não por problemas no teste da DE₅₀, mas devido a invalidações nas determinações da DL₅₀.

É importante observar que no período estudado (2000 a 2006), para o soro antitoxotrópico, 55% das amostras foram liberadas após a realização de um ensaio, 30% liberadas após dois ensaios, 9% após três ensaios, 2% após quatro ensaios, 3,5% após 5

ensaios e uma amostra necessitou de sete ensaios até se obter um ensaio válido. Para o soro anticrotálico 29,21% das amostras foram liberadas após dois ensaios e 14,61% após três ensaios. Apesar de a incidência de ensaios inválidos ser praticamente idêntica para os soros antibotrópico e anticrotálico, com 45% e 43,82% respectivamente, foi observada uma maior frequência de repetições para o soro antibotrópico, onde 15% das amostras necessitaram de três ensaios ou mais para que se obtivesse um ensaio válido (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13: Frequência de ensaios inválidos na determinação da potência de soro antibotrópico no INCQS.

Ano	Amostras	Válidos	Inválidos	Uma Repetição	Duas Repetições	Três Repetições	Quatro Repetições	Cinco Repetições	Seis Repetições	Total de Ensaios
2000	30	18 (60,0%)	12 (40,0%)	09 (30,0%)	03 (10,0%)	0	0	0	0	45
2001	30	17 (56,7%)	13 (43,3%)	11 (36,7%)	02 (6,6%)	0	0	0	0	45
2002	09	07 (77,8%)	02 (22,2%)	02 (22,2%)	0	0	0	0	0	11
2003	27	15 (55,5%)	10 (37,1%)	10 (37,1%)	01 (3,7%)	0	01 (3,7%)	0	0	43
2004	34	17 (50,0%)	09 (26,5%)	09 (26,5%)	05 (14,7%)	03 (8,8%)	0	0	0	62
2005	39	18 (46,1%)	21 (53,9%)	13 (33,3%)	01 (2,6%)	01 (2,6%)	06 (15,4%)	0	0	81
2006	31	18 (58,1%)	13 (41,9%)	06 (19,4%)	06 (19,4%)	0	0	0	1 (3,1%)	55
Total	200	110 (55,0%)	90 (45,0%)	60 (30,0%)	18 (9,0%)	04 (2,0%)	07 (3,5%)	0	1 (0,5%)	342

Tabela 14: Frequência de ensaios inválidos na determinação da potência de soro anticrotálico no INCQS.

Ano	Amostras	Válidos	Inválidos	Uma Repetição	Duas Repetições	Total de Ensaios
2000	16	09 (56,25%)	07 (43,75%)	02 (12,5%)	05 (31,25%)	28
2001	22	15 (68,2%)	07 (31,8%)	07 (31,8%)	0	29
2002	12	09 (75,0%)	03 (25,0%)	02 (16,7%)	01 (8,3%)	16
2003	15	08 (53,3%)	07 (46,7%)	05 (33,3%)	02 (13,4%)	24
2004	10	04 (40,0%)	06 (60,0%)	04 (40,0%)	02 (20,0%)	18
2005	07	01 (14,3%)	06 (85,7%)	05 (71,4%)	01 (14,3%)	14
2006	07	04 (57,1%)	03 (42,9%)	01 (14,3%)	02 (28,6%)	12
Total	89	50 (56,18%)	39 (43,82%)	26 (29,21%)	13 (14,61%)	141

III.3. DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste trabalho foi realizada a avaliação da metodologia analítica oficial para a determinação da potência dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência e das formulações comerciais dos soros antibotrópico e anticrotálico. Desde 1959 e até a última revisão em 2004 a Farmacopéia Brasileira descreve as metodologias analíticas para a liberação dos lotes de soros antipeçonhentos (BRASIL, 1959 e 2004). Em 1996, o Ministério da Saúde do Brasil publicou a Portaria nº 174 de 11 de novembro, que aprovou as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico (BRASIL, 1996).

A partir de uma decisão do Ministério da Saúde, desde 1987 o INCQS realiza os ensaios previstos pela Farmacopéia Brasileira em todos os lotes de antivenenos antes da liberação para distribuição e uso. No período estudado, compreendido entre 2000 e 2006, foram analisados pelo INCQS 619 lotes de soros antipeçonhentos. Neste período oito lotes foram considerados insatisfatórios (1,29%), três por pirogênio (0,48%) e cinco por análise de protocolo (0,81%). Estes cinco lotes, apesar de insatisfatórios pela análise de protocolo, foram aprovados nos ensaios realizados no INCQS e liberados para distribuição após o INCQS, a ANVISA (Autoridade Nacional Regulatória) e o Ministério da Saúde concluírem que, apesar de insatisfatórios pela análise de protocolo (concentração de NaCl, amostragem para o teste de esterilidade $< 0,4\sqrt{n}$ e falta de informações no protocolo do ensaio de esterilidade), estes lotes eram apropriados para o consumo humano. Os três lotes reprovados por pirogênio (0,48%) foram recolhidos, destruídos e repostos pelos produtores.

Devido à indisponibilidade de venenos de referência, o INCQS somente realiza os ensaios de potência para os soros antibotrópico e anticrotálico, o que, no período estudado, correspondeu a 485 lotes, ou seja, 78,23% das amostras analisadas, todas consideradas satisfatórias.

Estes resultados demonstraram uma baixa incidência de lotes rejeitados (0,48%), o que demonstra que os laboratórios produtores, de um modo geral, cumprem com os requisitos vigentes para a liberação de lotes, fornecendo produtos de boa qualidade para o Sistema Único de Saúde.

Apesar de os aspectos relacionados à segurança dos soros antiofídicos serem avaliados por metodologias padronizadas e validadas, a avaliação da potência é feita pela determinação da capacidade dos antivenenos em neutralizar 50% de uma determinada dose de um veneno específico em um modelo animal murino (ED_{50}), um

método que até hoje não foi formalmente validado, mas é considerado o “padrão ouro” para este tipo de determinação.

O cálculo da Dose Letal 50% (DL_{50}) para a quantificação da toxicidade aguda foi introduzida em 1927 por J. W. Trevan. Desde o desenvolvimento desta metodologia, Trevan e seus contemporâneos já afirmavam que a DL_{50} de uma droga não é um valor fixo, pois depende de inúmeros fatores extrínsecos. O valor numérico da DL_{50} é influenciado por vários fatores como: a espécie e a cepa de animal utilizada, idade, sexo, dieta, jejum, temperatura, confinamento, estação do ano, procedimentos experimentais e etc. Zbinden e Flury Roversi, pelos mesmos motivos, afirmaram em 1981, que o valor da DL_{50} não pode ser considerado uma constante biológica. Apesar destas limitações a determinação da DL_{50} dos venenos e a determinação da DE_{50} para os antivenenos são amplamente utilizadas na determinação de potência, com algumas variações como diferentes volumes e número de DL_{50} utilizadas, vias de inoculação, faixa de peso e cepas de camundongos utilizados (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

A oficina de trabalho coordenada pela OMS em 2001, sobre “padronização e controle de antivenenos”, dentre várias recomendações, apontou que os testes de potência utilizados na rotina para a liberação de lotes devem ser novamente estabelecidos e padronizados, usando ensaios validados e que preparações locais ou regionais de venenos e antivenenos de referência, são essenciais para a padronização destes ensaios assim como para permitir a comparação entre diferentes lotes e entre diferentes laboratórios. Também ressaltou que as atividades dos antivenenos deveriam ser expressas em unidades neutralizantes de toxinas, baseadas na atividade neutralizante destes padrões de referência (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

Desde 1987 o INCQS e todos os laboratórios produtores no Brasil, utilizam Veneno Botrópico e Crotálico de Referência para a realização dos ensaios de potência, no sentido de melhorar a reprodutibilidade dos resultados entre os diferentes laboratórios.

Um importante problema referente às determinações de potência dos soros antibotrópico e anticrotálico no INCQS foi o grande número de ensaios considerados inválidos. A frequência de invalidação de ensaios para a DL_{50} alcançou 20%, enquanto que para a DE_{50} chegou a alcançar o índice de 45% ao ano.

Os ensaios foram invalidados principalmente devido à ausência de linearidade entre as diluições ou quando o valor referente a 50% da dose protetora não se encontrava entre a maior e a menor dose do antiveneno. Estas inversões dos pontos, na

curva dose resposta, possivelmente ocorreram devido a variações intrínsecas, que são características deste tipo de ensaio (TREVAN, 1927; ZBINDEN E FLURY-ROVERSI, 1981).

Outra importante propriedade destas determinações é o fato de que a curva dose resposta das determinações de potência de venenos, assim como da mistura de venenos e antivenenos é sigmóide e caracterizada por uma inclinação excessivamente acentuada. Como conseqüência destas características, o fator de diluição deve obrigatoriamente, ser bastante estreito. Segundo a Farmacopéia Brasileira, o fator de diluição deve ser “nunca superior a 1,5” (BRASIL, 2004). No INCQS foram adotados os seguintes fatores de diluição: 1/1,2 para a DL₅₀ do veneno botrópico; 1/1,5 para o veneno crotálico; 1/1,3 para a DE₅₀ do soro antibotrópico e 1/1,5 para o soro anticrotálico.

A grande proximidade entre os pontos relativos as concentrações de veneno ou da mistura veneno antiveneno utilizadas, pode explicar a grande freqüência de sobreposição/inversão entre os pontos, ou seja, freqüentemente ocorre que nem sempre a maior resposta corresponde ao maior estímulo.

Devido a este alto índice de invalidações foi necessário realizar várias repetições que conseqüentemente levaram a atrasos, aumento de custos e do número de animais utilizados para a liberação dos lotes.

Rotineiramente, para cada determinação da DE₅₀ no INCQS, uma titulação da DL₅₀ do veneno de referência foi realizada em paralelo como um controle positivo, estes resultados nos permitiram realizar uma avaliação da precisão interensaios (repetibilidade) das determinações de DL₅₀ no INCQS, que demonstraram um CV geométrico (gCV) de 16,57% para o lote BRA/BOT/04 de 13,17% para BRA/BOT/05 de 31,82% para BRA/CROT/01 e 17,36% para BRA/CROT/02.

Considerando que van der Ark e colaboradores (2000) aceitam uma precisão de 20% ou menos, para imunoensaios como o ELISA e que a OMS (1997) considera que uma variação entre 5 e 20% é aceitável para ensaios *in vitro* e que uma variação maior que 50% pode ser obtida em ensaios que utilizem animais ou células, os Coeficientes de Variação obtidos no INCQS para as titulações dos venenos de referência podem ser considerados bastante satisfatórios.

A precisão interensaios (repetibilidade) e a precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) da determinação da DL₅₀ do lote BRA/BOT/05 foram avaliadas através de um estudo colaborativo com a participação do INCQS e de todos os laboratórios brasileiros produtores de soro antibotrópico (Tabela 10). Os resultados obtidos mostraram um CV interensaios variando entre 7,48% e 10,88% nos diferentes

laboratórios, enquanto que a precisão interlaboratórios obtida foi de 16,76%. Estes resultados demonstraram uma excelente repetibilidade e reprodutibilidade para as determinações do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência, em oposição ao esperado e sugerido pela literatura (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003; SELLS, 2003).

Para a avaliação da correlação entre os resultados da potência das formulações comerciais de soro antibotrópico e anticrotálico foi feito um estudo retrospectivo comparando-se os resultados obtidos nos ensaios de rotina para a liberação dos lotes realizados pelos laboratórios produtores e repetidos pelo INCQS, consistindo em apenas uma titulação feita por cada laboratório para a mesma amostra.

Para ensaios sorológicos, uma diferença de até o dobro em determinações interlaboratoriais para a mesma amostra tem sido amplamente aceita como o limite superior de variabilidade. A frequência destas diferenças entre pares de medidas tem sido proposta como um índice adequado para avaliação da variabilidade de ensaios sorológicos (WOOD E DURHAM, 1980; REED, LYNN E MEADE, 2002).

Durante o período estudado, os resultados obtidos no INCQS apresentaram uma diferença sempre inferior ao dobro em comparação com os resultados obtidos pelos laboratórios produtores, portanto segundo este critério de avaliação, todas as determinações podem ser consideradas como confiáveis.

Entretanto, a correlação de Pearson das determinações da potência dos soros antibotrópicos feitas pelo INCQS e laboratórios produtores (Tabela 11) foi de 0,286 o que é considerada uma correlação regular (HERZOG, *et al.*, 2004). A correlação com os laboratórios A e C foi de 0,14 durante o período de sete anos estudado, o que é considerada uma correlação fraca, porém a correlação entre o INCQS e o laboratório “B” foi de 0,516 o que é considerada uma correlação moderada. Estas correlações variaram de ano para ano.

A correlação de Pearson das determinações da potência dos soros anticrotálicos feitas pelo INCQS e laboratórios produtores (Tabela 12) foi praticamente nula durante o período avaliado (0,002).

Estes resultados demonstram que apesar da boa reprodutibilidade observada para as determinações da DL_{50} , existe muito pouca correlação entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelos produtores. Porém é importante ressaltar que esses dados foram obtidos retrospectivamente através da avaliação das determinações de potência rotineiramente realizadas pelos laboratórios produtores para a liberação dos lotes em comparação com as análises realizadas pelo INCQS, consistindo em apenas uma

titulação realizada por cada laboratório. Para uma avaliação mais exata da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) um estudo interlaboratorial prospectivo deve ser conduzido com um desenho experimental adequado que permita a determinação do Coeficiente de Variação entre os laboratórios.

É importante ressaltar que todos os laboratórios brasileiros (produtores e controlador) realizam o ensaio de potência de acordo com os requerimentos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004) e com as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 1996), que descrevem detalhadamente as etapas fundamentais para a execução do método e que as diferenças nos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP's) são variações mínimas, somente na faixa de diluição dos antivenenos. Portanto, as diferenças observadas entre os laboratórios, muito provavelmente são devidas a características intrínsecas da técnica e não devido a diferentes procedimentos técnicos entre os diversos laboratórios.

A correlação obtida entre o INCQS e o laboratório B (somente para o soro antibotrópico), foi considerada como moderada (0,516) no período estudado (2000 a 2006) e como boa (0,807) no período entre 2004 e 2006. Estes resultados podem ser considerados como uma forte evidência que o ensaio de potência absoluta pode apresentar boa correlação entre diferentes laboratórios. Porém, provavelmente esta correlação dependa de uma série de eventos intercorrentes imprevisíveis, muito difíceis de identificar e controlar.

É sabido que a determinação da potência absoluta para a titulação dos antivenenos, ao invés da potência relativa a uma preparação de referência, pode levar a variações significativas entre laboratórios e não permite uma padronização efetiva (SELLS, 2003).

Até hoje Soros de Referência não são disponíveis no Brasil, portanto a determinação da potência relativa apesar de recomendada por todos especialistas ainda não foi avaliada na prática.

Um estudo colaborativo interlaboratorial entre o INCQS e os laboratórios produtores para a determinação da potência de um candidato a soro antibotrópico de referência nacional Bra/antiBOT/01, para a avaliação da metodologia da potência relativa e para reavaliação da potência do lote nº 05 do veneno botrópico de referência BRA/BOT/05 está em andamento (anexo III) e espera-se que os resultados obtidos venham a esclarecer, pelo menos em parte estas questões levantadas.

IV. SEGUNDA ETAPA: ESTABELECIMENTO E DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE PADRÕES DE REFERÊNCIA NACIONAIS PARA VENENO BOTRÓPICO, CROTÁLICO E SORO ANTIBOTRÓPICO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO MÉTODO DA POTÊNCIA RELATIVA.

IV.1. MÉTODOS

1. Avaliação dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência.

1.1. Estabelecimento dos venenos de referência.

Segundo a Farmacopéia Brasileira, os Venenos de Referência são definidos como:

*“Uma mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica das espécies *Bothrops jararaca* ou *Crotalus durissus terrificus*. Devem ser liofilizados e mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os venenos foram padronizados pela determinação da dose Letal 50%” (BRASIL, 2004).*

Todos os venenos de referência utilizados no Brasil foram produzidos pelo Instituto Butantan, e estocados e distribuídos aos produtores pelo INCQS. Neste estudo avaliamos o desempenho dos seguintes lotes de venenos de referência:

- Veneno Botrópico de Referência Lote 04 (BRABOT/04). Preparação liofilizada de veneno de *B. jararaca* em 1.540 frascos contendo 30 mg, fabricado em 1996 com uma DL_{50} de $48,7\text{ }\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$.
- Veneno Botrópico de Referência Lote 05 (BRABOT/05). Preparação liofilizada de veneno de *B. jararaca* em 4.389 frascos contendo 30 mg, fabricado em 2003 com uma DL_{50} de $47,8\text{ }\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$.
- Veneno Crotálico de Referência Lote 01 (BRACROT/01). Preparação liofilizada de veneno de *C. durissus terrificus* em 1.000 frascos contendo 10 mg, fabricado em 1987 com uma DL_{50} de $1,46\text{ }\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$.

- Veneno Crotálico de Referência Lote 02 (BRACROT/02). Preparação liofilizada de veneno de *C. durissus terrificus* em 3.470 frascos contendo 10 mg, fabricado em 2005 com uma DL₅₀ de 1,32 µg/0,5 mL.

A potência dos venenos de referência foi estabelecida pelo INCQS, através do cálculo do valor médio de uma série de pelo menos sete determinações válidas, independentes (realizadas em momentos diferentes), da DL₅₀ dos venenos candidatos à Referência Nacional. Este valor da potência é denominado de potência declarada, expresso em µg/0,5 mL e é o valor utilizado para todos os cálculos referentes à determinação da potência dos soros antibotrópicos e anticrotálicos.

As DL₅₀ dos venenos de referência foram calculadas usando o método de Probitos (FINNEY, 1971) e a homogeneidade dos resultados foi avaliado pelo testes de Combinação de Resultados de Ensaio – COMBIN (COUNCIL OF EUROPE, 2005). Resultados considerados como não homogêneos foram descartados.

1.2. Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) e da Dose Efetiva 50% (DE₅₀).

As determinações da DL₅₀ e da DE₅₀ foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos na Farmacopéia Brasileira, fascículo 5, parte II, 2004. Monografia Soro Antibotrópico – Immunoserum bothropicum. Determinação da potência (BRASIL, 2004) e dos Procedimentos Operacionais Padronizados 65.3440-004 - Ensaio de potência para o Soro Antibotrópico - in vivo, 65.3440-005 - Ensaio de potência para o Soro Anticrotálico - in vivo e 65.3440-005 - Determinação da dose letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* – in vivo.

1.3. Estabilidade dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência.

Para cada determinação rotineira da potência dos soros antibotrópico e Anticrotálico, um ensaio de DL₅₀ foi feito em paralelo como um controle positivo para o ensaio de DE₅₀. Os resultados da DL₅₀ foram usados como um dos critérios para a determinar a validade dos ensaios de potência dos antivenenos.

Os resultados das DL₅₀ foram comparados com a potência declarada dos venenos de referência, com o objetivo de verificar a ocorrência de perda significativa na potência das referidas referências. A precisão interensaios (repetibilidade) do ensaio de DL₅₀ foi determinada através dos valores obtidos para a DL₅₀ desta série de determinações independentes e foi expressa pelo Coeficiente de Variação (CV)

refletindo as diferentes condições laboratoriais durante a execução dos ensaios (dias, técnicos, etc.). O CV foi calculado através da seguinte fórmula:

$$CV = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{média}}$$

1.4. Estudo colaborativo para a determinação da potência “in vivo” do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência.

Foi realizado no ano de 2002 um estudo colaborativo com a participação do INCQS e todos os laboratórios produtores de soro antibotrópico para a determinação do título médio do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência Nacional BRABOT/05. O candidato a veneno de referência foi enviado a cada laboratório participante, para a realização de pelo menos cinco ensaios válidos de Dose Letal 50% (DL₅₀) por laboratório. Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira, (BRASIL, 2001). Cada Laboratório participante utilizou seu próprio Procedimento Operacional Padronizado (POP).

Os resultados (dados brutos) foram enviados ao Laboratório Coordenador (INCQS) para a análise estatística. Os resultados obtidos por cada laboratório participante foram avaliados de maneira individual a fim de determinar a validade de cada ensaio. Foi empregado o método estatístico “Probitos” para a determinação da DL₅₀.

1.5. Produção do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

O candidato a lote 01 de Soro Antibotrópico de Referência, foi produzido no INCQS a partir da mistura de 360 ampolas com 10 mL, representativo de todos os produtores nacionais (Tabela 15). Este lote é constituído por 915 ampolas com 3 mL cada. Estas ampolas utilizadas na produção do lote BRAantiBOT/01 estavam estocadas no INCQS como sobra das amostras rotineiramente analisadas. Esta mistura foi submetida à filtração esterilizante (0,22 µm) e a ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica, que demonstrou sua condição de esterilidade.

O lote foi então fracionado em frascos com 3 mL, estocados a 4 °C no INCQS.

Tabela 15: Composição do Lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

Amostra	Lote	Produtor	Quantidade (ampolas de 10 mL)
3093/98	980043-A	I. Butantan	10
3094/98	980043-B	I. Butantan	15
3095/98	980043-C	I. Butantan	15
3762/98	9007070-A	I. Butantan	15
3763/98	9007070-B	I. Butantan	15
3764/98	9007070-C	I. Butantan	15
4277/98	9808078-A	I. Butantan	15
1298/00	0004052-A	I. Butantan	10
1299/00	0004052-B	I. Butantan	10
1300/00	0004052-C	I. Butantan	10
		Total IB	130
1102/98	980201	IVB	18
3483/98	980604-A	IVB	14
3484/98	980604-B	IVB	14
4828/98	980707	IVB	21
5242/98	980909	IVB	24
1986/00	991113	IVB	19
		Total IVB	110
3235/98	97070815	FUNED	10
4980/98	971015-20	FUNED	15
5474/98	980929-05B	FUNED	10
5476/98	980929-05C	FUNED	30
2967/99	990504-18	FUNED	21
3492/99	990517-22	FUNED	13
		Total FUNED	99
418/00	B02/99	CPPI	21
		Total Geral	360 ampolas

1.6. Determinação da potência “in vivo” do candidato a Soro Antibotrópico de Referência.

Foram realizados no INCQS 14 ensaios independentes, paralelamente às amostras rotineiramente analisadas, seguindo os mesmos procedimentos. Os resultados dos ensaios considerados válidos foram submetidos ao teste de Grubbs. O teste de Grubbs (GRUBBS, 1969 e STEFANSKY, 1972) é utilizado para detectar valores dispersos (fora do intervalo de confiança) em uma distribuição normal.

1.7. Comparação intralaboratorial entre potência relativa e potência absoluta.

Tendo em vista que o soro BRAantiBOT/01 foi titulado paralelamente com amostras rotineiramente analisadas, após a determinação do título médio de soro de referência e estabelecimento da Potência Declarada, foi possível calcular a potência relativa das 17 amostras de soro antibotrópico analisadas em paralelo com o Soro de Referência. O cálculo foi realizado pelo método de Probitos em programa desenvolvido no INCQS e validado de acordo com as especificações da Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2005) e frente ao programa rotineiramente utilizado (WHOPROG).

IV.2. RESULTADOS

1. Estabilidade dos Venenos Botrópico e Crotálico de Referência.

O lote 04 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/04) foi produzido em 1996 e utilizado até 2003, ou seja, sete anos em uso (Figura 21). A potência média de 41,31 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ observada no período estudado não difere significativamente da potência declarada (48,7 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) demonstrando uma estabilidade muito boa durante este período de sete anos em uso. O desvio padrão obtido para as 36 determinações realizadas foi de 6,33 o que corresponde a um CV de 15,25%, o que está além do desempenho esperado (até 20%) para ensaios *in vitro* como ELISA (van der ARK *et al.*, 2000).

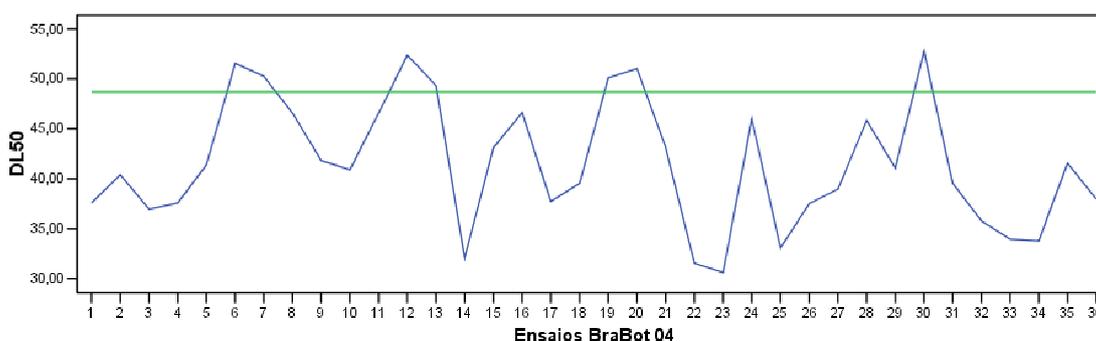


Figura 21: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Botrópico de Referência lote 04 (BRABOT/04). Valores de 36 determinações individuais da DL₅₀ realizadas entre 2000 e 2003. (potência declarada em DL₅₀ = 48,7 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, potência média em DL₅₀ = 41,3 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, desvio padrão = 6,33 e CV = 15,25%).

O lote BRABOT/05 (Figura 22) foi produzido em 2003 e até 2006 apresentou um bom padrão de estabilidade, sem demonstrar qualquer diferença significativa entre o título médio observado no período estudado de 44,2 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ e a potência declarada de 47,8 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$. O desvio padrão obtido para as 52 determinações realizados foi de 5,43, o que corresponde a um CV de 12,27%.

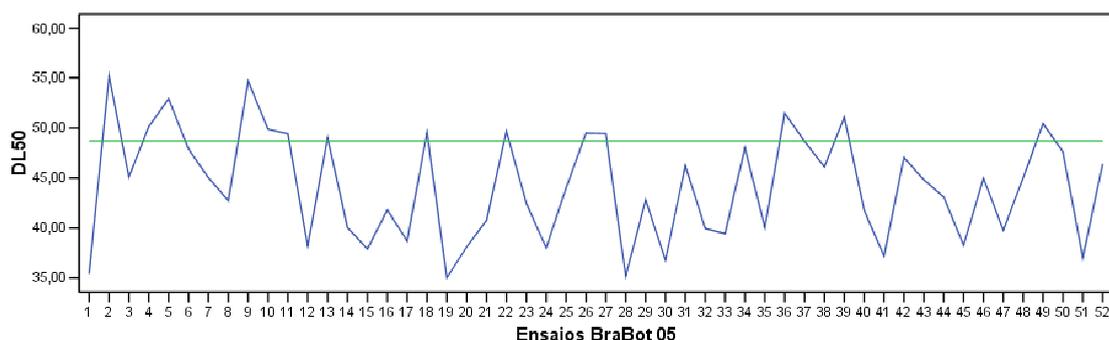


Figura 22: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Botrópico de Referência lote 05 (BRABOT/05). Valores de 52 determinações individuais da DL₅₀ realizadas entre 2003 e 2006. (potência declarada em DL₅₀ = 47,8 µg/0,5 mL, potência média em DL₅₀ = 44,23 µg/0,5 mL, desvio padrão = 5,43 e CV = 12,27%).

O lote 01 do Veneno Crotálico de Referência (BRACROT/01) foi estabelecido em 1987 e utilizado até 2006, ou seja, foi utilizado durante 20 anos (Figura 23). A potência média nos últimos oito anos (1,88 µg/0,5 mL) não difere significativamente da potência declarada de 1,46 µg/0,5 mL estabelecida em 1987, porém nos últimos anos este lote do veneno de referência aparentemente está perdendo homogeneidade, com um CV passando de 13,86% em 2000 para 38,41% em 2006 (Tabela 16).

Tabela 16: Determinação do desvio padrão e coeficiente de variação para o Veneno Crotálico de Referência BRACROT/01 entre 2000 e 2006.

	2000/06	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Título Médio	1,88	1,66	1,71	1,52	2,23	2,02	2,02	1,51
Desvio Padrão	0,57	0,23	0,38	0,49	0,36	0,53	0,52	0,58
Coeficiente de Variação	30,32	13,86	22,22	32,24	16,14	26,24	25,74	38,41
Total de Ensaios	64	10	8	9	11	10	10	6

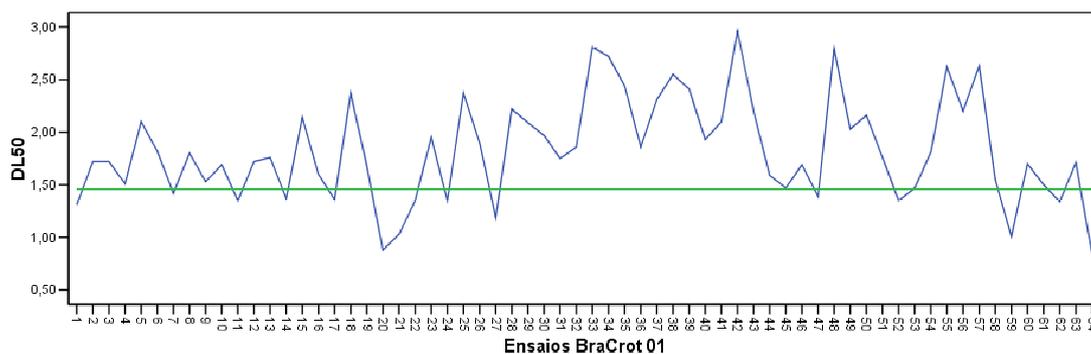


Figura 23: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Crotálico de Referência lote 01 (BRACROT/01). Valores de 64 determinações individuais da DL_{50} realizadas entre 2000 e 2006. (potência declarada em $DL_{50} = 1,46 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, potência média em $DL_{50} = 1,88 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, desvio padrão = 0,57 e CV = 30,32%).

O lote 02 do Veneno Crotálico de Referência (BRACROT/02) foi estabelecido em 2005 e distribuído aos produtores em 2007. A potência declarada pelo INCQS foi de $1,32 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ e o título médio de 11 titulações no INCQS é de $1,47 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ (Figura 24).

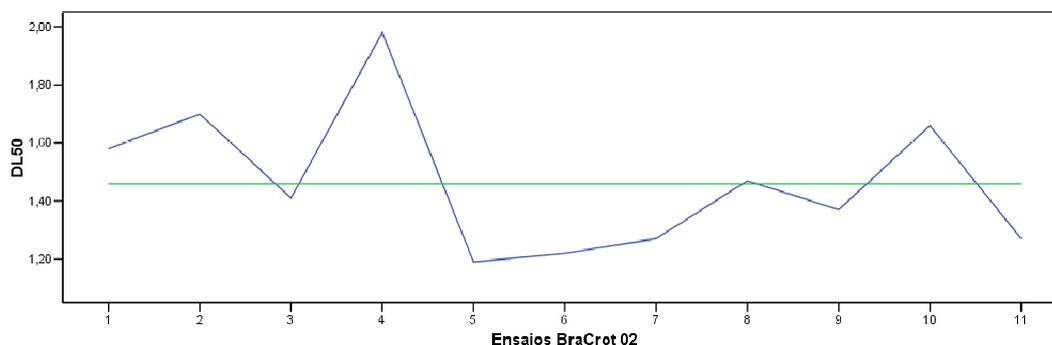


Figura 24: Representação gráfica da estabilidade do Veneno Crotálico de Referência lote 02 (BRACROT/02). Valores de 11 determinações individuais da DL_{50} realizadas em 2006. (potência declarada em $DL_{50} = 1,32 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, potência média em $DL_{50} = 1,47 \mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, desvio padrão = 0,244 e CV = 16,32%).

Estudos de degradação acelerada não foram realizados para nenhuma destas preparações.

2. Estudo colaborativo para a determinação da potência “in vivo” do lote 005 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05).

Cada laboratório apresentou o resultado de pelo menos cinco ensaios considerados válidos. Existe uma diferença no número de determinações válidas, pois cada laboratório possuía diferentes critérios para considerar a validade dos ensaios. Para efeito deste estudo, os ensaios foram considerados válidos de acordo com a interpretação de um consultor da OPAS sobre as recomendações da Farmacopéia Brasileira, que posteriormente foram consideradas excessivamente rigorosas. A adoção destes critérios de invalidação de ensaios levou a um número excessivamente alto de ensaios considerados inválidos.

De acordo com esta interpretação, o INCQS obteve um título médio de 47,85 $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ para cinco determinações de potência (Tabela 17), o laboratório “A” obteve um título médio de 33,20 $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ para oito determinações (Tabela 18), o laboratório “B” obteve um título médio de 33,67 $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ para nove determinações (Tabela 19) e o laboratório “C” obteve um título médio de 41,37 $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ para cinco determinações (Tabela 20).

Quanto à determinação da precisão intralaboratorial, o INCQS apresentou um CV de 7,96%, o laboratório “A” de 7,4%, o laboratório “B” de 10,88% e o laboratório “C” de 10,71%. A precisão interlaboratorial (entre o INCQS e todos os laboratórios) apresentou um CV de 16,76% (Tabela 22).

Tabela 17: Valores de DL_{50} para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo INCQS.

Protocolo	DL_{50} ($\mu\text{g}/0,5\text{mL}$)	Limite Inferior	Limite Superior
01	48,12	42,92	53,96
02	51,76	44,95	59,59
03	47,67	41,32	55,0
04	42,46	37,20	48,47
05	52,86	43,39	64,40
Média	47,85	44,97	50,93

Tabela 18: Valores de DL₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “A”.

Protocolo	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	Limite Inferior	Limite Superior
01	34,58	31,45	38,33
02	36,51	33,59	40,17
03	33,95	30,93	37,08
04	31,32	28,17	34,27
05	33,83	29,57	38,33
06	30,77	27,82	33,59
07	36,27	31,74	42,47
08	29,88	26,63	32,92
Média	33,20	32,02	34,43

Tabela 19: Valores de DL₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “B”.

Protocolo	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	Limite Inferior	Limite Superior
01	39,44	35,71	46,08
02	32,95	24,20	39,67
03	39,66	34,28	46,95
04	31,56	24,06	36,43
05	34,54	31,43	41,02
06	31,42	28,57	34,55
07	39,16	34,62	49,21
08	32,37	28,21	37,34
09	30,64	28,08	33,73
Média	33,67	32,21	35,19

Tabela 20: Valores de DL₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelo laboratório “C”.

Protocolo	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	Limite Inferior	Limite Superior
01	43,59	38,54	53,11
02	34,37	17,83	40,72
03	47,63	41,67	72,50
04	40,51	32,12	48,75
05	39,78	34,96	45,35
Média	41,37	38,01	45,02

Tabela 21: Valores médios de DL₅₀ para o Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelos laboratórios participantes.

Laboratório	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	Limite Inferior	Limite Superior
INCQS	47,85	44,97	50,93
A	33,20	32,02	34,43
B	33,67	32,21	35,19
C	41,37	38,01	45,02

Tabela 22: Coeficiente de Variação das determinações de potência do Veneno de Referência BRABOT/05, obtidos pelos laboratórios participantes.

Laboratório	DL ₅₀ (desvio padrão)	CV
A	33,20 (± 2,49)	7,48%
B	33,67 (± 3,75)	10,88%
C	41,37 (± 4,9)	10,71%
INCQS	47,85 (± 4,09)	7,96%
Interlaboratórios	39,07 (± 6,29)	16,76%

3. Determinação da potência *in vivo* do candidato a Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

Foram realizados no INCQS 14 ensaios independentes sendo que 10 ensaios foram considerados válidos e 4 ensaios inválidos, dos 10 ensaios válidos dois foram considerados aberrantes pelo teste de Grubbs, estes resultados não foram considerados para o cálculo do título médio (Tabela 23).

A DE₅₀ média do Soro Antibotrópico de Referência foi de 27,63 mg/mL o que corresponde a uma Potência de 6,92 mg/mL (Tabela 23). O Coeficiente de Variação para estas determinações foi de 11% (Figura 25, Tabela 24).

Tabela 23: Determinação da potência *in vivo* do lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

Ensaio Válidos					Ensaio Inválidos	
Protocolo	DE 50	LI	LS	Potência	Protocolo	Motivo
1*	35,15	31,84	38,80	5,43	2	Inversão
3	27,66	22,85	33,48	6,91	6	Não titulou
4	26,82	23,23	30,96	7,12	7	Não titulou
5	27,61	23,25	32,78	6,92	12	Inversão
8*	23,27	21,69	24,96	8,21		
9	33,48	27,15	41,29	5,71		
10	26,75	22,25	32,18	7,14		
11	24,94	21,66	28,71	7,66		
13	25,93	22,97	29,28	7,37		
14	32,25	27,92	37,24	5,92		
Média**	27,63	-	-	6,92		

* = Ensaio com resultados considerados aberrantes pelo teste de Grubbs.

** = Média excluindo-se os resultados considerados como não homogêneos.

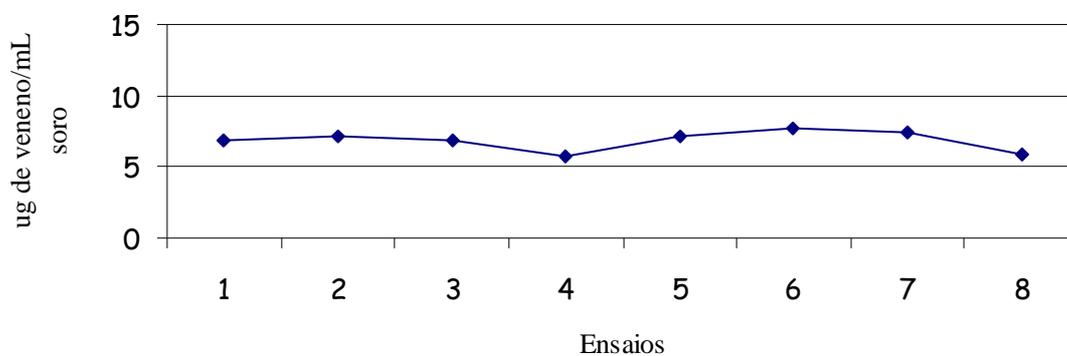


Figura 25: Representação gráfica dos valores de potência obtidos para o lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

Tabela 24: Determinação da DE₅₀ do Soro Antibotrópico de Referência.

European Pharmacopoeia 4									
Combinação ponderada de ensaios									
pot est	LI	LS	GL	Ln pot (M)	L(amplit)	t	Peso(W)	MW	W(M-Mmed) ²
27,66	22,85	33,48	20	3,3200	0,3820	2,086	119,28	395,99	0,00017
26,82	23,23	30,96	20	3,2891	0,2873	2,086	210,93	693,80	0,18540
27,61	23,25	32,78	20	3,3182	0,3435	2,086	147,50	489,42	0,00006
33,48	27,15	41,29	20	3,5109	0,4192	2,086	99,02	347,67	3,65625
26,75	22,25	32,18	20	3,2865	0,3690	2,086	127,82	420,10	0,13303
24,94	21,66	28,71	20	3,2165	0,2818	2,086	219,21	705,08	2,29508
25,93	22,97	29,28	20	3,2554	0,2427	2,086	295,45	961,79	1,18736
32,25	27,92	37,24	20	3,4735	0,2880	2,086	209,78	728,68	5,02199
N	GL total	W Total	MW total	M médio	t	s(Mmed)	LI	LS	
8	160	1428,99	4742,53	3,32	1,975	0,02645	3,2666	3,3710	
						Potência Estimada da combinação dos ensaios:			
						DE ₅₀	27,63	mg/mL	
						Lim Sup	26,22	mg/mL	
						Lim inf	29,11	mg/mL	
teste de homogeneidade:									
X ² calc	P	X ² tab							
12,479	0,0859	14,067							
Dados homogêneos									
			Valor máximo é válido		Valor mínimo é válido		CV = 11,00%		

4. Comparação intralaboratorial entre potência relativa e potência absoluta.

Foi feita a comparação entre os valores obtidos para a potência de diferentes amostras de soro antibotrópico calculadas pelos métodos da potência absoluta e pela potência relativa. As duas metodologias apresentaram resultados bastante concordantes em uma avaliação intralaboratorial (Figura 26).

A correlação de Pearson entre os valores da potência absoluta e da potência relativa obtidas no INCQS para as formulações comerciais de soros antibotrópicos foi considerada boa ($= 0,785$) (Tabela 25).

Em uma avaliação interlaboratorial preliminar realizada em 19 amostras analisadas rotineiramente, foi avaliada a correlação de Pearson entre os resultados obtidos pela potência absoluta pelo INCQS e pelos laboratórios produtores, com os resultados da potência relativa obtidos pelo INCQS e os resultados da potência absoluta obtidos pelos laboratórios produtores. Foi observado um aumento da correlação de regular ($= 0,38$) para moderada ($= 0,57$) (Tabela 26). Este resultado preliminar sugere que a precisão interlaboratorial deve aumentar significativamente com a adoção da metodologia da potência relativa por todos os laboratórios.

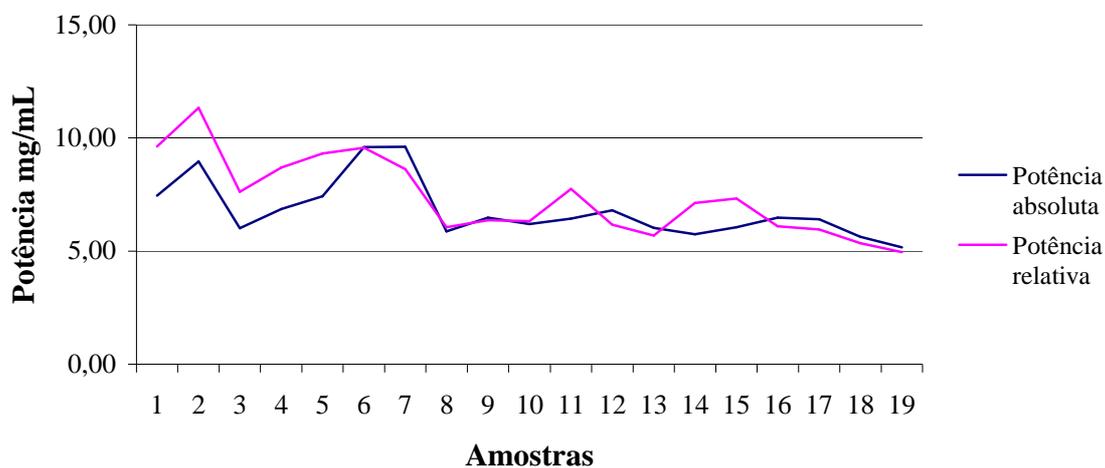


Figura 26: Comparação intralaboratorial (INCQS) entre os resultados da potência relativa e potência absoluta para amostras de rotina.

Tabela 25: Comparação intralaboratorial (INCQS) entre os resultados da potência relativa e potência absoluta para amostras de rotina.

Amostra	Data	Potência	DE ₅₀	Potência Relativa	DE ₅₀ Relativa
1117/04	25/06/04	7,45	25,65	9,61	25,57
1118/04	25/06/04	8,95	21,35	11,33	21,38
1359/04	25/06/04	6,01	31,80	7,62	31,85
1362/04	25/06/04	6,85	27,91	8,69	27,93
1537/04	25/06/04	7,42	25,76	9,32	26,00
1967/04	23/07/04	9,59	19,92	9,56	19,93
1968/04	23/07/04	9,60	19,91	8,63	19,74
2768/04	17/09/04	5,87	32,57	6,06	32,57
2810/04	17/09/04	6,47	29,52	6,36	29,73
2836/04	17/09/04	6,20	30,82	6,32	29,97
3116/04	14/11/04	6,43	29,71	7,75	29,75
3331/04	24/11/04	6,80	27,78	6,17	27,93
3341/04	15/12/04	6,03	31,70	5,69	31,92
3342/04	14/11/04	5,74	33,30	7,13	33,59
3387/04	14/11/04	6,06	31,53	7,32	31,56
3451/04	15/12/04	6,47	29,52	6,10	29,65
3547/04	24/11/04	6,40	29,63	5,95	28,91
3549/04	15/12/04	5,63	33,94	5,35	33,91
3796/04	15/12/04	5,17	36,98	4,95	37,02

Correlação de Pearson/DE₅₀ = 0,998

Correlação de Pearson/Potência = 0,785

Tabela 26: Comparação interlaboratorial dos resultados da potência absoluta com a potência relativa obtida no INCQS.

Amostra	INCQS		Produtores
	Potência Absoluta	Potência Relativa	Potência Absoluta
1117/04	7,45	9,61	6,39
1118/04	8,95	11,33	9,38
1359/04	6,01	7,62	5,91
1362/04	6,85	8,69	6,12
1537/04	7,42	9,32	7,61
1967/04	9,59	9,56	7,11
1968/04	9,60	8,63	5,58
2768/04	5,87	6,06	6,94
2810/04	6,47	6,36	7,39
2836/04	6,20	6,32	5,58
3116/04	6,43	7,75	6,46
3331/04	6,80	6,17	5,00
3341/04	6,03	5,69	6,07
3342/04	5,74	7,13	6,85
3387/04	6,06	7,32	5,23
3451/04	6,47	6,10	6,80
3549/04	5,63	5,35	5,45

Correlação PAXPA 0,38
 Correlação PAXPR 0,57

Onde: PA x PA = Correlação entre as potências absolutas de ambos laboratórios.

PR x PA = Correlação entre a potência relativa obtida no INCQS e a potência absoluta dos laboratórios produtores.

IV.3. DISCUSSÃO

Na segunda etapa deste trabalho, foram realizados o estabelecimento e determinação da estabilidade dos padrões de referência nacionais para veneno botrópico, crotálico e soro antibotrópico, assim como uma avaliação preliminar do método da potência relativa em comparação com o método oficial.

O “WHO Expert Committee on Biological Standardization” reunido em Genebra de 26 a 30 de Novembro de 2001, dentre várias recomendações reafirma a necessidade de se estabelecer padrões nacionais ou regionais de referência para a determinação da potência de antivenenos.

“Preparações nacionais ou regionais de referência para venenos e antivenenos são essenciais para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação entre lotes assim como comparações entre diferentes laboratórios. Idealmente as atividades dos antivenenos devem ser expressas em Unidades Neutralizantes de Toxinas, baseadas em padrões nacionais ou regionais” (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

Um padrão de referência biológico pode ser definido como uma preparação de uma substância biológica (por exemplo, soros, imunoglobulinas, vacinas, hormônios, etc.) distribuída em um grande número de frascos ou ampolas, apropriados para o envio aos laboratórios analíticos e que tenha sido estabelecido como um padrão, com unidades de atividade biológica definida por uma autoridade regulatória competente.

Três propriedades essenciais são necessárias para um padrão de referência biológico e devem ser verificados antes do seu estabelecimento.

1. As ampolas devem ser preenchidas com grande uniformidade e processadas como um único lote, garantindo que o conteúdo de todas as ampolas seja o mais semelhante possível.
2. O material deve ser estável, garantindo que sua atividade biológica não sofra alterações significativas durante a sua vida útil, geralmente de vários anos e freqüentemente décadas em uso.

3. O padrão deve ser adequado para a determinação da atividade biológica de diferentes tipos de preparações e formulações, assim como ser apropriado para diferentes metodologias analíticas oficiais, com uma aceitável especificidade e precisão (KIRKWOOD, SEAGROATT E SMITH, 1986).

Os padrões de referência biológicos são amplamente utilizados, no desenvolvimento, avaliação, padronização e controle da qualidade de medicamentos de origem biológica tanto pela indústria quanto por autoridades regulatórias, assim como na pesquisa acadêmica e desenvolvimento tecnológico.

Desde a implantação em 1987 das metodologias analíticas para a liberação dos lotes, o INCQS, visando uma padronização dos ensaios de potência, estabeleceu venenos botrópico e crotálico de referência. Estes lotes de veneno foram produzidos pelo Instituto Butantan e tiveram sua potência declarada (DL_{50}) determinada pelo INCQS, que é responsável pela sua guarda e distribuição. Estes venenos de referência são utilizados por todos os laboratórios brasileiros na realização dos ensaios de potência tanto para os produtos intermediários quanto para o produto final.

O controle da atividade neutralizante de uma preparação de antiveneno deve ser feito usando uma mistura de venenos bem caracterizados, levando-se em conta as variações intra-específicas na composição do veneno e sua antigenicidade (WARRELL, 1997). Atualmente existem várias lacunas na preparação e utilização de misturas de venenos para a padronização e controle dos antivenenos em nível mundial. Isto explica as discrepâncias nos testes de potência realizados em diferentes laboratórios. Para solucionar este problema, uma rede de laboratórios de Controle da Qualidade deve ser formada e a disponibilização de venenos de referência para utilização nos ensaios deve ser estimulada. A experiência do Brasil, onde um Veneno de Referência Nacional bem definido para *Bothrops jararaca* é preparado e distribuído para os fabricantes e laboratórios de controle da qualidade é um bom exemplo de coordenação nacional e interlaboratorial (WHO, 2007).

A determinação da potência declarada dos venenos de referência utilizados no Brasil foi até o presente momento, realizada unicamente pelo INCQS, apesar de ser recomendável a realização de estudos colaborativos interlaboratoriais para definir a potência e a adequação dos padrões de referência para utilização como referência internacional, regional ou nacional (PHILIPS, 1998).

No ano de 2002 foi realizado um estudo colaborativo interlaboratorial, coordenado pelo INCQS para o estabelecimento do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência Nacional – BRABOT/05, com a determinação da sua potência declarada pela média dos valores obtidos pelos laboratórios participantes.

Na época da realização do estudo, não havia um consenso entre os laboratórios produtores e controlador, sobre como interpretar os critérios de aceitação dos ensaios preconizados pela Farmacopéia Brasileira para o ensaio da DL₅₀.

“A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL” (BRASIL, 2004).

E para o ensaio da DE₅₀ :

“A faixa de resposta (porcentagem de sobrevivência) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem seus limites. Calcular a potência em miligramas por mililitro” (BRASIL, 2004).

Após consulta a diversos bioestatísticos, nos foi recomendado interpretar as recomendações da Farmacopéia Brasileira, da maneira mais rígida possível, ou seja, caso ocorresse na curva dose resposta, um ponto abaixo de 10% ou acima 90%, o ensaio deveria ser invalidado. Todos os pontos deveriam estar em uma relação perfeitamente linear, não podendo haver em hipótese alguma, qualquer inversão, ou mesmo repetição de valores, na curva dose resposta, senão o ensaio deveria ser invalidado.

A interpretação literal das recomendações da Farmacopéia Brasileira conforme nos foi sugerido, levou a um índice altíssimo de invalidação dos ensaios de potência de venenos e antivenenos. Nos ensaios de DL₅₀ realizados no INCQS para o referido estudo colaborativo, o índice de ensaios inválidos alcançou 77,27% quando seguidos estritamente estes critérios.

No ano de 2004, o INCQS recebeu a visita do Dr. Bertrand Poirier, estatístico da *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé* - AFSSAPS, o Laboratório Nacional de Controle da Qualidade francês, que esclareceu de maneira bem objetiva, como as recomendações para a validação dos ensaios, preconizadas pela Farmacopéia Brasileira deveriam ser interpretadas.

Para o cálculo, tanto da DL_{50} quanto da DE_{50} , são necessários no mínimo 03 pontos consecutivos (os ensaios possuem 05 diluições) da curva dose resposta que cumpram com os seguintes requisitos: estar entre 10% e 90%, apresentar uma relação linear e que o ponto relativo a 50% de mortos ou sobreviventes esteja compreendido dentro desta curva. Portanto a partir de então, foram utilizados estes critérios para considerar os ensaios de DL_{50} e DE_{50} como válidos.

Dentre as conclusões do referido estudo colaborativo, podemos destacar o fato de que o Coeficiente de Variação encontrado (16,76%) foi considerado, na ocasião, excessivamente elevado. Por isto, por cautela, foi adotado como valor de referência o título obtido pelo INCQS (47,8 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$) em detrimento do título médio interlaboratorial de 39,1 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$. Esta decisão privilegiou a potência do produto (soro antitoxotrópico) em detrimento ao rendimento/custos para os produtores, tendo em vista que um valor maior para a DL_{50} do veneno de referência, implica em mais veneno na dose de desafio no ensaio de potência do soro antitoxotrópico e conseqüentemente o soro antitoxotrópico deve ter uma concentração maior de imunoglobulinas específicas. Por exemplo, a dose de desafio de 5 DL_{50} para o valor médio obtido pelos laboratórios corresponderia a 195,5 μg , enquanto utilizando-se o valor obtido pelo INCQS, a dose de desafio passou a ser de 239 μg .

Após uma pesquisa bibliográfica mais detalhada, foi observado que estudos, como o de Van der Ark et al, 2000 aceitam uma precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) com um Coeficiente de Variação de até 20% para ensaios *in vitro* como ELISA. Já recomendações da OMS citam que um CV de 5 a 20% é aceitável para ensaios *in vitro* como ELISA, mas uma variação maior que 50% pode ser alcançada em ensaios com animais e células (WHO, 1997).

Para corrigir estas imprecisões, validar outros parâmetros relativos às determinações da potência dos soros antitoxotrópico e antitoxotático, estabelecer um título médio para o Veneno Botrópico de Referência, BRABOT/05, estabelecer um título médio para o Veneno Crotático de Referência, BRACROT/02, estabelecer um Soro Antitoxotrópico de Referência

BRAantBOT/01 e avaliar a metodologia da Potência Relativa frente à metodologia oficial da potência absoluta, um novo estudo colaborativo interlaboratorial com a participação de todos os laboratórios produtores de soro antibotrópico e anticrotálico está atualmente em andamento (Anexo III).

Caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresente um Coeficiente de Variação menor que 50% (WHO, 1997), o valor médio obtido por todos os laboratórios participantes do estudo deverá ser adotado como a Potência Declarada do lote BRABOT/05 em substituição ao valor declarado de 47,8 µg/mL, obtido exclusivamente pelo INCQS.

A estabilidade destes novos lotes de padrões de referência está sendo avaliada pelo seu desempenho em uso, assim como por estudos de degradação acelerada em andamento.

Rotineiramente, para cada determinação da DE₅₀ no INCQS, uma titulação da DL₅₀ do veneno de referência foi realizada em paralelo como um controle positivo. Os resultados da DL₅₀ foram comparados com o valor da potência declarada dos venenos de referência, com o objetivo de avaliar a sua estabilidade.

Nenhum dos venenos de referência apresentou perda de potência significativa nas condições ideais de armazenamento, demonstrando a boa estabilidade destas preparações. Os valores médios de potência, obtidos no período estudado (2000 a 2006) inclusive foram superiores aos da potência declarada para os lotes BRABOT/04 (oito anos em uso), com uma potência declarada em DL₅₀ de 48,7 µg/0,5 mL e uma potência média observada de 41,31 µg/0,5 mL e BRABOT/05 (quatro anos em uso), com uma potência declarada de 47,8 µg/0,5 mL e uma potência média observada de 44,23 µg/0,5 mL. O fato de o Padrão de Referência apresentar uma potência média superior à potência declarada após anos de utilização, quando se espera uma queda e não um aumento da potência é frequentemente observado em estudos de estabilidade. Este aparente aumento no valor da potência deve-se às variações intrínsecas inerentes aos ensaios de toxicidade aguda em animais (TREVAN, 1927; ZBINDEN e FLURY-ROVERSI, 1981), associados ao fato de que o material de referência não apresentou deterioração no período estudado, conseqüentemente apresentando uma boa estabilidade no período.

O alto CV encontrado para o lote BRA/CROT/01 nos últimos sete anos (30,32%) pode ser explicado pelo fato desta referência ter sido estabelecida em 1987, tendo 20 anos em uso e, portanto pode estar perdendo potência o que acarretaria na perda de homogeneidade dos resultados, visto que é esperado que nem todos os frascos da referência

se degradem simultaneamente com a mesma intensidade. Estes resultados também podem ser decorrentes de variações sistemáticas imprevisíveis, devido à natureza do ensaio, tendo em vista que as sete últimas determinações apresentaram um bom perfil de estabilidade (Figura 23). O CV para esta preparação variou significativamente durante o período estudado alcançando 13,86% em 2000, 22,22% em 2001, 32,24% em 2002, caindo para 16,14% em 2003 e aumentando nos anos subsequentes, 26,24% em 2004, 25,74% em 2005 até alcançar 38,41% em 2007 (Tabela 16).

Infelizmente não temos mais amostras deste lote disponíveis para avaliar o perfil de estabilidade por mais tempo. Estudos de degradação acelerada também deverão ser realizados nos lotes de veneno de referência em uso (BRABOT/05 e BRACROT/02).

A utilização de venenos e antivenenos de referência, apesar de pouco difundidas em nível mundial é fortemente recomendada pela OMS nos relatórios das últimas oficinas de trabalho relacionadas ao assunto. Todos os laboratórios produtores no Brasil utilizam os venenos botrópico e crotálico de referência desde 1987, quando o INCQS implantou as metodologias analíticas para o Controle da Qualidade de antivenenos. Esta iniciativa, inclusive foi elogiada no documento da OMS, intitulado: Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting, January 2007, Que cita “A experiência do Brasil, onde um Veneno de Referência Nacional bem definido para *Bothrops jararaca* é preparado e distribuído para os fabricantes e laboratórios de controle da qualidade é um bom exemplo de coordenação nacional e interlaboratorial” (WHO, 2007).

Apesar de dispormos de venenos botrópico e crotálico de referência desde 1987, somente em 2005 foi preparado um lote candidato a Soro Antibotrópico de Referência (BRAantiBOT/01) e somente em 2008 foi preparado um lote candidato a Soro Anticrotálico de Referência (BRAantiCROT/01).

O candidato a lote 01 de Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBot/01, foi produzido a partir de uma mistura de soros representativo de todos os produtores de soro antibotrópico no Brasil. Este lote é constituído por 915 frascos com 3 mL.

Em uma avaliação intralaboratorial no INCQS o soro BRAantiBot/01, se mostrou apto para ser avaliado como Soro de Referência Nacional para o desenvolvimento e validação de um ensaio de potência relativa para o soro antibotrópico. O soro apresentou uma potência em DL_{50} de 6,62 mg/mL, o CV para as determinações foi de 11%, o que pode ser considerado muito bom.

Tendo em vista que as determinações de potência para o candidato BRAantiBot/01 foram feitas em paralelo com amostras de rotina, após a determinação da potência média do soro padrão, foi possível fazer retrospectivamente o cálculo da potência relativa das amostras de rotina.

A correlação de Pearson entre os valores obtidos pelas duas metodologias foi de 0,785 o que é considerada uma correlação boa. É esperado que as duas metodologias não correlacionem perfeitamente, pois é previsto que com a utilização do método da potência relativa a um padrão de referência, ocorra uma diminuição no impacto de vários fatores intrínsecos a este tipo de ensaios que ocorram esporadicamente, portanto o valor da potência relativa é uma correção do valor obtido pela potência absoluta.

Em uma avaliação interlaboratorial preliminar realizada em 19 amostras analisadas rotineiramente, foi avaliada a correlação de Pearson entre os resultados obtidos pela potência absoluta pelo INCQS e pelos laboratórios produtores, com os resultados da potência relativa obtidos pelo INCQS e os resultados da potência absoluta obtidos pelos laboratórios produtores. Foi observado um aumento da correlação de regular (= 0,38) para moderada (= 0,57) (Tabela 26). Este resultado preliminar sugere que a precisão interlaboratorial deve aumentar significativamente com a adoção da metodologia da potência relativa por todos os laboratórios.

V. TERCEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA *IN VITRO* PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO E DO SORO ANTIBOTRÓPICO

V.1. MÉTODOS

1. Fundamentos do método proposto.

O princípio da metodologia proposta consiste no fato de que o veneno botrópico é capaz de provocar efeito citotóxico em células VERO cultivadas em monocamadas e que este efeito citotóxico pode ser neutralizado pelo soro antibotrópico.

A metodologia adotada para a quantificação do efeito citotóxico do veneno botrópico e sua inibição pelo soro antibotrópico *in vitro*, é uma modificação da técnica de quantificação de células descrita por Margis e Borojevic em 1989. Este método é capaz de quantificar células aderentes em superfícies planas ou microcarreadores, baseado na adsorção, eluição e posterior determinação da Densidade Ótica (DO) do corante Azul Brilhante de Coomassie (CBBR-250) que cora proteínas e lipídios celulares.

Considerando-se que a densidade ótica do corante eluído é diretamente proporcional à quantidade de células vivas, aderidas em monocamada, é possível determinar a quantidade de células mortas ou destacadas da fase sólida, comparando-se a DO de cada diluição do veneno, com a DO de um controle de células. O poder de inibição/neutralização deste efeito por diferentes concentrações do soro antibotrópico frente a uma concentração fixa de veneno botrópico de referência também pode ser calculado e conseqüentemente a potência de formulações comerciais de soro antibotrópico pode ser determinada.

Foi redigido um Procedimento Operacional Padronizado descrevendo todas as etapas da realização da determinação da potência do veneno botrópico (Anexo IV).

2. Células.

Foram utilizadas células VERO, originadas da ATCC, referência CCL – 81. Estas células são uma linhagem contínua de células epiteliais obtidas na Universidade de Chiba no Japão em 1962, do rim normal de um Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), adulto. É uma linhagem celular aneuplóide, com uma contagem cromossômica hipodiplóide com um número modal de cromossomos de 58 ocorrendo em 66% das células, e com uma

frequência de células com hiperplóidia de 1,7%. Esta linhagem é capaz de crescer indefinidamente em cultura e não tem propriedades oncogênicas em roedores imunossuprimidos (YASUMURA E KAWAKITA, 1963).

Estas células foram fornecidas pelo Setor de Cultura de Células do Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS e foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram fornecidas em suspensão com concentração de 10^5 células/mL, suplementada com 2% de SFB, 3 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES, 26 mM de NaHCO_3 , 1.000 UI de penicilina G potássica, 0,1 mg de sulfato de estreptomicina e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina-B.

3. Preparação de solução estoque de veneno de *B. jararaca* com 10 mg/mL.

O Veneno Botrópico de Referência é uma preparação liofilizada contendo 30 mg de veneno de *B.jararaca* por frasco ampola. Antes de sua utilização cada frasco de veneno foi reconstituído e a solução resultante foi alíquotada.

Foram identificados 15 frascos de vidro com capacidade para 2 mL, com as informações, BOT, n° do lote, concentração (10 mg/mL) e data de reconstituição.

Foi adicionado 1 mL de salina no frasco ampola contendo 30 mg do veneno liofilizado.

Após a completa dissolução do líófilo, a suspensão foi retirada e transferida para um outro frasco de vidro.

Foi adicionado 2 mL de salina ao frasco ampola para rinsagem.

Foram homogeneizados os 3 mL de suspensão e distribuídas em alíquotas de 200 μL (solução estoque, 10 mg/mL) tampadas com rolhas de borracha e vedadas com tampa metálica ou parafilm.

A solução estoque foi armazenada à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Esta solução foi utilizada no máximo até 30 dias após a sua reconstituição.

4. Determinação da potência (Dose Citotóxica 50% - DCt₅₀) do Veneno Botrópico *in vitro*.

Foram semeadas microplacas de 24 poços (Falcon, Multiwell 3047 ou Primaria 3847, Becton Dickinson, New Jersey, USA) com 10⁵ células VERO por poço, em meio Dulbecco's suplementado. Os poços A1, A2 e A3 (Figura 28) foram reservados sem células (somente com 1 mL de meio de cultura) para o controle negativo (branco) e os poços A4, A5 e A6 reservados para o controle de células.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera entre 3 e 5% de CO₂, para a adesão celular.

A solução de uso do veneno botrópico de referência foi preparada com uma concentração de 1 mg/mL, diluindo-se a solução estoque (10 mg/mL) a 1:10 (adicionou-se 1,8 mL de salina a 200 µL da solução estoque de veneno de referência).

Foram feitas diluições seriadas da solução de uso em salina, com um fator de 1:2 (Figura 27).

Foi retirado 100µL de meio de cultura de cada poço, exceto os controles de células e branco. Foi inoculado 0,1mL da primeira diluição nos orifícios B1, B2 e B3 (triplicata), da segunda diluição em B4, B5 e B6, da terceira diluição em C1, C2 e C3, da quarta diluição em C4, C5 e C6, da quinta diluição em D1, D2 e D3 e da sexta diluição em D4, D5 e D6 (Figura 28).

As microplacas foram Incubadas por 4 horas a 37° em atmosfera entre 3 e 5% de CO₂.

Após a incubação o inóculo foi retirado, vertendo-se as microplacas.

As microplacas foram lavadas duas vezes com 0,5 mL de PBS por orifício.

A seguir as microplacas foram fixadas com 0,5 mL de PBS contendo 0,2% de formol por poço, durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Todo o PBS/formol 0,2% foi vertido e as placas foram secas à temperatura ambiente ou em estufa 40/50 °C (para acelerar a secagem).

Foi adicionado 250µL de CBB R-250 0,2% por orifício e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora ao abrigo da luz.

As placas foram então lavadas gentilmente, por imersão em água potável e foram secas à temperatura ambiente ou em estufa 40/50 °C para acelerar a secagem.

A seguir o corante foi eluído com 1 mL de SDS 1,0% por uma hora à temperatura ambiente.

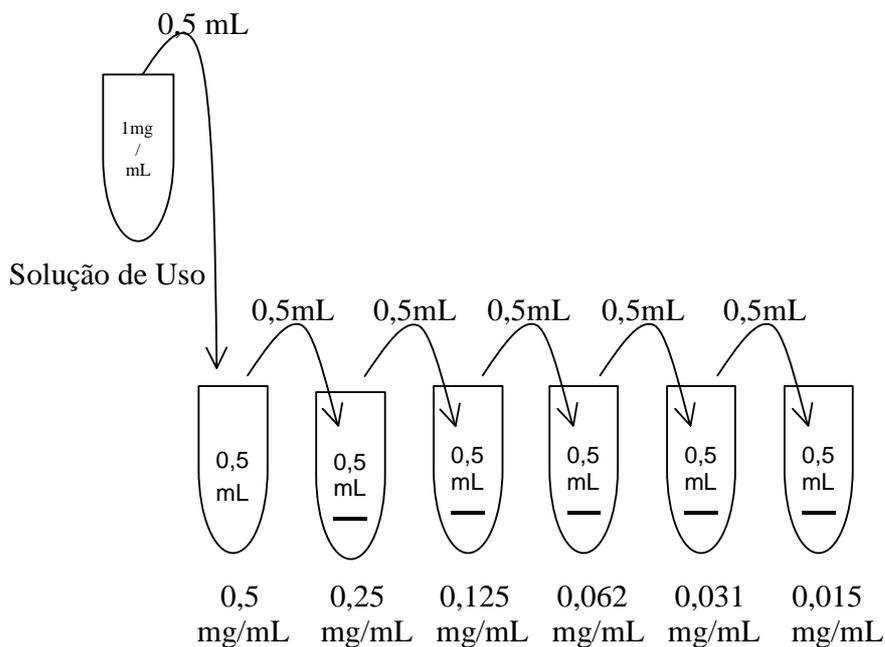


Figura 27: Esquema de diluição do Veneno Botrópico de Referência.

	1	2	3	4	5	6
A	Branco	Branco	Branco	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células
B	Diluição 1	Diluição 1	Diluição 1	Diluição 2	Diluição 2	Diluição 2
C	Diluição 3	Diluição 3	Diluição 3	Diluição 4	Diluição 4	Diluição 4
D	Diluição 5	Diluição 5	Diluição 5	Diluição 6	Diluição 6	Diluição 6

Figura 28: Esquema de inoculação da microplaca de 24 poços para a determinação da DC₅₀ do veneno botrópico.

A DO do eluato foi lida em leitor de microplacas (Biotech ®) para o comprimento de onda de 595 nm.

Foram realizados 16 ensaios válidos para a determinação da DC_{t50} do veneno botrópico de referência BRABOT/05.

4.1. Cálculos.

Foi desenvolvida uma planilha de cálculos no Excel® para o cálculo da Dose Citotóxica 50% (DC_{t50}) pelo método de Probitos de acordo com as recomendações da Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2005). Esta planilha foi alimentada com os resultados da leitura da DO (Figura 29).

Para que os ensaios fossem considerados como válidos, foram utilizados os mesmos critérios previstos pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004) e detalhados no POP de Determinação da Dose Letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* - *in vivo*. MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3440.006).

Para efeito do cálculo da DC_{t50} foi considerada a média das DO obtidas para as três repetições de cada diluição, descontando o valor médio da leitura dos três poços do controle negativo (branco), com o objetivo de minimizar a influência da coloração de fundo inespecífica, devida a uma certa afinidade do corante Azul Brilhante de Coomassie G - 250 com a superfície das microplacas tratadas para a adesão celular.

CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

Leitor de Microplacas Bio-Tek Instruments

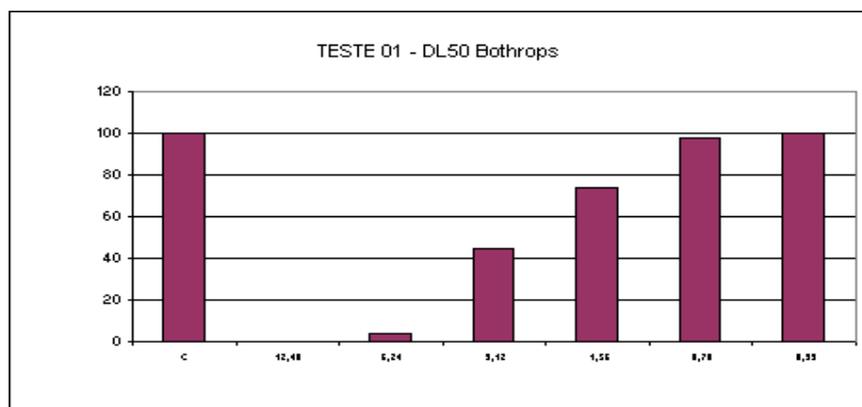
Resposns:

Humberto

Amostra:	Bot/005
Protocolo	02/05
Data	25/5/2005
Placa no.	2
Fator dil.	2,0000
Dose inicial	0,39

Dose $\mu\text{g/mL}$	Total	Positivos
0,39	100,00	100,000
0,78	100,00	97,582
1,56	100,00	73,571
3,12	100,00	44,451
6,24	100,00	3,462
12,48	100,00	0,000

	1	2	3	4	5	6
A	0,361	0,392	0,348	0,97	0,945	1,006
B	0,306	0,292	0,296	0,404	0,46	0,3
C	0,684	0,618	0,608	0,778	0,851	0,811
D	0,955	0,977	0,945	0,98	0,99	1,044



Dose $\mu\text{g/mL}$	% controle
C	100,000
12,48	0,000
6,24	3,462
3,12	44,451
1,56	73,571
0,78	97,582
0,39	100,000

		LIC	LSC
DL50 $\mu\text{g/mL}$	2,50	2,271	2,74
%		90,988	120,79
Linearidade	0,147	VÁLIDO	

	Branco	Controle +	Dil. 1	Dil. 2	Dil. 3	Dil. 4	Dil. 5	Dil.6
D.O	0,361	0,970	0,306	0,404	0,684	0,778	0,955	0,980
D.O	0,392	0,945	0,292	0,46	0,618	0,851	0,977	0,990
D.O	0,348	1,006	0,296	0,300	0,608	0,811	0,945	1,044
MÉDIA	0,367	0,974	0,298	0,388	0,637	0,813	0,959	1,005
DESV.PAD.	0,023	0,031	0,007	0,081	0,041	0,037	0,016	0,034
MÉDIA - Br	-	0,607	-0,069	0,021	0,270	0,446	0,592	0,638
DESV.MED.	0,017	0,022	0,005	0,059	0,032	0,025	0,012	0,026
VAR.%	6,159	3,149	2,420	20,926	6,486	4,495	1,707	3,427
ERROPAD	0,007	0,009	0,002	0,023	0,012	0,011	0,005	0,010
% do controle	-	100,000	-11,374	3,462	44,451	73,571	97,582	105,110

Figura 29: Exemplo de planilha de cálculos para a determinação da DCT_{50} do veneno botrópico.

5. Comparação entre os métodos “in vivo” e “in vitro” para a determinação da potência do Veneno Botrópico e de Soro Antibotrópico.

Para a comparação das duas metodologias foi calculado o Coeficiente de Variação para cada metodologia assim como a correlação de Pearson entre as diferentes metodologias.

Para que fosse possível realizar a correlação de Pearson entre as diferentes metodologias, uma seqüência de resultados de potência *in vivo*, com o mesmo tamanho da amostragem dos resultados obtidos pelo método *in vitro*, foi randomicamente selecionada. As duas seqüências de dados foram hierarquizadas em ordem crescente, para que fosse possível o pareamento dos dados.

6. Determinação da dose desafio de Veneno de Referência.

Para os ensaios de letalidade a dose de desafio deve sempre estimular uma resposta máxima, ou seja, a dose utilizada deve estar acima da porção linear da curva de dose resposta. Para o ensaio de determinação da DE_{50} (*in vivo*) é necessário utilizar uma dose de veneno correspondente a uma quantidade de DL_{50} sabidamente capaz de matar todos os animais inoculados (GUTIÉRREZ, 1990). O mesmo conceito foi aplicado para a determinação da dose desafio para o ensaio de inibição da citotoxicidade *in vitro* proposto.

Foram avaliadas diferentes concentrações do veneno botrópico de referência, com o objetivo de determinar a menor dose capaz de sempre lisar ou destacar 100% das células aderidas em monocamada.

7. Determinação da potência do Soro Antibotrópico (Dose Inibitória 50% - DI_{50}) *in vitro*.

A determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro* seguiu basicamente os mesmos procedimentos para a determinação da potência do veneno botrópico *in vitro*, como descrito em 1.3.

A principal diferença foi a inclusão da etapa de soroneutralização do veneno botrópico de referência, onde o soro antibotrópico foi diluído a 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} e cada diluição foi incubada com 6 DCt_{50} do veneno botrópico de referência (Figura 30).

Também foi incluído um controle positivo das 6 DCt_{50} do veneno botrópico de referência para aceitação do ensaio como válido (controle de veneno). Os procedimentos

para a soroneutralização foram realizados conforme o descrito em Parte I, item 3.2. Ensaio de Potência para o Soro Antibotrópico – *in vivo*.

	1	2	3	4	5	6
A	Branco	Branco	Branco	Controle de Células	Controle de Células	Controle de Células
B	Controle de Veneno	Controle de Veneno	Controle de Veneno	Diluição 1	Diluição 1	Diluição 1
C	Diluição 2	Diluição 2	Diluição 2	Diluição 3	Diluição 3	Diluição 3
D	Diluição 4	Diluição 4	Diluição 4	Diluição 5	Diluição 5	Diluição 5

Figura 30: Esquema de inoculação da microplaca de 24 poços para a determinação da DI_{50} do soro antibotrópico:

Foi desenvolvida uma planilha de cálculos no Excel para o cálculo da Dose Inibitória 50% (DI_{50}) pelo método de Probitos. Esta planilha (Figura 31) foi alimentada com os resultados da leitura da DO (Figura 30). Os valores obtidos no Controle de Veneno não são utilizados para efeito do cálculo da potência do soro antibotrópico, somente são considerados para a aceitação do ensaio como válido.

Inibição da Citotoxicidade em Células VERO

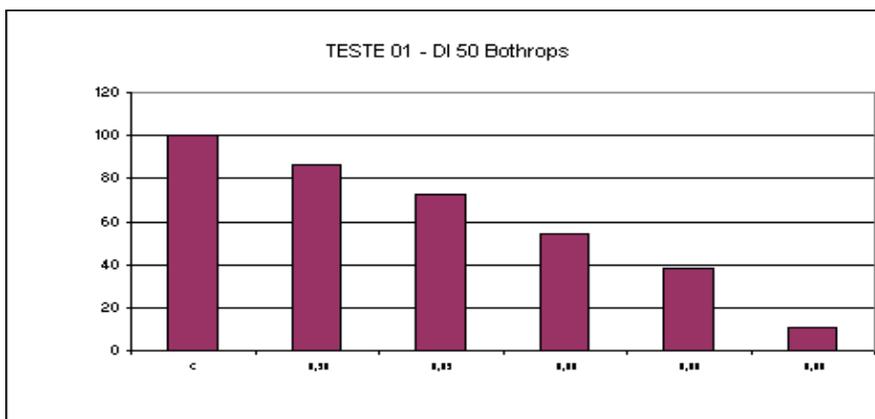
Leitor de Microplacas Bio-Tek Instruments

Responsável: Humberto

Amostra:	BraAntiBot 005
Protocolo	12/06
Data	11/10/2006
Placa no.	2
Fator dil.	10,0000
Dose inicial	0,3

Dose	Total	Positivos
0,3	100,00	86,203
0,03	100,00	72,689
0,003	100,00	54,305
0,0003	100,00	38,003
0,00003	100,00	10,339

	1	2	3	4	5	6
A	0,290	0,241	0,223	1,112	1,207	1,269
B	1,037	1,106	1,054	0,844	0,990	0,980
C	0,907	0,660	0,726	0,562	0,659	0,610
D	0,356	0,290	0,401			



F.D.	% controle
C	100,000
0,30	86,203
0,03	72,689
0,003	54,305
0,0003	38,003
0,00003	10,339

		LIC	LSC
DI 50	0,0022	0,001	0,004
%		59,143	282,81
Linearidade	0,252	VÁLIDO	

	Branco	Controle +	Dil. 1	Dil. 2	Dil. 3	Dil. 4	Dil. 5
			0,30	0,03	0,00	0,00	0,00
D.O	0,290	1,112	1,037	0,844	0,907	0,562	0,356
D.O	0,241	1,207	1,106	0,99	0,660	0,659	0,290
D.O	0,223	1,269	1,054	0,980	0,726	0,610	0,401
MÉDIA	0,251	1,196	1,066	0,938	0,764	0,610	0,349
DESV.PAD.	0,035	0,079	0,036	0,082	0,128	0,049	0,056
MÉDIA - Br	-	0,945	0,814	0,687	0,513	0,359	0,098
DESV.MED.	0,026	0,056	0,027	0,063	0,095	0,032	0,039
VAR.%	13,796	6,612	3,373	8,695	16,731	7,947	15,997
ERROPAD	0,010	0,023	0,010	0,024	0,037	0,014	0,016
% do controle	-	100,000	86,203	72,689	54,305	38,003	10,339

Figura 31: Exemplo de planilha de cálculos para a determinação da DI_{50} do soro antitoxico.

8. Validação da planilha Excel, de cálculo da DE₅₀, e da potência do Soro Antibotrópico frente ao programa “WHOPROG”, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde.

Foi desenvolvida uma planilha no Excel para o cálculo da DL₅₀ e DE₅₀, e da DCt₅₀ e DI₅₀ pelo método de Probitos, de acordo com as recomendações da Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2005), a ser utilizada em substituição ao programa estatístico WHOPROG, que somente permite o cálculo dos Probitos para valores inteiros (animais vivos/mortos) o que não permitia o cálculo dos valores da densidade ótica obtidos pelo método *in vitro*.

Foi realizado um estudo de validação desta planilha de cálculo, comparando-se os resultados obtidos em 28 determinações de potência e DE₅₀ *in vivo*, de diferentes lotes de soro antibotrópico, pelas duas ferramentas de cálculo. Foi estabelecida então a correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelas duas ferramentas de cálculo.

9. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência em Unidades Neutralizantes (UN).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o valor da potência do soro antibotrópico deve ser expresso em quantidade de veneno, em miligramas, neutralizados por 1 mL da amostra, e a potência mínima para a liberação de lote para o soro antibotrópico é de 5 mg/mL (BRASIL, 2004).

Foi proposta a expressão da potência do soro antibotrópico em Unidades Neutralizantes (UN). Cada UN corresponderia à capacidade de 1 mL de soro antibotrópico em neutralizar 1 mg de Veneno Botrópico de Referência.

V.2. RESULTADOS

1. Validação da planilha Excel desenvolvida no INCQS para o cálculo da DE_{50} e da potência do Soro Antibotrópico frente ao programa “WHOPROG”, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde.

Foram comparadas 28 determinações de potência de amostras comerciais do soro antibotrópico, calculadas pelos dois programas (Planilha Excell e WHOPROG).

A correlação de Pearson obtida para a determinação da DE_{50} foi de 0,999986 e para a determinação da potência foi de 0,999963, o que significa uma excelente correlação entre os dois programas estatísticos (Figura 32, Tabela 27).

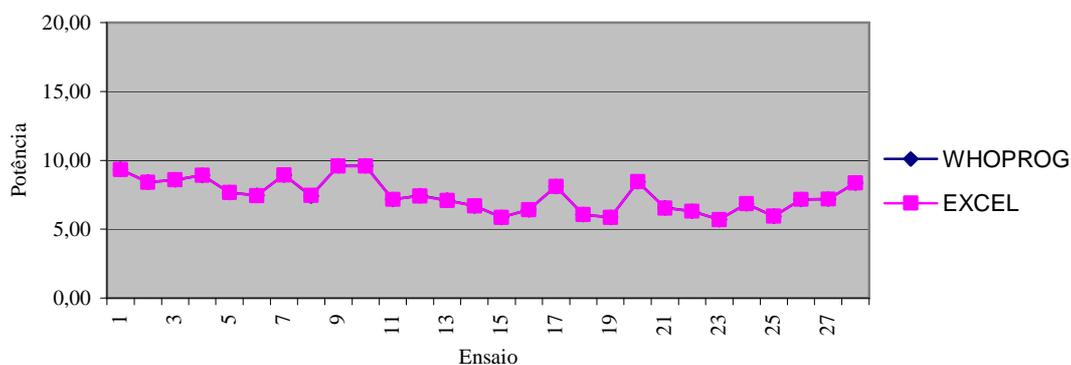


Figura 32: Comparação entre os resultados da potência de diferentes lotes de soro antibotrópico calculados pelo programa WHOPROG e pela planilha Excel desenvolvida no INCQS.

2. Determinação da potência do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05) pelo método *in vitro*.

Foram realizados 16 ensaios válidos para a determinação da Dose Citotóxica 50% (DC_{50}) do Veneno Botrópico de Referência, com o objetivo de determinar sua potencia média em DC_{50} . Destas 16 determinações quatro foram consideradas como não homogêneas pelo teste de Combinação Ponderada de Ensaios (COMBIM).

Excluindo-se estes quatro valores, foi obtida para o lote 05 do Veneno Botrópico de Referência - BRABOT/05 uma DC_{50} de 2,92 $\mu\text{g/mL}$, com um Limite Superior de 3,03 $\mu\text{g/mL}$ e Limite Inferior de 2,82 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 28).

Tabela 27: Comparação entre os resultados da potência de diferentes lotes de soro antibotrópico calculados pelo programa WHOPROG e pela planilha de Excel desenvolvida no INCQS.

Amostra	WHOPROG		Excell®	
	DE50	Potência	DE50	Potência
38/2004	20,45	9,35	20,48	9,34
41/2004	22,68	8,43	22,71	8,42
701/2004	22,23	8,60	22,26	8,59
878/2004	21,41	8,93	21,44	8,92
882/2004	24,91	7,68	24,94	7,67
1117/2004	25,65	7,45	25,67	7,45
1118/2004	21,35	8,96	21,38	8,94
1537/2004	25,46	7,42	25,60	7,47
1967/2004	19,92	9,60	19,95	9,58
1968/2004	19,91	9,60	19,94	9,59
2475/2004	26,65	7,17	26,67	7,17
2517/2004	25,73	7,43	25,76	7,42
2520/2004	26,94	7,10	26,97	7,09
2573/2004	28,53	6,70	28,55	6,70
2768/2004	32,57	5,87	32,59	5,87
3116/2004	29,71	6,44	29,74	6,43
3332/2004	23,53	8,13	23,55	8,12
3387/2004	31,53	6,06	31,56	6,06
3613/2004	32,65	5,86	32,66	5,85
3590/2004	22,60	8,46	22,63	8,45
4224/2004	29,18	6,55	29,20	6,55
4227/2004	30,26	6,32	30,28	6,31
104/2005	33,50	5,71	33,51	5,71
108/2005	27,91	6,85	27,93	6,85
112/2005	32,12	5,95	32,14	5,95
709/2005	26,64	7,18	26,67	7,17
711/2005	26,59	7,19	26,62	7,18
771/2005	22,84	8,37	22,86	8,36

Correlação de Pearson $DE_{50} = 0,999986$

Correlação de Pearson Potência = 0,999963

Tabela 28: Determinação da potência do lote 005 do Veneno Botrópico de Referência pelo método *in vitro*.

European Pharmacopoeia 4									
Combinação ponderada de ensaios									
pot est	LI	LS	GL	Ln pot (M)	L(amplit)	t	Peso(W)	MW	W(M-Mmed)2
2,58	2,25	2,96	20	0,9478	0,2743	2,086	231,39	219,31	3,58910
2,72	2,35	3,15	20	1,0006	0,2930	2,086	202,76	202,89	1,04235
2,9	2,56	3,29	20	1,0647	0,2509	2,086	276,53	294,42	0,01606
2,98	2,6	3,42	20	1,0919	0,2741	2,086	231,61	252,90	0,08890
3,01	2,65	3,43	20	1,1019	0,2580	2,086	261,48	288,13	0,22922
3,2	2,87	3,57	20	1,1632	0,2183	2,086	365,38	425,00	3,01373
2,58	2,25	2,96	20	0,9478	0,2743	2,086	231,39	219,31	3,58910
2,72	2,35	3,15	20	1,0006	0,2930	2,086	202,76	202,89	1,04235
2,9	2,56	3,29	20	1,0647	0,2509	2,086	276,53	294,42	0,01606
2,98	2,6	3,42	20	1,0919	0,2741	2,086	231,61	252,90	0,08890
3,01	2,65	3,43	20	1,1019	0,2580	2,086	261,48	288,13	0,22922
3,2	2,87	3,57	20	1,1632	0,2183	2,086	365,38	425,00	3,01373
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
				0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,00	0,00000
n	GL total	W Total	MW total	M médio	t	s(Mmed)	LI	LS	
12	240	3138,30	3365,30	1,07	1,970	0,01785	1,0372	1,1075	
						Potência Estimada da combinação dos ensaios:			
							2,92	UI/vial	
teste de homogeneidade:						Lim. Inferior	2,82	UI/vial	
X² calc	p	X² tab				Lim. Superior	3,03	UI/vial	
15,959	0,1427	19,675							
Dados homogêneos									
Teste de Grubbs para resultados aberrantes:									
valor máximo é válido									
valor mínimo é válido									

3. Comparação entre os métodos “in vivo” e “in vitro” para a determinação da potência do Veneno Botrópico.

Para a comparação do desempenho do método *in vitro* proposto com a metodologia oficial *in vivo*, foi determinada a precisão interensaios (repetibilidade) através do Coeficiente de Variação obtido para cada metodologia, assim como a correlação de Pearson entre a DCt₅₀ (*in vitro*) e a DL₅₀ (*in vivo*).

A precisão interensaios para as determinações da DL₅₀ pelo método *in vivo* apresentou um CV de 12,27% (Figura 22) enquanto que para as determinações da DCt₅₀ (o método *in vitro* proposto) o CV foi de 7,19% (Tabela 29).

A correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelas duas metodologias foi de 0,96.

Tabela 29: Determinação da potência média do Veneno Botrópico de Referência BRABOT/05 pelo método *in vitro*.

Ensaio	Potência In Vitro
1	2,58
2	2,72
3	2,90
4	2,98
5	3,01
6	3,20
7	2,58
8	2,72
9	2,90
10	2,98
11	3,01
12	3,20
Média	2,92
D Pad	0,20
CV%	7,19

4. Determinação da dose desafio de Veneno de Referência.

Foi determinada a dose de 6 DC_{t50} como a dose de desafio para o ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro* (a menor dose capaz de produzir sempre um efeito citotóxico de 100%).

5. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01 pelo método *in vitro*.

Foram realizados somente cinco ensaios considerados válidos para a determinação da potência do soro antibotrópico de Referência pelo método *in vitro*.

A potência média obtida para soro BRAantiBOT/01 pelo método *in vitro* foi de 3092,60 mg/mL (Tabela 30), o que representa que esta metodologia possui uma sensibilidade cerca de 450 vezes maior do que a da determinação da potência pelo método *in vivo* (= 6,92 mg/mL). Na prática esta característica representaria uma significativa economia de veneno botrópico de referência para a execução dos ensaios de potência.

A precisão interensaios (repetibilidade) obtida para estas cinco determinações foi de 56,81%, um valor que embora aceitável foi considerado ainda excessivamente alto. Por outro lado a determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro* apresentou uma correlação de Pearson com a metodologia oficial, igual a 0,90 o que é considerada uma correlação muito boa (HERZOG, *et al.*, 2004).

Tabela 30: Determinação da potência média do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01.

Ensaio	DC _t 50 (mL)	Potência <i>in vitro</i> (mg/mL)	Potência <i>in vivo</i> (mg/mL)
1	0,00782	1867,01	6,01
2	0,00247	5910,93	6,85
3	0,00695	2100,72	7,42
4	0,00392	3724,49	7,45
5	0,00785	1859,87	8,95
Média	0,00580	3092,60	7,34
Desv Pad	0,00246	1756,97	1,07
CV %	42,41379	56,81	14,65

6. Determinação da potência do Soro Antibotrópico de Referência em Unidades Neutralizantes (UN).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o título da potência do soro antibotrópico deve ser expresso em quantidade de veneno em miligramas neutralizados por 1 mL de soro (BRASIL, 2004).

Neste trabalho nós propomos que a potência do soro antibotrópico seja expressa em Unidades Neutralizantes (UN) e que cada UN corresponda à capacidade de 1 mL de soro antibotrópico neutralizar 1 mg de veneno botrópico de referência.

7. Custos.

Foi feita uma avaliação de custos para as duas metodologias onde a metodologia *in vitro* se mostrou até 69% mais econômica. O custo unitário de uma determinação de potência do soro antibotrópico pelo método *in vivo* foi avaliada em R\$ 1.032,89 enquanto que a determinação da potência de uma amostra de soro antibotrópico pelo método *in vitro* foi avaliada em R\$ 318,90 o que significa uma economia de 69%.

Ao se testar quatro amostras em paralelo, temos uma economia de escala bastante significativa para ambos os métodos, baixando os custos de execução do ensaio *in vivo* de R\$ 1.032,89 para R\$ 450,62 por amostra e do ensaio *in vitro* de R\$ 318,90 para R\$ 187,02. A economia representada pelo ensaio *in vitro* em relação ao ensaio *in vivo* ainda alcança o expressivo índice de 58%.

Tipo	1 Amostra	4 Amostras
IN VIVO	R\$ 1.032,89	R\$ 450,62
IN VITRO	R\$ 318,90	R\$ 187,02
Variação	- 69%	- 58%

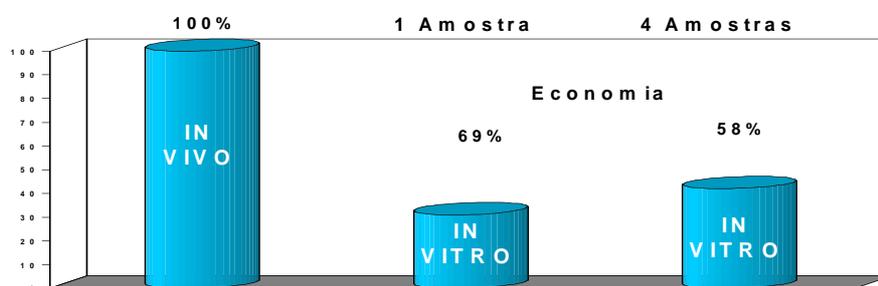


Figura 33: Avaliação de custos do ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico pelos métodos *in vivo* e *in vitro*.

V.3. DISCUSSÃO

Na terceira etapa deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia *in vitro* para a determinação da atividade citotóxica do veneno de *B. jararaca* em células VERO, assim como para a determinação da potência do soro antiofídico pela inibição do efeito citotóxico. Esta metodologia se propõe como uma alternativa ao ensaio de letalidade em camundongos, que é a metodologia oficial vigente (BRASIL, 2004).

Medicamentos biológicos como soros e vacinas podem ser resumidamente definidos como produtos derivados de (ou produzidos por) organismos vivos em um sistema de lotes. Esta definição implica que as características do produto podem variar de lote para lote e conseqüentemente um minucioso controle de qualidade para a liberação de lotes é necessário para garantir a qualidade de cada lote individualmente (HENDRIKSEN, 2002). Portanto, uma acurada determinação da atividade biológica ou da potência de cada lote é fundamental para que se garanta a eficácia desta classe de medicamentos.

A produção e o controle da qualidade de medicamentos imunobiológicos é regulada por monografias e normas publicadas por farmacopéias nacionais (Farmacopéia Brasileira) ou internacionais (e.g. Farmacopéia Européia), organizações internacionais (e.g. OMS) e autoridades regulatórias internacionais (e.g. EMEA). O objetivo desta regulamentação é garantir a qualidade destes produtos, com ênfase nos aspectos relacionados à sua segurança e potência.

No Brasil esta regulamentação é feita pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2004), complementada pela Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996 do Ministério da Saúde do Brasil que aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico (BRASIL, 1996). Estas normas preconizam que as determinações de potência tanto para o veneno botrópico quanto para o soro antiofídico sejam obrigatoriamente realizadas através da determinação da DL₅₀ e da DE₅₀ em modelos murinos.

Em 1959 Russel e Burch publicaram “The Principles of Humane Experimental Technique” (Os Fundamentos da Técnica Experimental Humanitária), no qual introduziram o conceito dos “3 R’s”, a saber, “Replacement” (substituição), “Reduction” (redução) e “Refinement” (refinamento), como um ponto de partida para uma abordagem menos cruel na experimentação animal, sempre mantendo a qualidade científica da experimentação.

Estima-se que mundialmente, mais de 10 milhões de animais sejam utilizados anualmente no desenvolvimento, produção e controle da qualidade de imunobiológicos. Estes animais são utilizados em testes que podem ser divididos em duas categorias, os testes de segurança e eficácia para efeito de registro (estudos pré-clínicos que assegurem que o imunobiológico induza uma imunidade protetora após a sua administração e garantam que o produto não provoque reações adversas inesperadas) assim como ensaios de segurança e potência para o controle da qualidade e conseqüente liberação dos lotes (HALDER, 2001). Cerca de 80% destes animais são utilizados em testes rotineiros de controle da qualidade para liberação de lotes (HENDRIKSEN, 2000).

Somente para a realização do ensaio de potência para o produto final dos soros antibotrópico e anticrotálico, são utilizados no INCQS cerca de 5.500 camundongos por ano, com um total de aproximadamente 3.000 camundongos somente para a realização do ensaio de potência para o soro antibotrópico.

Atualmente no Brasil não existe nenhuma norma geral sistematizadora atualizada referente a vivisseção e experimentação com animais, nem para fins didáticos, científicos ou regulatórios. A única lei referente a esse tema data de 1979 e não chegou a ser regulamentada. Leis mais recentes, também não regulamentadas, equiparam a prática de experimentos científicos aos atos de abuso e maus tratos de animais, na presença de tecnologia alternativa. No município do Rio de Janeiro, a prática de vivisseção e de experiências com animais em instituições veterinárias públicas municipais está proibida, desde 2001. Mais recentemente, em 2005, foi aprovado no município do Rio de Janeiro um projeto de lei que proíbe o uso de experimentação animal na cidade, esta lei está no momento aguardando regulamentação que deverá caracterizar que tipos de procedimentos serão permitidos e quais deverão ser abolidos nas instituições de produção e pesquisa sediadas neste município.

Existe um Projeto de Lei datado de 1997 (PL 3994/1997) que regulamenta o uso de animais de experimentação e define a criação de um Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal e regula a criação de Comissões de Ética no Uso de Animais. Este projeto tem o apoio da comunidade científica que anseia pela regulamentação dos procedimentos experimentais com o uso de animais. Existem em tramitação outros projetos, como o PL 215/2007, que propõe a criação do Código Federal de Bem-Estar Animal, que pode trazer imenso retrocesso à pesquisa biomédica, pois caso seja aprovado

com o texto original, a utilização de pequenos animais para experimentação científica poderá ser proibida (MARQUES, 2005).

Em 2001 o “WHO Expert Committee on Biological Standardization” reuniu-se em Genebra para discutir o progresso na padronização e controle de antivenenos. Dentre várias recomendações desta oficina de trabalho, podemos destacar que foram ressaltadas a necessidade e a importância de se estimular o desenvolvimento de métodos alternativos ao modelo de letalidade murina.

“Foi consenso que os ensaios murinos in vivo atualmente utilizados causam considerável sofrimento, são caros e mostram pequena ou nenhuma correlação com o envenenamento e terapia em humanos. Certamente, nos últimos anos o uso do ensaio de letalidade murina (DL_{50} e DE_{50}) assim como outros testes in vivo tem sido questionados na Europa e EUA. O UK Home Office, por exemplo, solicitou que ensaios alternativos sejam desenvolvidos para a substituição destes testes. O workshop concordou que esforços devem ser direcionados para o desenvolvimento de métodos alternativos para a substituição de ensaios em roedores para a determinação da potência de antivenenos” (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003).

Pelo exposto é necessário que a comunidade científica esteja preparada para enfrentar uma regulamentação nacional e internacional, cada vez mais restritiva ao uso da experimentação animal, inclusive para as metodologias analíticas oficiais utilizadas com fins regulatórios e preconizadas por farmacopéias ou outras recomendações internacionais.

O desenvolvimento de métodos *in vitro* para a avaliação da potência dos soros antipeçonhentos deve ter como objetivo obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis, além da redução dos custos analíticos e das questões relacionadas ao bem estar animal.

Alguns métodos alternativos têm sido desenvolvidos para a determinação da atividade biológica dos venenos de serpentes, assim como para a avaliação da potência de soros antiofídicos, a maioria baseada na neutralização *in vitro* de efeitos específicos dos venenos, como por exemplo, antiprocoagulante, mionecrótico, hemolítico ou efeitos proteolíticos e citotóxicos em cultivos celulares (da SILVA E BIER, 1982; WARRELL *et al.*, 1986; GUTIÉRREZ *et al.*, 1988; LAING *et al.*, 1992; GOWDA E MIDDLEBROOK,

1993; GOÑI, VAISBERG E ZAVALA, 1992; ARAÚJO *et al.*, 1999, GIRÓN *et al.*, 2005).

Também foram propostos métodos utilizando ovos embrionados (SELLS, LAING E THEAKSTON, 2001), degradação da gelatina (CLEGG *et al.*, 1997), hemaglutinação passiva e inibição da hemaglutinação (PRADHAN *et al.*, 2007), ELISA (THEAKSTON, 1983; RIAL *et al.*, 2006), SE-HPLC (PRICE III E SANNY, 2007), assim como a determinação e neutralização da atividade enzimática (esfingomielinase D) para o soro antiloxoscélico (BARBARO *et al.*, 2005; OLVERA *et al.*, 2006).

Apesar da grande diversidade de metodologias desenvolvidas, a grande maioria das técnicas descritas foi avaliada para fins de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico (mais voltadas à caracterização bioquímica e farmacológica de componentes dos venenos ou para o controle de processos de produção) e não com uma abordagem voltada para a liberação de lotes ou ações regulatórias vinculadas à Vigilância Sanitária. Nenhum destes métodos foi submetido a um estudo comparativo ou de validação frente à metodologia oficial vigente para a determinação da potência de antivenenos (modelo letal murino).

Até o presente momento, o modelo de letalidade murina é o único método previsto para a liberação de lotes de soros antipeçonhentos em nível mundial (com exceção do ensaio dermonecrótico em coelhos para a potência do soro antiloxoscélico). Portanto, devido ao exposto, é altamente recomendável o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas *in vitro* capazes de substituir os ensaios murinos para fins regulatórios.

Foi então, por nós proposto, um método colorimétrico *in vitro* para a quantificação da atividade citotóxica do veneno de *B. jararaca* em células VERO e sua inibição pelo antiveneno específico, para a determinação da potência do veneno botrópico e de soro antibotrópico.

O princípio da metodologia proposta consiste no fato de que o veneno botrópico é capaz de provocar efeito citotóxico em células VERO cultivadas em monocamadas e que este efeito citotóxico pode ser neutralizado pelo soro antibotrópico. Utilizando-se da propriedade do corante Azul Brilhante de Coomassie (CBBR-250) em corar proteínas e lipídios celulares, e do fato que este corante pode ser eluído dos cultivos e que a densidade óptica do corante eluído é diretamente proporcional à quantidade de células vivas, aderidas em monocamada, foi possível determinar a quantidade de células mortas ou destacadas da

fase sólida, comparando-se a DO de cada diluição do veneno com a DO de um controle de células.

Este método se propõe a determinar a Dose Citotóxica 50% (DC_{t50}) que substituiria a Dose Letal 50% (DL₅₀) para a determinação da potência do veneno botrópico e a Dose Inibitória 50% (DI₅₀) em substituição à Dose Efetiva 50% (DE₅₀).

Inicialmente, para que fosse possível realizar os cálculos da DC_{t50} e da DI₅₀ com os valores da DO, que apresentam valores com 3 casas decimais, foi necessário desenvolver uma planilha no Excel (Microsoft) para o cálculo dos Probitos em substituição ao programa estatístico WHOPROG (desenvolvido pela OMS), que somente permite o cálculo dos Probitos para valores inteiros (animais mortos/sobreviventes). Esta planilha foi desenvolvida e validada de acordo com as recomendações da Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2005).

O estudo de validação em questão consistiu basicamente em calcular a correlação entre os resultados experimentais obtidos pelas duas ferramentas de cálculo. Foram comparadas 28 ensaios de potência (*in vivo*) que apresentaram uma correlação de Pearson de 0,999986 para a determinação da DE₅₀, e de 0,999963 para a determinação da potência. Este resultado mostra que existe uma excelente correlação entre os resultados obtidos pelos dois programas estatísticos e, portanto o programa de cálculos na planilha do Excel pode ser seguramente utilizado.

Para uma primeira avaliação da performance da metodologia de determinação da potência do veneno botrópico pela quantificação do efeito citotóxico médio (DC_{t50}) foram realizadas 16 determinações independentes, consideradas válidas, do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05).

Os critérios para a aceitação do ensaio como válido foram:

1. Linearidade (pelo menos em três diluições consecutivas).
2. Localização da DC_{t50} (a dose que induz 50% de efeito citotóxico, deve estar localizada no intervalo compreendido entre a maior e a menor diluição do ensaio).

Destas 16 determinações válidas, quatro foram consideradas como não homogêneas pelo teste de Combinação Ponderada de Ensaios (COMBIM) e não foram utilizadas para efeito da determinação da potência média *in vitro* do Veneno Botrópico de Referência BRABROT/05.

O valor médio da DCt₅₀ do veneno BRABOT/05 foi então estabelecida em 2,92 ug/mL, com um Limite Superior de 3,03 ug/mL e Limite Inferior de 2,82 ug/mL. A potência declarada em DL₅₀ para o veneno de referência BRABOT/05 foi de 47,8µg/ 0,5 mL o que significa que o método *in vitro* possui uma sensibilidade aproximadamente 33 vezes maior que o método *in vivo* para a determinação da potência do veneno botrópico.

Para a comparação do desempenho do método *in vitro* proposto com a metodologia oficial *in vivo*, foi determinada a precisão interensaios (repetibilidade) através do Coeficiente de Variação, assim como a correlação de Pearson entre a DCt₅₀ (*in vitro*) e a DL₅₀ (*in vivo*).

A precisão interensaios para as determinações da DL₅₀ pelo método *in vivo* apresentou um CV de 12,27% (Figura 22) enquanto que para as determinações *in vitro* da DCt₅₀ o CV foi de 7,19% (Tabela 29). Esta precisão interensaios demonstrada tanto pelo método *in vitro*, quanto pelo método *in vivo* pode ser considerada como muito boa, tendo em vista que a precisão esperada para imunoenaios como o ELISA é de um Coeficiente de Variação de até 20% (van der ARK, 2000 *et al.*; WHO, 1997).

A correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelas duas metodologias foi de 0,96, o que é considerado uma correlação excelente (HERZOG, *et al.*, 2004).

Estes resultados demonstram que a metodologia proposta para a determinação da potência do veneno botrópico apresenta uma repetibilidade muito boa, assim como correlaciona excelentemente com a metodologia oficial murina. Portanto podemos concluir que a metodologia proposta tem potencial para ser formalmente validada e apresentada como uma alternativa *in vitro* ao modelo oficial de letalidade murina.

Foi então padronizada a metodologia *in vitro* para a determinação da potência do soro antibotrópico pela determinação da Dose Inibitória 50% (DI₅₀).

Para a realização de ensaios de inibição da letalidade (determinação da DE₅₀ ou pelo método *in vitro* da DI₅₀) o mais comum é fazer a soroneutralização frente a uma dose única de veneno utilizando-se diferentes diluições do soro hiperimune. Para isso é necessário estabelecer uma Dose de Desafio. Esta dose deve sempre estimular uma resposta máxima, ou seja, deve estar acima da região central linear da curva dose-resposta. Para o ensaio de determinação da DE₅₀ é necessário utilizar uma dose de veneno correspondente a uma quantidade de DL₅₀ sabidamente capaz de matar todos os animais inoculados (GUTIÉRREZ, 1990). O mesmo conceito foi aplicado para a determinação da dose desafio

para o ensaio de inibição da citotoxicidade (DI_{50}) *in vitro*. Para o ensaio *in vivo*, a Farmacopéia Brasileira preconiza a utilização de 5 DL_{50} .

Foram avaliadas diferentes concentrações do veneno botrópico de referência, com o objetivo de determinar a menor dose capaz de sempre lisar ou destacar 100% das células aderidas em monocamada.

A dose de 6 DCT_{50} foi determinada como a dose de desafio para o ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro*, pois foi sempre capaz de produzir um efeito citotóxico de 100%.

Após a determinação da dose de desafio para o veneno botrópico de referência, foram realizados diversos experimentos visando principalmente estabelecer qual o fator de diluição mais adequado. Para a determinação da DE_{50} , foi utilizado um fator de diluição de 1:1,2. A Farmacopéia Brasileira preconiza que o fator de diluição não seja superior a 1,5 (BRASIL, 2004). Este fator de diluição tão pequeno certamente foi responsável por várias invalidações de ensaios, porém, como a curva dose resposta para estas titulações em modelos animais é bastante crítica, os pontos da curva devem necessariamente estar muito próximos uns dos outros. Surpreendentemente no ensaio *in vitro* a inclinação da curva dose resposta não se mostrou tão crítica, quanto para o ensaio *in vivo*. Portanto o fator de diluição de 1:10 se mostrou bastante adequado, como pode ser observado na Figura 31.

Esta diferença observada no perfil da curva dose resposta (sigmóide) pode estar relacionada ao fato de a sensibilidade do ensaio *in vitro* ser significativamente maior que a do ensaio *in vivo*.

Após a determinação da dose de desafio e do fator de diluição para o ensaio da DI_{50} somente foram realizados cinco ensaios de potência para o Soro de Referência BRAantiBOT/01 considerados como válidos. A potência média de BRAantiBOT/01 para estas cinco determinações pelo método *in vitro* foi de 3.092,6 mg/mL (Tabela 30) enquanto que a potência média obtida pelo método *in vivo* foi de 6,92 mg/mL (Tabela 23), o que representa uma sensibilidade do teste *in vitro* cerca de 450 vezes maior do que a do teste *in vivo*.

A precisão interensaios (repetibilidade) apresentou um CV de 56,81% o que apesar de estar dentro dos valores esperados para ensaios utilizando animais ou cultivos celulares pela OMS, que aceita Coeficientes de Variação superiores a 50% (WHO, 1997) foi considerada excessivamente alta principalmente levando-se em conta que a precisão interensaios obtida para a determinação da potência do veneno botrópico de referência foi

de apenas 7,19%. O pequeno número de repetições, aliado ao fato de que estes dados foram obtidos durante o processo de padronização do teste podem justificar este elevado Coeficiente de Variação.

A metodologia para a determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro* ainda precisa de alguns ajustes para a sua completa padronização. Serão realizados posteriormente alguns ensaios complementares visando confirmar tanto a dose de desafio de 6 DC₅₀ quanto o fator de diluição utilizado atualmente (1:10).

Também serão necessárias mais repetições da determinação da potência *in vitro* para o estabelecimento da precisão interensaios.

A sensibilidade entre as duas metodologias é extremamente diferente, visto que a potência do veneno de referência BRABOT/05, pelo método *in vivo*, foi de 6,92 mg/mL (Tabela 23), enquanto que a potência pelo método *in vitro* foi de 3.092,6 mg/mL (Tabela 30). Isto representa uma sensibilidade do teste *in vitro* cerca de 450 vezes maior do que a do teste *in vivo*. Para que seja possível fazer qualquer comparação entre as duas metodologias, é necessário que a potência do Soro de Referência seja expressa em Unidades Neutralizantes e que seja utilizada a metodologia da Potência Relativa.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o valor da potência do soro antibotrópico deve ser expresso em quantidade de veneno em miligramas neutralizados por 1 mL de soro (BRASIL, 2004). No presente trabalho foi proposto que a potência do soro antibotrópico seja expressa em Unidades Neutralizantes (UN) e que cada UN corresponda à capacidade de 1 mL de soro antibotrópico neutralizar 1 mg de veneno botrópico de referência. Assim, a potência do lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01 estabelecida *in vivo* como 6,92 mg/mL seria considerada como 6,92 UN. Conseqüentemente a potência estimada *in vitro* do mesmo soro de referência determinada como 3.092,60 mg/mL também corresponderia às mesmas 6,92 UN.

Portanto, como a potência mínima para a liberação de lote do soro antibotrópico segundo a Farmacopéia Brasileira é de 5 mg/mL, este limite passaria a ser considerado como o mínimo de 5 UN, tanto no sistema murino (*in vivo*) quanto no sistema de inibição da citotoxicidade (*in vitro*).

A determinação da potência em Unidades Neutralizantes permitirá, não só a comparação dos resultados obtidos pelas metodologias *in vivo* e *in vitro*, mas também a determinação da Potência Relativa (a um soro antibotrópico de referência) em substituição à Potência Absoluta. A adoção da potência relativa, em tese deverá diminuir

significativamente a variação interlaboratorial das determinações de potência. A avaliação da aplicabilidade da metodologia da Potência Relativa (*in vivo*) está sendo avaliada em um estudo colaborativo com a participação de todos os laboratórios produtores nacionais (Anexo III).

Foi também realizada uma avaliação de custos para as duas metodologias onde a metodologia *in vitro* se mostrou até 69% mais econômica. O custo unitário de uma determinação de potencia do soro antibotrópico pelo método *in vivo* foi avaliada em R\$ 1.032,89 enquanto que a determinação da potência de uma amostra de soro antibotrópico pelo método *in vitro* foi avaliada em R\$ 318,90 o que significa uma economia de 69%.

Ao se testar quatro amostras em paralelo, teríamos uma economia de escala bastante significativa para ambos os métodos, ficando os custos de execução do ensaio *in vivo* em R\$ 450,62 por amostra e do ensaio *in vitro* em R\$ 187,02.

Durante o período estudado de 2000 a 2006, foram analisados 376 lotes de soro antibotrópico em todas as suas formulações. Considerando-se a incidência de ensaios inválidos, foram realizados 643 ensaios de potência durante estes sete anos, o que corresponde a uma média de 92 determinações de potência de soro antibotrópico por ano.

Fazendo-se uma projeção, caso estas amostras tivessem sido avaliadas individualmente, o custo anual dos ensaios *in vivo* seria de R\$ 95.026,80 e para o método *in vitro* seria de R\$ 29.338,80, gerando uma economia anual de R\$ 65.688,00. Caso todas as amostras fossem avaliadas de quatro em quatro simultaneamente, o custo anual pelo método *in vivo* seria de R\$ 41.457,04 enquanto que pelo método *in vitro* seria de R\$ 17.205,84, o que consistiria em uma economia anual de R\$ 24.251,20, ou seja, uma redução de 58,49% no custo por análise.

Pelo exposto a metodologia proposta pode ser considerada como uma boa candidata a um método alternativo ao ensaio de toxicidade aguda em camundongos para a determinação da potência do veneno botrópico e de soro antibotrópico, apesar de os estudos de padronização da metodologia da determinação da potência do soro antibotrópico ainda não estão plenamente estabelecidas.

Após a padronização e validação estatística das metodologias propostas será necessário realizar um estudo de validação bioquímica do método, com o objetivo de identificar que classes de toxinas presentes no veneno botrópico são responsáveis pelo efeito citotóxico observado no modelo em questão.

VI. DISCUSSÃO FINAL

Este estudo buscou fazer um diagnóstico da situação atual da determinação da potência do soro antiofídico e anticrotálico no Brasil, assim como propor e avaliar materiais de referência e metodologias alternativas à oficial (potência relativa e inibição da citotoxicidade *in vitro*) com o objetivo de melhor avaliar a qualidade do soro antiofídico utilizado no Brasil.

Quando se pensa no controle da qualidade de medicamentos, em particular dos imunobiológicos, temos que ter em mente que o seu principal objetivo é avaliar se os produtos, tanto os intermediários quanto o final, estão em conformidade com as características físico-químicas e biológicas descritas nas normas técnicas e monografias farmacopéicas, assim como de acordo com as especificações detalhadas quando do registro do produto.

Para que se possa garantir que um determinado produto cumpra com os requisitos de segurança e eficácia para uso humano, três aspectos essenciais devem ser considerados: Registro (com estudos pré-clínicos e clínicos bem conduzidos), Boas Práticas de Fabricação e Controle da Qualidade. Portanto o controle da qualidade, apesar da sua importância, é apenas um dos três componentes principais do sistema regulatório referente à qualidade de medicamentos.

A responsabilidade pela oferta de um produto seguro e eficaz é exclusiva do produtor. O Código de defesa do Consumidor reforça a legislação de Vigilância Sanitária, reafirmando a responsabilidade do produtor pela qualidade dos produtos e serviços ofertados no mercado de consumo, como também a responsabilidade institucional da Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

Após a crise na produção e distribuição de soros antiofídicos na década de 1980, o Ministério da Saúde tomou várias decisões visando à implementação de um Programa Nacional de Ofidismo. Esta crise foi agravada quando o laboratório privado Syntex do Brasil resolveu desativar a área de produção de imunobiológicos, ficando a produção nacional restrita aos três laboratórios oficiais que naquele momento não tinham condições operacionais para suprir a demanda nacional. Dentre estas medidas, foi decidido que a aquisição e distribuição dos soros antiofídicos, a partir do ano de 1985 seriam realizadas no âmbito do Programa Nacional de Imunizações (CARDOSO E WEN, 2003).

A partir de 1987, por solicitação do Ministério da Saúde o INCQS passou a testar todos os lotes de soros antipeçonhentos antes da liberação para a distribuição pelo PNI.

Entre os anos de 2000 e 2006 o INCQS analisou 619 lotes de soros antiofídicos, o que correspondeu a uma produção total de 2.513.690 ampolas. Neste período, oito lotes foram considerados insatisfatórios (1,29%) sendo três por pirogênio (0,48%) e cinco por análise de protocolo (0,81%). Tendo em vista que todos os cinco lotes reprovados pela análise documental foram aprovados nos ensaios analíticos executados pelo INCQS e considerados aptos para uso humano conjuntamente com o MS e ANVISA, devemos considerar que apenas três lotes (0,48%) foram recolhidos para destruição, o que pode ser considerado um índice bastante aceitável demonstrando que os laboratórios produtores, de um modo geral, cumprem com os requisitos vigentes para a liberação de lotes, fornecendo produtos de boa qualidade para o Sistema Único de Saúde.

Desde 1987, por iniciativa do INCQS, foram adotados os Venenos Botrópico e Crotálico de Referência para a realização dos ensaios de potência, no sentido de melhorar a reprodutibilidade dos resultados entre os diferentes laboratórios.

O desempenho destes Padrões de Referência foi avaliado através da determinação da precisão interensaios (repetibilidade) e da precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) através do Coeficiente de Variação (CV). A repetibilidade para o lote BRA/BOT/04 foi de 16,57% e para BRA/BOT/05 de 13,17% o que pode ser considerada uma precisão muito boa. Para BRA/CROT/01 (20 anos em uso) a repetibilidade foi de 31,82%, o que apesar de estar de acordo com o considerado como aceitável pela OMS (OMS, 1997) ficou bastante acima do observado para BRA/CROT/02, com apenas dois anos em uso, que apresentou um baixo CV (17,36%).

Nenhum dos venenos de referência apresentou perda de potência significativa nas condições ideais de armazenamento, demonstrando a boa estabilidade destas preparações.

A precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) do lote BRA/BOT/05, assim como a precisão interensaios (repetibilidade) de cada laboratório foram avaliadas através de um estudo colaborativo com a participação do INCQS e de todos os laboratórios brasileiros produtores de soro antibotrópico. A precisão interlaboratórios obtida foi de 16,76% e a precisão interensaios variou entre 7,48% e 10,88% nos diferentes laboratórios, o que pode ser considerado excelente, em oposição ao esperado e sugerido pela literatura (THEAKSTON, WARRELL E GRIFFITHS, 2003; SELLS, 2003).

Para a avaliação da correlação entre os resultados da potência das formulações comerciais de soro antibotrópico e anticrotálico foi feito um estudo retrospectivo comparando-se os resultados obtidos nos ensaios de rotina para a liberação dos lotes realizados pelos laboratórios produtores e repetidos pelo INCQS, consistindo em apenas uma titulação feita por cada laboratório para a mesma amostra.

A correlação de Pearson das determinações da potência dos soros antibotrópicos feitas pelo INCQS e laboratórios produtores foi de 0,286 o que é considerada uma correlação regular (HERZOG, *et al.*, 2004). A correlação com os laboratórios A e C foi de 0,14 o que é considerada uma correlação fraca, porém a correlação entre o INCQS e o laboratório “B” foi de 0,516 o que é considerada uma correlação moderada.

A correlação de Pearson das determinações da potência dos soros anticrotálicos feitas pelo INCQS e laboratórios produtores foi praticamente nula durante o período avaliado (0,002).

Estes resultados demonstram que apesar da boa reprodutibilidade observada para as determinações da DL_{50} , existe muito pouca correlação entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelos produtores.

O fato de que a correlação obtida entre o INCQS e o laboratório B para o soro antibotrópico ser considerada como moderada (0,516) no período estudado e como boa (0,807) no período entre 2004 e 2006, pode representar uma evidência de que os ensaios de potência podem correlacionar, porém provavelmente esta correlação dependa de uma série de eventos intercorrentes imprevisíveis, difíceis de identificar e controlar.

Um importante problema referente às determinações de potência dos soros antibotrópico e anticrotálico no INCQS foi o grande número de ensaios considerados inválidos. A frequência de invalidação de ensaios para a DL_{50} alcançou 20%, enquanto que para a DE_{50} chegou a alcançar o índice de 45% ao ano.

Apesar de dispormos de venenos botrópico e crotálico de referência desde 1987, somente em 2005 foi preparado um lote candidato a Soro Antibotrópico de Referência (BRAantiBOT/01) e em 2008 foi preparado um lote candidato a Soro Anticrotálico de Referência (BRAantiCROT/01).

Em uma avaliação intralaboratorial no INCQS o soro BRAantiBot/01 apresentou uma potência de 6,62 mg/mL, o CV para as determinações foi de 11%, o que pode ser considerado muito bom. A correlação de Pearson entre os valores obtidos pelas duas

metodologias (potência relativa e absoluta) foi de 0,785 o que é considerada uma correlação boa.

Em uma avaliação interlaboratorial preliminar realizada em 19 amostras analisadas rotineiramente, foi avaliada a correlação de Pearson entre os resultados obtidos pela potência absoluta pelo INCQS e pelos laboratórios produtores, com os resultados da potência relativa obtidos pelo INCQS e os resultados da potência absoluta obtidos pelos laboratórios produtores. Foi observado um aumento da correlação de regular (= 0,38) para moderada (= 0,57). Este resultado preliminar sugere que a precisão interlaboratorial deve aumentar significativamente com a adoção da metodologia da potência relativa por todos os laboratórios.

Na terceira etapa deste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia *in vitro* para a determinação da atividade citotóxica do veneno de *B. jararaca* em células VERO, assim como para a determinação da potência do soro antitoxêmico pela inibição do efeito citotóxico. Esta metodologia se propõe como uma alternativa ao ensaio de letalidade em camundongos, que é a metodologia oficial vigente (BRASIL, 2004).

Este método se propõe a determinar a Dose Citotóxica 50% (DC_{t50}) que substituiria a Dose Letal 50% (DL₅₀) para a determinação da potência do veneno botrópico e a Dose Inibitória 50% (DI₅₀) em substituição à Dose Efetiva 50% (DE₅₀).

Inicialmente, para que fosse possível realizar os cálculos da DC_{t50} e da DI₅₀ com os valores da DO, que apresentam valores com 3 casas decimais, foi necessário desenvolver uma planilha no Excel (Microsoft) para o cálculo dos Probitos em substituição ao programa estatístico WHOPROG (desenvolvido pela OMS), que somente permite o cálculo dos Probitos para valores inteiros (animais mortos/sobreviventes). Esta planilha foi desenvolvida e validada de acordo com as recomendações da Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2005).

O estudo de validação em questão consistiu basicamente em calcular a correlação entre os resultados experimentais obtidos pelas duas ferramentas de cálculo. Foram comparadas 28 ensaios de potência (*in vivo*) que apresentaram uma correlação de Pearson de 0,999986 para a determinação da DE₅₀, e de 0,999963 para a determinação da potência. Este resultado mostra que existe uma excelente correlação entre os resultados obtidos pelos dois programas estatísticos e, portanto o programa de cálculos na planilha do Excel pode ser seguramente utilizado.

Para uma primeira avaliação da performance da metodologia de determinação da potência do veneno botrópico pela quantificação do efeito citotóxico médio (DC_{t50}) foram realizadas 16 determinações independentes, consideradas válidas, do lote 05 do Veneno Botrópico de Referência (BRABOT/05).

O valor médio da DC_{t50} do veneno BRABOT/05 foi então estabelecida em 2,92 ug/mL, com um Limite Superior de 3,03 ug/mL e Limite Inferior de 2,82 ug/mL. A potência declarada em DL₅₀ para o veneno de referência BRABOT/05 foi de 47,8µg/ 0,5 mL o que significa que o método *in vitro* possui uma sensibilidade aproximadamente 33 vezes maior que o método *in vivo* para a determinação da potência do veneno botrópico.

Para a comparação do desempenho do método *in vitro* proposto com a metodologia oficial *in vivo*, foi determinada a precisão interensaios (repetibilidade) através do Coeficiente de Variação, assim como a correlação de Pearson entre a DC_{t50} (*in vitro*) e a DL₅₀ (*in vivo*).

A precisão interensaios para as determinações da DL₅₀ pelo método *in vivo* apresentou um CV de 12,27% enquanto que para as determinações *in vitro* da DC_{t50} o CV foi de 7,19%. Esta precisão interensaios demonstrada tanto pelo método *in vitro*, quanto pelo método *in vivo* pode ser considerada como muito boa, tendo em vista que a precisão esperada para imunoenaios como o ELISA é de um Coeficiente de Variação de até 20% (van der ARK *et al.*, 2000; WHO, 1997).

A correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelas duas metodologias foi de 0,96, o que é considerado uma correlação excelente (HERZOG, *et al.*, 2004).

Estes resultados demonstram que a metodologia proposta para a determinação da potência do veneno botrópico apresenta uma repetibilidade muito boa, assim como correlaciona excelentemente com a metodologia oficial murina. Portanto podemos concluir que a metodologia proposta tem potencial para ser formalmente validada e apresentada como uma alternativa *in vitro* ao modelo oficial de letalidade murina.

Foi então padronizada a metodologia *in vitro* para a de terminação da potência do soro antibotrópico pela determinação da Dose Inibitória 50% (DI₅₀).

A dose de 6 DC_{t50} foi determinada como a dose de desafio para o ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico *in vitro*, pois foi sempre capaz de produzir um efeito citotóxico de 100%. Foi utilizado um fator de diluição para o soro de 1:10.

Após a determinação da dose de desafio e do fator de diluição para o ensaio da DI₅₀ somente foram realizados cinco ensaios de potência para o Soro de Referência

BRAantiBOT/01 considerados como válidos. A potência média de BRAantiBOT/01 para estas cinco determinações pelo método *in vitro* foi de 3.092,6 mg/mL, enquanto que a potência média obtida pelo método *in vivo* foi de 6,92 mg/mL, o que representa uma sensibilidade do teste *in vitro* cerca de 450 vezes maior do que a do teste *in vivo*.

A precisão interensaios (repetibilidade) apresentou um CV de 56,81% o que apesar de estar dentro dos valores esperados para ensaios utilizando animais ou cultivos celulares pela OMS, que aceita Coeficientes de Variação superiores a 50% (WHO, 1997) foi considerada excessivamente alta principalmente levando-se em conta que a precisão interensaios obtida para a de terminação da potência do veneno botrópico de referência foi de apenas 7,19%. O pequeno número de repetições, aliado ao fato de que estes dados foram obtidos durante o processo de padronização do teste podem justificar este elevado Coeficiente de Variação.

A sensibilidade entre as duas metodologias é extremamente diferente, a potência do veneno de referência BRABOT/05, pelo método *in vivo*, foi de 6,92 mg/mL, enquanto que a potência pelo método *in vitro* foi de 3.092,6 mg/mL. Isto representa uma sensibilidade do teste *in vitro* cerca de 450 vezes maior do que a do teste *in vivo*.

Para que seja possível fazer qualquer comparação entre as duas metodologias, é necessário que a potência do Soro de Referência seja expressa em Unidades Neutralizantes e que seja utilizada a metodologia da Potência Relativa.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira, o valor da potência do soro antibotrópico deve ser expresso em quantidade de veneno em miligramas neutralizados por 1 mL de soro (BRASIL, 2004). Neste trabalho foi proposto que a potência do soro antibotrópico seja expressa em Unidades Neutralizantes (UN) e que cada UN corresponda à capacidade de 1 mL de soro antibotrópico neutralizar 1 mg de veneno botrópico de referência. Assim, a potência do lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01 estabelecida *in vivo* como 6,92 mg/mL seria considerada como 6,92 UN. Conseqüentemente a potência estimada *in vitro* do mesmo soro de referência determinada como 3.092,60 mg/mL também corresponderia às mesmas 6,92 UN.

Portanto, como a potência mínima para a liberação de lote do soro antibotrópico segundo a Farmacopéia Brasileira é de 5 mg/mL, este limite passaria a ser considerado como o mínimo de 5 UN, tanto no sistema murino (*in vivo*) quanto no sistema de inibição da citotoxicidade (*in vitro*).

Foi também realizada uma avaliação de custos para as duas metodologias onde a metodologia *in vitro* se mostrou até 69% mais econômica. O custo unitário de uma determinação de potencia do soro antibotrópico pelo método *in vivo* foi avaliada em R\$ 1.032,89 enquanto que a determinação da potência de uma amostra de soro antibotrópico pelo método *in vitro* foi avaliada em R\$ 318,90 o que significa uma economia de 69%.

Ao se testar quatro amostras em paralelo, teríamos uma economia de escala bastante significativa para ambos os métodos, ficando os custos de execução do ensaio *in vivo* em R\$ 450,62 por amostra e do ensaio *in vitro* em R\$ 187,02.

Pelo exposto a metodologia proposta pode ser considerada como uma boa candidata a um método alternativo ao ensaio de toxicidade aguda em camundongos para a determinação da potência do veneno botrópico e de soro antibotrópico, apesar de os estudos de padronização da metodologia da determinação da potência do soro antibotrópico não estarem ainda plenamente concluídos.

Após a padronização e validação estatística das metodologias propostas será necessário realizar um estudo de validação bioquímica do método, com o objetivo de identificar que classes de toxinas presentes no veneno botrópico são responsáveis pelo efeito citotóxico observado no modelo em questão.

Esta mesma metodologia de quantificação do efeito citotóxico do veneno botrópico, em células aderidas em monocamadas, foi utilizada como ferramenta para a determinação do efeito tóxico de drogas com atividade tripanossomicida em células de mamíferos. Este método permitiu identificar drogas (oxiranos relacionados estruturalmente com derivados da Lapachona e Naftoquinonas) com alta toxicidade para o *Trypanosoma cruzi* e baixa toxicidade para células de mamíferos, como possíveis candidatos à terapia contra a Doença de Chagas. Este trabalho resultou nas seguintes publicações:

1. JORQUEIRA, A.; GOUVÊA, R.; FERREIRA, V.F.; SILVA, M. N.; SOUZA, M. C. B. V. ; ZUMA, A. A.; CAVALCANTI, D. F. B.; ARAÚJO, H. P.; SANTOS, D. O.; BOURGUIGNON, S.C. Oxirane derivative of α -lapachone is potent growth inhibitor of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 99, p. 429-433, 2006.

2. FERREIRA, V.F.; JORQUEIRA A.; SOUZA, SilvA, M. N.; SOUZA, M. C. B. V.; GOUVÊA, R. M.; RODRIGUES, C. R.; PINTO, A. V.; CASTRO, H. C.; SANTOS, D. O.; ARAUJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 5459-5466, 2006.

E no pedido de patente:

Universidade Federal Fluminense. **Compostos tripanossomicidas, composição farmacêutica contendo os mesmos e processo para a produção de composição farmacêutica.** BR n. PI 0503558-9, 26 ago. 2005.

VII. CONCLUSÕES

- Devido ao baixo índice de reprovação de lotes (0,48%) podemos concluir que os laboratórios produtores cumprem com os requisitos vigentes para a liberação de lotes, fornecendo produtos de boa qualidade para o Sistema Único de Saúde.
- Os lotes 04 e 05 do Veneno Botrópico de Referência e o lote 02 do Veneno Crotálico de Referência apresentaram uma precisão interensaios (repetibilidade) muito boa, com um CV de 16,57%, 13,17% e de 17,36%, respectivamente.
- O lote BRA/CROT/01 que foi utilizado por 20 anos apresentou um CV de 31,82%. Este CV variou de 13,86% em 2000 a 38,41% em 2006, o que pode ser devido à perda de estabilidade.
- A precisão interlaboratórios (reprodutibilidade) para lote BRA/BOT/05 foi de 16,76%, e a precisão interensaios (repetibilidade) variou entre 7,48% e 10,88% o que pode ser considerado excelente.
- A frequência de ensaios inválidos para a potência da veneno botrópico e dos soro antibotrópico foi excessivamente alta alcançando 20% para a DL₅₀ e 45% para a DE₅₀. Este aspecto deve ser intensamente trabalhado, focando principalmente em intervenções no nível de Boas Práticas de Laboratório
- O soro de referência BRAantiBot/01 apresentou uma potência em DL₅₀ de 6,62 mg/mL, o CV para as determinações foi de 11%, o que pode ser considerado muito bom. A correlação de Pearson entre os valores obtidos pelas duas metodologias (potência relativa e absoluta) foi de 0,785 o que é considerada uma correlação boa.
- Resultados preliminares sugerem que a introdução da potência relativa para o soro antibotrópico deva aumentar significativamente a correlação entre os resultados obtidos pelo INCQS e laboratórios produtores.
- A validação da planilha para o cálculo dos probitos desenvolvida em Excel em comparação com o programa da OMS (WHOPROG) apresentou uma correlação de Pearson de 0,999986 para a determinação da DE₅₀, e de 0,999963 para a determinação da potência, o que é suficiente para a aprovação da sua utilização.
- O valor médio da DCt₅₀ do veneno BRABOT/05 foi estabelecida em 2,92 ug/mL, com um Limite Superior de 3,03 ug/mL e Limite Inferior de 2,82 ug/mL. A potência declarada em DL₅₀ para o veneno de referência BRABOT/05 foi de

47,8µg/ 0,5 mL o que significa que o método *in vitro* possui uma sensibilidade aproximadamente 33 vezes maior que o método *in vivo* para a determinação da potência do veneno botrópico.

- A precisão interensaios (repetibilidade) para as determinações da DC_{t50} (potência do veneno botrópico) apresentou um CV de 7,19%, o que pode ser considerado muito bom
- A precisão interensaios (repetibilidade) para as determinações da DI₅₀ (potência do soro antibotrópico) apresentou um CV de 56,81%, o que pode ser considerado um CV muito elevado, necessitando de ajustes finos na metodologia.
- A potência média *in vitro* de BRAantiBOT/01 foi de 3.092,6 mg/mL, enquanto que a potência média obtida pelo método *in vivo* foi de 6,92 mg/mL, o que representa uma sensibilidade do teste *in vitro* cerca de 450 vezes maior do que a do teste *in vivo*.
- Neste trabalho foi proposto que a potência do soro antibotrópico seja expressa em Unidades Neutralizantes (UN) e que cada UN corresponda à capacidade de 1 mL de soro antibotrópico neutralizar 1 mg de veneno botrópico de referência. Assim, a potência do lote 01 do Soro Antibotrópico de Referência BRAantiBOT/01 estabelecida *in vivo* como 6,92 mg/mL seria considerada como 6,92 UN. Conseqüentemente a potência estimada *in vitro* do mesmo soro de referência determinada como 3.092,60 mg/mL também corresponderia às mesmas 6,92 UN.
- O método *in vitro* representa uma economia de custos entre 58 e 69%.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. ARAÚJO, H.P.; AGUIAR, A.M.; VIEGAS, J.A.A.; ALVES, P.S.; STEPHENS, P.R.; BOLLER, M.A.A. In vitro cytotoxicity assay to evaluate the potency of Bothrops antivenom: an alternative to animal assay. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, p. 382, 1999.
2. ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S.C.; BOLLER, M.A.A.; DIAS, A.A.S.O.; LUCAS, E.P.R.; SANTOS, I.C.; DELGADO, I.F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: The national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p. 502-514, 2008.
3. BALLS, M. BLAAUBOER, B.; BRUSICK, D.; FRAZIER, J.; LAMB, D.; PEMBERTON, M.; REINHARDT, C.; ROBERFROID, M.; ROSENKRANZ, H.; SCHMID, B.; SPIELMANN, H.; STAMMATI, A.L.; WALUM, E. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity tests procedures. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.18, p. 313-337, 1990.
4. BALLS, M.; BLAAUOER, B.J.; FENTEM, J.H.; BRUNER, L.; COMBES, R.D.; EKWALL, B.; FIELDER, R.J.; GUILLOUZO, A.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.P.; REINHARDT, C.A.; REPETTO, G.; SLADOWISKI, D.; SPIELMANN, H.; ZUCCO, F. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, p. 129-147, 1995.
5. BALLS, M; KARCHER, W. The validation of alternative methods. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.23, p. 884-886, 1995.
6. BARBARO, K.C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, p. 489-499, 2005.
7. BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, p. 325-372, 1994.
8. BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venoms of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 31, p. 1137-1150, 1993.

9. BOURGUIGNON, S.C.; PASE, F.S.; CALHEIROS, E.B.; JULIANO, M.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; GIOVANNI-DE-SIMONI, S. *Bothrops moojeni* venom peptides containing Bradykinin potentiating peptides sequence. **Protein and Peptide Letter**, v. 8, p. 21-26, 2001.
10. BRASIL. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1959. 2 ed. São Paulo: Siqueira, p.1034-1035.
11. BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília n. 220, p. 23491, 12 nov. 1996 seção 1.
12. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 120 p.
13. BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Soro Antibotrópico. Immunoserum bothropicum 4ª Edição, fasc. 2, São Paulo: Atheneu 2001.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. Direito sanitário e saúde pública. Márcio Iorio Aranha (Org.) – Brasília: Ministério da Saúde, 2003, 375 p.
15. BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Soro Antibotrópico. Immunoserum ad usum humanum 4a ed. fasc. 5, parte II. São Paulo: Atheneu, 2004.
16. BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Soro Antibotrópico. Immunoserum bothropicum 4a ed. fasc. 5, parte II. São Paulo: Atheneu, 2004.
17. BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobras. **Revista de Medicina de São Paulo**, v. 13, p. 265-278, 1903.
18. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns anti-peçonhentos. **Revista Médica de São Paulo**, v. 10, n. 22, p. 457-462, 1907. (I)
19. BRAZIL, O.V. History of the primordial of snakebite accident serotherapy. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 49, n. 1, p. 7-20, 1987.
20. CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T.; SÁNCHEZ, E.F. Pharmacological characterization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, p. 501-509. 2002.
21. CARDOSO, J. L. C.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; SANTORO,

- M.L.; CHUDZINSKI, A.M.; CASTRO, S.C.B.; KAMIGUTI, A.S.; KELEN, E.M.A. HIRATA, M.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D. A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 86, p. 315-325, 1993.
22. CARDOSO, J.L.C. José de Anchieta e as cartas. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p. 456-457.
23. CARDOSO, J.L.C.; WEN, F.H. Introdução ao ofidismo. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p.3-5.
24. CARDOSO, D.F.; YAMAGUCHI, I.K.; MOURA DA SILVA, A.M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p. 367-379.
25. CASTRO, H., C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R.B. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon**, v. 37, p. 1403-1416, 1999.
26. CHIPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.
27. CLEGG, P.D.; COUGHLAN, A.R. RIGGS, C.M.; CARTER, S.D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, p. 343-348, 1997.
28. CLISSA, P.B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1567-1573, 2001.
29. COSTA, E.P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA da SILVA, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation, **Inflammation**, v. 26, n.1, p. 13-17, 2002.
30. COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. (Chapter - General texts - 4). In: The European Pharmacopoeia, 5th ed. Strasbourg, France. 2005. p 484-6.

31. CURREN, R.D.; SOUTHEE, J.A.; SPIELMANN, H.; LIEBSH, M.; FENTEM, J.H.; BALLS, M. The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, p. 211-217, 1995.
32. da SILVA, M.H.; BIER, O.G. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. **Toxicon**, v. 20, p. 563-569, 1982.
33. DALMORA, S.L. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. Memórias do Instituto Butantan, v. 54 n. 1, p. 21-30, 1992.
34. DETERMINAÇÃO da Dose Letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* - *in vivo*. In MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10.(65.3440.006)
35. DIAS DA SILVA, W. GUIDOLIN R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten species of *Bothrops* species. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 51, p. 153-168, 1989.
36. ENSAIO de potência para o Soro Antibotrópico - *in vivo*. In MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3440.005).
37. ENSAIO de potência para o Soro Anticrotálico - *in vivo*. In MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3440.004).
38. ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Effectiveness of Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 269-274, 2000.
39. FARSKY, S.H.P.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGUI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP1 activate the complement system. Role in leucocytes recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 9, p. 213-221, 2000.
40. FERREIRA, S.H. A bradykinin – potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, p.163-169, 1965.
41. FINNEY, D.J., 1971. Probit analysis 3rd ed: Cambridge University Press. 333 p.

42. FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p.73-86.
43. FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N. GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, p. 63-77, 2000.
44. FRANCISCHETTI, I.M.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. *Bothrops sp.* Snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology, Toxicology Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 21-29, 1998.
45. GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; ROMERO L.; SANCHEZ E.E.; PEREZ J.C.; RODRIGUEZ-ACOSTA A. A low cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.47, n. 3, p. 147-152, 2005.
46. GOÑI, M.; VAISBERG, A.; ZAVALATA, A. Citotoxicidad inducida por veneno de serpentes peruanas sobre fibroblastos de ratón. **Revista de Biología Tropical**, v. 40, n. 1, p. 143-145, 1992.
47. GOUDA, T.T.; MIDDLEBROOK, J.L. Effects of myonecrotic snake venom phospholipase A₂ toxins on cultured muscle cells. **Toxicon**, v. 31, p. 1267-1278, 1993.
48. GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.
49. GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E. CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26 n. 4, p. 411-413, 1988.
50. GUTIÉRREZ, J.M. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**, v. 28, n. 10, p. 1127-1129, 1990.
51. GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.
52. GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: MEIER J, WHITE J. (Eds.) **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. p. 645-665.

53. GUTIÉRREZ, J.M. LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36 n. 11, p. 1529-1538, 1998.
54. GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
55. HALDER, M. Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals. **ALTEX**, v. 18, n. supl., p. 13-46, 2001.
56. HARMS, A.J. The purification of antitoxic plasma by enzyme treatment and heat denaturation. **Biochemical Journal**, v. 42, p. 390-397, 1948.
57. HAWGOOD, B.J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v. 37, p. 1241-1258, 1999.
58. HENDRIKSEN, C.F.M., SPIESSER, J.M., AKKERMANS, A. Validation of alternative methods for the potency tests of vaccines. The report and recommendations of the ECVAM Workshop 31. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 26, p. 747-761, 1998.
59. HENDRIKSEN, C.F.M. Replacement, reduction and refinement and biologicals: about facts, fiction and frustrations. In M. Balls, A-M, van Zeller; Halder, M.E. (eds.) Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam, Elsevier Science, p. 51-63, 2000.
60. HENDRIKSEN, C.F.M. Refinement, reduction and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. **Institute for Laboratory Animals Research Journal**, v. 43, n. supl. p. 43-48, 2002.
61. HERZOG, C.; BRITTEN, M.; BALZER, J.O.; MACK, M.G.; ZANGOS, S.; ACKERMANN, H.; SCHAECHINGER, V.; SCALLER, S.; FLOHR, T.; VOGL, T.J.; Multidetector-row cardiac CT: diagnostic value of calcium scoring and CT coronary angiography in patients with symptomatic, but atypical, chest pain. **European Radiology** v. 14, p. 169-177, 2004.
62. HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; LUKASIEWICZ, H.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein II-b-IIIa complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 16157-16163, 1987.

63. JORQUEIRA, A. et al. Oxyrane derivative of α -lapachone is potent inhibitor of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 429-433, 2006.
64. KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I. South American snake venoms affecting haemostasis. **Journal of Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 359-374, 1995.
65. KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, 627-642, 1996.
66. KIRKWOOD, T.B.L.; SEAGROATT, V.A.; SMITH, S.J. Statistical aspects of the planning and analysis of collaborative studies on biological standards. **Journal of Biological Standardization**, v. 14, p. 273-287, 1986.
67. KOCHOLATY, W.F.; BILLINGS, T.A.; ASHLEY, B.D.; LEDFORD, E.B.; GOETZ, J.C. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. **Toxicon** v. 5, p. 165-170, 1968.
68. LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.G.; LEITE, R.P.; DIAS da SILVA, W.; WARRELL, D.A. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. **Toxicon**, v. 30, p. 1219-1225, 1992.
69. LI-GUO, J.; XIAO-MING, W.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich domains of Atrolysin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 20, 13094-13102, 1997.
70. LOMONTE, B. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. Göteborg: Tryckt & Bunden, 1994 (Thesis-Doctorate).
71. MALASIT, P.; WARRELL, D.A.; CHANTAVANICH, P. Prediction, prevention and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snakebites. **British Medical Journal**, v. 292, p. 17-20, 1986.
72. MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. **Analytical Biochemistry**, v.181, p. 209-211, 1989.
73. MARQUES, R.G.; MIRANDA, M.L.; CAETANO, R.C.V.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Towards a Brazilian regimentation for use of animals in teaching and in scientific research. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p.262-267, 2005 .
74. MINISTÉRIO da Saúde do Brasil, Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2nd ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

75. OECD [Organization for Economic Cooperation and Development]. Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 49 pp. Paris: OECD (1996).
76. OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTÉVEZ, J.; CLEMENT, H.; de ROODT, A.; PANIAGUA-SOLIS, J.; VÁZQUEZ, H.; ZAVALETA, A.; ARRUZ, M.S. STOCK, R.P., ALAGÓN, A. North and South American Loxosceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v. 48, p. 64-74, 2006
77. OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Handbook of Toxicology. New York, Marcel Decker 1990. p. 601-654.
78. PARDAL, P.P.; SOUZA S.M.; MONTEIRO, M.R.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.; FRANÇA F.O.; TOMY, S.C.; SANO-MARTINS, I.S.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; COLOMBINI, M.; KODERA, N.F.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; VELARDE, D.T.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 28-42, 2004.
79. PHILLIPS, P. The preparation of international biological standards. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 473-475, 1998.
80. POPE, C.G. Desegregation of proteins by enzymes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 19, p. 245-251, 1938.
81. POPE, C.G.; STEVENS, M.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. III. Further studies on enzyme systems wich split the antitoxin molecule. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 32, p. 314-324, 1951.
82. PORTAL DA SAÚDE. Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em 15 de ago. 2007.
83. PRADHAN, S.; KUMAR, S.; SINGH, D. SOOD, R.C.; SEHGAL, R. Development of passive haemagglutination (PHA) and haemagglutination inhibition (HAI) technique for potency estimation of Cobra Antisnake Venom Serum (ASVS). **Biologicals**, v. 37, p. 155-160, 2007.
84. PRICE III, J.A.; SANNY, C.G. Cro FabTM total anti-venom activity measured by SE-HPLC, and anti-PLA₂ activity assayed *in vitro* at physiological pH. **Toxicon**, v. 49, p. 848-854, 2007.

85. PURCHASE, I.F.; BOTHAM, P.A.; BRUNER, L.H.; FLINT, O.P.; FRAZIER, J.M.; STOKES, W.S. Workshop Review: Scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement and replacement of animals in toxicity tests. **Toxicological Sciences**, v. 43, p. 86-101, 1998.
86. REED, G.F.; LYNN, F.; MEADE, B.D. Use of CV in assessing variability of quantitative assays. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p.1235-1239, 2002.
87. REICHL, A.P.; SERRANO, S.M.T.; SAMPAIO, C.A.M.; MANDELBAUM, F.R. Hydrolytic specificity of three basic proteinases isolated from the venom of *Bothrops moojeni* for the B-chain of oxidized insulin. **Toxicon**, v. 31, p. 1479-1482, 1993.
88. RIAL, A.; MORAIS, V.; ROSSI,S.; MASSALDI, H. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. **Toxicon**, v. 48, p. 462-466, 2006.
89. ROCHA E SILVA, M; HERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin: a hypotensive and smooth-muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261*-273, 1949.
90. RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 63, p. 186-199, 1995.
91. RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ. J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 79, p. 245-254, 1998.
92. RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LEON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIERREZ, J. M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 313–319, 2000.
93. RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C.F.P.; FERNANDES, C.M.; DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in

- skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 121-128, 2002.
94. RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Effect of metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. **Toxicon**, v. 43, p. 417-424, 2004.
95. RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1959, 238 pp.
96. SARAIVA, P.; ROJAS, E.; ESCALANTE, T.; ARCE, V.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. **Toxicon**, v. 39, p. 401-405, 2001.
97. SBH. 2005. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>, acessado em 02/10/2007.
98. SCHÖTTLER, W.H.A. Aspectos metodológicos da titulação de soros anti-peçonhentos **Memórias do Instituto Butantan**, v. 26, p. 249-256, 1954.
99. SELLS, P.G.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.G. An *in vivo* but insensate model for the evaluation of antivenoms, (ED₅₀) using fertile hens' eggs. **Toxicon**, v. 39, p. 665-668, 2001.
100. SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. **Toxicon**, v. 42, p. 115-133, 2003.
101. SILES VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42/43, p. 311-323, 1978/1979.
102. SILES VILLARROEL, M. et al. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42/43, p. 337-344, 1978/1979.
103. SILES VILLARROEL, M. et al. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 44/45, p. 271-279, 1980/1981.

104. SINITOX, Rio de Janeiro, Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 15 ago. 2007.
105. SLOTTA, C.H., SYSKA, G. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 11, p. 109-119, 1937.
106. SMYTH, D.H. Alternatives to animal experimentation. London, Scholar Press, Research Defense Society, 1978, 218 pp.
107. SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; TOYAMA, M.H.; LOMBARDI, F.R.; ARNI, R.K. GIGLIO, J.R. A rapid procedure for isolation of the lys-49 myotoxin-II from *Bothrops moojeni* (caissaca): biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. – **Toxicon**, v. 36, p. 503-514, 1998.
108. SOKAL, R.R.; ROHLF, J.F. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1997. 850p.
109. STEFANSKY, W. Rejecting outliers in factorial designs. **Technometrics**, v. 14, p. 469-479, 1972.
110. SUTHERLAND, S.K.; LOVERING, K.E. Antivenoms: use and adverse reactions over a 12-month period in Australia and Papua New Guinea. **The Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 671-674, 1979.
111. SWARUP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 10, p. 37-76, 1954.
112. THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, p. 541-557, 2003.
113. THEAKSTON, R.D.G. The application of immunoassay techniques including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to snake venom research. **Toxicon**, v. 21, 341-352, 1983.
114. TREVAN, J.W. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society (London)**, v. 101B, p. 483-514, 1927.
115. U.S. CONGRESS, OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. Alternatives to animal use in research, testing and education. Washington, Government Printing Office, 1986, 433 pp.

116. van der ARK, A.; KAPPELLE, I.V.S.; OLANDER, R.M.; ENSSLE, K.; JADHAV, S.; DONK, H.V.; HENDRIKSEN, C.F.M.; The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. **Biologicals** 28, 105-118, 2000.
117. WARRELL, D.A.; LOOAREESUWAN, S.; THEAKSTON, R.D.G.; PHILLIPS, R.E.; CHANTHAVANICH, P.; VIRAVAN, C. SUPANARANOND, W.; KARBWANG, J.; HO, M.; HUTTON, R.A; VEJCHO, S. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 1235-1247, 1986.
118. WARRELL, D.A. **Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes**. In: Thorpe, R.S.; Wuster, W; Malhotra A. eds. *Venomous snakes. Ecology, evolution and snakebite*. Clarendon Press, Oxford, 1997, pp.189-203.
119. WEN, F.H. Soroterapia. In: Cardoso, J.L.C (Coord.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003. p.p. 381-393.
120. WHO. Requirements for immune sera of animal origin. Requirements for Biologicals Substances n° 18. **WHO Technical Report Series**, v. 413, p. 45-60, 1969.
121. WHO. Requirements for snake antivenins. Requirements for Biologicals Substances n° 21. **WHO Technical Report Series**, v. 463, p. 27-44, 1971.
122. WHO. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. **WHO Offset Publication**, v. 58, p. 4-44, 1981.
123. WHO – A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15 Validation of analytical assays. P 65- 69. Geneva, 1997.
124. WHO. Genebra, Worl Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/em. Acesso em 16 ago 2007.
125. WHO, Genebra, Rabies and envenomings: a neglected public health issue : report of a Consultative Meeting, January 2007.
126. WOOD, R.J., DURHAM, T.M. Reproducibility of serological titers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 541-545, 1980.
127. WORTH, A.P.; BALLS, M. The role of ECVAM in promoting the regulatory acceptance of alternative methods in the European Union. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.29, p. 525-535, 2001.

128. YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. Vero cell line: An established cell line from African Green Monkey kidney cells. *Nippon Rinsho*, v. 21, p. 1209, 1963.
129. ZBINDEN, G.; FLURY-ROVERSI, M. Significance of LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Archives of Toxicology*, v. 47, p.77-99, 1981.

IX. ANEXOS

ANEXO I

SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS PARA A PRODUÇÃO E CONTROLE DE SOROS ANTIPEÇONHENTOS UTILIZADOS NO BRASIL

Relatório da reunião realizada nos dias 22 e 23 de maio de 2002

ENTIDADES PARTICIPANTES:

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA

Centro de Produção e Pesquisa EM Imunobiológicos – CPPI

Fundação Ezequiel Dias – FUNED

Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO

Instituto de Biologia do Exército – IBEx

Instituto Butantan – IB

Instituto Vital Brazil – IVB

LOCAL: Residência Oficial – Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

COORDENADOR: Eduardo Chaves leal

RELATORIA: Leila de Mello Yañez Nogueira

Maria Aparecida Affonso Boller

PRESENTES:

INCQS

Alexandre Souza Alves de Oliveira Dias

André Luis Gemal

Catia Ines Costa

Cristina Maia Cruz

Eduardo Chaves Leal
Eduardo Jorge Rabelo Netto
Elizabeth Porto Reis Lucas
Filipe Soares Quirino da Silva
Flavio Rocha da Silva
Humberto Pinheiro de Araújo
Ivani Cútis dos Santos
Jaline Alves Cabral da Costa
Leila de Mello Yañez Nogueira
Lucia Maria Correa Werneck
Marcos Santos Veiga
Maria Aparecida Affonso Boller
Paulo Roberto Soares Stephens

ANVISA

Flávia Cardoso Melo

FUNASA

Francisco Anilton Alves Araújo
Laura Dina Bedin Bertollo Arruda
Maria de Lourdes de Sousa Maia

CPPI

Isolete Pauli Silva
Sandra Regina Sella

FUNED

David Toledo Velarde
Gilberto José Ribeiro

IQUEGO

Afonso Celso Fernandes

Ivana Lucia Borges e Garcia

IBEx

Francisco Augusto Pereira dos Santos

Ivan da Costa Garcez Sobrinho

Joana Mara Carvalho de Carvalho

IB

Ivone K. Yamaguchi

IVB

Elizabeth Moreira dos Santos

José Wilson Miguel Albuquerque

Joseane Zaja Almada

Maria José Machado

DIA 22 DE MAIO DE 2002 (MANHÃ)

ABERTURA:

André Luis Gemal - Diretor do INCQS

O Diretor do INCQS abriu a reunião informando que como gestor de instituição pública e com o apoio da vice-diretoria de soros e vacinas e, baseado nas atividades de planejamento estratégico, necessita definir melhor nossas atividades nesta área. Desta forma percebeu-se que seria melhor trabalhar com o conjunto de atores no tema e que para tal uma reunião com ANVISA, FUNASA e produtores seria necessária. Esta foi a origem do nosso encontro esperando que nestes dois dias o grupo apresente propostas concretas para avançarmos na produção e controle de soros anti-peçonhentos, visando atingir patamares próximos aos alcançados pelas vacinas, aproveitando a experiência acumulada pelo INCQS nesses 21 anos de atuação e pelas demais instituições aqui presentes.

Maria de Lourdes de Sousa Maia – Coordenadora do PNI

"O PNI tem que ser cada vez mais apropriado pela população" informa a coordenadora do PNI, esclarecendo que a população representada por entidades de classes (comitê técnico assessor de imunizações), discute as necessidades do país, e atua a partir das recomendações do PNI. O orçamento para aquisição de vacinas para o ano de 2003, em dados preliminares está em torno de 486 milhões de reais. Lembra que o PNI é um Programa já implantado em todo território nacional e conta com a confiança e reconhecimento da população.

Afirma que precisamos aproveitar esta reunião para melhorar as questões relacionadas aos soros. Informa aos presentes sobre o agendamento de reunião com os produtores e controladores, com a presença da coordenação de zoonoses e administradores do programa, para os dias 9 e 10 de julho de 2002, em Brasília, para avaliação da potencialidade dos produtores, do cronograma de entrega dos soros e de custos, entre outros. Esclarece que o PNI não tem a responsabilidade técnica pela disponibilidade dos soros, isso fica com a vigilância epidemiológica. "O papel do PNI é comprar, armazenar e distribuir. Saber se em algum estado está faltando soro não é responsabilidade do PNI".

APRESENTAÇÃO DAS INSTITUIÇÕES:

Cada entidade presente fez uma apresentação sobre as principais atividades realizadas (situação atual), propostas e questionamentos sobre o sistema de produção, regulação e controle da qualidade dos soros antipeçonhentos utilizados no país. Diante disso foram descritas as seguintes atividades:

INCQS - Humberto Pinheiro de Araújo.

Contribuição do INCQS no Controle da Qualidade de Soros Antipeçonhentos utilizados no Brasil: inspeção; registro; análise de protocolo de produção e controle; liberação de lotes; análise laboratorial.

Participação dos Produtos no Período de Janeiro de 1998 a Abril de 2002: percentual por soro, onde a importância quantitativa do número de lotes foi documentada. Análises laboratoriais realizadas no INCQS: esterilidade; toxicidade inespecífica; volume médio; pH; teor de fenol; teor de sólidos totais; ensaio de potência.

Ensaio de potência: realizado para soro antibotrópico (poliespecífico realizado somente para o componente anti *B. jararaca*) e anticrotálico; soro antiloxoscélico em fase de implantação; demais soros dependendo da disponibilidade de venenos candidatos à referência nacional; ocorrência de um número significativo de ensaios inválidos.

Potência Absoluta X Potência Relativa: a potência relativa teoricamente reduziria as variações observadas na determinação da dose efetiva; estabelecimento de um soro padrão de referência, representativo dos diferentes produtores nacionais.

Normas Técnicas: Farmacopéia X Portarias Ministeriais; criação de um grupo de especialistas com o objetivo de subsidiar a subcomissão de imunobiológicos da comissão permanente da Farmacopéia Brasileira em relação à revisão das monografias publicadas e a elaboração de monografias específicas para os produtos não contemplados; avaliação e revisão da Portaria 174.

Harmonização de Metodologias: Avaliar a possibilidade de validação das metodologias adotadas através de estudo colaborativo; Para determinação da Dose Efetiva - avaliar a possibilidade de uma validação retrospectiva; Para a determinação da potência relativa - estabelecimento de soro de referência e validação através de estudo colaborativo interlaboratorial; Revisão do modelo de protocolo resumido de produção e controle.

Materiais de Referência: Problemas na produção e distribuição de venenos de referência nacional; soros poliespecíficos desafiados contra venenos monoespecíficos (botrópico); Produção, estabelecimento e validação de soros de referência.

Desenvolvimento tecnológico nas áreas de produção e controle da qualidade:

Produção -Adesão às normas de boas práticas de fabricação; Avaliação da consistência da produção, com especial atenção à pureza/métodos de purificação; Introdução de novos produtos. Controle - Adoção de ensaios para a avaliação da potência relativa em substituição à determinação da potência absoluta; Desenvolvimento e validação de metodologias *in vitro* capazes de substituir os ensaios *in vivo*.

ANVISA - Flavia Cardoso de Melo.

Situação atual: produtos registrados, produtos sem registro, registro vencido e registro não revalidado.

Registro de imunobiológicos – Lei 6360, Decreto 79094.

Lei 9782 cria a ANVISA - Registro de Produtos Biológicos.

Criação de setor específico responsável pelas atividades de Registro de Produtos Biológicos (UPBIH).

Atividades da UPBIH: vacinas, soros hiperimunes, hemoderivados, biomedicamentos, alergênicos.

RDC 80 de 18 de março de 2002. Regulamento técnico dos procedimentos de registro, de alteração e inclusão pós-registro e revalidação (pré-registro, registro e pós-registro).

Assuntos de petições: registro de produto biológico novo, registro de produto biológico, alteração do registro, revalidação do registro, outros assuntos.

Somente os Produtos Biológicos registrados na ANVISA/MS, fabricados ou importados por estabelecimentos devidamente autorizados pelo governo federal e licenciados pelo governo estadual podem ser comercializados, distribuídos e utilizados no país. Definirmos critério para acertar cada assunto particular de cada instituição.

Todos os Produtos Biológicos, devido à origem biológica de seus princípios ativos e à diversidade dos processos biotecnológicos utilizados na sua obtenção, devem ser analisados para Registro como “Produtos Biológicos Novos”. Cada produto tem sua particularidade, tem que apresentar seu estudo clínico, controle da qualidade.

Os produtos biológicos estão divididos em três categorias: registros solicitados após a publicação da RDC 80 – cumprir com todas as exigências; registros em processos de análise – prazo de 1 ano para cumprir com todas as exigências; registros válidos na data da publicação da RDC 80 – prazo de 1 ano, prazo de 2 anos (o prazo de 1 ano para atualizar e o prazo de 2 anos para apresentação de estudos clínicos).

FUNASA - Francisco Anilton Alves Araújo.

Há pelo menos 10 anos estamos hibernando em uma situação que pensamos estar sob controle. Em 1982 aumentamos a produção de soros, deixando um pouco de lado o controle da qualidade. Em alguns momentos fomos obrigados a liberar soros sem o controle da qualidade realizado pela autoridade nacional de controle, embora o controle tenha sido feito pelo produtor.

Programa de Acidentes com Animais Peçonhentos. Foi criado em 1986. A preocupação maior era não haver dados sobre a incidência de acidentes ofídicos no Brasil. Utilizando como base de cálculo 5 ampolas por acidente, teria a necessidade de manter um estoque. Foi montado um sistema de vigilância de acidentes ofídicos, porém é uma rede falha. O MS investiu para atender a demanda de soros. As unidades federadas recebiam os soros e esses só seriam repostos após a notificação das ocorrências. Em 1988 o programa

foi ampliado para acidentes com outros animais peçonhentos. Distribuição de material informativo. Objetivos do Programa: redução da gravidade dos acidentes (colocando o soro mais próximo ao acidentado e em mãos de pessoas treinadas) e redução da mortalidade (tempo transcorrido entre o acidente e o tratamento).

Distribuição de Imunobiológicos; normatização do diagnóstico e tratamento; conhecimento da distribuição geográfica dos animais peçonhentos; padronização dos soros; vigilância epidemiológica.

Acidentes ofídicos: 20.000 acidentes/ano; acidentes escorpiônicos: 8.000 acidentes/ano (somente acidentes com pessoas que tomaram soro - estima-se que este número seja apenas 5% do número total); acidentes araneídicos: 5.000 acidentes/ano (a grande maioria é da região sul, principalmente do Paraná).

Na tabela de Acidentes Ofídicos - Distribuição de casos confirmados por UF - Brasil de 1990 a 2000, houve um aumento no número de acidentes a partir de 1996, quando foi criado o Programa.

Acidentes Ofídicos: que grupo de risco, que população está sendo acometida no Brasil? A região sudeste tem um maior número e a região norte é que tem o menor número de acidentes.

Quanto a sazonalidade, tem picos acompanhando a safra agrícola do Brasil. Nas festas juninas na Bahia os acidentes duplicam pelo fato das pessoas irem para áreas rurais.

Quanto ao grupo de risco, em torno de 70% são do sexo masculino e 20% do sexo feminino.

Número de casos segundo o local da picada (1994 a 1997): pé/perna - 70,85%; mão/antebraço - 13,46%; não informados - 12,01%; outros locais - 3,68%.

Número de acidentes segundo a faixa etária (1994 a 1977): a grande maioria ficou entre os 25 e 49 anos. Em crianças com menos de 4 anos os acidentes ocorrem naquelas que acompanham as mães ao trabalho no campo.

Número de casos segundo gênero da serpente: *Bothrops* - 73,05%; não informado - 16,34%; *Crotalus* - 6,25%; não peçonhentos - 2,89%; *Lachesis* - 1,15%; *Micrurus* - 0,34%.

Número de casos segundo a evolução clínica (1994 a 1997): cura - 77,64%; óbitos - 0,46%; não informado - 21,92% (informação antes do paciente receber alta).

O veneno crotálico chega a ser 6 vezes mais letal que o botrópico. Os acidentes por cascavel precisam de terapia mais rápida.

Tempo transcorrido entre o acidente e a chegada e a Unidade: mais de 6 horas; 57,86%. Uma série de outros fatores além do tempo de chegada do paciente também interfere, como tratamento inadequado, via inadequada, uso de soro inadequado, mostrando uma necessidade de capacitação do pessoal das Unidades, disponibilização dos soros nas Unidades.

Durante todos esses anos, o MS foi sempre parceiro dos laboratórios produtores, por isso a falta de registro de determinados soros nunca tenha sido punida.

FUNASA - Laura Dina Bedin Bertollo Arruda.

Produção e controle de soros antipeçonhentos no Brasil.

Criação de Programa Nacional de Imunizações (PNI).

Estabelecimento de um sistema Nacional de Controle da Qualidade dos Imunobiológicos (vacinas e soros) utilizados pelo PNI.

1 982/83 - avaliação do parque produtor nacional que apresentava uma situação crítica naquela época e em 1985. Criação do Programa de Autosuficiência em Imunobiológicos.

Laboratórios Produtores: IB, Biomanguinhos, Fundação Ataulpho de Paiva, FUNED, IVB, TECPAR; Laboratórios Produtores de Plasma: IBEx e IQUEGO; Laboratório de Controle da Qualidade: INCQS.

Soros disponibilizados pelo Programa Nacional de Imunizações: soro antiaracnídico, antiescorpiônico, antilonomia, antilatrodectus, antibotrópico, anticrotálico, antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquélico, antielapídico.

CPPI - Sandra Regina Sella e Isolete Pauli Silva.

O CPPI está trabalhando em uma nova proposta institucional na produção e reestruturação da área física.

Principais atividades: educação em saúde (atendimento a escolares), pesquisa e desenvolvimento (melhoria de processos e desenvolvimento de novos produtos) e pesquisas (realizadas na área de produção).

Produção: venenos de animais peçonhentos e Soros Hiperimunes (Antibotrópico e Antiloxoscélico).

O soro antiloxocélico foi submetido para avaliação de registro junto a ANVISA.

Vantagens do soro antiloxoscélico: apresentou uma potência neutralizante maior que o soro antiaracnídico, com uma eficácia de neutralização maior.

Foi produzido soro antiloxoscélico para três espécies e esse soro mostrou uma maior eficiência na neutralização da dermonecrose. Os testes foram *in vivo* e *in vitro* (ELISA).

FUNED - David Toledo Velarde.

Estrutura Organizacional Atual da FUNED.

Em 1984 apenas 2.000 ampolas foram processadas. A partir disso, várias reuniões foram realizadas e resultou um relatório que resolvia que a produção deveria aumentar.

Em 1986, foi instituído um Grupo de Trabalho para estabelecer normas e padrões para a produção de venenos e antivenenos ofídicos, normas e diretrizes para o tratamento dos acidentes com animais ofídicos e para estabelecer mecanismos educativos, necessários ao esclarecimento da população em geral e dos profissionais de saúde em particular, em matéria de acidentes com animais ofídicos.

Cada instituição produtora tinha um antígeno para produzir o soro. Todos os grupos se uniram e foi definido um soro universal.

Produção de venenos na FUNED: o serpentário tem produzido sistematicamente quantidades crescentes de veneno.

Alguns trabalhos seguindo as orientações dos grupos de trabalho foram feitos.

Ensaio *in vitro* ainda não estão implantados, mas já estão sendo realizadas pesquisas.

Quando as instituições públicas são efetivamente apoiadas, temos uma resposta rápida, porém temos que contar com esse apoio permanentemente. Quando não há o apoio, os técnicos ficam desmotivados. Historicamente as instituições públicas entram em processo cíclico.

IQUEGO - Afonso Celso Fernandes.

Apresentou sobre as atividades nas áreas de produtos veterinários e da Produção de plasma hiperimune, como matéria prima para a produção de soro antipeçonhentos de outros laboratórios.

IBEx - Joana Mara Carvalho de Carvalho.

Histórico - originado do Laboratório de Microscopia Clínica e Bacteriologia em 1894. Em 1993 foi firmado convênio entre o IBEx e a FUNASA para produção de plasma hiperimune eqüino antipeçonhento.

Metas - transferência da divisão veterinária (para adequação das instalações) para uma fazenda para melhorar a qualidade e a quantidade de imunobiológicos produzidos. O IBEx tem as 5 espécies botrópicas em seu serpentário e se disponibiliza para fornecer o veneno para o INCQS.

Comercialização de plasma hiperimune para o Instituto Butantan, porém estão procurando novos contratos para ter todo o plantel inoculado. Os animais já existem, se alimentam, mas não estão produzindo. Teria condição de produzir mais plasma dependendo da parceria.

Produção de plasma hiperimune eqüino (Antibotrópico, Anticrotálico, Antiescorpiônico e Antiaracnídico).

Conclusão: o IBEx e o IB estão montando um projeto de pesquisa para a viabilização da venda de soro antiofídico trivalente botrópico-laquético-crotálico liofilizado.

IB - Ivone K. Yamaguchi.

Produção e controle de soros antipeçonhentos no Instituto Butantan.

Investigação para a melhoria do produto final. Diminuir a concentração de proteína, obtendo um produto puro com baixa concentração de proteína e alta especificidade.

A importância da qualidade do plasma na produção (número de ampolas).

Melhorias no esquema de imunização: aumentar o intervalo de imunização, diminuição das doses de veneno e aumento gradativo da quantidade de veneno. Finalidade: boa resposta imune, menor intoxicação dos animais pelo veneno e melhoria do estado geral do animal.

O processo convencional de purificação dá um rendimento de 30 a 40% no produto final. Foi introduzida mais uma etapa de purificação por cromatografia e a grande diferença foi na concentração da proteína e na pureza.

Estudo dos antígenos com resposta imune para *Lachesis muta*.

Investimento cada vez mais nos testes *in vitro*. Esses testes são utilizados para determinar a quantidade de anticorpo no animal.

Os testes *in vivo* e *in vitro* tiveram uma correlação de 96%.

Conclusão: desenvolver plano de pesquisa e desenvolvimento voltados para projetos que tenham aplicabilidade, reprodutibilidade e baixo custo.

IVB - José Wilson Miguel Albuquerque

Imunobiológicos produzidos pelo IVB: soros antibotrópico, anticrotálico, antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquélico, antilatrodético e antiescorpiônico.

Papel do IVB dentro do MS: vacinas e soros para o PNI.

No organograma existe um Departamento para produção de soros onde o Controle da qualidade está diretamente ligado à produção.

Produção de soros: obtenção do antígeno, imunização, sangria, processamento do plasma, controle da qualidade, se aprovado: diluição e filtração estéril, envase e acondicionamento.

Controle da qualidade: reforma estrutural adequando a área física às exigências de GMP; aquisição de novos equipamentos; validação da área asséptica.

Convênios: IB, FUNED, FIOCRUZ, UFF, UERJ, UFRJ, FAP.

Perspectivas futuras: investimentos no setor de purificação, construção de nova área de envase, estudos de novos métodos de obtenção de plasma, criação experimental de animais SPF utilizados nos testes de dosagens e controle dos produtos imunobiológicos, continuação da produção de novos soros antilatrodético e antiescorpiônico, produção experimental de soro liofilizado.

22 de maio (tarde)

REGISTRO

Coordenação: Flávia Cardoso de Melo.

A representante da ANVISA apresentou um panorama nacional quanto ao registro de soros antipeçonhentos no país e alertou para a necessidade de todos os produtores se adequarem à Resolução nº. 80 de 18 de março de 2002, isto é, "somente os Produtos Biológicos registrados na ANVISA/MS, fabricados ou importados por estabelecimentos devidamente autorizados pelo governo federal e licenciados pelo governo estadual, podem ser comercializados, distribuídos e utilizados no país".

Após discussão o grupo chegou às seguintes propostas:

1. A ANVISA e o INCQS se disponibilizam em assessorar os laboratórios que ainda não entraram com pedido de registro. Devido à necessidade de se estabelecer um prazo, igual para todos, para que os produtores entrem com pedido de registro, o grupo concluiu que 4 meses é um prazo viável (até 23 de setembro de 2002). Quem já possui registro deverá atualizar toda a documentação no prazo de 1 ano conforme determina a RDC 80 de 18 de março de 2002.

NORMAS TÉCNICAS E HARMONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS

Coordenação: Eduardo Chaves Leal

O INCQS sugere que a subcomissão de imunobiológicos da Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira se reúna o mais breve possível para revisar as monografias relacionadas a soros peçonhentos publicadas no 2º fascículo da 4ª edição da Farmacopéia Brasileira, bem como elaborar as monografias dos demais soros ainda não contemplados. Também sugere, que outros especialistas na área de soros anti-peçonhentos sejam convidados a colaborar na revisão e elaboração das monografias em conjunto com a referida comissão. Propõem que este mesmo grupo realize uma revisão na Portaria/MS 174 de 1996.

Propostas:

1. Até 15 de agosto será reunida a subcomissão da Farmacopéia Brasileira para imunobiológicos com o objetivo de elaborar as monografias publicadas e, rever a Portaria/MS 174. O CPPI manifestou a concordância em participar da reunião da subcomissão. A FUNED informou que irá solicitar a substituição da sua atual representante na subcomissão de imunobiológicos.

DIA 23 DE MAIO (MANHA)

MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Coordenação: Humberto Pinheiro de Araújo

O INCQS abre a discussão alertando sobre a falta de veneno de referência no país. Lembra que o estoque dos venenos botrópico e crotálico de referência está em níveis baixos com risco de desabastecimento dos mesmos. Quanto aos demais venenos, a situação ainda é pior, pois nunca foram estabelecidos.

Os produtores esclarecem que devido à pequena quantidade de venenos, priorizam a utilização destes para produção em detrimento ao estabelecimento de venenos de referência.

Propostas:

1. Veneno Botrópico e Crotálico de Referência: elaboração e fornecimento regular (de acordo com a necessidade) de um novo lote de veneno de referência.
2. Veneno escorpiônico de referência: deve-se fazer um levantamento da necessidade nacional (os produtores apresentarão suas necessidades, e quanto poderão disponibilizar).
3. Estabelecimento e fornecimento pelo INCQS aos produtores.
4. Estabelecimento de soro de referência (também utilizado no controle da qualidade dos soros). O INCQS se comprometeu de apresentar protocolo para a realização de um estudo colaborativo para a potência relativa do soro antibotrópico após estabelecimento e validação do soro candidato à referência nacional.
5. Os fabricantes: CPPI, FUNED, IB, IVB encaminharão comentários e sugestões ao protocolo e se reunirão com o INCQS para definição do cronograma de execução.

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO NAS ÁREAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DA QUALIDADE

Coordenação: David Toledo Velarde.

O representante da FUNED abriu a discussão conceituando o desenvolvimento tecnológico como pesquisa aplicada a novas metodologias nas áreas de produção e controle e abre a palavra aos demais presentes:

O IB está introduzindo o uso de cromatografia na purificação dos soros hiperimunes para obtenção de um produto final mais purificado e está em andamento estudos de estabilidade de soros liofilizados.

O IVB informa que na produção de soro antilactrodético foi implantado ensaio de potência expressando seu valor em mg. Informa também a elaboração de projeto de nova planta de produção incluindo o setor de envase.

O INCQS esclarece que está em fase de validação o ensaio de citotoxicidade em células VERO para determinação da potência do soro antibotrópico com o objetivo de no futuro substituir o ensaio *in vivo*.

A FUNED está começando a produzir soro antithrops-atrox-laquétrico; implantando o acompanhamento da resposta imunológica dos animais inoculados, por ELISA; estão desenvolvendo também, estudos de estabilidade dos soros produzidos; encontra-se em fase experimental a produção de soros liofilizados, restando aprofundar a discussão de custo/benefício de sua produção. Questionado pelo técnico da coordenação de zoonoses sobre andamento de estudo de identificação por ELISA dos venenos em pacientes acidentados o representante da FUNED esclarece que o estudo foi concluído e não implantado e que a FUNED pode reativá-lo.

NOTA: Com relação aos estudos técnico-científicos, incluindo estudos de estabilidade desenvolvidos pelos laboratórios produtores, o grupo recomenda a divulgação ampla dos mesmos (publicação, internet etc).

23 DE MAIO (TARDE)

Leitura do relatório, aprovação das propostas e encerramento do evento.

ANEXO II:

RELATÓRIO FINAL DO ESTUDO COLABORATIVO PARA O ESTABELECIMENTO DO LOTE Nº 05 DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL

I - INTRODUÇÃO

a) OBJETIVO

Estabelecer um novo lote de Veneno Botrópico de Referência Nacional através de Estudo Colaborativo Interlaboratorial.

b) LABORATÓRIO COORDENADOR

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS

c) LABORATÓRIOS PARTICIPANTES

Fundação Ezequiel Dias – FUNED

Instituto Butantan – IB

Instituto Vital Brazil – IVB

II – MATERIAL E MÉTODOS

a) DADOS DO VENENO DE REFERÊNCIA PROPOSTO.

NOME: Veneno *Bothrops jararaca*

NOME DO PRODUTOR: Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

NÚMERO DO LOTE: 005

NÚMERO DE FRASCOS RECEBIDOS: 4368

DATA DE ENTREGA: 11/06/2002

APRESENTAÇÃO: Liofilizados em frascos com 30 mg de veneno

TEMPERATURA DE CONSERVAÇÃO: - 20 °C

b) DESENHO DO ESTUDO

Foram enviados 30 frascos de veneno *Bothrops jararaca* Lote 005 para cada Laboratório participante para a realização de 8 ensaios de Dose Letal 50% (DL₅₀) válidos por Laboratório. Os resultados foram enviados para o Laboratório Coordenador para a análise estatística. Cada Laboratório participante utilizou seu próprio protocolo de trabalho. Estes protocolos também foram enviados ao Laboratório Coordenador.

c) MÉTODO DE ENSAIO

Os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito na Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição, São Paulo, Atheneu 2001, Fascículo 2 (Anexo 1).

d) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos por cada Laboratório participante foram avaliados de maneira individual a fim de determinar a validade do ensaio. Foi empregado o método estatístico “Probitos” para a determinação da DL₅₀.

III – RESULTADOS

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE – INCQS:

Foram realizados 22 (vinte e dois) ensaios em camundongos suíços e determinados como válidos 5 (cinco) ensaios.

Tabela 4: Resultados dos ensaios de potência dos ensaios válidos realizados pelo INCQS.

PROTOCOLO	DL ₅₀ (ug/mL)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
01/2003	48,12	42,92	53,96
02/2003	51,76	44,95	59,59
09/2003	47,67	41,32	55,0
11/2003	42,46	37,20	48,47
21/2003	52,86	43,39	64,40
MÉDIA	47,85	44,97	50,93

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS – FUNED

Foram efetuados 12 (doze) ensaios, os quais foram utilizados 9 (nove) ensaios considerados como válidos pelo laboratório produtor.

Tabela 5: Resultados dos ensaios de potência dos ensaios válidos realizados pela FUNED.

PROTOCOLO	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
01	39,44	35,71	46,08
02	32,95	24,20	39,67
03	39,66	34,28	46,95
04	31,56	24,06	36,43
05	34,54	31,43	41,02
06	31,42	28,57	34,55
07	39,16	34,62	49,21
08	32,37	28,21	37,34
09	30,64	28,08	33,73
MÉDIA	33,67	32,21	35,19

INSTITUTO BUTANTAN – IB

Foram efetuados 8 (oito) ensaios, sendo todos considerados como válidos pelo laboratório produtor e utilizados para os cálculos.

Tabela 6: Resultados dos ensaios de potência dos ensaios válidos realizados pelo IB.

PROTOCOLO	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	FATOR DE PRECISÃO
01	34,58	31,45	38,33	0,22
02	36,51	33,59	40,17	0,19
03	33,95	30,93	37,08	0,2
04	31,32	28,17	34,27	0,2
05	33,83	29,57	38,33	0,28
06	30,77	27,82	33,59	0,19
07	36,27	31,74	42,47	0,32
08	29,88	26,63	32,92	0,21
MÉDIA IB	33,38875	29,9875	37,145	0,22625
MÉDIA WHOPROG	33,20	32,02	34,43	

INSTITUTO VITAL BRAZIL – IVB

Foram efetuados 12 (doze) ensaios, os quais foram utilizados 5 (cinco) ensaios considerados como válidos pelo IVB. (O laboratório não indicou quais ensaios seriam considerados válidos).

Tabela 7: Resultados dos ensaios de potência dos ensaios válidos realizados pelo IVB.

PROTOCOLO	DL ₅₀ (µg/0,5mL)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
FRASCO 02	43,59	38,54	53,11
FRASCO 04	34,37	17,83	40,72
FRASCO 07	47,63	41,67	72,50
FRASCO 10	40,51	32,12	48,75
FRASCO 11	39,78	34,96	45,35
MÉDIA WHOPROG	41,37	38,01	45,02

Tabela 8: Valores médios das DL₅₀ obtidas pelos laboratórios participantes:

LABORATÓRIO	DOSE LETAL 50% (µg/0,5mL)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
INCQS – C. Swiss Webster	47,85	44,97	50,93
FUNED	33,67	32,21	35,19
IB	33,20	32,02	34,43
IVB	41,37	38,01	45,02

IV – DISCUSSÃO

Foi observado que nenhum dos Laboratórios participantes segue estritamente os critérios de validação do ensaio prescritos pela Farmacopéia Brasileira:

Determinação da DL₅₀ de veneno: reconstituir a preparação liofilizada de veneno para determinada concentração p/V, com solução fisiológica 0,85% (p/V). Efetuar diluições em progressão geométrica com o mesmo diluente, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, e igualando os volumes finais. Inocular, por via intraperitoneal, volume de 0,5 mL por camundongo de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos albinos suíços de 18 a 22g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Calcular a DL₅₀ utilizando métodos estatísticos comprovados (probitos, Spearman & Karber, transformação angular ou logitos). A faixa

de resposta (porcentagem de mortes) deve estar compreendida entre 10% e 90%, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 05, mL.

Tabela 9: Incidência e causas de invalidação de ensaios.

LABORATÓRIO	<i>Em grupos de, no mínimo, 10 camundongos albinos suíços de 18 a 22g.</i>	<i>A faixa de resposta deve estar compreendida entre 10% e 90%*</i>	<i>Formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear*</i>	<i>Os limites de confiança não devem ser amplos*</i>	ENSAIOS VÁLIDOS / TOTAL
INCQS (SWISS)	10	04 (18,18%)	13 (59,09%)	N/A	05/22 (22,72%)
FUNED	10	02 (16,66%)	08 (66,66%)	02 (16,66%)	0/12 (0%)
IB	08	08 (100%)	N/A	N/A	0/8 (0%)
IVB	10	04 (33,33%)	03 (25,0%)	01 (8,33%)	04/11 (33,33%)

* Relativo aos ensaios que não seguem os itens da Farmacopéia Brasileira.

N/A – Não analisado

As diferenças observadas nas estimações de DL50, assim como um excessivo número de ensaios inválidos, pode ter como prováveis causas:

Cada Laboratório executa um desenho experimental diferente – todos utilizam o mesmo fator de diluição e, no entanto apresentam diferentes esquemas de diluição.

O número de animais utilizados por diluição não é o mesmo em todos os Laboratórios.

As soluções por hora encontradas seriam:

Definir a preparação do estímulo.

Definir o tipo e quantidade da unidade experimental.

Modelo Experimental X Respostas Esperadas.

O modelo experimental é um ensaio biológico que implica em administrar diferentes quantidades de estímulo esperando diferentes respostas, pois se pressupõe a associação entre estímulo e resposta. Usualmente esta associação está descrita por um modelo sigmóide e a estimativa da DL50 é obtida através do modelo linear proposto por Finney (Probitos). Isto implica que aqueles experimentos onde a resposta obtida é diferente da resposta esperada devem ser considerados inválidos.

No caso específico da titulação do veneno botrópico, a Farmacopéia Brasileira recomenda que o esquema de diluição a ser utilizado deve proporcionar respostas entre 10 e 90%. Quando isso não ocorre, significa que há problemas no experimento, que pode estar na unidade experimental, no esquema e/ou fator de diluição ou no processo de montagem da prova.

O modelo utilizado algumas vezes demonstra uma inversão nos resultados obtidos, e uma vez que nas unidades experimentais utilizadas alguns fatores podem levar a variações muito grandes nas respostas individuais, e que na maioria das vezes não pode ser atribuída à distribuição de tolerâncias, uma possível linha de investigação a seguir seria a verificação do comportamento do experimento (através da resposta esperada) utilizando um maior número de animais frente a cada quantidade de estímulo.

Os modelos experimentais utilizados pelos laboratórios participantes são diferentes entre si, visto que cada laboratório utiliza uma faixa de diluição diferente. Estes protocolos podem ou não ser equivalentes. Tendo em vista que os resultados obtidos não são semelhantes entre si, pode-se supor que provavelmente os modelos não sejam equivalentes, e, portanto não comparáveis.

Os resultados apresentados a seguir parecem evidenciar que possa haver uma relação entre os resultados obtidos e o desenho experimental utilizado (esquema de diluição), visto que os laboratórios que utilizaram esquemas de diluição semelhantes obtiveram respostas mais próximas entre si, mostrando uma apreciação empírica interessante.

Tabela 10: Comparação entre esquema de diluição e título médio obtido pelos diferentes laboratórios.

LABORATÓRIO	DOSE LETAL 50%	ESQUEMA DE DILUIÇÃO
INCQS	47,85	62,5 – 52 - 43,4 - 36,1 - 30,1
FUNED	33,67	45,6 – 38 - 31,7 - 26,4 - 22
IB	33,20	49,8 - 41,5 - 34,6 - 28,8 - 24
IVB	41,37	51,8 - 43,2 – 36 – 30

Obs. Todos os laboratórios trabalham com 5 diluições e o IVB com apenas 4.

V - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

É fundamental que os requisitos para execução e validação dos ensaios preconizados pela Farmacopéia Brasileira sejam rigorosamente cumpridos.

Tendo em vista os diferentes resultados obtidos pelos Laboratórios participantes, não é possível a determinação de um valor de DL₅₀ para o Lote 005 do veneno de referência que represente o comportamento do ensaio nos diferentes Laboratórios nas condições atualmente observadas.

O INCQS deverá propor em um prazo de 45 (quarenta e cinco) dias, um Protocolo de Determinação da DL₅₀ a ser adotado por todos os Laboratórios em um novo Estudo Colaborativo.

Este Protocolo será definido após a realização de experimentos preliminares pelo INCQS, visando equacionar ou minimizar os problemas observados no presente Estudo. O Protocolo proposto será submetido a todas as Instituições para apreciação e sugestões antes de ser adotado para o Estudo em questão.

Caso seja comprovado que os requisitos preconizados pela Farmacopéia Brasileira não são compatíveis com os resultados obtidos pela metodologia oficial vigente, deverá ser proposta uma revisão da monografia correspondente.

Até que seja possível a titulação do Lote 005 do Veneno Botrópico de Referência através de um Estudo Colaborativo, os Laboratórios deverão utilizar como referência o valor da DL₅₀ de 47,85 µg/0,5mL , obtido pelo INCQS.

ANEXO III

ESTUDO COLABORATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE UM CANDIDATO A SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL BRA/ANTIBOT/01, PARA A AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DA POTÊNCIA RELATIVA E PARA REAVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO LOTE Nº 05 DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA BRA/BOT/05.

I. INTRODUÇÃO:

Com o objetivo de aperfeiçoar a metodologia analítica para a determinação da potência do Soro Antitoxinotrópico e de acordo com as recomendações do “*Workshop on the Standardization and Control of Antivenoms*” realizado em Londres em 2001 e coordenado pela “*Quality Assurance and Safety of Biologicals Unit*” da Organização Mundial de Saúde (THEAKSTON, 2003), que preconiza “... o estabelecimento de venenos e antivenenos de referência é essencial para a padronização destes ensaios e para permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre laboratórios. Idealmente a atividade dos antivenenos deve ser expressa em unidade neutralizante de toxina baseada em um padrão nacional ou regional”.

O INCQS se propõe a organizar um estudo colaborativo com o objetivo de:

1. Avaliar a potência de um candidato a Soro Antitoxinotrópico de Referência Nacional.

O lote candidato a Soro Antitoxinotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01, foi produzido no INCQS a partir de uma mistura de 360 frascos provenientes dos seguintes produtores: Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI; Fundação Ezequiel Dias – FUNED; Instituto Butantan – IB e Instituto Vital Brasil – IVB. Este lote consiste em uma preparação líquida em alíquotas de 3 mL, estocado entre 4 e 8 °C.

2. Comparar a metodologia de determinação da Potência do Soro Antitoxinotrópico pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE₅₀) com a metodologia da Potência Relativa.

Com o objetivo de discutir as questões relacionadas à produção e controle da qualidade dos soros antipeçonhentos produzidos no país o INCQS convocou uma oficina de trabalho nos dias 22 e 23 de maio de 2002, intitulada: Situação atual e perspectivas futuras para a produção e controle de soros antipeçonhentos utilizados no Brasil. Esta reunião contou com a participação das seguintes entidades: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, Centro de Produção de Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Indústria Química do Estado de Goiás – IQUEGO, Instituto de Biologia do Exército – IBEx, Instituto Butantan – IB e Instituto Vital Brasil – IVB. Dentre várias deliberações resultantes da reunião, podemos destacar a disposição de todos os envolvidos em trabalhar conjuntamente na avaliação e implementação de melhorias nas metodologias analíticas para o controle da qualidade destes produtos. Foi ponto consensual que o desenvolvimento e validação de uma metodologia de avaliação da potência relativa do soro antibotrópico frente a um soro padrão de referência nacional, possivelmente seja a estratégia mais adequada no sentido de se obter resultados mais confiáveis, em curto prazo.

3. Reavaliar a potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05.

De acordo com as conclusões e recomendações do estudo colaborativo para o estabelecimento do veneno botrópico de referência nacional realizado em março de 2003 onde foi consenso que: “Tendo em vista os diferentes resultados obtidos pelos Laboratórios participantes, não é possível a determinação de um valor de DL_{50} para o Lote 05 do Veneno de Referência que represente o comportamento do ensaio nos diferentes Laboratórios nas condições atualmente observadas” e também, “**até que seja possível a titulação do Lote 05 do Veneno Botrópico de Referência através de um Estudo Colaborativo**, os Laboratórios deverão utilizar como referência o valor da DL_{50} de 47,85 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$, obtido pelo INCQS”, propomos a uma reavaliação do título do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência.

4. Avaliar a aplicabilidade de um controle de veneno.

Tendo em vista que a metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira não prevê a realização de controle positivo para a dose de veneno utilizada no desafio,

propomos a avaliação da aplicabilidade da introdução de um controle positivo para a dose desafio (5 DL₅₀), em paralelo as determinações da potência. Em observações preliminares evidenciamos, com uma certa frequência, que a dose desafio (5 DL₅₀) pode não matar 100% dos animais inoculados, o que seguramente interfere significativamente nos resultados obtidos.

Este estudo consistirá em duas etapas, primeiramente será determinada a potência do soro candidato à referência, reavaliado o título do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 e avaliada a aplicabilidade de um controle de veneno. Em uma segunda etapa será realizada a comparação entre as metodologias de determinação da potência pela DE₅₀ e pela Potência Relativa.

II. PARTICIPANTES

Laboratórios brasileiros produtores de soro antibotrópico e o INCQS.

IV. MATERIAL

BRA/ANTIBOT/001: Serão enviados 12 frascos do soro candidato, para a determinação da potência em unidades neutralizantes (UN) e para a comparação entre as metodologias de determinação da potência pela DE₅₀ e pela Potência Relativa.

BRA/BOT/005: Serão enviados 05 frascos de veneno botrópico de referência.

Amostras codificadas: Serão enviados 04 frascos de quatro amostras codificadas (de A a D).

V. MÉTODO

1ª Etapa: Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional BRA/ANTIBOT/01, reavaliação da potência do lote nº 05 do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05 e avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno.

Deverão ser realizados três ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) das seguintes determinações:

- Determinação da DE₅₀ do Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/01. Esta determinação deverá ser feita em duplicata.
- Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/05. Esta determinação deverá ser feita em paralelo com a determinação da DE₅₀.
- Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno. Paralelamente a cada determinação de potência, deverá ser inoculado com 5 DL₅₀ um grupo de 10 animais.

2ª Etapa: Comparação da metodologia de determinação da Potência do Soro Antibotrópico pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE₅₀) com a metodologia da Potência Relativa.

As quatro amostras codificadas deverão ser tituladas em dois ensaios independentes (repetições em momentos diferentes) em paralelo com o soro candidato a referência.

Todas as amostras serão analisadas de acordo com a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira, parte II, 2004. As determinações da DL₅₀ e DE₅₀ deverão ser realizadas seguindo os procedimentos operacionais padronizados de cada laboratório.

VI. COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

O INCQS será responsável pelo recebimento, revisão e codificação dos dados submetidos pelos laboratórios participantes. Um relatório será preparado e distribuído para todos os participantes, para comentários. Os laboratórios serão identificados por um código em todas as análises para manter a confidencialidade dos resultados.

Os materiais de referência (soros e venenos) serão considerados aptos, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresente coeficientes de variação inferiores a 50% (WHO. 1997. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15. Validation of analytical assays. p. 65- 69. Geneva).

A metodologia da potência relativa será considerada aplicável, caso a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) apresente coeficientes de variação do ensaio da potência relativa inferiores aqueles observados para a potência absoluta. A aplicabilidade da implantação da metodologia, caso seja considerada apta, deverá ser definida após uma avaliação de custo benefício.

VI. PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS

O INCQS será responsável pela publicação dos resultados do estudo em revista científica especializada. Serão considerados autores a equipe técnica do INCQS e até dois técnicos de cada laboratório participante, designado pelo investigador principal.

ESTUDO COLABORATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE UM CANDIDATO A SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL BRA/ANTIBOT/001, PARA A AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DA POTÊNCIA RELATIVA E PARA REAVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO LOTE N° 05 DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA BRA/BOT/005.

1ª Etapa:

1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional. BRA/ANTIBOT/001.

Nome do Laboratório	
Ensaio de potência n°: IA	Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005):

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Ensaio de potência n°: IB	Data: / /
----------------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

1ª Etapa:

1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional.
BRA/ANTIBOT/001.

Ensaio de potência n°: **IIA** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Ensaio de potência n°: **IIB** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

1ª Etapa:

1. Avaliação da potência do candidato a Soro Antibotrópico de Referência Nacional.
BRA/ANTIBOT/001.

Ensaio de potência n°: **IIIA** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Ensaio de potência n°: **IIIB** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A						
B						
C						
D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

1ª Etapa:

2. Determinação da DL₅₀ do Veneno Botrópico de Referência BRA/BOT/005

Ensaio de potência nº: **1** Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
A					
B					
C					
D					
E					

DL₅₀: _____ .

Ensaio de potência nº: **2** Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
A					
B					
C					
D					
E					

DL₅₀: _____ .

Ensaio de potência n°: **3** | Data: / /

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Diluição	Concentração de Veneno (µg)	Salina (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
A					
B					
C					
D					
E					

DL₅₀: _____ .

1ª Etapa:

3. Avaliação da aplicabilidade de um controle de veneno

Experimento nº: 1	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno	Nº de animais	Nº de sobreviventes
5 DL ₅₀	10	

Experimento nº: 2	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno	Nº de animais	Nº de sobreviventes
5 DL ₅₀	10	

Experimento nº: 3	Data: / /
-------------------	-----------

Concentração de veneno	Nº de animais	Nº de sobreviventes
5 DL ₅₀	10	

ESTUDO COLABORATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE UM CANDIDATO A SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA NACIONAL BRA/ANTIBOT/001, PARA A AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DA POTÊNCIA RELATIVA E PARA REAVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO LOTE N° 05 DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA BRA/BOT/005.

2ª Etapa: Comparação da metodologia de determinação da Potência do Soro Antibotrópico pela determinação da Dose Efetiva 50% (DE50) com a metodologia da Potência Relativa.

Ensaio de potência n°: 1	Data: / /
---------------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/005)

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
Soro de Referência	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
Soro A	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	N° de animais	N° de sobreviventes
Soro B	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro C	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro D	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Ensaio de potência nº: 2	Data: / /
---------------------------------	-----------

Veneno de referência (BRA/BOT/005) diluído em _____ mL de _____.

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro de Referência	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro A	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro B	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro C	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

Amostra	Diluição	Título do Soro	Salina (mL)	Soro (mL)	Veneno (mL)	Nº de animais	Nº de sobreviventes
Soro D	A						
	B						
	C						
	D						

DE₅₀: _____ .

Potência: _____ .

ANEXO IV

ENSAIO DE INIBIÇÃO DA CITOTOXICIDADE "IN VITRO" PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO E DO SORO ANTIBOTRÓPICO.

Palavras-chave: Veneno Botrópico – Soro Antibotrópico - Potência – Citotoxicidade

SUMÁRIO:

Objetivo

Campo de Aplicação

Definições

Siglas

Condições gerais

Condições específicas

Referências

1. OBJETIVO

Este POP define e padroniza procedimentos para a avaliação da potência do Veneno Botrópico através da determinação da citotoxicidade *in vitro* e do Soro Antibotrópico através do método de inibição da citotoxicidade *in vitro*.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Os procedimentos descritos nesse POP são aplicados no controle da qualidade de amostras de lotes de Soro Antibotrópico, destinados ao tratamento de acidentes por serpentes, do gênero *Bothrops*.

3. DEFINIÇÕES

3.1. Soro Antibotrópico

Solução injetável da fração Fab'2 de imunoglobulinas eqüinas específicas, purificadas e concentradas, obtidas a partir de soro de eqüinos hiperimunizados com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

3.2. Lote

Quantidade conhecida de produto elaborado em uma única etapa de trabalho conforme comprovação protocolar do fabricante.

3.3. Veneno referência – BRABOT

Mistura de veneno de várias serpentes da espécie *Bothrops jararaca*, liofilizado, em frascos contendo 30 mg. Produzido pelo Instituto Butantan, aferido pelo INCQS e distribuído aos produtores de soro antiofídico para o ensaio de potência do Soro Antibotrópico.

3.4. Dose Citotóxica 50%

Quantidade de veneno capaz de produzir efeito citotóxico em 50% das células em monocamada.

3.5. Potência

Quantidade de veneno em mg, neutralizada por 1 mL de soro.

4. SIGLAS

ATTC – American Type Culture Collection

CCL – Controlled Cell Lines

BRA/BOT – Brasil/*Bothrops jararaca*

CBB R-250 – Coomassie Brilliant Blue R-250

DO – Densidade Ótica

DC₅₀ – Dose Citotóxica 50%

DI₅₀ – Dose Inibitória 50%

PBS – Tampão Salina Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

qsp – quantidade suficiente para

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

UI – Unidades Internacionais

5. CONDIÇÕES GERAIS

Para a execução dos procedimentos descritos neste POP, deve-se dispor de:

5.1. Amostra a ser analisada

5.2. Células VERO (ATCC/CCL81)

Cultura em monocamada com uma concentração de 10^5 células/mL em placas de 24 poços.

5.3. Veneno referência BRA/BOT

Deve ser reconstituído conforme descrito no POP INCQS nº 65.3440.006 e fracionado em frascos de vidro em alíquotas de 200 µL e conservado a – 20 °C.

5.3. Vidraria

Toda vidraria utilizada deve ser lavada, preparada e esterilizada.

5.4. Manipulação

Os procedimentos de manipulação devem basear-se no Manual de Biossegurança, POP 65.1000.003.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1. Material

- a) Amostra a ser analisada (Item 5.1);
- b) veneno de referência (Item 5.2.2);
- c) células VERO em monocamada;
- d) PBS pH 7,5;
- e) seringa hipodérmica para 1 mL;

- f) frasco de 2 mL com rolhas de borracha e tampas metálicas;
- g) tubos de ensaio 13 x 100 mm;
- h) pipetas de 10 e 25 mL;
- i) parafilm;
- j) pipetador automático ;
- k) estufa de CO₂;
- l) placas de cultivo celular com 24 orifícios;
- m) micropipetas automáticas para volumes de 10 a 100 µL e de 100 a 1000µL;
- n) ponteiras para pipetas automáticas;
- o) banho-maria;
- p) cabine de fluxo laminar;
- q) solução de PBS/Formol 0,2%;
- r) solução de CBBR 250 - 0,2%;
- s) solução de SDS 1%;
- t) leitor de ELISA.

6.2. Procedimentos

6.2.1 - Preparação de solução estoque de veneno de *B. jararaca* com 10 mg/mL.

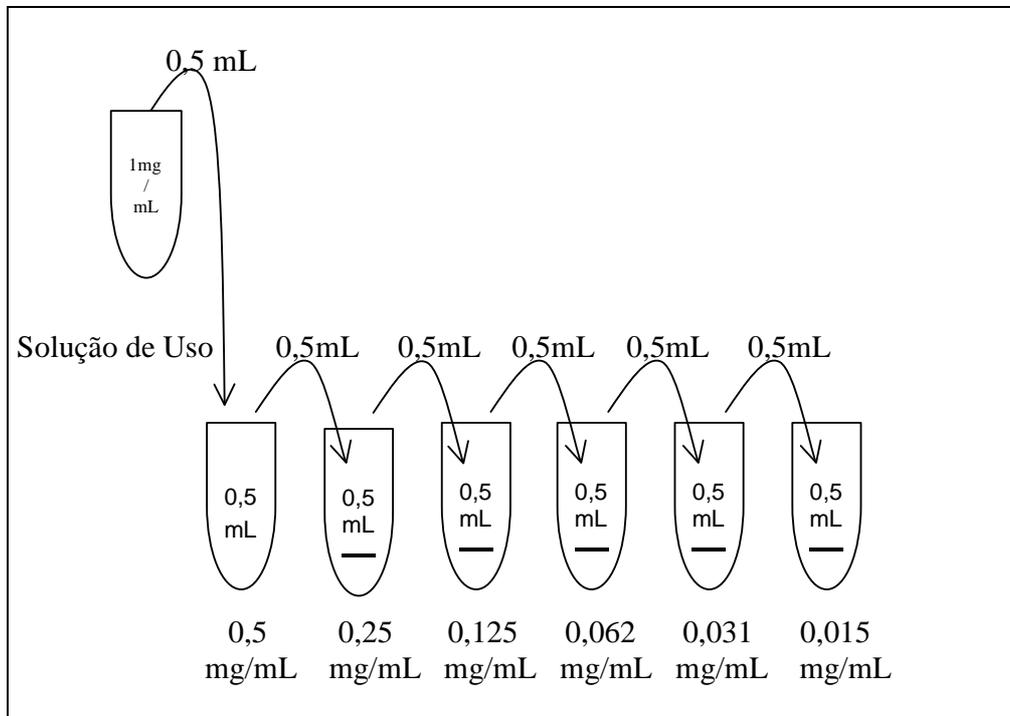
- Identificar 15 frascos de vidro com capacidade para 2 mL, com as informações, BOT n^o do lote, concentração (10 mg/mL) e data de reconstituição.
- Introduzir 1 mL de salina no frasco ampola contendo 30 mg do veneno liofilizado.
- Observar a completa dissolução do líófilo, retirar a suspensão com a mesma pipeta, transferindo para um outro frasco de vidro.
- Adicionar 2 mL de salina ao frasco ampola para rinsagem
- Homogeneizar os 3 mL de suspensão e distribuir em alíquotas de 200µL, tampar com rolhas de borracha e vedar com tampa metálica ou parafilm (solução estoque, 10 mg/mL).
- Estocar a -20 °C.

6.2.2. Titulação do Veneno Botrópico de Referência.

- Preparar placas de 24 orifícios contendo 10⁵ células VERO por orifício, em meio Dulbecco's com 2% de SFB, reservando os orifícios A 1, 2 e 3 sem células para controle.

- Incubar 24 horas a 37 °C em atmosfera de 3 a 5% de CO₂.
- Preparar a solução de uso (1 mg/mL) diluindo a solução estoque 1:10, (adicionar 1,8 mL de salina a 200 µL da solução estoque).
- Fazer diluições seriadas em salina da solução de uso com um fator de 1:2, segundo o esquema 1.
- Retirar 100µL de meio de cultura de cada orifício, exceto os controles de células e branco.
- Inocular 0,1mL da primeira diluição nos orifícios B 1, 2 e 3, da segunda em B 4, 5 e 6 da terceira em C, 1, 2 e 3, da quarta em C 4, 5 e 6, da quinta em D 1, 2 e 3 e da sexta em D 4, 5 e 6 (Anexo 1).
- Incubar por 4 horas a 37° em atmosfera de 5% de CO₂.
- Retirar o inóculo, vertendo as placas.
- Lavar duas vezes com 0,5 mL de PBS por orifício.
- Fixar com 0,5 mL de PBS/formol 0,2% por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Verter todo o PBS/formol 0,2% e secar bem as placas a temperatura ambiente ou em estufa 40/50 °C para acelerar a secagem.
- Adicionar 250µL de CBB R-250 0,2% por orifício e incubar por uma hora ao abrigo da luz.
- Lavar as placas por imersão em água corrente, sem deixar cair água diretamente no fundo da placa.
- Secar a temperatura ambiente ou em estufa 40/50 °C para acelerar a secagem
- Eluir com 1 mL de SDS 1,0% por uma hora,
- Ler a DO em leitor de microplacas para o comprimento de onda de 595 nm.

Esquema 1:



6.2.2.1. Cálculos

a) Alimentar a planilha de cálculos de Excel, com os resultados da leitura da DO (esquema 2).

Esquema 2:

Citotoxicidade em células VERO

	Branco	Controle +	Dil. 1	Dil. 2	Dil. 3	Dil. 4	Dil. 5	Dil.6
D.O	0,356	0,702	0,340	0,339	0,345	0,354	0,535	0,569
D.O	0,330	0,696	0,345	0,327	0,312	0,341	0,503	0,609
D.O	0,321	0,720	0,316	0,304	0,311	0,394	0,504	0,708
MÉDIA	0,336	0,706	0,334	0,323	0,323	0,363	0,514	0,629
DESVPAD.	0,018	0,012	0,016	0,018	0,019	0,028	0,018	0,072
MÉDIA - Br	-	0,370	-0,002	-0,012	-0,013	0,027	0,178	0,293
DESV.MED.	0,014	0,009	0,012	0,013	0,015	0,021	0,014	0,053
VAR.%	5,415	1,769	4,646	5,501	5,996	7,609	3,540	11,382
ERROPAD	0,005	0,004	0,004	0,005	0,006	0,008	0,005	0,021
% do controle	-	100,000	-0,540	-3,330	-3,510	7,381	48,155	79,118

ANEXO A

Teste n.º _____ Data: _____ Placa n.º _____

	1	2	3	4	5	6
A	<input type="checkbox"/>					
B	<input type="checkbox"/>					
C	<input type="checkbox"/>					
D	<input type="checkbox"/>					

/ANEXO B

ANEXO B

PREPARO DE SOLUÇÕES

a) PBS:

NaCl – 24 g

KCl – 0,6 g

Na₂HPO₄ 2H₂O – 3,43 g

KH₂PO₄ – 0,6 g

H₂O destilada q.s.p. 4000 mL

pH = 7,5

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Estocar a 4 °C.

b) PBS/formol 0,2%:

Formaldeído – 4,0 mL

PBS q.s.p. 2000 mL

pH = 7,5

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

Estocar a 4 °C.

c) Coomassie Blue 0,2%:

Coomassie Brilliant Blue R-250 – 0,2 g

Ácido acético – 10 mL

Metanol – 40 mL

H₂O destilada q.s.p. 100 mL

Estocar a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

d) SDS 1%:

SDS – 10 g

H₂O q.s.p. 100 mL

Estocar a temperatura ambiente.

ANEXO V

**POTENCY EVALUATION OF ANTIVENOMS IN BRAZIL: THE
NATIONAL CONTROL LABORATORY EXPERIENCE BETWEEN
2000 AND 2006**