

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Renata Norbert Costa Nundes

**PRÉ-VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA VENENO  
BOTRÓPICO E SORO ANTIBOTRÓPICO**

Rio de Janeiro

2017

Renata Norbert Costa Nundes

**PRÉ-VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA VENENO  
BOTRÓPICO E SORO ANTIBOTRÓPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida  
Humberto Pinheiro de Araujo

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Nundes, Renata Norbert Costa

Pré-validação do ensaio de potência *in vitro* para veneno botrópico e soro antibotrópico/ Renata Norbert Costa Nundes. Rio de Janeiro: INCQS /FIOCRUZ, 2017.

107 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Orientadores: Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida; Humberto Pinheiro de Araujo

1. Bothrops. 2. Venenos de Serpentes. 3. Antivenenos. 4. Testes Imunológicos de Citotoxicidade. 5 Alternativas aos Testes com Animais. I. Título.

Pre-Validation of an *In Vitro* Potency Assay for Bothrops Venom and Antivenom

Renata Norbert Costa Nundes

**PRÉ-VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA VENENO  
BOTRÓPICO E SORO ANTIBOTRÓPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marcelo Salabert González (Doutor)  
Universidade Federal Fluminense

---

Wlamir Corrêa de Moura (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

---

Humberto Pinheiro de Araújo (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela dádiva da vida! Ao buscar refúgio nos momentos de desânimo Ele sempre me abençoava e mostrava: estou aqui!

Aos meus pais que com muita dedicação e amor me ensinaram o melhor caminho a seguir na vida e me deram a educação sem a qual eu não teria chegado até aqui. Sempre apoiando as minhas decisões.

Ao meu irmão pelo estímulo e carinho nos momentos importantes da minha vida.

A minha avó Rosa pela alegria de poder compartilhar momentos de cuidado e carinho nesses dois anos.

Ao meu querido marido por todo o incentivo, companheirismo e apoio no cumprimento de mais uma etapa na minha carreira profissional. Não há palavras para expressar tamanha gratidão!

Aos meus lindos filhos que torciam e vibravam junto comigo em cada etapa e dificuldade superada. Com eles a caminhada foi mais colorida e feliz!

Ao Dr. Humberto Pinheiro de Araújo pelas orientações, sugestões e elaboração deste Projeto confiado a mim. Por ter sido um grande encorajador e muito amigo.

Ao Dr. Antônio Eugênio de Castro Cardoso de Almeida pela orientação, motivação e valiosas contribuições. Pelos conselhos e palavras de incentivo e por ter sido sempre atencioso.

A minha amiga Dra Jane Margaret Costa Frontin Werneck que sempre foi uma excelente profissional e exemplo de determinação e desafios superados.

Ao amigo Dr. Alexandre Alves de Souza de Oliveira Dias pelo incentivo, sugestões e conselhos sempre tão pertinentes.

A querida Lucia Maria Correa Werneck Chefe do Departamento de Imunologia do INCQS, pela oportunidade de fazer o Mestrado e pelo entusiasmo e força.

Às amigas do INCQS Andrea Raed Gandra Pinto, Clarice do Canto Lima Abreu, Valéria de Mello Medeiros, Michele Cardoso do Nascimento e Izabela Gimenes Lopes, pelos conselhos, carinho, atenção e ajuda.

As minhas amigas queridas de todas as horas Sabrina, Grasiela, Fernanda, Luciana, Herika, Jaqueline e Cristiane. Vocês animavam meus dias nublados!

A minha terapeuta Giselaine de La Rosa que me ajudou de forma imensurável nessa caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Vacinas Bacterianas e Soros Antipeçonhentos: Maria Aparecida Affonso Boller, Elizabeth Porto Reis Lucas, Gabriele Fátima de Souza e Fabio Henrique Dias Martins Lima, que me acolheram muito bem no laboratório, trazendo desta forma a tranquilidade necessária para dar continuidade ao projeto do Mestrado.

Aos colegas do Banco de Células do INCQS pelos ensinamentos, pelas células e insumos fundamentais para os experimentos.

Ao amigo Miguel Madi Filho do Departamento de Microbiologia do INCQS pelas fotos das células.

Ao Alexandre Medeiros Correia de Sousa, Chefe da Biblioteca do INCQS pelas orientações na formatação desta dissertação.

“Há pessoas que vivem em um mundo de sonhos, outras que enfrentam a realidade, e há outras que transformam sonhos em realidade”.

Douglas H. Everett.

## RESUMO

Acidentes com animais peçonhentos são a segunda causa de intoxicação em humanos no Brasil. Na América Central e do Sul a incidência destes acidentes é predominantemente por serpentes do gênero *Bothrops*. No Brasil em 2015 foram notificados 24.467 acidentes dentre os quais 73,5% causados pelo gênero *Bothrops*. No Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde (INCQS) são utilizados aproximadamente 5.500 camundongos/ano somente para os ensaios de potência de antivenenos botrópico e crotálico, portanto é importante o desenvolvimento de uma metodologia alternativa ao uso de animais. O INCQS possui um grupo de pesquisadores engajados na busca por métodos alternativos ao uso de animais desde 1999. O objetivo deste trabalho é pré-validar um método alternativo *in vitro* para a determinação da potência do veneno botrópico e do soro antibotrópico. O princípio da técnica proposta baseia-se na propriedade do veneno botrópico provocar efeito citotóxico em células Vero de rim de macaco e sua inibição pelo antiveneno. A concentração de células aderidas pode ser avaliada pela coloração e posterior eluição do corante, sendo a densidade óptica do eluato do corante diretamente proporcional à concentração de células vivas. Um método alternativo validado deve passar por todas as fases de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas conferindo credibilidade através dos Centros de Validações. A pré-validação é importante antes da realização de um estudo formal de validação em larga escala, deve envolver a otimização e padronização do protocolo, a identificação de qualquer problema inesperado, incluindo aqueles relacionados à análise dos resultados, bem como uma avaliação inicial da transferibilidade interlaboratorial do método. Este estudo pretende pré-validar uma metodologia mais eficiente do que a recomendada atualmente e que é mais rápida, visando reduzir o custo através da redução de insumos, materiais utilizados e tempo para liberar lotes de veneno e antiveneno. O método proposto é capaz de quantificar o efeito citotóxico de metaloproteases e fosfolipases A2, principais toxinas presentes no veneno de *B. jararaca*. A potência *in vitro* do Veneno Botrópico de Referência foi de 4,18 µg/mL e para o Soro Antibotrópico de Referência foi de 0,126 µl / mL. O ensaio de potência do Veneno Botrópico teve o coeficiente de variação geométrico (gCV) interensaios de 27,79% e o gCV intraensaios de 14,76%. Para a potência do Soro Antibotrópico de Referência o resultado obtido de gCV intraensaio foi 7,52% e o gCV interensaio foi 7,59%. O método apresentou linearidade válida ( $p > 0,05$ ) para todos os ensaios. Os resultados obtidos demonstram que o método proposto apresenta precisões intraensaios e interensaios conformes e é um bom candidato a método alternativo ao ensaio murino, tanto para a determinação da potência do veneno botrópico quanto do soro antibotrópico.

Palavras-chave: Veneno Botrópico. Soro Antibotrópico. Ensaio de citotoxicidade. Método alternativo. Pré-validação.



## ABSTRACT

Accidents with venomous animals are the second cause of human intoxication in Brazil. In Central and South America the incidence of these accidents is predominantly by Bothrops snakes. In Brazil in 2015, 24,467 accidents were reported, of which 73.5% were caused by the genus Bothrops. In the Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) approximately 5,500 mice are used per year only for the bothropic and crotalic antivenom potency assay, therefore it is very important to develop an alternative method to the use of animals. INCQS has a group of researchers engaged in the search for alternative methods to animal use since 1999. The principle of the proposed technique is based on the property of the bothropic venom to induce cytotoxicity effect in monkey kidney Vero cells and its inhibition by the antivenom. The concentration of adhered cells can be evaluated by staining and subsequent elution of the dye, the optical density of the dye eluate is directly proportional to the concentration of living cells. A validated alternative method must go through all phases of development, pre-validation, validation and review by experts, conferring credibility through the Validation Centers. Pre-validation is important prior to conducting a formal validation study on a large scale, it should involve any optimization and standardization in the protocol, the identification of any unexpected problem including those related to the analysis of the results, as well as an initial assessment of the Interlaboratorial transferability of the method. This study aims to pre-validate a methodology that is more efficient than currently recommended and that is faster, aiming at reducing the cost through the reduction of inputs, materials used and time to release lots of venom and antivenom. The proposed method is able to quantify the cytotoxic effect of metalloproteases and phospholipases A<sub>2</sub>, the main toxins present in *B. jararaca* venom. The determined potency *in vitro* for the Brazilian Bothrops Reference Venom was 4,18 µg/mL, and for the Brazilian Bothropic Reference Antivenom was 0,126 µl/mL. For the potency evaluation of Bothrops Reference Venom the inter-assay geometric Coefficient of Variation (gCV) was 27,79% and the gCV intra-assay of 14.76%. The intra-assay precision of potency *in vitro* for Bothrops Reference Antivenom determinations was 7.52% and the gCV inter-assay was 7.59%. The method presented valid linearity ( $p > 0.05$ ) for all assays. The results obtained demonstrate that the proposed method intra-assay and inter-assay precisions were according and it is a good candidate for an alternative method to the murine assay, both for the determination of the potency of the bothropic venom and of the bothropic antivenom.

Key-words: Bothropic Venom. Bothropic Antivenom. Cytotoxicity Assay. Alternative Method. Pre-Validation.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BRA/BOT/05 - Veneno Botrópico de Referência Nacional  
BRAantiBOT/01 - Soro Antibotrópico de Referência Nacional  
CBB R-250 - *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Corante Azul de Coomassie 0,2%)  
CGPNI - Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações  
CPPI - Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos  
CV – Controle de Veneno  
DC<sub>t50</sub> - Dose Citotóxica 50% ou Dose Citotóxica Média  
DE<sub>50</sub> - Dose Efetiva 50% ou Dose Efetiva Média  
DL<sub>50</sub> - Dose Letal 50% ou Dose Letal Média  
DO - Densidade Óptica  
ECVAM - *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos)  
EUA – Estados Unidos da América  
Fab - *Antigen Binding Fragment* (Fragmento de Ligação ao Antígeno)  
F(ab')<sub>2</sub> - *Bivalent Antigen Binding Fragment* (Fragmento de Ligação ao Antígeno Bivalente)  
Fc - Fração Cristalizável (imunoglobulina)  
FD – Fator de Diluição  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FUNASA - Fundação Nacional de Saúde  
FUNED - Fundação Ezequiel Dias  
gCV - Coeficiente de Variação Geométrico  
IB - Instituto Butantan  
IgG - Imunoglobulina G  
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
IVB - Instituto Vital Brazil  
MS - Ministério da Saúde do Brasil  
OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Salina Fosfato)  
POP - Procedimento Operacional Padronizado  
SAB - Soro Antibotrópico  
SABC - Soro Antibotrópico-crotálico  
SABL - Soro Antibotrópico-laquélico  
SBH - Sociedade Brasileira de Herpetologia  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SINITOX - Sistema Nacional de Informações Toxicológicas  
SUS - Sistema Único de Saúde  
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil  
TC - Tempo de Coagulação  
TNF - Fator de Necrose Tumoral  
UK – *United Kingdom* (Reino Unido)  
WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Bothrops jararaca</i> .....	17
Figura 2 <i>Bothrops alternatus</i> .....	18
Figura 3 <i>Bothrops jararacussu</i> .....	18
Figura 4 <i>Bothrops moojeni</i> .....	18
Figura 5 <i>Bothrops newiedi</i> .....	19
Figura 6 <i>Bothrops jararaca</i> e fosseta loreal evidenciada.....	20
Figura 7 Número de acidentes ofídicos por Regiões do Brasil.....	22
Figura 8 Edema, equimose, e sangramento no local da mordida.....	25
Figura 9 Edema, eritema, equimose e bolhas.....	26
Figura 10 Hematúria.....	27
Figura 11 Tempo de coagulação.....	27
Figura 12 Síndrome compartimental e limitação de movimentos.....	28
Figura 13 Amputação.....	29
Figura 14 Extração de veneno.....	32
Figura 15 Apresentação: soro antiofídico.....	34
Figura 16 Conservação de frascos de soro antiofídico em geladeira.....	34
Figura 17 Produção de anticorpos em cavalos.....	35
Figura 18 Digestão enzimática para obtenção de F(ab') <sub>2</sub> .....	36
Figura 19 Etapas para a produção de anticorpos preconizada pela OMS.....	38
Figura 20 Linhagem celular Vero.....	54
Figura 21: Fluxograma das etapas do projeto.....	55
Figura 22 Gel de eletroforese do Veneno de Referência de <i>Bothrops</i> lote 5.....	59
Figura 23 Reconstituição do Veneno Botrópico de Referência.....	60
Figura 24: Diluição do Veneno Botrópico de 1:1,5 em meio de cultivo .....	61
Figura 25: Etapas do ensaio de citotoxicidade .....	62
Figura 26: Distribuição das concentrações do Veneno Botrópico de referência.....	63
Figura 27: A leitura da densidade óptica realizada através de leitora de microplaca.....	63
Figura 28: Planilha do CombiStats®: Resultados do Ensaio de Potência do Veneno Botrópico de Referência em Células Vero.....	65
Figura 29: Diluição de BRAAntiBOT/01 <sup>1</sup> empregando fator de diluição de 1:5.....	70
Figura 30: Soroneutralização do BRA/BOT/05 <sup>1</sup> : 500 µL da ETAPA 1 + 500 µL da ETAPA 2...71	
Figura 31: Planilha do CombiStats®: Resultados da Soroneutralização do Veneno Botrópico de Referência em células Vero.....	73
Figura 32: Gráfico de Controle das Médias do Logaritmo de BRA/BOT/05.....	78
Figura 33: Gráfico estatístico BRA/BOT/05.....	79
Figura 34: Fotomicrografias de células Vero coradas após o ensaio da potência do BRA/BOT/05 <sup>1</sup> <i>in vitro</i> .....	80
Figura 35: Gráfico de Controle das Médias do Logaritmo de (BRAAntiBOT/01).....	85
Figura 36: Gráfico estatístico BRAAntiBOT/01.....	86
Figura 37: Avaliação de custos do ensaio de determinação da potência do soro antiofídico pelos métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	93

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ação da peçonha relacionada ao gênero da serpente.....	24
Quadro 2	Manifestação e tratamento do envenenamento.....	30
Quadro 3	Manutenção de garrafas com cultivo celular.....	57
Quadro 4	Esquema de inoculação do veneno botrópico.....	61
Quadro 5	Diluição DCt <sub>50</sub> .....	68
Quadro 6	Inoculação DCt <sub>50</sub> .....	68
Quadro 7	Diluição DFV + SORO (FD= 1:2).....	71
Quadro 8	Soroneutralização.....	72
Quadro 9	Resultados do ensaio de potência <i>in vitro</i> do Veneno Botrópico FD: 1:2.....	76
Quadro 10	Resultados do ensaio de potência <i>in vitro</i> do Veneno Botrópico FD:1,1,5.....	77
Quadro 11	Citotoxicidade das DCt <sub>50</sub> .....	81
Quadro 12	Resultados das 6DCT <sub>50</sub> após incubação a 37 °C por 30 min.....	83
Quadro 13	Resultados da potência do Soro Antibotrópico de Referência.....	84
Quadro 14	Exemplo de soroneutralização.....	84
Quadro 15	Resultados ensaio de coloração inespecífica.....	86
Quadro 16	Grupos analisados.....	87
Quadro 17	Anova.....	87
Quadro 18:	Avaliação das precisões para BRA/BOT/05.....	88
Quadro 19:	Avaliação das precisões para BRAantiBOT/01 .....	88
Quadro 20:	Vantagens e desvantagens das metodologias <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i> .....	91

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS SERPENTES.....	15
1.1.1 Serpentes de importância médica.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.3 PROFILAXIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS.....	22
1.4 TOXICOLOGIA.....	23
1.5 FISIOPATOLOGIA EFEITO LOCAL E SISTÊMICO.....	26
1.5.1 Manifestações Clínicas e tratamento.....	29
1.6 SOROTERAPIA.....	30
1.7 CAPTURA E CRIAÇÃO DE SERPENTES, COLETA E PROCESSAMENTO DO VENENO.....	31
1.7.1 Produção de antivenenos.....	33
1.7.2. Produtores de Antiveneno no Brasil.....	34
1.7.3 Imunização dos equinos.....	35
1.7.4 Purificação do antiveneno.....	36
1.7.5 Controle da qualidade do soro antitoxico.....	39
1.8 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO ENSAIO DE LETALIDADE.....	39
1.8.1 Validação.....	42
1.8.2 Pré-validação.....	44
1.8.3 A participação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na implantação da política dos 3R's.....	45
1.9 JUSTIFICATIVA.....	47
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>48</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>49</b>
3.1 MONOGRAFIA DA 5ª ED., FASCÍCULO 5, PARTE II DA FARMACOPEIA BRASILEIRA PARA O SORO ANTIBOTRÓPICO.....	49
3.1.1 Soro Antitoxico Pentavalente (Immunoserum bothropicum).....	50
3.2 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA.....	50
3.2.1 Veneno Botrópico de Referência.....	51
3.3 PROCEDIMENTOS OPERAIS PADRONIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ) E DA DOSE EFETIVA 50% (DE <sub>50</sub> ).....	52
3.4 METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	53

3.4.1 Linhagem celular.....	53
3.4.2 Origem das células VERO.....	54
3.4.3 Descongelamento das células VERO.....	55
3.4.4 Manutenção de células VERO.....	56
3.4.5 Preparação das placas de 24 poços.....	58
3.5 VENENO DE REFERÊNCIA BOTRÓPICO.....	58
3.5.1 Reconstituição do Veneno de Referência Botrópico.....	59
3.6 ENSAIO DE POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO <i>IN VITRO</i> .....	60
3.6.1 Cálculos.....	64
3.6.2 Critérios para aceitação do ensaio como válido.....	66
3.7 ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA DOSE DE DESAFIO PARA O ENSAIO DE POTÊNCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO <i>IN VITRO</i> .....	67
3.7.1 Termoestabilidade.....	67
3.7.2 Ensaio para avaliação da coloração inespecífica .....	69
3.8 SORO ANTIBOTRÓPICO ( <i>IMMUNOSERUM BOTHROPICUM</i> ) .....	69
3.8.1 Ensaio de potência <i>in vitro</i> do Soro Antibotrópico de Referência.....	70
3.8.2 Diluição do Soro (etapa 1) .....	70
3.8.3 Soroneutralização (etapa 2) .....	71
3.8.4 Critérios para aceitação do ensaio como válido.....	74
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE DILUIÇÃO PARA O VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA .....	76
4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EFEITO CITOTÓXICO DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA.....	80
4.3 POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA.....	80
4.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE DESAFIO DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRABOT/05).....	80
4.5 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRAantiBOT/01).....	83
4.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO INESPECÍFICA.....	86
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
5.1 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> X <i>IN VITRO</i> .....	90
5.2 CUSTOS.....	93
5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	93

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>103</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As serpentes povoam o imaginário, despertam a curiosidade e o temor desde os tempos mais remotos (CARDOSO, 2003). Seus encantos vão além da beleza e diversidades de suas escamas coloridas, pela sua forma peculiar de locomoção se rastejando, ou pelas citações em narrativas e na Bíblia. Em Genesis 3:1,2 a serpente é citada como uma personificação do mal e a tentação de Eva:

*“Ora, a serpente era mais astuta que todas as alimárias do campo que o Senhor Deus tinha feito. E esta disse à mulher: É assim que Deus disse: Não comereis de toda a árvore do jardim? E disse a mulher à serpente: do fruto das árvores do jardim comeremos”.*

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS SERPENTES

Possuem o corpo alongado, cilíndrico e são ápodas. São animais pecilotérmicos com o corpo coberto por escamas que evitam a desidratação e fornecem proteção mecânica para o corpo ao rastejarem. Se alimentam principalmente de roedores, aves, mamíferos, outros répteis e as serpentes que vivem em rios e mares se alimentam de peixes (MELGAREJO, 2003).

São ovíparas principalmente nas regiões tropicais e algumas espécies de clima temperado são vivíparas. Seu crescimento se dá através de ecdises. Não possuem pálpebras, apenas uma membrana translúcida recobre os olhos. São desprovidas de canal auditivo, mas a língua com função sensorial é longa e bifurcada ampliando desta forma a sua capacidade de captar moléculas químicas, odores e aromas do ambiente tanto do ar como do solo. A língua é lançada para fora e balançada no ar em movimentos rápidos e repetidos. Ao fechar a boca a língua leva as moléculas capturadas até a região vomeronasal, onde encontra-se o órgão de Jacobson – os receptores captam as substâncias e transmitem estímulos ao cérebro para distinção (FUNED, 2014).

A mandíbula apresenta grande mobilidade promovendo uma ampla abertura bucal propiciando ao animal se alimentar de presas de grande porte. A digestão é lenta, porém eficiente. Por apresentarem metabolismo lento se alimentam de 10 a 12 vezes em um ano. A ausência do osso esterno deixa as costelas livres proporcionando

a flexibilidade necessária para engolir a presa facilitando a deglutição. A respiração se dá através da traqueia cujo orifício está localizado abaixo da língua, sendo assim a deglutição lenta não atrapalha a respiração (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

No Brasil as serpentes peçonhentas possuem fosseta loreal e a única exceção se dá nas cobras corais verdadeiras que apesar de não possuírem fosseta loreal são peçonhentas. A fosseta loreal auxilia as serpentes na percepção de outros animais no ambiente e na mudança da temperatura ambiental (FUNASA, 2001).

### 1.1.1 Serpentes de importância médica

Encontramos cerca de 3.000 espécies de serpentes em todas as regiões do planeta, principalmente nas regiões tropical e equatorial. É importante ressaltar que destas, 600 espécies são peçonhentas e mais de 200 apresentam relevância médica (WHO, 2007). A estimativa mundial é de 5 milhões de acidentes ofídicos por ano, onde 2,5 milhões de pessoas são envenenadas acarretando 100.000 mortes e pelo menos 300.000 ficam com sequelas provenientes das complicações causadas pela ação do veneno diretamente no local da mordida (GUTIÉRREZ et al, 2010). A maior incidência desses acidentes ocorre nas regiões rurais de países tropicais em desenvolvimento. Na América Central e do Sul a incidência destes acidentes é predominantemente por serpentes da subfamília Crotalinae, principalmente as do gênero *Bothrops* (CHIPAUX, 1998; WHO 2007, CAVALCANTI, 2011).

No Brasil as serpentes peçonhentas são classificadas em 4 gêneros:

1. *Crotalus*: popularmente conhecidas como cascavel, habitam ambientes áridos e possuem um guizo na ponta da calda. Ao perceberem a presença de um possível agressor balançam rapidamente esse chocalho gerando o som característico que serve como alerta.

2. *Lachesis*: Surucucu-pico-de-jaca é a maior serpente peçonhenta das Américas. Os acidentes com essas serpentes são raros. Apesar dos sintomas serem parecidos ao do envenenamento botrópico, quando ocorre a identificação da serpente como sendo do gênero *Lachesis* deve ser prescrito o tratamento específico com soro antilaquéutico. Na ausência dessa informação pode ser utilizado o soro antibotrópico-laquéutico.

3. *Micrurus*: são as cobras corais verdadeiras. Possuem anéis coloridos e ausência de fosseta loreal. Os acidentes são raros, pois essas cobras vivem enterradas. São ovíparas e seu veneno é neurotóxico e miotóxico. Leva a paralisia respiratória aproximadamente uma hora após o acidente. Os sintomas mais perceptíveis são as faces miastênicas devido a ptose palpebral bilateral e diplopia.

4. *Bothrops*: são as serpentes com comportamento mais agressivo e ágeis. As principais responsáveis pelos acidentes ofídicos no Brasil – aproximadamente 80% dos casos notificados. Podemos destacar as espécies a seguir cujo veneno fazem parte da composição do antiveneno botrópico:

a) *Bothrops jararaca* – São muito ágeis e encontradas em abundância nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1).

b) *Bothrops alternatus* – Sua característica mais marcante são os desenhos que lembram ferraduras ou ganchos de telefone ao longo do corpo. Grande produção de veneno. Habitat desde o Sul do Brasil até o Sul de Goiás (Figura 2).

c) *Bothrops jararacussu* – Tem o porte avantajado o que lhe confere uma grande produção de veneno. São encontrados do Sul da Bahia passando pelo Sudeste e Sul do País (Figura 3).

d) *Bothrops moojeni* – Bem adaptada ao Cerrado do Planalto Central é encontrada do Paraná ao Maranhão. Apresenta comportamento agressivo (Figura 4).

e) *Bothrops neuwiedi* – Amplamente distribuída no Brasil entre o Sul e o Nordeste são responsáveis por um grande número de acidentes (Figura 5) (FUNASA, 2001).

Figura 1: *Bothrops jararaca*



Fonte: (FUNASA, 2001)

Figura 2: *Bothrops alternatus*



Fonte: (FUNASA, 2001)

Figura 3: *Bothrops jararacussu*



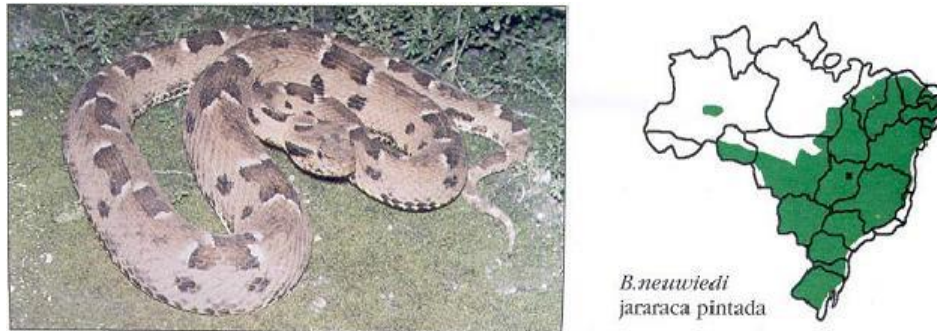
Fonte: (FUNASA, 2001)

Figura 4: *Bothrops moojeni*



Fonte: (FUNASA, 2001)

Figura 5: *Bothrops neuwiedi*



Fonte: (FUNASA, 2001)

No Brasil foram descritas 386 espécies de serpentes e 40 subespécies (SBH, 2014). Sessenta espécies são peçonhentas, pertencentes a duas famílias: família Elapidae e Viperidae. Na família Elapidae encontram-se 30 espécies peçonhentas chamadas corais verdadeiras, enquanto na família Viperidae existem 28 espécies de jararacas, 1 espécie de cascavel e 1 espécie de surucucu (DUARTE; CARDOSO, 2012). Neste estudo destaca-se a importância das serpentes do gênero *Bothrops* popularmente conhecidas como jararacas pertencentes à família Viperidae. São de grande relevância para a saúde pública e apresentam ampla distribuição geográfica. Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas. De hábitos noturnos, também são encontradas ao amanhecer (FUNASA, 2001). Possuem características próprias como cauda lisa, cabeça triangular recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo e presença de fosseta loreal – um órgão termoreceptor, caracterizado por um pequeno orifício entre os olhos e a narina (Figura 6). A dentição é do tipo solenóglifa com um par de dentes grandes móveis localizados na região anterior da arcada dentária. Esses dentes possuem um canal que sai da glândula de veneno por onde o veneno passa até a inoculação no local da mordida. (SINITOX, 2015).

Figura 6: *Bothrops jararaca* e fosseta loreal evidenciada



Fonte: (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos3/biorepteis2.php>)

Acidentes com animais peçonhentos foram descritos pela primeira vez no Brasil em 1560 por José de Anchieta (ANCHIETA, 1560; CARDOSO, 2003).

*“[...] 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 [...]”*

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

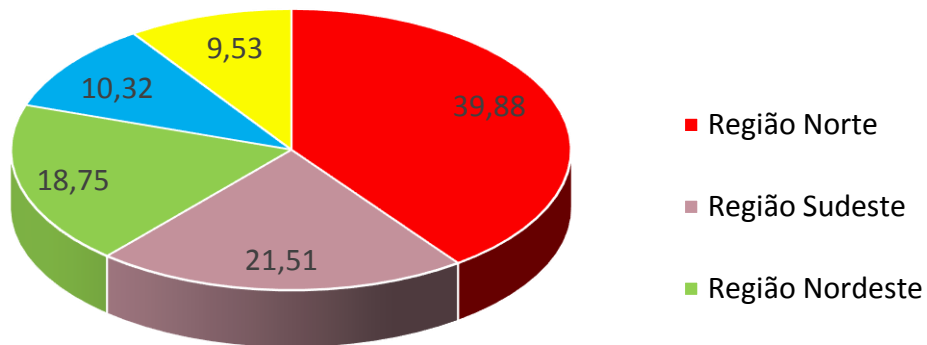
De acordo com os últimos dados disponíveis no SINITOX acidentes com animais peçonhentos são a segunda causa de intoxicação em humanos no Brasil, com 26,84% dos casos notificados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, sendo superados apenas pelas intoxicações provocadas por medicamentos com 27,27% dos casos notificados em 2012 (SINITOX, 2015).

Em 2009 a OMS incluiu o envenenamento por mordida de serpentes na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). Desde agosto de 2010, estes acidentes foram incluídos na Lista de Notificação Compulsória (LNC) do Brasil. Independente da gravidade do acidente, todos devem ser notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em até sete dias. A comunicação se inicia a partir dos profissionais de saúde envolvidos no atendimento ao paciente que notificam os casos a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS). Com base nessas informações os soros são distribuídos pelo Ministério da Saúde aos Centros de Referências para atendimentos de Acidentes por Animais Peçonhentos (BRASIL, 2011; MS/SINAN, 2017).

No Brasil, em 2010 a incidência registrada foi de 15,5 acidentes/100.000 habitantes e a taxa de mortalidade foi de 0,5%.

A Região Norte tem o maior número de acidentes com 39,88% dos casos notificados ocorridos principalmente no Estado do Pará. Em seguida a Região Sudeste com 21,51% dos casos com destaque para o Estado de Minas Gerais como o segundo Estado Brasileiro com maior número de notificações de acidentes ofídicos. A Região Sul apresenta a menor incidência de acidentes com serpentes (MS/SINAN, 2017) como mostra a Figura 7.

Figura 7: Número de acidentes ofídicos divididos por Regiões do Brasil



Fonte: (MS/SINAN, 2017)

Os acidentes atribuídos ao gênero *Bothrops* foram o de maior incidência, com 72,5% (21.485), no total foram, 146 mortes por serpentes, sendo 92 do gênero *Bothrops*. No Brasil em 2015 foram notificados 24.467 acidentes por serpentes, dentre os quais 73,5% causados pelo gênero *Bothrops*, com uma mortalidade em torno de 0,44% dos casos notificados.

O sexo masculino está mais sujeito a estes acidentes devido a sua maior exposição às serpentes ao realizarem trabalhos em lavouras. Estes dados ficam evidentes ao observarmos os registros dos casos notificados ocorridos em 2014 nos quais os homens são acometidos na maioria dos episódios - 14.775 (77,29%).

Destaca-se a importância epidemiológica dos acidentes botrópicos por representarem entre 72% e 90% dos casos notificados (MS/SINAN, 2017).

### 1.3 PROFILAXIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS

Ao contrário do que é difundido popularmente a mordida é o último artifício que uma serpente utiliza contra o ser humano. Os animais são dotados de variadas táticas de defesa como: camuflagem, emissão de sons e cores chamativas para nos alertar. As cascavéis por exemplo balançam o guizo promovendo um barulho de alerta, as



jararacas batem a cauda no chão, as jiboias emitem um som com a glote, as corais escondem a cabeça no corpo enrolado e levantam a cauda. Portanto, as serpentes só desferem o bote quando nenhum desses alertas foi suficiente (MELGAREJO, 2003).

Segundo informações do SINITOX, a maioria dos acidentes com ofídios poderia ser prevenido com simples orientações a população e principalmente aos trabalhadores do campo sobre utilização de equipamentos de proteção, adoções de medidas de higiene e precauções em relação aos locais onde as serpentes habitam ou eventualmente podem se esconder.

As serpentes atacam principalmente os membros inferiores o que poderia ser evitado com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) - botas e perneiras, uma vez que as pernas são acometidas em 80% dos acidentes. Aos trabalhadores rurais é indicado o uso de luvas de couro nas mãos. Manter o entorno das casas sempre limpo, sem acúmulo de lixo, restos de alimentos e folhas secas, vedar frestas e buracos em paredes e assoalhos são orientações indispensáveis para prevenção destes acidentes (SINITOX, 2017).

#### 1.4 TOXICOLOGIA

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 proteica é composta por carboidratos, lipídios, metais (frequentemente associados a glicoproteínas e metaloproteases), 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).

A principal função do veneno é a caça e início do processo digestório: imobiliza, mata e digere a presa. Algumas enzimas citotóxicas já iniciam a digestão dos tecidos no local da mordida antes mesmo da presa ser engolida inteira (MELGAREJO, 2003).

O veneno de cada serpente tem características e toxinas diferenciadas. Portanto, cada gênero possui uma composição própria levando a sintomas característicos que possibilitam a distinção entre um acidente botrópico, um acidente laquético ou um acidente crotálico (Quadro1). A composição do veneno também é diferente em serpentes jovens e serpentes adultas e varia de acordo com o estado metabólico do animal, alimentação e distribuição geográfica (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; BORGES, 2001).

Quadro 1: Ação da peçonha relacionada ao gênero da serpente

Ação proteolítica	<i>Bothrops e Lachesis</i>
Ação coagulante e hemorrágica	<i>Bothrops</i>
Ação coagulante	<i>Crotalus, Lachesis e Bothrops</i>
Ação hemorrágica	<i>Bothrops e Lachesis</i>
Ação neurotóxica	<i>Crotalus, Lachesis e Micrurus</i>
Ação miotóxica	<i>Crotalus e na espécie Bothrops jararacussu</i>

Fonte: (BORGES, 2001)

Os acidentes laquéticos envolvem as surucucus que são as maiores serpentes peçonhentas podendo medir até 3,5 metros de comprimento (FUNASA, 2001). Injetam grande quantidade de veneno e as manifestações clínicas são semelhantes ao acidente botrópico com ação coagulante, hemorrágica e inflamatória aguda. Os acidentes são raros no Brasil, pois habitam as florestas tropicais onde não há muita circulação de pessoas. A soroterapia consiste em administrar o soro antilaquético ou antibotrópico-laquético (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Nos acidentes crotálicos apesar do número reduzido de notificações em torno de 9% a letalidade é alta. A composição do veneno é de fosfolipases principalmente a crotoxina e metaloproteases. A ação neurotóxica causada principalmente pela crotoxina causa paralisia muscular e motora. A principal característica dos acidentados são as “facies miastênicas” causadas pela flacidez do músculo palpebral. A crotamina e crotoxina estão relacionadas às lesões musculares sistêmicas. Esse acidente é sempre grave, pois além da paralisia respiratória pode causar insuficiência renal aguda (IRA) (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Os acidentes elapídicos são mais raros com menos de 1% das notificações, provavelmente porque estas serpentes apresentam hábitos fossoriais (animais adaptados a escavar) e não tem comportamento agressivo. O veneno é neurotóxico, portanto logo após o acidente leva a dificuldade respiratória aguda e dificuldade de deglutição. Diante desse quadro o paciente precisa receber respiração artificial imediatamente. Os sintomas são semelhantes aos encontrados em acidente crotálicos, porém apresentam maior gravidade devido à paralisia respiratória (BORGES, 2001).

Nos acidentes botrópicos, após a inoculação, o veneno age diretamente no local da mordida causando dor, equimose e edema podendo evoluir para bolhas e necrose (Figuras 8 e 9). A microbiota das serpentes composta principalmente por bactérias anaeróbias e gram-negativas são associadas aos abscessos no local da mordida e a reação inflamatória aguda. 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; ZINGALI, 1999; CAMEY; VELARDE; SÁNCHEZ, 2002; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Figura 8: Edema, equimose e sangramento no local da mordida nos acidentes botrópicos



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

Figura 9: Edema, eritema, equimose e bolhas em acidentes botrópicos



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

### 1.5 FISIOPATOLOGIA: EFEITO LOCAL E SISTÊMICO

Os venenos das serpentes viperídeas possuem diversos componentes: água, enzimas, proteínas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, íons orgânicos e compostos inorgânicos como o zinco. Cerca de 90% são proteínas: divididas em três categorias enzimas proteolíticas, toxinas e proteínas não tóxicas. As toxinas podem ser neurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas e fatores que alteram a homeostase como as hemorraginas. Essas toxinas são as principais responsáveis por grandes danos teciduais concomitante a outros processos inflamatórios, como isquemia secundária e aumento da pressão intracompartimental (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

As fosfolipases são divididas em enzimaticamente ativas e enzimaticamente inativas. As enzimas ativas são mionecróticas e interagem com as membranas citoplasmáticas promovendo a morte da fibra muscular. Outra ação importante ligada a essa classe de enzimas é a mioglobínúria: a mioglobina presente nos músculos adentra a corrente sanguínea e ao circular se acumula nos glomérulos renais, levando a falência renal. Este sintoma é caracterizado pela cor escura da urina dos pacientes em estado grave, sendo a insuficiência renal a maior causa de mortes dos acidentes botrópicos em seres humanos (Figura 10) (BORGES, 2001).

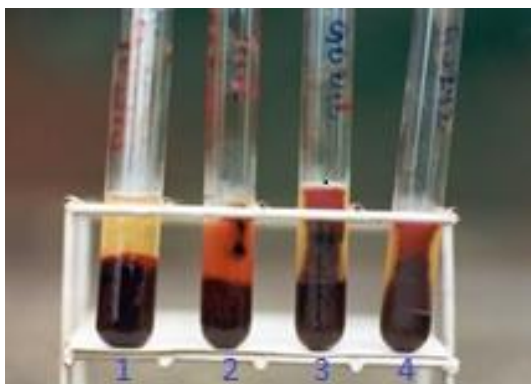
Figura 10: Hematúria causada pelo veneno botrópico



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

O veneno botrópico pode conter toxinas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X levando a incoagulabilidade sanguínea (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). O tempo de coagulação sanguínea é utilizado para avaliação da gravidade dos acidentes enquanto o paciente está em atendimento hospitalar. Podemos observar a alteração no tempo de coagulação sanguínea provocada pelo veneno botrópico nos tubos 3 e 4 da figura 11.

Figura 11: Tempo de coagulação sanguínea



Normal: até 9 min (tubo 1)

Prolongado: 10 a 30 min (tubo 2)

Incoagulável: > 30 min (tubo 3 e 4)

Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

As metaloproteases podem inibir a agregação plaquetária induzindo a hemorragias. Os efeitos sinérgicos das enzimas ativas e das toxinas do veneno levam a alterações sistêmicas principalmente em relação a coagulação sanguínea. Podem ocasionar hemorragia no local da mordida com risco potencial de isquemia e difícil recuperação da lesão. Quando ocorre hemorragia sistêmica acomete a gengiva, os

pulmões e o sistema nervoso central (Figura 11) (OWNBY, 1990; BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

Geralmente após o acidente botrópico é observado sangramento e edema firme no local da mordida – que são indicativos da hemorragia. A maioria dos pacientes apresenta dor no local. Em poucas horas observa-se aumento dos gânglios e podem aparecer bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico e necrótico (FRANÇA; MALAQUE, 2003).

A necrose do membro acometido pode ocorrer provocada por vários fatores tais como: atividade das fosfolipases e das metaloproteases provocando isquemia local, infecção, trombose arterial e atividade inflamatória. O uso indevido de torniquetes e a inoculação do veneno nas extremidades dos membros podem levar a gangrena (FUNASA, 2001).

O principal empecilho na ação dos antíseros no organismo humano é a dificuldade de neutralizar a ação das toxinas no local da mordida - antes que os danos aos tecidos sejam irreversíveis. Necrose e paralisia permanente são as possíveis complicações sofridas mesmo em pacientes que receberam o antísero corretamente (Figura 12).

Figura 12: Síndrome compartimental com limitação de movimentos após acidente botrópico



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

Após a administração do antísero, as toxinas continuam agindo no tecido atingido. Se o socorro à pessoa acidentada for rápido e o antísero administrado corretamente, o índice de mortalidade tende a baixar, mas as sequelas incapacitantes e amputações do membro atingido devido a necroses, ocorrem com frequência e

geram grandes danos psicológicos, além da possibilidade de incapacitar o cidadão para o trabalho, o que pode impactar na economia do país (Figura 13) (WHO, 2007).

Figura 13: Amputação de membro atingido em acidente botrópico



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

### 1.5.1 Manifestações Clínicas e Soroterapia

Atualmente a soroterapia continua sendo o único tratamento eficaz para neutralizar o veneno das serpentes. A administração do soro antiofídico o mais rápido possível é indispensável para neutralizar os efeitos do veneno no organismo humano.

Alguns aspectos básicos devem ser observados:

- ❖ Não usar garrote ou torniquetes.
- ❖ Não fazer incisões no local da mordida.
- ❖ Não aplicar querosene, amoníaco ou outras substâncias no local da mordida.
- ❖ Não ingerir líquidos tóxicos ou bebidas alcoólicas.
- ❖ Manter o paciente em repouso, evitando caminhar e hidratado.

Na unidade de saúde o paciente deve ficar em observação para avaliação dos sintomas e aplicação do antissoro específico se necessário. Os principais sintomas e soroterapia recomendados nesses acidentes estão representados no Quadro 2.

Quadro 2: Manifestações clínicas e tratamento dos acidentes botrópicos.

MANIFESTAÇÕES	LEVE	MODERADA	GRAVE
<b>Locais</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dor</li> <li>• Edema</li> <li>• Equimose</li> <li>• Sangramento de pele e mucosa</li> </ul>	Ausentes ou discretos	Evidentes	Intensas**
<b>Sistêmicos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemorragia grave</li> <li>• Choque/ hipotensão</li> <li>• Insuficiência renal</li> <li>• Anúria</li> </ul>	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de Coagulação (TC*)	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAB/SABC/SABL***	2-4	4-8	12

Fonte: (FUNASA, 2001)

\* TC normal = até 10 min; TC prolongado = 10 até 30 min; TC incoagulável = > 30 min

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

\*\*\* SAB – Soro Antibotrópico; SABC – Soro Antibotrópico e Anticrotático; SABL – Soro Antibotrópico e Antilaquético.

## 1.6 SOROTERAPIA

Na França em 1894, Albert Calmette iniciou os primeiros trabalhos com soroterapia. Baseando-se nesses trabalhos, Vital Brazil iniciou a produção de soros antibotrópico, anticrotático e antiofídico no Instituto Soroterapêutico, localizado na Fazenda Butantan em 1901. Brazil disponibilizou os soros antipeçonhentos junto com o *Boletim para Observação de Accidente Ophidico*, para ser preenchido com as informações de cada acidente (BRAZIL, 1907; BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Atualmente essa Fazenda chama-se Instituto Butantan e implementou a produção de soros antipeçonhentos baseados nos métodos originalmente descritos.



Até 1985 eram 4 laboratórios produtores: três eram públicos e um privado chamado Syntex do Brasil. Quando o laboratório privado encerrou a produção, ocorreu um desabastecimento no mercado de soros antipeçonhentos. Em 1986, o Ministério da Saúde se propôs a adquirir integralmente a produção de soros, criou grupos de trabalho (GTs) e o Programa Nacional de Ofidismo para dar incentivo aos produtores. Posteriormente os acidentes por escorpiões e aranhas foram incluídos e por consequência o programa passou a se chamar: Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos.

Atualmente, os soros antiofídicos são distribuídos em pontos de atendimento de acidentes ofídicos nos estados, a partir das solicitações encaminhadas à Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações - CGPNI, conforme a disponibilidade 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.

## 1.7 CAPTURA E CRIAÇÃO DAS SERPENTES, COLETA E PROCESSAMENTO DO VENENO

As serpentes utilizadas na produção de veneno são coletadas em diferentes regiões geográficas ou adquiridas por doações após captura e são identificadas em relação à espécie e distribuição geográfica. Segundo a Instrução Normativa do Ibama 02/2001 consta que a identificação dos espécimes precisa ser individual (IBAMA, 2001).

As serpentes são mantidas em quarentena e posteriormente incorporadas ao serpentário. Podem ser mantidas em um serpentário semiextensivo que é um fosso único onde as serpentes ficam soltas, simulando um ambiente mais próximo ao habitat natural, porém neste sistema de manejo é mais difícil o controle sanitário dos animais. Se ocorrer alguma contaminação, esta poderá se propagar em todo o serpentário (CONCEA, 2015).

Outro sistema de criação se dá de forma individual em caixas de polipropileno colocadas em estantes de aço inox com etiqueta de identificação com código de barras. Esse código de barras corresponde ao *microchip* implantado por via subcutânea nas serpentes. Desta forma pode-se garantir a rastreabilidade do veneno (informação verbal<sup>1</sup>).

As caixas são cobertas com tampas transparentes para facilitar a observação das serpentes, controle da iluminação e contribuindo com o bem estar animal. Para manipulação dos animais é utilizado gancho herpetológico (BORGES, 2001).

A alimentação dos animais adultos é realizada uma vez por mês sempre após a extração do veneno. Desta forma, todo veneno produzido é extraído otimizando a produção e o quantitativo restante na glândula será utilizado pelo animal para a sua alimentação. Os filhotes são alimentados a cada 15 dias e seu veneno só é utilizado para pesquisas científicas. Ao veneno extraído são adicionados adjuvantes visando aumentar o potencial antigênico e são liofilizados e mantidos em freezer – 20 °C. Para extração do veneno as serpentes são anestesiadas com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Cerca de quatro animais são colocados em um recipiente acoplado a uma mangueira para hipóxia e após alguns minutos cada serpente é retirada desta câmara e tem o veneno extraído manualmente introduzindo as presas em um becher ou tubo de ensaio e pressionando a glândula de veneno com o auxílio de uma pinça (Figura 14) (informação verbal<sup>1</sup>).

Figura 14: Extração de veneno de serpente



Fonte: (IVB, 2015)

### 1.7.1 Produção de Antiveneno

A produção de antiveneno obedece a etapas distintas que ocorrem simultaneamente: coleta e identificação das serpentes; extração do veneno; manutenção de equinos; inoculação em cavalos; sangria dos cavalos; plasmáfereze e digestão enzimática da imunoglobulina G (IgG). Em todas essas fases ocorrem controle da qualidade do produto e dos animais envolvidos nos processos (WHO, 2012).

O veneno é pesado e separado em aliquotas de acordo com os protocolos de imunizações estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). A produção de soros se dá a partir da inoculação subcutânea do veneno em equinos. A inoculação ocorre em pontos distintos em doses sub-letais aumentando progressivamente a concentração, com o objetivo de evitar desta forma processos inflamatórios no local da injeção. Após a imunização é realizada uma coleta de sangue para avaliar a potência do soro (BORGES, 2001).

Após a confirmação são realizadas sangrias nesses cavalos em quatro dias seguidos (segunda, terça, quarta e quinta). Na terça-feira após a segunda sangria já é realizada a plasmaferese para reinfusão das hemácias hidratadas com salina. Esta infusão ocorre nos cavalos pela mesma via de acesso da sangria para diminuir o desconforto dos animais. A plasmáfereze ocorre na (terça, quarta, quinta e sexta). Podem ser realizadas 4 sangrias a cada dois meses (informação verbal<sup>1</sup>).

Os soros fabricados no Brasil passam por uma etapa de purificação através da digestão proteolítica da imunoglobulina IgG que é composta por duas cadeias pesadas com fração c (Fc) e duas cadeias leves de ligação ao antígeno (Fab). A pepsina corta a fração Fc, que é a principal responsável por causar reações adversas nas pessoas submetidas a soroterapia. Essa etapa é o aperfeiçoamento da técnica originalmente descrita por Pope (1938), modificada dez anos depois (HARMS, 1948) e otimizada por POPE; STEVENS (1951).

Nota de rodapé:

<sup>1</sup> Informação registrada em visita técnica da autora ao Instituto Vital Brazil (IVB)

### 1.7.2 Produtores de Antiveneno no Brasil

São produzidos no Brasil 6 tipos de antivenenos ofídicos: Antibotrópico (SAB); Anticrotálico (SAC); Antielapídico (SAE); Antilaquético (SAL); Antibotrópico-crotálico (SABC) e Antibotrópico-laquético (SABL) (ANVISA, 1996).

Os antivenenos são produzidos por quatro laboratórios brasileiros:

- ❖ Instituto Butantan, São Paulo
- ❖ Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais
- ❖ Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro
- ❖ Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), Paraná

As Figuras 15 e 16 mostram a forma de apresentação do frasco-ampola de soro antibotrópico e a condição de manutenção do soro antibotrópico mantido em geladeira com temperatura de 2 a 8 °C.

Figura 15: Apresentação: soro antibotrópico



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

Figura 16: Conservação de frascos de soro antibotrópico em geladeira



Fonte: ([http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03\\_peconhentos.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/aula03_peconhentos.pdf))

### 1.7.3 Imunização dos equinos

Os cavalos são hiperimunizados por via subcutânea com antígenos específicos preparados a partir do veneno das serpentes com doses em concentrações crescentes com intervalo necessário para produção de anticorpos. Após a sequência de imunizações e confirmação da soroconversão os cavalos são sangrados para obtenção do plasma que será submetido a purificações para obtenção das imunoglobulinas. As hemácias são ressuspensas em solução salina e transferidas de volta aos cavalos por plasmaferese (Figura 17) (INSTITUTO BUTANTAN, 2015).

Figura 17: Esquema de produção de anticorpos a partir de cavalos imunizados com antígenos de veneno de serpentes



Fonte: (<http://diariodebiologia.com/2010/06/como-e-feito-o-soro-para-picada-de-cobras/>)

No Brasil dentre outros produtos imunobiológicos são produzidos os seguintes soros antiofídicos contendo soro antibotrópico em sua formulação:

- ❖ Soro antibotrópico pentavalente com venenos provenientes de cinco espécies representantes da biofauna brasileira do gênero *Bothrops*: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*.

- ❖ Soro antibotrópico pentavalente e anticrotálico com venenos provenientes de cinco espécies de *Bothrops* e *Crotalus durissus terrificus*.
- ❖ Soro antibotrópico pentavalente e antilaquétrico proveniente de cinco espécies de *Bothrops* e *Lachesis muta*.

#### 1.7.4 Purificação do antiveneno

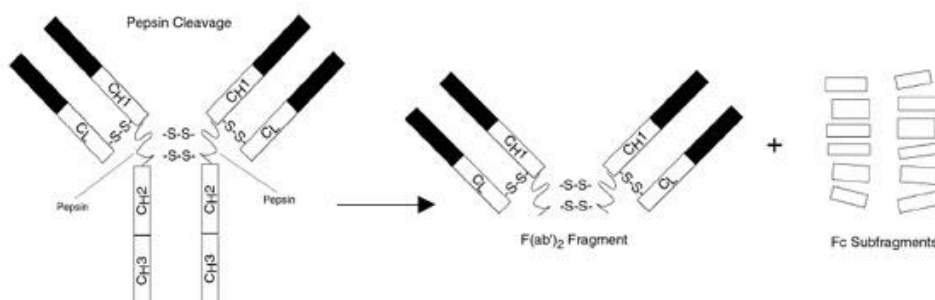
Atualmente não se utiliza todo o soro extraído do cavalo. Após a coleta de sangue é feita uma precipitação do plasma para obtenção das imunoglobulinas.

Mundialmente os produtores de antiveneno seguem protocolos de produção distintos. Podemos enumerar três tipos de purificações diferentes de antissoro:

- ❖ Antissoro contendo a imunoglobulina IgG inteira;
- ❖ Antissoro com fragmentos de fração de ligação ao antígeno (FAB) após digestão da IgG pela enzima papaína;
- ❖ Antissoro com fragmentos da fração de ligação ao antígeno bivalente ( $F(ab')_2$ ) de IgG purificada após a digestão por pepsina.

No Brasil é utilizado pelos laboratórios produtores a técnica de digestão enzimática da IgG pela pepsina clivando a IgG para obtenção específica dos fragmentos  $F(ab')_2$  (Figura 18).

Figura 18: Digestão enzimática para obtenção de fragmentos  $F(ab')_2$



Fonte: (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20343>)

Estas etapas de purificação contribuem para inativação ou remoção de vírus adventícios que possam estar presentes no plasma, contribuindo desta forma para uma maior segurança no uso dos antivenenos. O ácido caprílico utilizado na

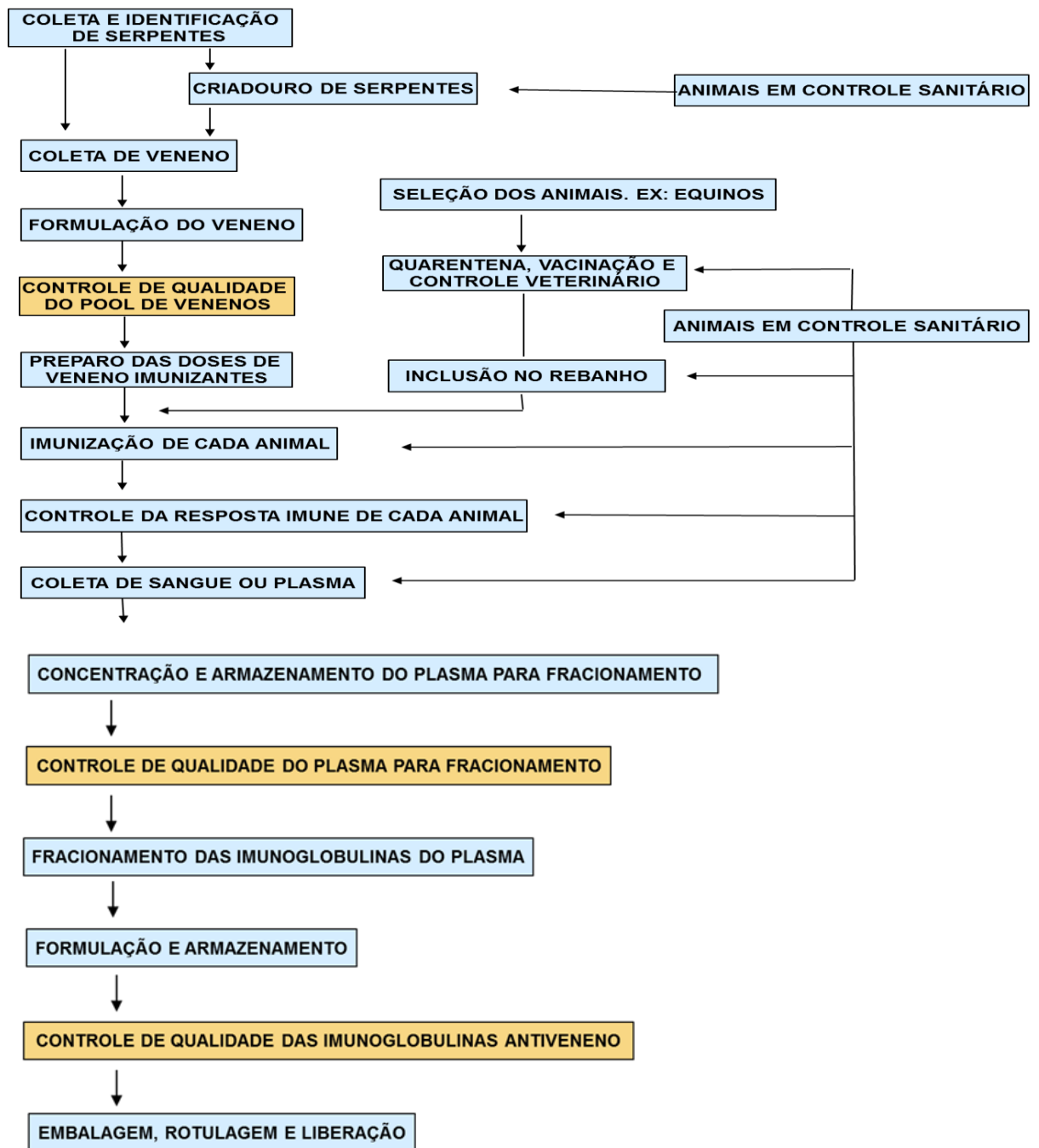
purificação da IgG para obtenção de F(ab')<sub>2</sub> pode remover o invólucro lipídico de vírus envelopados e inativá-los (BURNOUF et al, 2007; MPAND et al, 2007). A digestão da pepsina, como ocorre com pH baixo em torno de 3,2, pode inativar vírus com invólucro lipídico e alguns vírus sem envelope (BURNOUF et al, 2004; LAZAR et al, 2002; GUITIÉRREZ et al, 2011).

O soro antitoxinotrópico é pentavalente e sua formulação inclui o veneno das espécies mais prevalentes no Brasil e que possuem reatividade cruzada com outras espécies de serpentes que não compõem a formulação: 50% de *B. jararaca* e os outros 50% divididos em frações iguais, sendo 12,5% de *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* (ANVISA, 1996). É produzido pelo Instituto Butantan (IB) em São Paulo, Instituto Vital Brasil (IVB) no Rio de Janeiro e Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Minas Gerais.

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 (CARDOSO; YAMAGUCHI; MOURA DA SILVA, 2003; ARAUJO et al., 2008).

Na figura 19 podemos observar as etapas para produção e controle da qualidade de antivenenos preconizada pela OMS.

Figura 19: Etapas para produção de antivenenos preconizada pela OMS <sup>2</sup>



Fonte: (WHO, 2012).

Nota de rodapé:

<sup>2</sup> Tradução da autora



### 1.7.5 Controle da Qualidade do Soro Antitoxinico

Conforme publicação da Portaria 174 da ANVISA a produção de soro antiofídico deve cumprir as Boas Práticas de Fabricação e Normas de Biossegurança. Para garantir a qualidade dos antivenenos são realizados ensaios físicos, químicos, microbiológicos, segurança, atividade e potência conforme preconizado pela 5ª Edição da Farmacopeia Brasileira, parte II, 2010 (BRASIL, 2010). Ainda de acordo com esta determinação, para assegurar a qualidade do produto nas diversas fases de processamento, devem ser realizados testes de esterilidade, pH, proteínas, atividade ou potência por métodos *in vitro* ou *in vivo*.

Tendo em vista que a soroterapia é o único tratamento para os acidentes ofídicos, o controle da qualidade dos antivenenos é fundamental para garantir a segurança e eficácia do tratamento. O ensaio de determinação da potência é preconizado pela Farmacopeia Brasileira tanto para produto intermediário quanto para liberação do lote (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O método oficial para a determinação da potência do veneno é a Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>) e para a potência do antiveneno é a Dose Efetiva Média (DE<sub>50</sub>) pela inoculação intraperitoneal em camundongos. O INCQS testa cada lote por solicitação do CGPNI – Análise de Orientação.

A eficácia do tratamento dos envenenamentos é dependente da disponibilidade de antivenenos de qualidade. Deficiências nas práticas de garantia da qualidade e no controle da qualidade podem resultar na produção de antivenenos com baixa atividade neutralizante (WHO, 2007).

## 1.8 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO ENSAIO DE LETALIDADE

Na obra *Principles of Humane Experimental Technique* publicado por Russel e Burch (1959) foi proposto o princípio dos 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*). Até os dias de hoje, esses princípios, que em português se consagraram como redução, refinamento e substituição, norteiam a busca constante de métodos que visam o aperfeiçoamento dos processos envolvidos na experimentação reduzindo o

número e o desconforto dos animais; ou, até mesmo, que substituam por completo e com segurança, os testes *in vivo*.

Segundo os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) devemos considerar que os animais sofrem, se angustiam e possuem instinto de sobrevivência assim como os seres humanos. Tendo conhecimento dessas características devemos ter uma abordagem ética e responsabilidade nos experimentos com animais. Não seria possível desenvolver e prosperar em diversas áreas da ciência sem as pesquisas com animais. Porém, devemos minimizar o número de cobaias utilizadas no laboratório, além de aplicar todos os recursos disponíveis contra dor e sofrimento desses animais (SBCAL, 2017).

Em outubro de 2008 foi decretada e sancionada a Lei Arouca (Lei Nº 11.794) que limita o uso de animais unicamente para fins científicos e acadêmicos. Esta Lei abrange os animais das espécies classificadas como filo **Chordata** – animais que possuíram em alguma fase do desenvolvimento notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único e subfilo **Vertebrata** – animais com encéfalo grande encerrado em uma caixa craniana e coluna vertebral. Para fins acadêmicos a Lei só permite o uso de animais nos cursos de ensino superior e cursos técnicos na área de Biomedicina.

A partir da Lei Arouca foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA - órgão regulador que monitora e avalia as técnicas alternativas; credencia pesquisadores e instituições que utilizam animais, além de formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas a humanização no tratamento aos animais submetidos a experimentação. Em seguida foram instituídas as Comissões de Ética ao Uso de Animais (CEUA). Estas comissões multiprofissionais visam exigir o cumprimento das normas impostas pelo CONCEA (CONCEA, 2015).

Cada instituição que utiliza animais em experimentação tem que criar sua própria CEUA constituída por médicos veterinários, biólogos, docentes e pesquisadores na área específica e um representante da sociedade protetora de animais. As atribuições da CEUA são:

- ❖ Cumprir e fiscalizar para que as resoluções do CONCEA e demais normas à utilização de animais para pesquisa e ensino sejam atendidas.

- ❖ Avaliar os projetos previamente a fim de liberar ou não as atividades de acordo com a legislação aplicável.
- ❖ Manter cadastro dos pesquisadores envolvidos com os projetos e enviar cópia ao CONCEA.
- ❖ Expedir certificados para órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos e outros.
- ❖ Em caso de acidentes com animais a CEUA da Instituição deverá notificar imediatamente o CONCEA e autoridades sanitárias, informando como o problema poderá ser resolvido.
- ❖ A CEUA poderá determinar a paralisação da atividade até que a irregularidade seja sanada (CONCEA, 2015).

O Comitê de Especialistas em Padronização Biológica (*WHO Expert Committee on Biological Standardization*) reunido em Genebra de 26 a 30 de novembro de 2001 recomendou 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<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub>) assim como outros testes *in vivo* têm sido questionados na Europa e EUA. O *UK Home Office*, também, solicitou que ensaios alternativos sejam desenvolvidos para a substituição destes testes. O Comitê 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; GRIFFITHS, 2003).

Há algum tempo têm havido apelos, tanto por parte da comunidade científica quanto por parte de entidades ligadas ao bem estar animal, para o desenvolvimento de ensaios alternativos capazes de substituir os métodos oficiais de DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub>. Porém existem controvérsias entre os benefícios dos ensaios animais, frente ao impacto da experimentação animal (morte, dor e sofrimento). Atualmente existem métodos alternativos capazes de reduzir o número de animais ou que utilizem sistemas *in vitro* em substituição ao ensaio de letalidade murina para a determinação

da potência de antivenenos. Infelizmente estes sistemas não são atualmente aceitos como substitutos aos ensaios murinos (SELLS, 2003; WHO, 2012).

Tanto ensaios *in vivo* quanto *in vitro* tem limitações técnicas. Os protocolos de inoculação de veneno e veneno/antiveneno por via intraperitoneal em camundongos, não reproduzem a situação natural, assim como a resposta fisiológica de roedores ao envenenamento e terapia, podem diferir significativamente do ocorrido em humanos. Estas limitações fazem com que o modelo murino reproduza o envenenamento e tratamento em humanos aquém do ideal. Cuidados devem ser tomados no sentido de evitar extrapolações simplistas destes ensaios para a situação clínica. Entretanto os ensaios de DL<sub>50</sub> e de DE<sub>50</sub> são os métodos oficiais para a determinação da potência e vários estudos clínicos tem demonstrado que a DE<sub>50</sub> é bastante útil, porém não infalível ao predizer a eficácia dos antivenenos na prática clínica (THEAKSTON, 1995; SELLS, 2003; WHO, 2012).

Conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais na avaliação da potência dos antivenenos deve ser encorajado, porém as alternativas devem ser cuidadosamente avaliadas para garantir a validade dos resultados. Pesquisas devem ser realizadas para o desenvolvimento tanto do refinamento dos protocolos dos ensaios *in vivo* quanto as alternativas *in vitro*. Os resultados de qualquer modificação nos protocolos ou protocolos alternativos devem ser rigorosamente comparados com os resultados dos métodos oficiais, para garantir a validade estatística dos métodos propostos (WHO, 2012).

### 1.8.1 Validação

Um método alternativo validado é o método que passe por todas as etapas de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas conferindo credibilidade através dos Centros de Validações ou através de colaborações internacionais (MCT, RESOLUÇÃO NORMATIVA 17, 2014).

O processo de validação de um método consiste de um modo geral em cinco etapas. Estas etapas refletem a sequência de atividades a serem realizadas em um estudo de validação prospectivo (BALLS et al., 1990; BALLS et al., 1995; BALLS; KARCHER, 1995; CURREN et al., 1995; WORTH; 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 (BALLS et al., 1990; CURREN et al., 1995; BALLS et al., 1995; BALLS E KARCHER, 1995; WORTH E BALLS, 2001). No caso do Brasil, à Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira.

#### 1.8.2 Pré-validação

A pré-validação pode ser dividida em 3 fases. Na fase I é realizado o refinamento do protocolo onde o desenvolvedor da técnica transfere o conhecimento ou coloca em prática a técnica. Nesta fase os problemas que possam aparecer durante a execução dos ensaios serão detectados e a técnica ajustada. O principal produto dessa fase compreende um detalhado protocolo de execução para ser utilizado na fase II.

Na fase II o protocolo trabalhado na fase I deve ser transferido a um laboratório para avaliar a reprodutibilidade. Na fase III é realizado um estudo cego envolvendo dois ou mais laboratórios. É fundamental que tanto o desenvolvedor quanto o laboratório que executou os ensaios da fase I participem das 3 fases.

De acordo com CURREN e colaboradores (1995) a comunicação entre os diversos laboratórios envolvidos deve ser constante e baseada no detalhamento dos procedimentos executados e registados. Cooperação e dedicação são os pilares necessários para otimizar o ensaio e conseguir reprodutibilidade e boa previsão para validar um método *in vitro*.

Dessas três fases distintas são esperados alguns critérios para aceitação, tais como:

- ❖ Indicação do objetivo do ensaio;
- ❖ Justificativa para esse teste comparando-o com *in vivo* e com outros métodos;
- ❖ Um resumo de como o método foi derivado e a base biológica para sua relevância;
- ❖ Detalhes dos parâmetros medidos e como os resultados seriam aplicados;
- ❖ Procedimento escrito bem detalhado que permita que outro laboratório execute;
- ❖ Prova documental embasando o teste: relatórios in-house, trabalhos publicados, etc.

### 1.8.3 A participação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na implantação da política dos 3R's

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde possui um grupo de pesquisadores engajados na busca por métodos alternativos ao uso de animais desde 1999. Após uma parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criado em 2012 o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), pioneiro na América Latina tem o objetivo de validar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação. Ao receber uma demanda, o BraCVAM, após análise, encaminha a solicitação ao Conselho Diretor da RENAMA que identifica quais laboratórios poderão participar e executar o processo de validação. Enquanto o CONCEA avaliará os métodos empregados e os resultados obtidos.

A Resolução Normativa MCT, nº 17 publicada no Diário Oficial em 3 de julho de 2014 complementa a Lei Arouca definindo método alternativo como um método que busque refinar, reduzir ou substituir o uso de animais – são os métodos nos quais a sustentação sejam os princípios dos 3R's (MCT, 2014). O Método Alternativo Reconhecido seria o Método Alternativo Validado após aprovação do CONCEA.

O CONCEA reconhece 17 métodos alternativos na Resolução Normativa MCT, nº 18 publicada no Diário Oficial em 24 de setembro de 2014. São ensaios *in vitro*

divididos em sete grupos: avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele, avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular, avaliação do potencial de fototoxicidade, avaliação da absorção cutânea, avaliação do potencial de sensibilização cutânea, avaliação de toxicidade aguda e avaliação de genotoxicidade. Estes métodos alternativos foram formalmente validados por centros internacionais de validação seguindo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e está disponível para consulta no site da própria Instituição. Nesta Resolução fica estabelecido um prazo de cinco anos para que os métodos originais sejam substituídos pelos métodos alternativos.

Atualmente no Departamento de Imunologia do INCQS, para os ensaios de potência do veneno e antiveneno de serpentes, utiliza-se um número expressivo de animais experimentais. Nos quais, as diluições de veneno ou veneno/antiveneno são injetadas por via intraperitoneal. Os animais são observados após 24h e 48h para verificação da letalidade.

O Departamento de Imunologia coordenou o estudo de validação do ensaio *in vitro* de potência para soro antirrábico (Moura et al., 2009) que serviu de base para sua inclusão na Farmacopeia Brasileira (2010).

Pelo exposto acima estamos propondo a metodologia de determinação da potência do veneno botrópico e do soro antibotrópico por um ensaio de citotoxicidade em células Vero.



## 1.9 JUSTIFICATIVA

Uma das missões do INCQS é desenvolver, adequar ou implantar metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde conforme demanda da ANVISA.

Anualmente no INCQS são utilizados aproximadamente 5.500 camundongos somente para os ensaios de potência de antivenenos. Portanto o projeto justifica-se pela tendência mundial de substituição de métodos *in vivo* por ensaios *in vitro* amplamente adotada pelo INCQS.

Este estudo visa obter uma metodologia *in vitro* alternativa ao método oficial de letalidade murina

## 2 OBJETIVO GERAL

- Realizar a pré-validação do ensaio de potência *in vitro* do veneno botrópico e do soro antibotrópico pelo método de citotoxicidade em células Vero.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver técnicas de cultivo celular em linhagem Vero.
- Determinar o fator de diluição para o Veneno Botrópico de Referência;
- Demonstrar a capacidade do veneno botrópico de provocar efeito citotóxico em células Vero;
- Determinar a potência do Veneno Botrópico de Referência;
- Determinar a dose de desafio para o ensaio de potência do Soro Antibotrópico de Referência;
- Determinar a potência do Soro Antibotrópico de Referência;
- Avaliar a confiabilidade do método através da determinação das precisões intraensaios e interensaios.
- Analisar a relevância desta metodologia para substituir o uso de animais no controle da potência de veneno e antiveneno botrópico.
- Comparar os métodos *in vivo* e *in vitro*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MONOGRAFIA DA 5ª EDIÇÃO, FASCÍCULO 5, PARTE II DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA PARA O SORO ANTIBOTRÓPICO

Todas as metodologias analíticas utilizadas para o controle da qualidade e consequente liberação dos lotes de soros antipeçonhentos são realizadas de acordo com as Normas Oficiais Brasileiras, *Immunosera ad usum humanum* e *Immunoserum bothropicum*, publicadas pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume 2 (BRASIL, 2010).

Ensaio recomendado pela Farmacopeia Brasileira:

Ensaio físico-químico:

- ❖ 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 proteico. No máximo 15% (p/v) de proteínas. Para determinar a concentração de proteínas, multiplicar o resultado de nitrogênio proteico por 6,25.
- ❖ Potência - Conforme indicado na monografia respectiva.
- ❖ Sólidos totais - No máximo 20%.
- ❖ Sulfato de amônio. No máximo 0,20% (p/v).
- ❖ Umidade residual – Após liofilização no máximo 3%.

Identificação:

- ❖ Por Imunodifusão duplo radial, observar a presença de linha de precipitação (a identificação pode ser feita pelo ensaio de potência).
- ❖ Atende aos requisitos descritos em Doseamento.

Características:

- ❖ Determinação de volume - Cumpre o teste.
- ❖ pH - 6,0 a 7,0

Testes de segurança biológica:

- ❖ Esterilidade: Cumpre o teste. Método de filtração por membrana até 0,45 µm.
- ❖ Pirogênios: Cumpre o teste. Injetar 1 mL/kg e não reutilizar os animais usados no teste.

### 3.1.1 Soro Antibotrópico Pentavalente (*Immunoserum bothropicum*)

O soro antibotrópico pentavalente é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de soros hiperimunes para uso humano. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg de veneno de referência de *B. jararaca*.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA *IN VIVO*

*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.*

*Determinação da  $DL_{50}$  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  $DL_{50}$  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 DL<sub>50</sub>. 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% (DE<sub>50</sub>) em microlitros, utilizando métodos estatísticos comprovado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, 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. Calcular a potência em miligramas por mililitro, segundo a expressão:*

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

*T<sub>v</sub> = número de DL<sub>50</sub> utilizadas por camundongo na dose teste de veneno.*

*O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1mL da amostra. Poderá haver um CV igual a 10% em virtude da variação inerente aos testes com animais de laboratório. Deste modo a potência mínima poderá variar até 4,5 mg/mL.*

### 3.2.1 Veneno Botrópico de Referência

Veneno Botrópico de Referência é uma 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% (DL<sub>50</sub>).

### 3.3 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRONIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>) E DA DOSE EFETIVA 50% (DE<sub>50</sub>)

Todas as determinações da DL<sub>50</sub> e da DE<sub>50</sub> foram realizadas de acordo com os POPs: INCQS nº 65.3440-006 - Determinação da dose letal 50 dos venenos *Crotalus durissus terrificus* e de *Bothrops jararaca* – *in vivo*, INCQS nº 65.3440-004 - Ensaio de potência para o soro antitoxinogênico – *in vivo*.

Estes POPs descrevem minuciosamente todas as etapas da execução, interpretação e registro dos resultados e estão de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

Para o ensaio de DL<sub>50</sub> são realizadas duas leituras com 24 e 48h para anotar o número de mortos sobre o total de inoculados. Os critérios de aceitação do ensaio *in vivo* seguem as determinações da farmacopeia:

- O valor da DL<sub>50</sub> deve estar dentro dos limites de confiança;
- A proporção de animais mortos deve corresponder a concentração de veneno de pelo menos três diluições consecutivas;
- A curva de regressão deve apresentar relação linear;
- A dose que leva a óbito 50% dos animais deve estar entre a menor e a maior diluição utilizada. Quando ocorrer dois valores iguais em qualquer das extremidades da curva dose resposta apenas o primeiro valor é considerado.
- A potência mínima do soro antitoxinogênico é de 5 mg/mL.

Os protocolos de determinação da DL<sub>50</sub> e da DE<sub>50</sub> foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA), através do protocolo nº 0135/02.

### 3.4 METODOLOGIA *IN VITRO*

O princípio da técnica se baseia na propriedade do veneno botrópico em provocar efeito citotóxico em células Vero cultivadas em monocamada e o soro antibotrópico ser capaz de inibir este efeito tóxico.

A metodologia adotada para a quantificação do efeito citotóxico *in vitro* do veneno botrópico e sua inibição pelo soro antibotrópico, 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 Óptica (DO) do corante Azul Brilhante de Coomassie (CBB R-250) que cora proteínas e lipídios celulares.

A concentração de células aderidas pode ser avaliada pela coloração e posterior eluição do CBB R-250, sendo a DO do eluato do corante diretamente proporcional à concentração de células aderidas em monocamada. É possível determinar a quantidade de células aderidas comparando-se a DO de cada diluição do veneno, com a DO do controle de células.

Todos os procedimentos com células foram executados com bases nos POPs do INCQS: Manutenção de cultivos celulares aderentes (65.3430.031), Criopreservação de linhagens de células animais (65.3430.032) e Fornecimento de Linhagens celulares, suspensões celulares, meios de cultura e soluções (65.3430.034). A formulação e preparo dos insumos para realização do ensaio de potência estão disponíveis no Apêndice A. O preparo dos insumos utilizados na manutenção das células estão descritos no Anexo A.

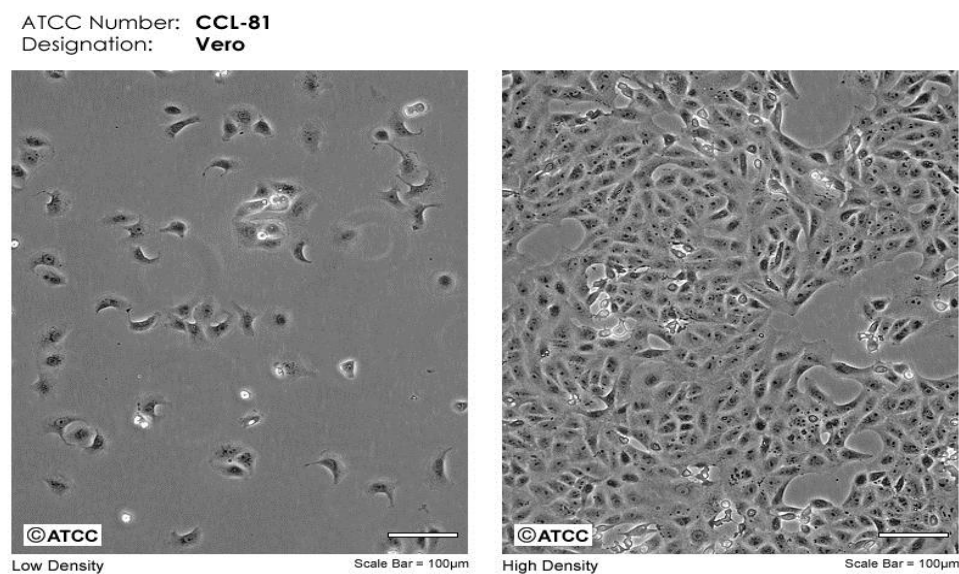
#### 3.4.1 Linhagem celular

A linhagem celular Vero é originária de rins de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*) e forma cultura em monocamada aderente em garrafas de cultivo celular (Figura 20). Estas células são amplamente utilizadas por serem acessíveis e simples

para cultivo e manutenção. São suscetíveis a diversos vírus e demonstram sensibilidade aos estímulos externos. Já foram descritas no cultivo de bactérias e parasitos intracelulares, na avaliação dos efeitos de produtos químicos, toxinas e algumas substâncias a nível molecular e também para produção de vacinas de rotavírus, varíola e pólio inativadas, também é utilizada para produção de vírus da raiva, reovírus e vírus da encefalite japonesa (ATCC, 2017).

No Departamento de Imunologia do INCQS/Fiocruz estas células são utilizadas para ensaios de potência de vacina de febre amarela, tríplice viral, tetra viral e dengue.

Figura 20: Linhagem celular Vero



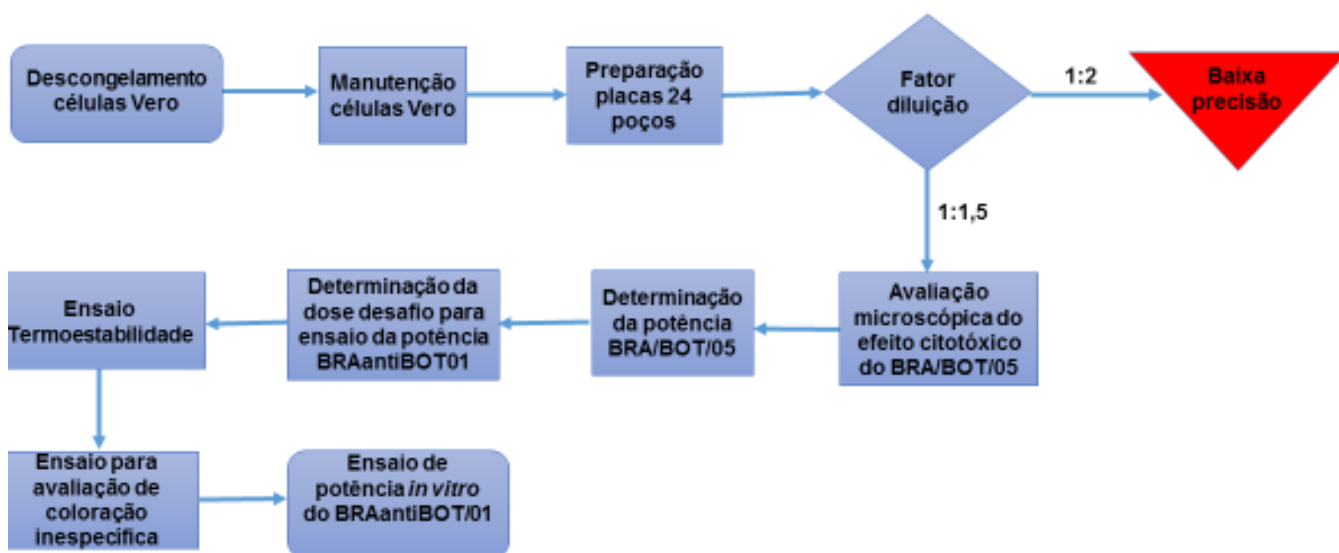
Fonte: (ATCC, 2017)

### 3.4.2 Origem das células Vero

As células Vero utilizadas neste estudo são provenientes da ATCC e foram fornecidas pelo Banco de Células do Departamento de Imunologia do INCQS/FIOCRUZ.



Figura 21: Fluxograma das etapas do projeto



### 3.4.3 Descongelamento de células Vero

As células Vero são mantidas criopreservadas acondicionadas em criotubos, organizados em gavetas nos reservatórios de nitrogênio líquido em temperatura aproximada de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os criotubos contendo células Vero são retirados do *container* de nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a  $30 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  para descongelar. Em seguida os criotubos são retirados do banho-maria e é realizada assepsia com álcool 70% e introduzidos na cabine de fluxo laminar (CSB). São ressuspensas em um tubo de centrífuga com 2 mL de meio de cultura Dulbecco Modificado com sais de Eagle (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) para cada criotubo com aproximadamente 1,5 mL de suspensão celular na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^6\text{ cél/mL}$  semeadas em garrafa de  $75\text{ cm}^2$ .

Após 24h o sobrenadante das garrafas é descartado e um novo meio de cultura (DMEM) é adicionado. Retirando as células mortas e que não aderiram além do DMSO utilizado para criopreservação das células.

#### 3.4.4 Manutenção de células Vero

O meio de cultivo utilizado para manutenção das células Vero foi o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM de (N- (2-hidroxietil) piperazina-N'- (2-ácido etanosulfônico (HEPES 1M) e 200 mM de glutamina levógena (L-Glu), solução de antibióticos (1g de sulfato de streptomina + 0,6 g de penicilina sódica ou potássica – PS100x) e 2,5 µg/mL de anfotericina B 0,025%. A cada 15 dias a glutamina deve ser acrescentada ao meio de cultivo celular.

Formulação DMEM utilizado para cultivo celular e ensaios em estufa com CO<sub>2</sub>

DMEM	Anfotericina	Sol. Antib.	L-Glu	HEPES	NaHCO <sub>3</sub>	2%SFB	5%SFB
1000	10 mL	10 mL	15 mL	20 mL	30 mL	20 mL	50 mL

Formulação DMEM sem HEPES para cultivo celular e ensaios em estufa sem CO<sub>2</sub>

DMEM	Anfotericina	Sol. Antib.	L-Glu	HEPES*	NaHCO <sub>3</sub>	2%SFB	5%SFB
1000	10 mL	10 mL	15 mL	-	30 mL	20 mL	50 L

\*Para estufa sem CO<sub>2</sub> é necessário manter as garrafas de cultivo fechadas e vedar as placas.

Para o repique das células foi utilizada solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (BSS.CMF) ou Tampão Salina Fosfato (PBS) e solução de tripsina/ácido etilenodiamino tetra-acético (Tripsina 0,05/EDTA 0,02%).

Semanalmente deve ser feito um repique na monocamada. Os insumos antes de serem utilizados devem ser colocados em banho-maria por 15 minutos a 37°C: BSS.CMF ou PBS, solução de tripsina/ EDTA, DMEM com 5% SFB e L-Glu.

Em fluxo laminar deve-se descartar o sobrenadante e lavar a monocamada duas vezes com BSS.CMF. Adicionar tripsina/EDTA para dissociação celular. Pode-

se colocar em estufa seca ou úmida a aproximadamente 37 °C por 3 min para acelerar o processo. Em seguida adicionar o mesmo quantitativo de DMEM para neutralizar o efeito da tripsina nas células. Homogeneizar a suspensão pelo menos 5 vezes a fim de dissolver qualquer agregado celular - com auxílio de pipetador automático e pipeta. Para cada tamanho de garrafa de cultivo celular utiliza-se a quantidade proporcional de insumos conforme demonstrado no quadro 3.

Quadro 3: Manutenção de garrafas com cultivo celular

Garrafas (cm <sup>2</sup> )	BSS.CMF (mL)	Tripsina/EDTA (mL)	DMEM (mL)	Manutenção das garrafas DMEM (mL)
25	3	2	2	8
75	6	4	4	25
175	12	6	6	40

❖ Neste estudo utilizamos apenas as garrafas de 75 e 175 cm<sup>2</sup>

Retirar um quantitativo para contagem celular em câmara de *Neubauer* diluindo esta alíquota com corante azul de Tripán 0,4%p/v para a concentração de 1:10. Sendo 180 µL de corante para 20µL de suspensão celular. Conta-se o número total de células vivas em cada quadrante excluindo as células que estariam por cima das linhas que delimitam a parte exterior dos quadrantes e divide-se por 8 que é o número correspondente de quadrantes na câmara de *Neubauer* para obtenção da média. Multiplica-se a média pelo fator de diluição utilizado (FD=10).

$$\text{Concentração celular da suspensão} = \frac{\text{células vivas}}{8} = \text{células} \times (\text{FD}) \times (10^4)$$

Com o número de células mortas calcula-se a porcentagem de células viáveis:

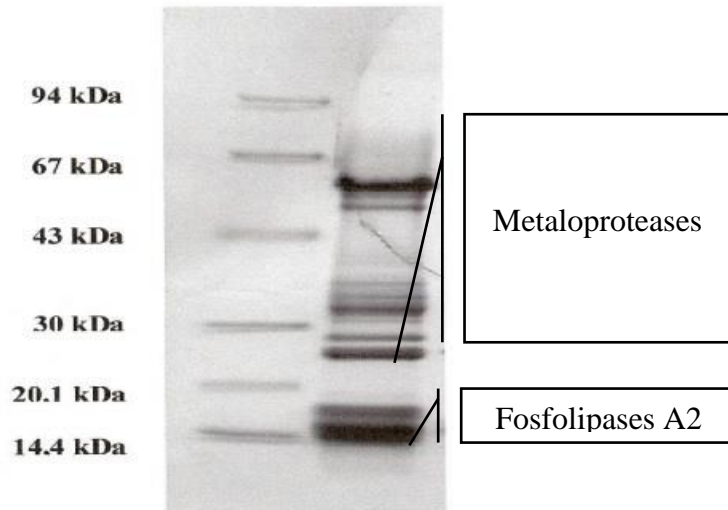
$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}}$$

### 3.4.5 Preparação das placas de 24 poços

Após o cultivo de células Vero em garrafas de 75 ou 175 cm<sup>2</sup> é preparada uma suspensão celular na concentração de 10<sup>5</sup> cel/mL em DMEM 1x, suplementado com 2% de SFB, 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM de (N- (2-hidroxietil) piperazina-N'- (2-ácido etanosulfônico (HEPES 1M) e 2 mM de glutamina levógena (L-glu), de penicilina sódica – PS100x e 2,5 µg/mL de anfotericina B 0,025%. É semeado 1mL dessa suspensão celular a partir do poço A4 em placas de 24 poços. Nos 3 primeiros poços (A1, A2 e A3) é semeado 1mL de meio de cultivo celular sem células obtendo desta forma o controle do meio de cultivo (branco) com o objetivo de quantificar a coloração inespecífica. As placas são incubadas a 37 °C com atmosfera de 3 a 5% CO<sub>2</sub> por 24h. Caso a estufa não possua atmosfera de CO<sub>2</sub>, vedar as placas com parafilm®.

### 3.5 VENENO DE REFERÊNCIA BOTRÓPICO

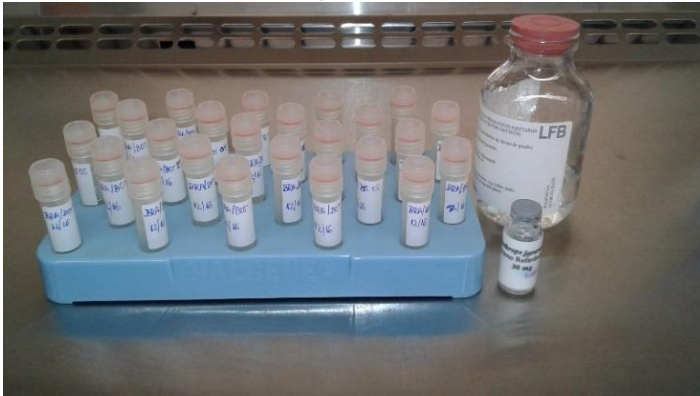
O Veneno de Referência Botrópico Brasileiro lote 5 (BRA/BOT/05) foi produzido a partir da extração de 4.430 espécimes de *B. jararaca* de diferentes localizações geográficas do Brasil. Configurando desta forma um veneno heterogêneo e que seja representativo no que tange a variabilidade gênica das composições do veneno dentro da mesma espécie. Na figura 22 podemos observar o perfil eletroforético em SDS-PAGE com 12 bandas de proteínas. As metaloproteases e fosfolipases estão evidenciadas.

Fiigura 22: Gel de eletroforese do Veneno de Referência de *Bothrops* lote 5

### 3.5.1 Reconstituição do Veneno Botrópico de Referência

O BRA/BOT/05 é pesado e reconstituído em água para injetáveis em quantidade suficiente para atingir a concentração final de 1mg de veneno por mL de água (1mg/mL). Cada frasco contém aproximadamente 30mg de veneno botrópico que é transferido para um erlenmeyer e homogeneizado com a mesma proporção de água (1mg/mL). Em seguida, o volume é fracionado em criotubos com auxílio de pipetador automático dispensando 1 mL por criotubo (Figura 23). Estes criotubos são identificados com o lote do veneno e mantidos em freezer a - 20 °C. Nos ensaios de potência para veneno botrópico e soro antibotrópico esses criotubos são denominados solução mãe. A solução mãe é retirada do freezer apenas quando todo o material de trabalho está pronto. Evitar que a solução mãe fique fora do gelo antes da diluição.

Figura 23: Reconstituição e fracionamento do Veneno Botrópico de Referência.

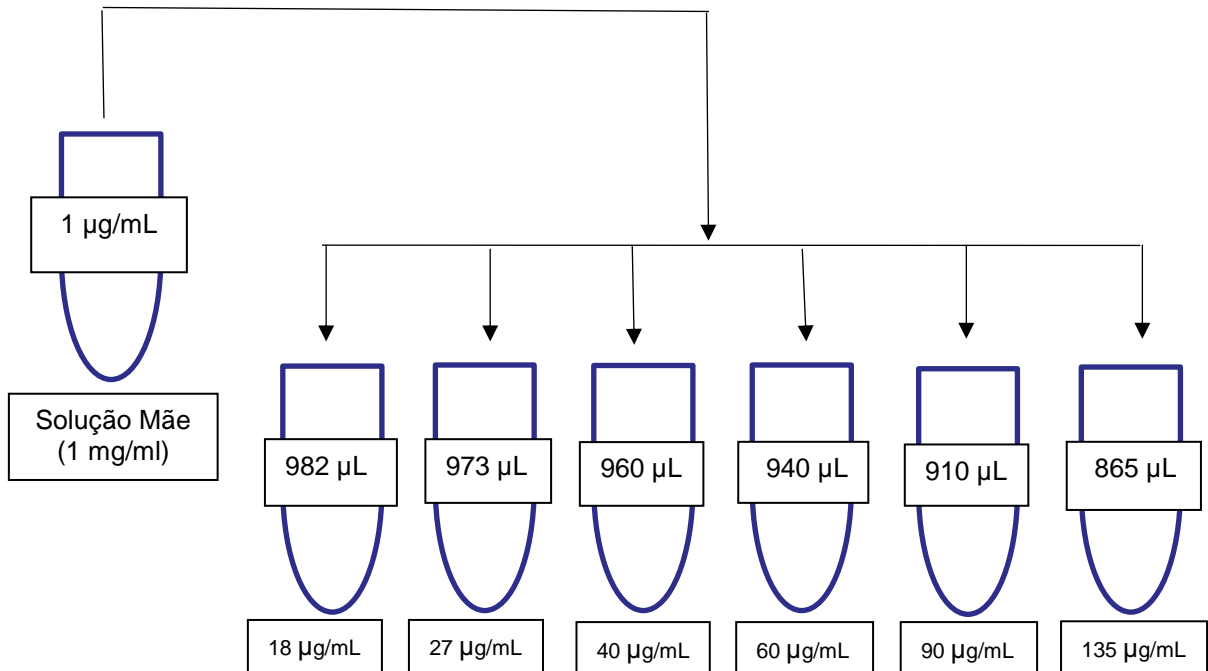


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

### 3.6 ENSAIO DE POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO *IN VITRO*

Para testar a potência do veneno o procedimento é baseado na diluição e inoculação de BRA/BOT/05 (solução mãe) em placas de 24 poços contendo células Vero preparadas com 24h de antecedência (item 3.4.5 descrito nesta dissertação). Utilizar o fator de diluição de 1:1,5 para preparo do inóculo (solução mãe diluída em DMEM a 2%SFB). Preparar seis tubos do tipo centrífuga contendo DMEM nas quantidades indicadas no quadro 4. Inocular a quantidade correspondente de solução mãe nesses tubos (Figura 24). Homogeneizar com auxílio de micropipeta cinco vezes. Inocular em triplicata as respectivas diluições dos poços B1 até D6 (Quadro 4). Incubar por 4h em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> à 37 °C.

Figura 24: Diluição do Veneno Botrópico de 1:1,5 em meio de cultivo



Quadro 4: Esquema de inoculação do Veneno Botrópico de Referência

TUBO	SOLUÇÃO MÃE (1 mg/mL)	MEIO	[ ] TUBO	[ ] PLACA	POÇOS
1	135 µL	865 µL	135 µg/mL	13,5 µg/mL	<b>B1, B2, B3</b>
2	90 µL	910 µL	90 µg/mL	9 µg/mL	<b>B4, B5, B6</b>
3	60 µL	940 µL	60 µg/mL	6 µg/mL	<b>C1, C2, C3</b>
4	40 µL	960 µL	40 µg/mL	4 µg/mL	<b>C4, C5, C6</b>
5	27 µL	973 µL	27 µg/mL	2,7 µg/mL	<b>D1, D2, D3</b>
6	18 µL	982 µL	18 µg/mL	1,8 µg/mL	<b>D4, D5, D6</b>

[ ] = concentração de veneno

Em seguida é realizada a lavagem manual das placas duas vezes com 2 mL de PBS por poço. A pipeta deve ser direcionada na parede do poço a fim de evitar contato com as células e desprendimento da monocamada. Após a lavagem é adicionado 0,5 mL de PBS/Formol 0,2% por 15 min para fixação (Figura 25).

Depois da fixação as placas são deixadas vertidas na bancada para secagem.

Após a secagem é adicionado 250 µl do corante Azul de Coomassie 0,2% (CBB R-250) por poço por 1h ao abrigo de luz. Após 1h, as placas são lavadas duas vezes por imersão em água corrente.

Posteriormente é adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS) para eluição do corante. A leitura da DO do eluato do corante é realizada em leitor de microplacas utilizando o programa Softmax Pro com filtro de 595 nm (Figuras 26 e 27). O resultado impresso foi digitado em planilha CombiStats®.

Figura 25: Etapas do ensaio de citotoxicidade do Veneno Botrópico de Referência em células Vero

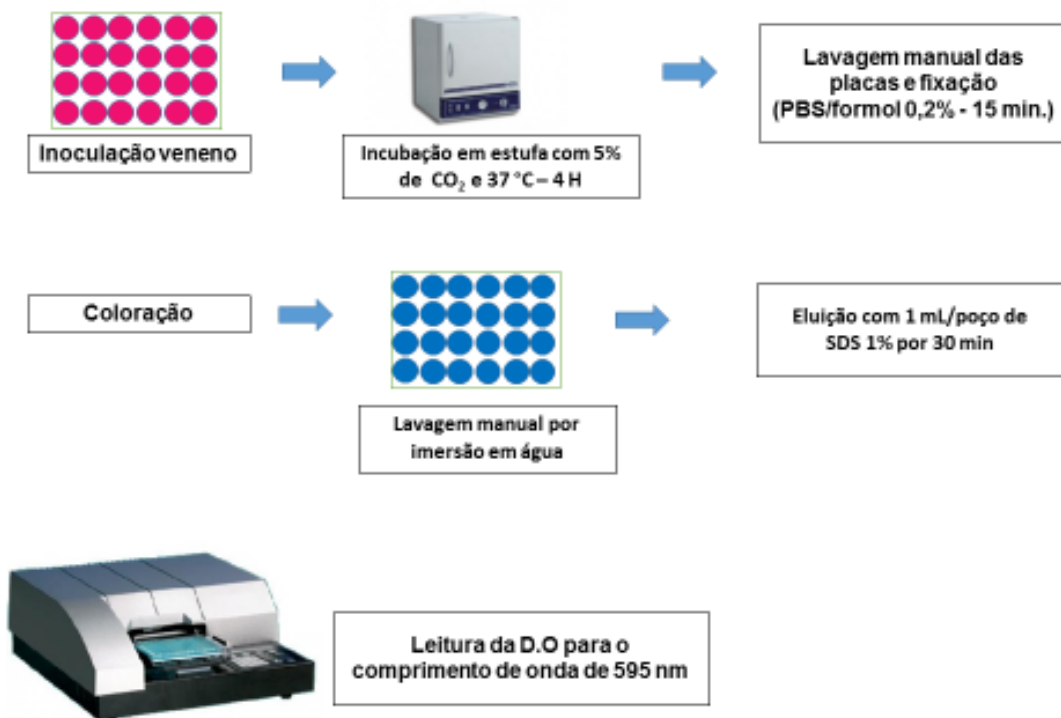




Figura 26: Distribuição das seis concentrações do Veneno Botrópico de Referência em placas de 24 poços conforme demonstrado no Quadro 4.

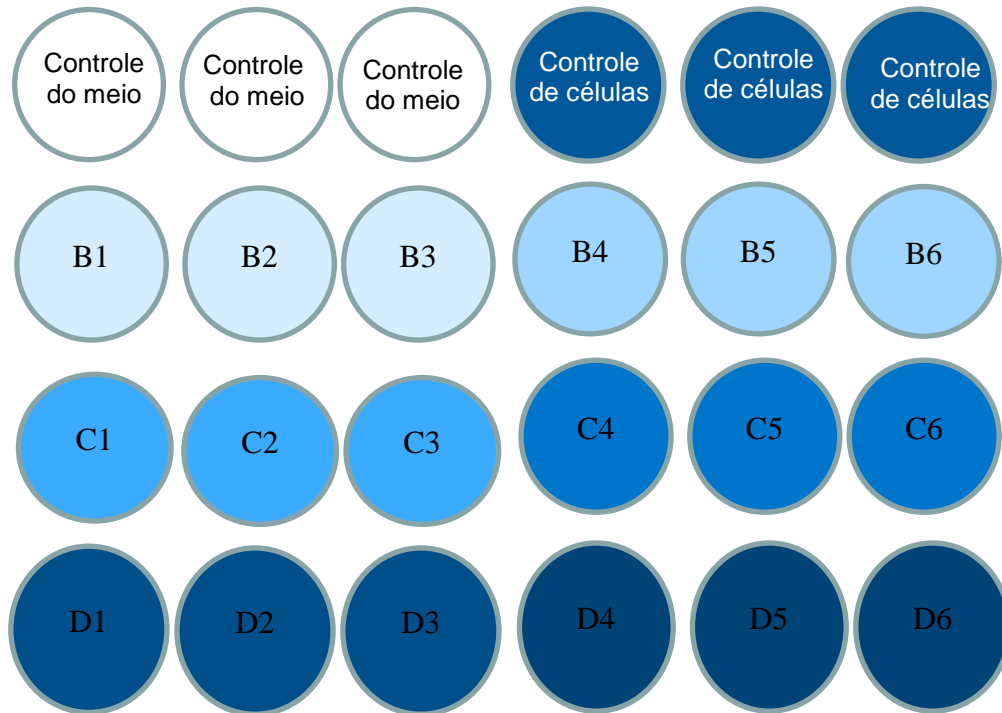
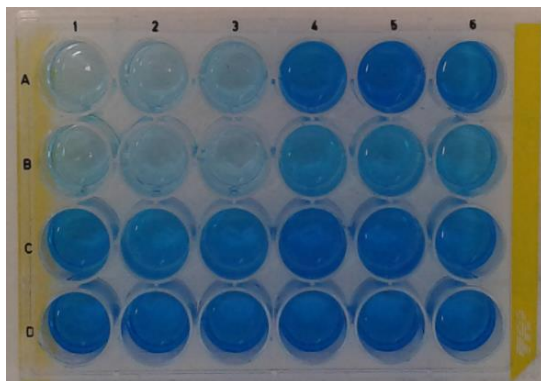


Figura 27: A leitura da densidade ótica foi realizada através de leitora de microplaca utilizando o programa Softmax Pro no comprimento de onda de 595 nm após o ensaio de potência de veneno botrópico



### 3.6.1 Cálculos

Foi utilizado o programa estatístico CombStats® para o cálculo da Dose Citotóxica 50% (DC<sub>t50</sub>) do BRA/BOT/05. Foi utilizado o modelo de ajuste de curva sigmóide de 4 parâmetros (4PL). Esta planilha foi preenchida com os resultados da leitura da DO (Figura 28).

A precisão do método foi expressa como Coeficiente de Variação geométrico g(%CV). A variância da Repetitividade e da Precisão Intermediária assim como os Coeficientes de Variação geométricos g(CV%) foram calculados a partir das concentrações estimadas.

Para que os ensaios fossem considerados como válidos, foram utilizados os mesmos critérios previstos pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e detalhados no POP de Determinação da Dose Letal 50% dos venenos *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* - *in vivo*. MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3440.006).

Figura 28: Planilha do CombiStats®: Resultados do Ensaio de Potência do Veneno Botrópico de Referência em Células Vero

Substance	Veneno Botrópico	Observ.	(1)	(2)	(3)
Method	DCt50	(A)	0.176	0.152	0.164
Assay number	10/16	(B)	1.015	0.930	1.161
Technician	Renata Nundes	(C)	0.181	0.169	0.155
Date of assay	01/11/16	(D)	0.158	0.150	0.158
		(E)	0.302	0.235	0.231
		(F)	0.459	0.507	0.456
		(G)	0.790	0.711	0.737
		(H)	0.895	0.904	0.920

Standard			
Id.	Veneno		
Ass. pot.	0.45 µg/mL		
Doses	(1)	(2)	(3)
1/1	0.181	0.169	0.155
1/1.5	0.158	0.150	0.158
1/2.25	0.302	0.235	0.231
1/3.38	0.459	0.507	0.456
1/5.06	0.790	0.711	0.737
1/7.59	0.895	0.904	0.920

Design	(1)	(2)	(3)
(A)	PC	PC	PC
(B)	NC	NC	NC
(C)	1 1 1	1 1 2	1 1 3
(D)	1 2 1	1 2 2	1 2 3
(E)	1 3 1	1 3 2	1 3 3
(F)	1 4 1	1 4 2	1 4 3
(G)	1 5 1	1 5 2	1 5 3
(H)	1 6 1	1 6 2	1 6 3

Model:  $y=d+a*(\lg(x))$  where  $x=c.+b*\ln(\text{dose})$

Design: Completely randomized

Weight function:  $w=1.0$

Variance: Observed residuals

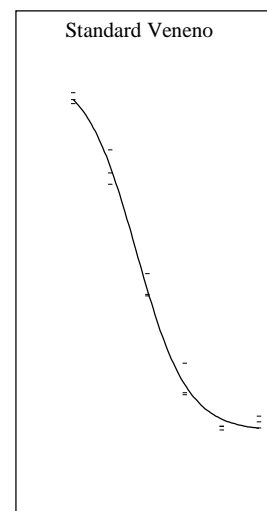
Common slope(factor):  $b = -3.61369$  (-3.91531 to -3.31207)

Correlation |r|: 0.981726 (Weighted), 0.996464

Asymptotes: 0.146946 and 0.966717

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Regression	1	0.283633	0.283633	388.361	0.000 (***)
Non-linearity	4	0.00189329	0.000473323	2.59237	0.628
Treatments	5	0.285526	0.0571052	390.953	0.000 (***)
Residual error	12	0.00876400	0.000730333		
Total	17	0.294290	0.0173112		

Standard			
Id.	Veneno		
(µg/mL)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	0.450000	0.450000	0.450000
Rel. to Ass.	100.0%	100.0%	100.0%



### 3.6.2 Critérios para aceitação do ensaio como válido:

1. O média da DO do controle de células (CC) deve ficar abaixo de 1.700 e a média do branco abaixo de 300.
2. Deve apresentar uma relação linear ( $p > 0,05$ ), ou seja, o efeito deve ser proporcional às concentrações de veneno em pelo menos 3 diluições consecutivas.
3. O valor aberrante dentre as triplicatas, pode ser excluído e o cálculo será feito com o valor médio dos dois valores não aberrantes. O programa CombiStats aponta o valor aberrante.
4. A Dct50 deve ser no mínimo 50% do controle de células (CC).

### 3.7 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA DOSE DE DESAFIO PARA O ENSAIO DE POTÊNCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO *IN VITRO*

Baseado nos resultados obtidos nos ensaios de potência do BRA/BOT/05 foram feitas as diluições do veneno em PBS para a determinação da dose de desafio para o ensaio de potência do soro antibotrópico. Obtivemos uma  $DC_{t50}$  média do veneno botrópico igual a 4,2  $\mu\text{g/mL}$ . A partir desta dose de veneno definiram-se 5 doses para determinação da menor dose de veneno citotóxica capaz de provocar a morte da maioria das células aderidas em monocamada. A partir de 4,2  $\mu\text{g/mL}$  ( $1DC_{t50}$ ) multiplicamos por 2, 3, 4, 5 e 6 obtendo os seguintes valores de doses para o ensaio: Dose 1 = 4,2  $\mu\text{g/mL}$ ; Dose 2 = 8,4  $\mu\text{g/mL}$ ; Dose 3 = 12,6  $\mu\text{g/mL}$ ; Dose 4 = 16,8  $\mu\text{g/mL}$ ; Dose 5 = 21  $\mu\text{g/mL}$  e Dose 6 = 25,2  $\mu\text{g/mL}$ . As diferentes diluições de BRA/BOT/05 foram preparadas de acordo com o procedimento mostrado no Quadro 5. Preparar 6 tubos do tipo centrífuga com a quantidade de PBS descrita no quadro 5 e homogeneizar com a quantidade correspondente de BRA/BOT/05. Inocular as 6 diluições a partir do poço B1 em triplicata. Nos poços A1, A2 e A3 é inoculado apenas o meio DMEM a 2% de SFB para controle (branco) e nos poços A4, A5 e A6 é inoculado o controle de células no preparo das placas de 24 poços com 24h de antecedência do ensaio conforme descrito no item 3.4.5.

#### 3.7.1 Termoestabilidade

A termoestabilidade do BRA/BOT/05 foi avaliada para testar possíveis interferências da temperatura de 37°C na estabilidade do veneno após a diluição em PBS. Os criotubos contendo veneno diluído em PBS foram colocados em banho-maria à 37° C por 30 min. Em seguida foram higienizados com álcool 70% e retornados a cabine de fluxo laminar para serem inoculados nas células. Foram inoculadas 100  $\mu\text{l}$  das 6 diferentes diluições de BRA/BOT/05 em triplicata a partir dos poços B1 a D6 e incubadas por 4h em estufa com atmosfera de 3 a 5% de  $\text{CO}_2$  à 37 °C (Quadro 6).

Em seguida é realizada a lavagem manual das placas duas vezes com 2 mL de PBS por poço. Após a lavagem é adicionado 0,5 mL de PBS/Formol 0,2% por 15

min para fixação. Depois da fixação as placas são deixadas vertidas na bancada para secagem. Após a secagem é adicionado 250 µl do corante Azul de Coomassie 0,2% (CBB R-250) por poço por 1h ao abrigo de luz. Após 1h, as placas são lavadas duas vezes por imersão em água corrente.

Posteriormente é adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS) para eluição do corante. A leitura da DO do eluato do corante é realizada em leitor de microplacas utilizando o programa Softmax Pro® com filtro de 595 nm.

Quadro 5: Procedimento de Diluição de BRA/BOT/05<sup>1</sup> em relação ao valor de DCt<sub>50</sub><sup>2</sup>

TUBO	BRA/BOT/05 (1 mg/mL)	PBS	[ ] TUBO	[ ] PLACA	POÇOS	DCt <sub>50</sub>
1	42 µL	958 µL	42 µg/mL	4,2 µg/mL	D4, D5, D6	1 DCt <sub>50</sub>
2	84 µL	916 µL	84 µg/mL	8,4 µg/mL	D1, D2, D3	2 DCt <sub>50</sub>
3	126 µL	874 µL	126 µg/mL	12,6 µg/mL	C4, C5, C6	3 DCt <sub>50</sub>
4	168 µL	832 µL	168 µg/mL	16,8 µg/mL	C1, C2, C3	4 DCt <sub>50</sub>
5	210 µL	790 µL	210 µg/mL	21 µg/mL	B4, B5, B6	5 DCt <sub>50</sub>
6	252 µL	748 µL	252 µg/mL	25,2 µg/mL	B1, B2, B3	6 DCt <sub>50</sub>

<sup>1</sup>Veneno Botrópico de Referência Lote 5; <sup>2</sup>Dose citotóxica média de BRA/BOT/05; [ ] = concentração de BRA/BOT/05.

Quadro 6: Esquema de inoculação das 6 doses de BRA/BOT/05<sup>1</sup> em relação à DCt<sub>50</sub><sup>2</sup> em microplaca de 24 orifícios

	1	2	3	4	5	6
A	Branco <sup>3</sup>	Branco	Branco	CC <sup>4</sup>	CC	CC
B	6DCt <sub>50</sub>	6DCt <sub>50</sub>	6DCt <sub>50</sub>	5DCt <sub>50</sub>	5DCt <sub>50</sub>	5DCt <sub>50</sub>
C	4DCt <sub>50</sub>	4DCt <sub>50</sub>	4DCt <sub>50</sub>	3DCt <sub>50</sub>	3DCt <sub>50</sub>	3DCt <sub>50</sub>
D	2DCt <sub>50</sub>	2DCt <sub>50</sub>	2DCt <sub>50</sub>	1DCt <sub>50</sub>	1DCt <sub>50</sub>	1DCt <sub>50</sub>

<sup>1</sup>Veneno Botrópico de Referência Lote 5; <sup>2</sup>Dose citotóxica média de BRA/BOT/05;

<sup>3</sup> Controle do meio; <sup>4</sup> Controle de células.

Para o cálculo da Dose Citotóxica Mínima foi considerada a média das DO obtidas para as três repetições de cada diluição, descontando o valor médio da leitura dos três poços do Branco (controle do meio), com o objetivo de minimizar a influência da coloração de fundo inespecífica, devida a uma certa afinidade SFB com a superfície das placas tratadas para a adesão celular.

### 3.7.2 Ensaio para avaliação da coloração inespecífica

Em placas de 24 poços são inoculadas 100 µl em triplicata de PBS, diferentes concentrações de meio com soro fetal bovino (2%, 5% e 10%) e poços vazios (sem inoculação). Após a inoculação as placas são incubadas por 24h em estufa com atmosfera de 3 a 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. Em seguida é realizada a lavagem manual das placas duas vezes com 2 mL de PBS por poço. Após a lavagem é adicionado 0,5 mL de PBS/Formol 0,2% por 15 min para fixação. Depois da fixação as placas são deixadas vertidas na bancada para secagem. Após a secagem é adicionado 250 µl do corante Azul de Coomassie 0,2% (CBB R-250) por poço por 1h ao abrigo de luz. Após 1h, as placas são lavadas duas vezes por imersão em água corrente.

Posteriormente é adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS) para eluição do corante. A leitura da DO do eluato do corante é realizada em leitor de microplacas utilizando o programa Softmax Pro com filtro de 595 nm.

### 3.8 SORO ANTIBOTRÓPICO (*IMMUNOSERUM BOTHROPICUM*)

O soro antibotrópico é uma solução pentavalente que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equinos hiperimunizados com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de soros hiperimunes para uso humano. Contém em cada mililitro imunoglobulinas heterólogas em quantidade suficiente para neutralizar, no mínimo, 5 mg de veneno-referência de *B. jararaca*. O frasco-ampola contém 10 mL de Soro Antibotrópico.

### 3.8.1 Ensaio de potência *in vitro* do Soro Antibotrópico de Referência

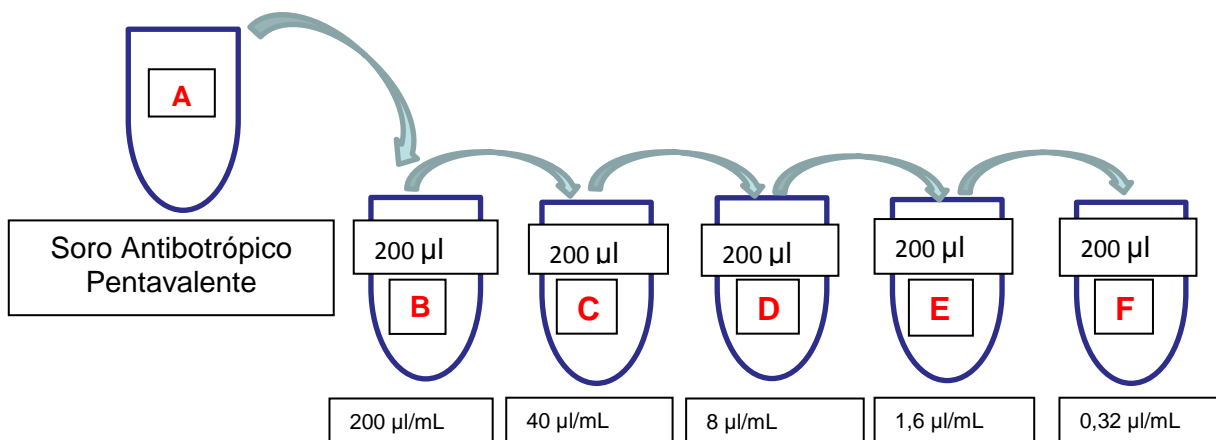
Para testar a potência do soro o procedimento é baseado na inoculação de uma dose fixa de BRA/BOT/05 em uma diluição seriada de antiveneno nas placas de 24 poços contendo células Vero aderidas em monocamada. A dose de veneno fixa corresponde a duas vezes a Dose Mínima Citotóxica (menor dose capaz de exercer 100% de efeito citotóxico em células Vero).

Para a titulação do antiveneno é realizada a soroneutralização 30 min. antes da inoculação nas células. Foi desenvolvido um esquema de diluição descritos em 3.8.2 e 3.8.3.

### 3.8.2 Diluição do Soro (Etapa 1)

Do frasco-ampola de Soro Antibotrópico de Referência (BRAAntiBOT/01) contendo 5 mL foi transferido 200 µl para um tubo de microcentrífuga A. Em seguida, foram transferidos 200 µl para o tubo B contendo 800 µl de PBS e homogeneizados com micropipeta 5 vezes. Outros 4 tubos de microcentrífuga denominados C, D, E e F contendo 800 µl de PBS receberam 200 µl em uma diluição seriada de 1:5 conforme mostrado na Figura 29. O tubo A foi descartado após a diluição seriada.

Figura 29: Diluição de BRAAntiBOT/01<sup>1</sup> empregando fator de diluição de 1:5



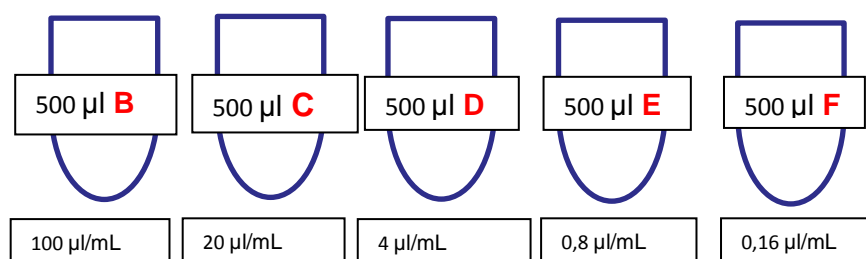
<sup>1</sup> Soro Antibotrópico de Referência.



### 3.8.3 Soroneutralização (Etapa 2)

Primeiramente é realizada a diluição de 840 µl do BRA/BOT/05 em 4,160 µl de PBS que será a dose fixa de veneno (DFV) a ser neutralizado. A DFV corresponde a 2 DC<sub>50</sub> (4,2 µg/mL x 2 = 8,4 µg/mL). 500 µl da DFV são distribuídos em cinco tubos de microcentrífuga conforme Figura 30. A seguir 500 µl dos tubos B, C, D, E e F (**ETAPA 1**) são adicionados aos respectivos tubos B, C, D, E e F (**ETAPA 2**) da Figura 30. Após a homogeneização, os tubos B, C, D, E e F contendo 500 µl DFV + 500 µl do antiveneno são colocados em banho-maria à 37 °C por 30 min para aguardar a soroneutralização do veneno botrópico (Quadro 7).

Figura 30: Soroneutralização do BRA/BOT/05<sup>1</sup>: 500 µL da ETAPA 1 + 500 µL da ETAPA 2



<sup>1</sup>Veneno Botrópico de Referência Lote 5.

Quadro 7: Diluição DFV<sup>1</sup> + SORO<sup>2</sup> (FD<sup>3</sup>= 1:2)

TUBO	DFV µg/mL	SORO µL/mL	[ ] TUBO µL/mL	[ ] PLACA µL/mL
<b>B</b>	8,4	200	100	10
<b>C</b>	8,4	40	20	2
<b>D</b>	8,4	8	4	0,4
<b>E</b>	8,4	1,6	0,8	0,08
<b>F</b>	8,4	0,32	0,16	0,016

<sup>1</sup>Dose fixa de Veneno Botrópico de Referência; <sup>2</sup>Soro Antibotrópico de Referência; <sup>3</sup>Fator de diluição; [ ] = concentração de Soro Antibotrópico de Referência.

Serão inoculados nos 3 poços (B1, B2 e B3) 100 µl da DFV para controle do veneno (Quadro 8). São inoculados 100 µl das diluições de DFV + SORO em triplicata a partir dos poços B4 a D6 e incubadas por 4h em estufa com atmosfera de 3 a 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C.

Quadro 8: Soroneutralização do BRA/BOT/05<sup>1</sup>

	1	2	3	4	5	6
A	Branco <sup>2</sup>	Branco	Branco	CC <sup>3</sup>	CC	CC
B	CV <sup>4</sup>	CV	CV	Tubo B <sup>5</sup>	Tubo B	Tubo B
C	Tubo C <sup>5</sup>	Tubo C	Tubo C	Tubo D <sup>5</sup>	Tubo D	Tubo D
D	Tubo E <sup>5</sup>	Tubo E	Tubo E	Tubo F <sup>5</sup>	Tubo F	Tubo F

<sup>1</sup>Veneno Botrópico de Referência; <sup>2</sup> Controle do meio; <sup>3</sup> Controle de células; <sup>4</sup> Controle do veneno; <sup>5</sup> Concentrações de soro relacionadas no Quadro 7.

Os criotubos contendo veneno diluído em PBS foram colocados em banho-maria à 37° C por 30 min. Em seguida foram higienizados com álcool 70% e retornados a cabine de fluxo laminar para serem inoculados nas células. Foram inoculadas 100 µl das 6 diferentes diluições de BRA/BOT/05 em triplicata a partir dos poços B1 a D6 e incubadas por 4h em estufa com atmosfera de 3 a 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C (Quadro 6).

Em seguida é realizada a lavagem manual das placas duas vezes com 2 mL de PBS por poço. Após a lavagem é adicionado 0,5 mL de PBS/Formol 0,2% por 15 min para fixação. Depois da fixação as placas são deixadas vertidas na bancada para secagem. Após a secagem é adicionado 250 µl do corante Azul de Coomassie 0,2% (CBB R-250) por poço por 1h ao abrigo de luz. Após 1h, as placas são lavadas duas vezes por imersão em água corrente.

Posteriormente é adicionado 1 mL de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS) para eluição do corante. A leitura da DO do eluato do corante é realizada em leitor de microplacas utilizando o programa Softmax Pro com filtro de 595 nm.

O resultado do ensaio de potência impresso em DO e obtido na leitora de placas foi digitado no programa CombiStats® (Figura 31). Desta forma, as 5 diluições de soro antibotrópico (B, C, D, E e F) foram utilizadas na planilha para cálculo da potência do soro.

Figura 31: Planilha do CombiStats®: Resultados da Soroneutralização do Veneno Botrópico de Referência em células Vero

Substance	Soro Antibotrópico
Method	DI50
Assay number	13/17
Technician	Renata Nundes
Date of assay	09/05/17

Standard			
Id.	Veneno		
Ass. pot.	10 µg/mL		
Doses	(1)	(2)	(3)
1/1	1.2506	1.2663	1.197
1/5	1.1591	1.2079	1.2637
1/25	1.1456	1.1451	1.077
1/125	0.9954	0.9274	0.8661
1/625	0.7648	0.74	0.8435

Design	(1)	(2)	(3)
(A)	PC	PC	PC
(B)	NC	NC	NC
(C)	1 5 1	1 5 2	1 5 3
(D)	1 4 1	1 4 2	1 4 3
(E)	1 3 1	1 3 2	1 3 3
(F)	1 2 1	1 2 2	1 2 3
(G)	1 1 1	1 1 2	1 1 3

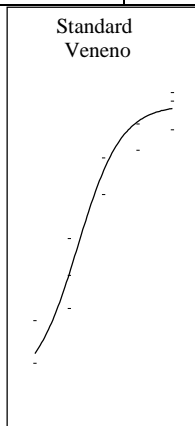
Observ.	(1)	(2)	(3)
(A)	0.3096	0.2768	0.2815
(B)	1.3444	1.3582	1.4854
(C)	0.7648	0.74	0.8435
(D)	0.9954	0.9274	0.8661
(E)	1.1456	1.1451	1.077
(F)	1.1591	1.2079	1.2637
(G)	1.2506	1.2663	1.197

Model:  $y=d+a*(\text{Igt}(x))$  where  $x=c.+b*\ln(\text{dose})$  Common slope(factor):  $b = 0.987694$  (0.732211 to 1.24318)  
 Design: Completely randomized Correlation |r|: 0.895297 (Weighted), 0.973182 (Unweighted)  
 Weight function:  $w=1.0$  Asymptotes 0.719288 and 1.2430  
 Variance: Observed residuals

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Regression	1	0.102875	0.102875	40.4368	0.000 (***)
Non-linearity	3	2.81673E-05	9.38909E-06	0.0110716	1.000
Treatments	4	0.102904	0.0257259	40.4479	0.000 (***)
Residual error	10	0.0254411	0.00254411		
Total	14	0.128345	0.00916748		

	Slope per Sample	Difference with Standard	Ratio with Standard
Standard	0.987694 (0.732211 to 1.24318)	0	1

Standard			
Id.	Veneno		
(µg/mL)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	10.0000	10.0000	10.0000
Rel. to Ass.	100.0%	100.0%	100.0%
Rel. to Est.	100.0%	100.0%	100.0%
µg/ED50	0.0831003	0.119273	0.170560
Rel. to Ass.	586.3%	838.4%	1203.4%
Rel. to Est.	69.9%	100.0%	143.5%



#### 3.8.4 Critérios para aceitação do ensaio como válido:

1. Nos poços B1, B2 e B4 é realizado o controle do veneno, portanto, para o ensaio estar válido a leitura da DO deve estar próxima ao valor do branco (poços A1, A2 e A3). O controle do veneno não é computado pelo CombiStats devendo ser o primeiro critério avaliado pelo analista que executou o ensaio.
2. O média da DO do controle de células (CC) deve ficar abaixo de 1.700 e a média do branco abaixo de 300.
3. Deve apresentar uma relação linear ( $p > 0,05$ ), ou seja, o efeito deve ser proporcional às concentrações de veneno em pelo menos 3 diluições consecutivas.
4. O valor aberrante dentre as triplicatas, pode ser excluído e o cálculo será feito com o valor médio dos dois valores não aberrantes. O programa CombiStats aponta o valor aberrante.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela determinação das precisões, intra e interensaios, através do cálculo da variância (coeficiente de variação geométrico), da concordância entre os resultados dos métodos *in vivo* e *in vitro*, e da sensibilidade do método proposto (WOOD, 1980; REED, 2002).

Os resultados foram avaliados através do programa estatístico CombiStats<sup>®</sup>, utilizando o modelo de ajuste de curva sigmoide de 4 parâmetros.

Foram calculadas as médias das triplicatas para avaliar a precisão intraensaio, ou seja, avaliação da concordância entre os resultados de um mesmo analista, no mesmo dia e em uma placa. Foi avaliada a repetitividade de uma mesma diluição.

Em seguida foi calculada a precisão interensaios através da avaliação de todos os resultados (replicatas) executados em dias diferentes.

O terceiro cálculo foi a precisão intermediária que foi avaliada como gCV obtido com a soma das variâncias intraensaios e interensaios.

Onde foi necessário, houve uma transformação dos dados em logaritmo do (valor+1), para evitar valores de logaritmos negativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE DILUIÇÃO PARA O VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRA/BOT/05)

Inicialmente foi determinado o FD ideal para o ensaio de potência do BRA/BOT/05. Foram avaliados os fatores de diluição de 1:2 e 1:1,5.

A Farmacopeia Brasileira estabelece que o FD do veneno botrópico para o ensaio *in vivo* deve ser de no máximo 1:1,5. Porém, inicialmente, optamos pelo FD de 1:2 por possibilitar uma diluição seriada que é mais precisa e de mais fácil execução. Foram avaliados 12 ensaios válidos com potência média de 8,580 µg/mL com Limite Inferior (LI) de 7,814 µg/mL e Limite Superior (LS) de 9,706 µg/mL. O resultado obtido demonstrou que houve uma variação muito alta entre os resultados. A precisão intraensaios (gCV intra) foi igual a 100,77% e a precisão interensaios (gCV inter) igual a 68,76%. Sendo assim, as precisões avaliadas foram consideradas insatisfatórias para o fator de diluição 1:2 (Quadro 9).

Quadro 9: Resultados do ensaio de potência *in vitro* do Veneno Botrópico de Referência utilizando fator de diluição: 1:2

	Potência	LIC	LSC
1	5,841	5,138	6,613
2	12,928	11,264	15,943
3	1,151	0,806	1,470
4	3,334	2,940	3,767
5	12,222	11,842	12,645
6	13,654	12,923	14,587
7	3,334	2,940	3,767
8	14,256	13,223	15,921
9	13,897	12,509	16,240
10	5,184	4,551	6,110
<b>Média</b>	8,580	7,814	9,706
<b>gCV intra</b>	100,77%		
<b>gCV inter</b>	68,76%		
<b>PI</b>	139,07%		

\*Resultados expressos em µg/mL; LIC = Limite inferior de controle; LSC = Limite superior de controle; gCV= coeficiente de variação geométrico; intra = precisão intraensaios; inter = precisão interensaios; PI = precisão intermediária

Com base nesses resultados foi necessário testar outra diluição, estreitando a faixa para uma diluição de 1:1,5 não seriada. Foram feitos 13 ensaios válidos (Quadro 10).

Quadro 10: Resultados do ensaio de potência *in vitro* Veneno Botrópico de Referência utilizando fator de diluição de 1:1,5

Ensaio	Potência	LIC	LSC
1	3,45	3,01	3,78
2	3,51	3,26	3,72
3	2,75	2,61	2,88
4	2,68	2,34	3,03
5	2,35	2,12	2,56
6	3,55	3,44	3,66
7	2,59	2,51	2,67
8	3,70	3,62	3,78
9	3,52	3,41	3,63
10	4,95	4,65	5,28
11	4,40	4,31	4,50
12	5,40	5,10	5,71
13	4,13	3,91	4,36
<b>Média</b>	3,61	3,41	3,81
<b>gCV intra</b>	14,76%		
<b>gCV inter</b>	27,79%		
<b>PI</b>	32,47%		

\*Resultados expressos em  $\mu\text{g/mL}$ ; LIC = Limite inferior de controle; LSC = Limite superior de controle; gCV = coeficiente de variação geométrico; intra = precisão intraensaios; inter = precisão interensaios; PI = precisão intermediária

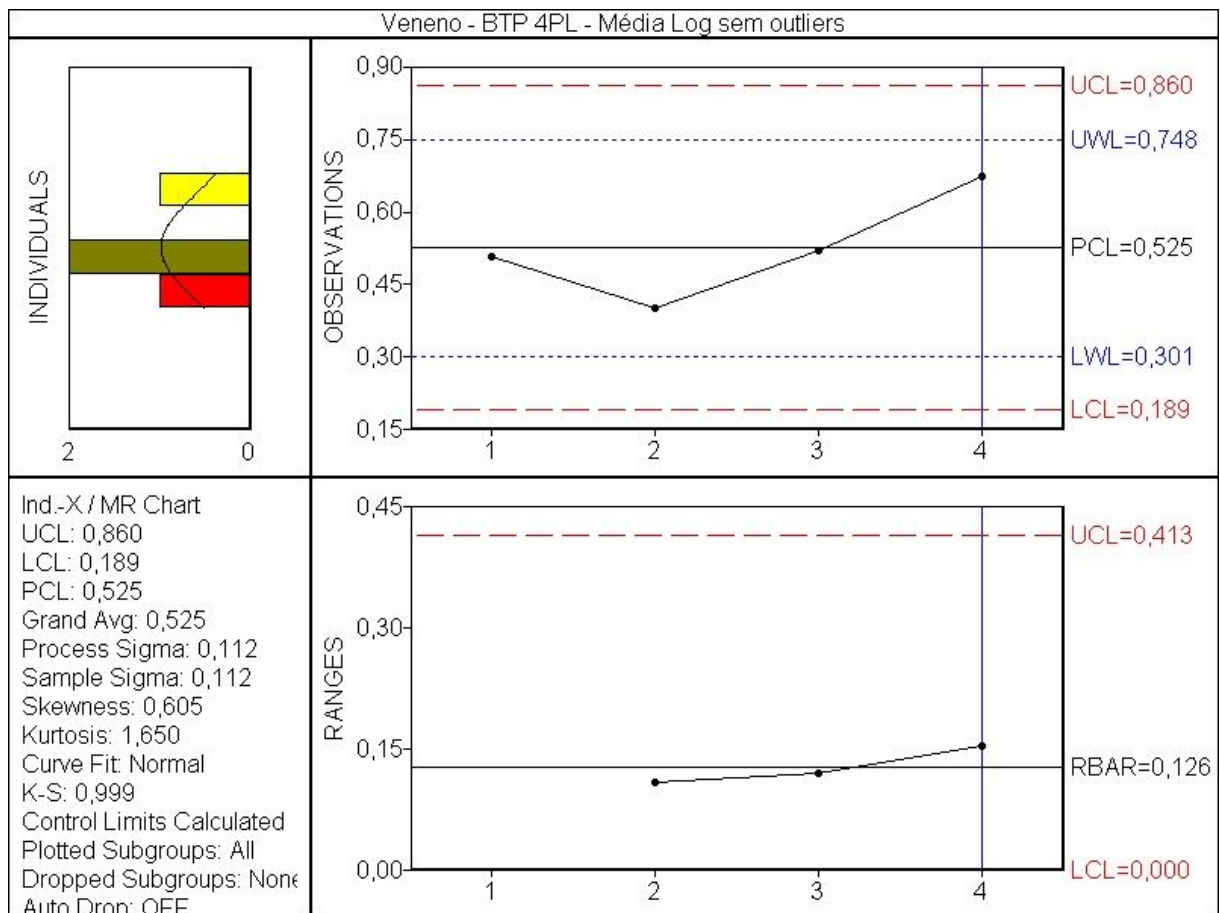
Para o controle dos ensaios de potência do veneno botrópico foram avaliados os resultados dos ensaios pelos gráficos de controle para medidas individuais e amplitudes móveis em ensaios biológicos (programa SPC-Explorer RT). Os valores obtidos ficaram dentro dos limites nos dois gráficos de controle. Quando as médias das replicatas do Veneno Botrópico foram plotadas, os valores obtidos ficaram dentro dos limites nos dois gráficos de controle. Os valores se mantiveram próximos à linha central do processo (PCL), que representa a média geral.

O segundo gráfico na Figura 32 é o controle de amplitudes móveis, que monitora a variação entre subgrupos consecutivos ao longo do tempo. Compara o segundo ensaio com relação ao primeiro e assim sucessivamente.

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S), que avalia quanto os dados obtidos se ajustam à distribuição normal, obteve um resultado igual a 0,999 o que é considerado um bom resultado.

Os resultados obtidos no intervalo de concentrações testado para as precisões foram: precisão intraensaios – gCV% de 14,76%; precisão interensaios – gCV% de 27,79% e precisão intermediária - gCV % de 32,47%. O estudo demonstrou que o método empregado é confiável para avaliar a potência *in vitro* do veneno botrópico e apresenta aplicabilidade na validação do ensaio.

Figura 32: Gráfico de Controle das Médias do Logaritmo (do valor +1) de BRA/BOT/05

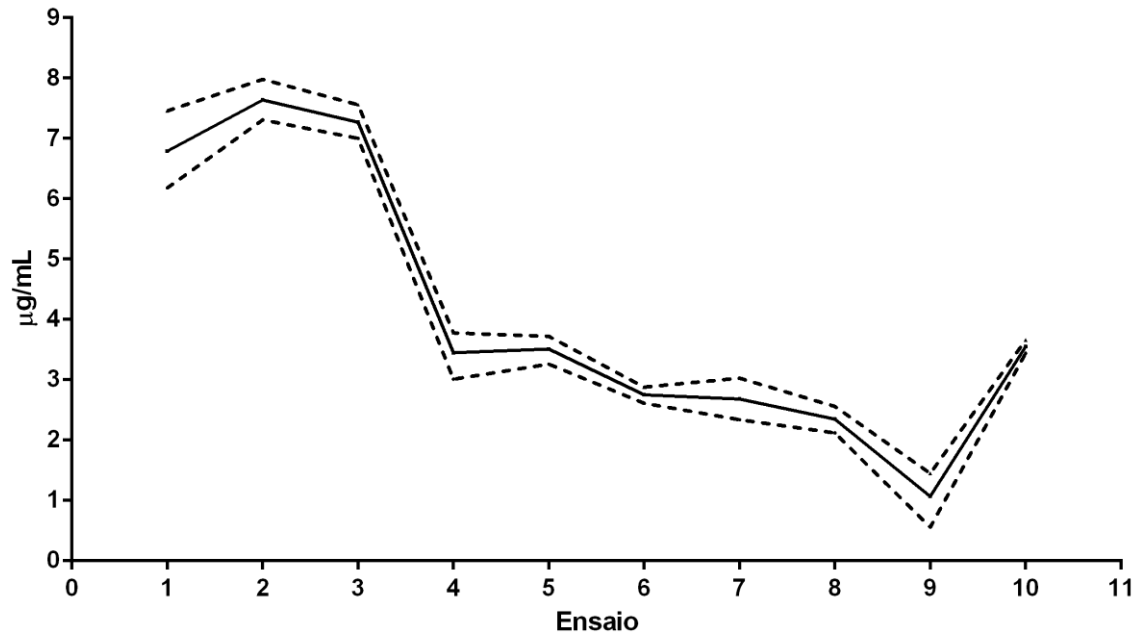


UCL = Limite superior de controle; UWL = Limite de alerta superior; PCL = Linha Central do Processo (Média Geral); LWL = Limite de alerta inferior; K-S = Kolmogorov-Smirnov



Para observarmos as precisões dos ensaios utilizamos o programa Graphpad Prism®. Na figura 33 podemos verificar a maior precisão intraensaios e maior dispersão dos resultados interensaios.

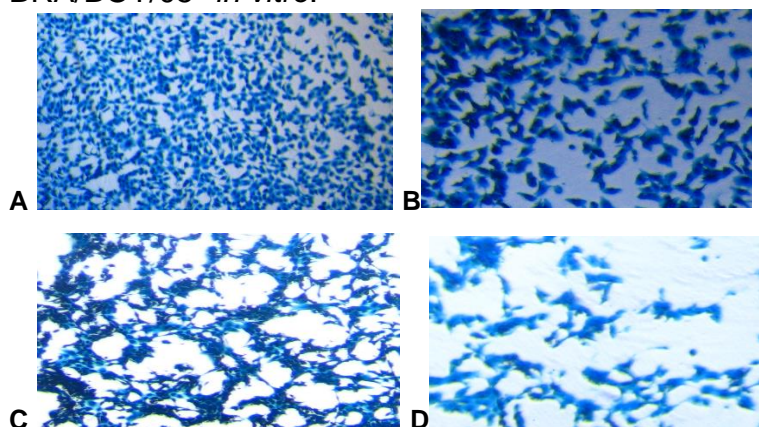
Figura 33: Gráfico estatístico BRA/BOT/05



## 4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EFEITO CITOTÓXICO DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA

Após a etapa de coloração foram fotografadas as células VERO para comparação entre o CC e o efeito citotóxico no FD 1:1,5 de veneno (Figura 34).

Figura 34: Fotomicrografias de células Vero coradas após o ensaio da potência do BRA/BOT/05<sup>1</sup> *in vitro*.



<sup>1</sup>Veneno Botrópico de Referência lote 5

**A:** Controle de células; **B** (1,56 µg/mL) – **C** (3,125 µg/mL) – **D** (6,25 µg/mL): sequência do efeito citotóxico da menor para a maior concentração de veneno. Corante: CBB-250 Aumento: 100x  
Créditos da imagem: Miguel Fialho

## 4.3 POTÊNCIA DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA

Com os resultados obtidos na etapa anterior, utilizando o fator de diluição de 1:1,5 a potência média do veneno botrópico *in vitro* (DC<sub>t50</sub>) foi 4,18 µg/mL.

## 4.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE DESAFIO DO VENENO BOTRÓPICO DE REFERÊNCIA

Para a determinação da potência do soro antibotrópico, avalia-se a atividade neutralizante de diluições do antiveneno frente a uma dose fixa do BRA/BOT/05 (dose desafio). Essa dose deve estar o mais próximo possível da Dose Citotóxica Mínima, ou seja, a menor dose capaz de provocar 100% do efeito tóxico.

Foi avaliada a toxicidade de 6 concentrações de Veneno Botrópico de Referência – 1DCt<sub>50</sub> até 6 DCt<sub>50</sub> - considerando-se a potência média (1DCt<sub>50</sub>) de 4,2 µg/mL calculada na etapa anterior. Podemos observar no quadro 11 os resultados agrupados por DCt<sub>50</sub>.

$$1DCt_{50} = 4,2 \text{ µg/mL}$$

$$2DCt_{50} = 4,2 \times 2 = 8,4 \text{ µg/mL}$$

$$3DCt_{50} = 4,2 \times 3 = 12,6 \text{ µg/mL}$$

$$4DCt_{50} = 4,2 \times 4 = 16,8 \text{ µg/mL}$$

$$5DCt_{50} = 4,2 \times 5 = 21 \text{ µg/mL}$$

$$6DCt_{50} = 4,2 \times 6 = 25,2 \text{ µg/mL}$$

Quadro 11: Citotoxicidade das DCt<sub>50</sub> do Veneno Botrópico de Referência

A		1DCt <sub>50</sub>	
ENSAIO	DO - BR	DO+1	log
1	0,566	1,566	0,195
2	0,430	1,430	0,155
3	0,839	1,839	0,265
4	0,632	1,632	0,213
5	0,797	1,797	0,255
6	0,803	1,803	0,256
7	0,408	1,408	0,149
8	0,322	1,322	0,121
9	0,645	1,645	0,216
10*	0,291	1,291	0,111
11*	0,573	1,573	0,197
<b>Média</b>	<b>0,573</b>	<b>gCV</b>	13,224

B		2DCt <sub>50</sub>	
ENSAIO	DO - BR	DO+1	log
1	0,017	1,017	0,007
2	0,011	1,011	0,005
3	0,036	1,036	0,015
4	0,015	1,015	0,006
5	0,022	1,022	0,009
6	0,012	1,012	0,005
7	0,036	1,036	0,015
8	0,008	1,008	0,003
9	0,090	1,090	0,037
10*	0,066	1,066	0,028
11*	0,026	1,026	0,011
<b>Média</b>	<b>0,031</b>	<b>gCV</b>	2,485

DO = Densidade óptica; DCt<sub>50</sub> = Dose citóxica

C		3DCt <sub>50</sub>	
ENSAIO	DO - BR	DO+2	log
1	0,009	2,009	0,303
2	-0,004	1,996	0,300
3	0,009	2,009	0,303
4	0,005	2,005	0,302
5	-0,002	1,998	0,301
6	0,012	2,012	0,304
7	0,003	2,003	0,302
8	-0,002	1,998	0,301
9	0,050	2,050	0,312
10*	0,034	2,034	0,308
11*	0,006	2,006	0,302
<b>Média</b>	<b>0,011</b>	<b>gCV</b>	0,823

D		4DCt <sub>50</sub>	
ENSAIO	DO - BR	DO+2	log
1	0,024	2,024	0,306
2	-0,007	1,993	0,300
3	0,011	2,011	0,303
4	-0,001	1,999	0,301
5	-0,009	1,991	0,299
6	-0,003	1,997	0,300
7	0,016	2,016	0,304
8	0,016	2,016	0,304
9	0,059	2,059	0,314
10*	0,042	2,042	0,310
11*	0,010	2,01	0,303
<b>Média</b>	<b>0,014</b>	<b>gCV</b>	1,045

DO = Densidade óptica; DCt<sub>50</sub> = Dose citóxica

Observando os resultados, podemos concluir que com 1DCt<sub>50</sub> obtivemos o efeito tóxico em 42,7% das células - 57,3% de células viáveis (Quadro 11 A). Com 2 DCt<sub>50</sub> (Quadro 11 B) obtivemos 96,9% de efeito citotóxico (viabilidade de 3,1%), portanto podemos concluir que 2 DCt<sub>50</sub> são suficientes para provocar um efeito citotóxico muito próximo de 100% e deve ser usada como a dose desafio.

Nos ensaios 10\* e 11\* (Quadro 11 A, B, C e D) para testar a termoestabilidade as diluições do veneno botrópico foram colocadas à 37 °C por 30 min antes da inoculação nas placas semeadas com células Vero. O intuito era observar se haveria queda da potência durante a incubação para soroneutralização. Não foi observada alteração nos resultados das potências após a incubação à 37 °C por 30 min (Quadro 12).

Quadro 12: Resultados das 6DCT<sub>50</sub> de BRA/BOT/05 após incubação à 37 °C por 30 min.

Inóculo	Ensaio 10		Ensaio 11	
	DO - BR	Log	DO - BR	Log
1 DCT <sub>50</sub>	0,291	0,110	0,573	0,196
2 DCT <sub>50</sub>	0,066	0,027	0,026	0,011
3 DCT <sub>50</sub>	0,034	0,014	0,006	0,002
4 DCT <sub>50</sub>	0,042	0,017	0,01	0,004
5 DCT <sub>50</sub>	0,02	0,008	0,005	0,002
6 DCT <sub>50</sub>	0,036	0,015	0,013	0,005

BRA/BOT/05= Veneno Botrópico de Referência; DO = densidade óptica; BR = branco.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO DE REFERÊNCIA (BRAAntiBOT/01)

Para a determinação da potência do BRAAntiBOT/01 foi realizada uma diluição seriada do soro com FD 1:5. Em seguida cada diluição foi homogeneizada e adicionada às doses fixas de veneno botrópico na proporção de 1:2. Apesar do protocolo de ensaio *in vivo* padronizar a soroneutralização incubando as diluições em estufa por 1h, nós nos baseamos na metodologia de Solano et al (2010). Este grupo de pesquisadores testou a neutralização em banho-maria a 37 °C por 0, 20, 60 e 120 min e não encontrou diferença significativa. Indicando que a interação entre as toxinas do veneno e as imunoglobulinas do soro acontecem logo após a homogeneização.

Foram calculadas as médias das triplicatas e replicatas. Foram analisados 11 ensaios válidos com a potência média de 0,126 µl/mL com LIC de 0,100 µl/mL e o LSC de 0,218 µl/mL. Os resultados obtidos demonstraram a boa precisão do método. O gCV intraensaio foi 7,52% e o gCV interensaio foi 7,59% (Quadro 13).

Quadro 13: Resultados da potência do Soro Antibotrópico de Referência

ENSAIO	POTÊNCIA*	LIC	LSC
1	0,078	0,121	0,188
2	0,032	0,045	0,061
3	0,168	0,226	0,301
4	0,118	0,075	0,185
5	0,146	0,117	0,183
6	0,207	0,148	0,290
7	0,085	0,029	0,239
8	0,191	0,079	0,458
9	0,122	0,088	0,166
10	0,119	0,083	0,171
11	0,121	0,090	0,158
<b>Média</b>	0,126	0,100	0,218
<b>gCV intra</b>	7,52%		
<b>gCV inter</b>	7,59%		
<b>PI</b>	10,86%		

\*Resultados expressos em  $\mu\text{l/mL}$ ; gCV = coeficiente de variação geométrico; intra = precisão intraensaios; inter = precisão interensaios; PI = precisão intermediária; LIC = Limite inferior de controle; LSC = Limite superior de controle.

O BRAAntiBOT/01 após soroneutralização foi capaz de neutralizar o efeito citotóxico do BRA/BOT/05. Quanto maior a concentração de BRAAntiBOT/01 maior a proteção às células. A diluição com maior concentração de soro obteve a DO mais próxima da DO do controle de células (controle negativo) exemplo destacado em azul no Quadro 14.

Quadro 14: Exemplo de soroneutralização do BRA/BOT/05

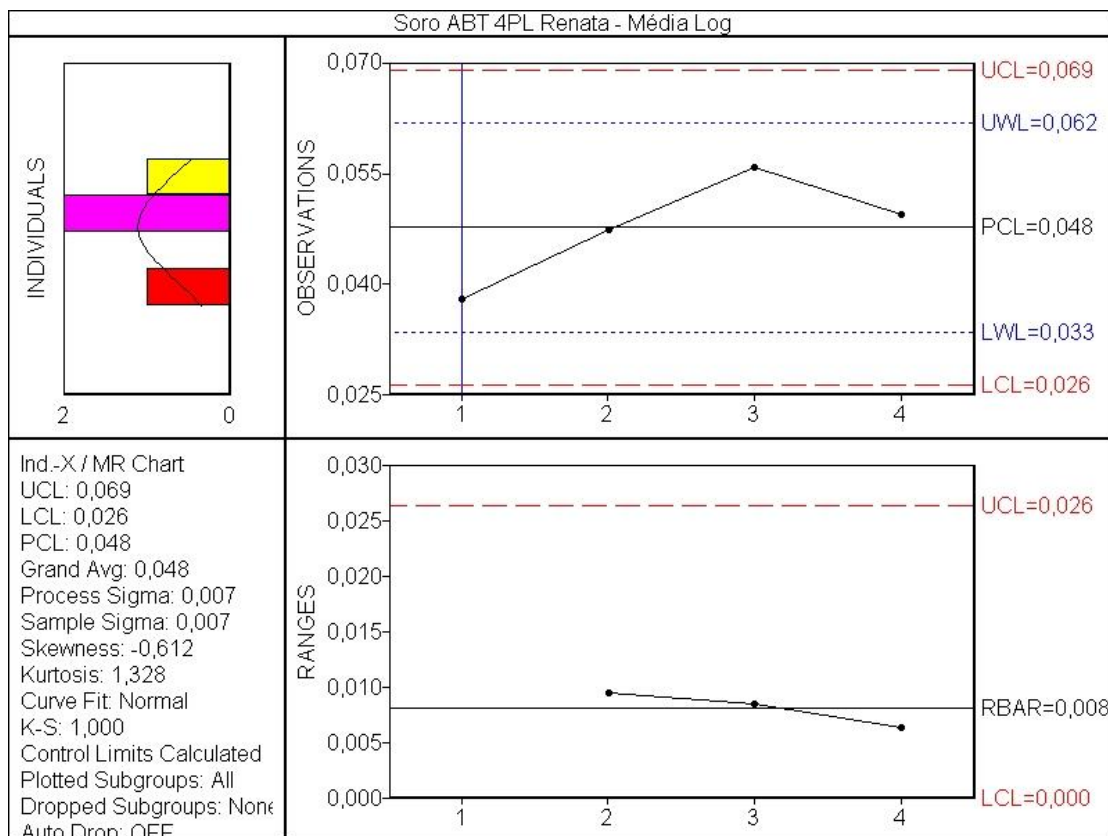
Inóculo	Triplícatas (DO)		
<b>CV</b>	0,256	0,277	0,268
<b>CC</b>	<b>1,634</b>	<b>1,626</b>	<b>1,726</b>
<b>10 <math>\mu\text{g/mL}</math>*</b>	<b>1,552</b>	<b>1,622</b>	<b>1,524</b>
<b>2 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	1,495	1,523	1,539
<b>0,4 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	1,446	1,297	1,254
<b>0,08 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	1,000	0,985	0,956
<b>0,016 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	0,924	0,713	0,469

CV = controle do veneno; CC = controle de células \* maior concentração de BRAAntiBOT/01

Para o controle dos ensaios de potência do soro antitoxotrópico foram analisados os resultados das médias dos ensaios. Os valores observados ficaram dentro dos limites de controle nos dois gráficos. O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) também obteve bom resultado igual a 1,000 (Figura 35).

Os resultados obtidos no intervalo de concentrações testado para as precisões foram: precisão intraensaios – gCV% de 7,52%; precisão interensaios – gCV% de 7,59% e precisão intermediária - gCV% de 10,86%. O estudo demonstrou que o método empregado é confiável para avaliar a potência *in vitro* de antiveneno botrópico e apresenta aplicabilidade na validação do ensaio.

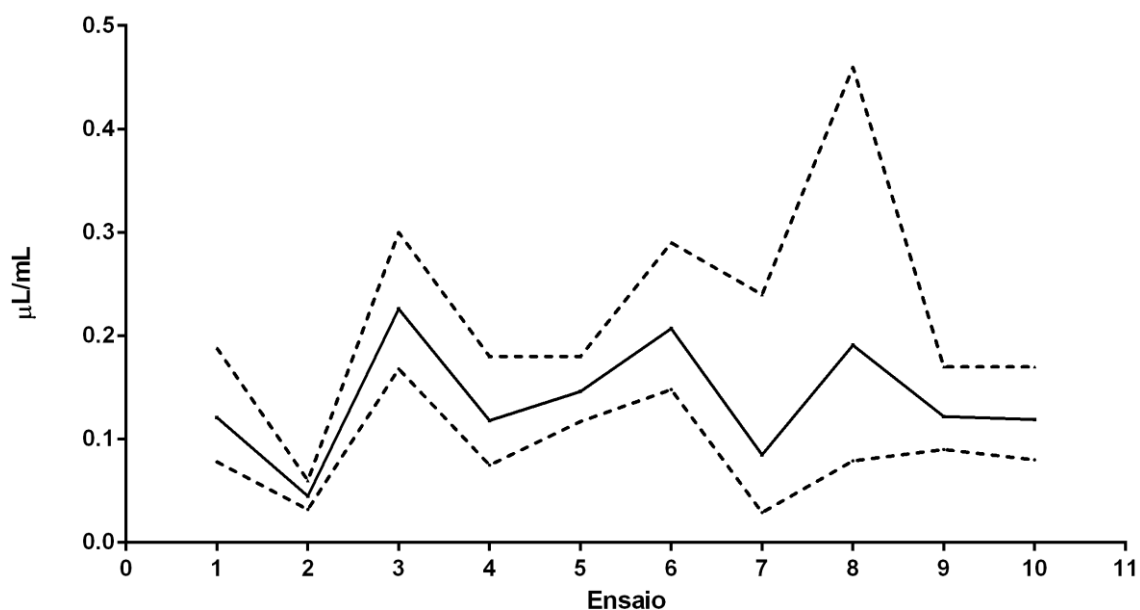
Figura 35: Gráfico de Controle das Médias do Logaritmo (do valor +1) de (BRAAntiBOT/01)



UCL = Limite superior de controle; UWL = Limite de alerta superior; PCL = Linha Central do Processo;  
 LWL = Limite de alerta inferior; K-S = Kolmogorov-Smirnov

Para observarmos as precisões dos ensaios utilizamos o programa Graphpad Prism®. Na figura 36 podemos verificar uma maior precisão interensaios.

Figura 36: Gráfico estatístico BRAantiBOT/01



#### 4.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA COLORAÇÃO INESPECÍFICA

Foi realizado um ensaio onde inoculamos meio de cultivo celular com diferentes concentrações de SFB (2%, 5% e 10%), com o objetivo de avaliar as causas da coloração inespecífica observada no controle branco. São mostrados no Quadro 15 os valores das leituras da DO.

Quadro 15: Resultados ensaio de coloração inespecífica

Inóculo	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Média
<b>Vazio</b>	0,191	0,182	0,171	0,177	0,186	0,179	0,194	0,158	0,210	<b>0,183</b>
<b>PBS</b>	0,154	0,167	0,155	0,155	0,169	0,205	0,156	0,138	0,178	<b>0,164</b>
<b>2%SFB</b>	0,330	0,293	0,287	0,282	0,282	0,269	0,338	0,301	0,309	<b>0,299</b>
<b>5%SFB</b>	0,350	0,335	0,311	0,312	0,327	0,313	0,369	0,335	0,322	<b>0,330</b>
<b>10%SFB</b>	0,322	0,318	0,318	0,388	0,369	0,357	0,344	0,355	0,350	<b>0,347</b>



O resultado demonstrou que mesmo nos poços vazios ou com PBS ocorre uma coloração mínima com médias de DO igual a 0,183 e 0,164 respectivamente. Em relação as diferentes concentrações de SFB também houve diferença sendo demonstrado que quanto maior a porcentagem de soro maior o valor da DO. Para o SFB à 2% obtivemos uma média de 0,299 com o limite inferior (LI) entre as replicatas de 0,282 e com limite superior (LS) entre as replicatas de 0,338. Com soro à 5% obtivemos a média de 0,330 sendo o LI = 0,312 e LS = 0,369. Com a porcentagem de 10% a média subiu para 0,347 com LI = 0,318 e LS = 3,69. Podemos observar no quadro 16 a análise da variância em relação à média dos grupos (2%, 5% e 10% de SFB).

Quadro 16: Grupos analisados

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
2%SFB	9	2,691	0,299	0,000531
5%SFB	9	2,974	0,330	0,000377
10%SFB	9	3,121	0,346	0,000582

Quadro 17: Anova

<i>Fonte da variação</i>	<i>Sjkn kQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,010615	2	0,005307	10,69156	0,000478	3,402826
Dentro dos grupos	0,011914	24	0,000496			
Total	0,022529	26				

Podemos observar no quadro 17 o valor de  $P < 5$  comprovando que houve diferença significativa entre os grupos.

Portanto, podemos concluir que ocorre coloração do fundo da placa mesmo quando vazios ou com PBS. Em relação às três concentrações de SFB quanto maior a concentração maior o valor da DO.

Comparando os resultados mostrados nos quadros 18 e 19 podemos afirmar que o método *in vitro* para potência do veneno e soro antitoxinótico apresentou um excelente grau de precisão.

Levando em consideração a precisão dos resultados obtidos pelo método *in vitro*, que se mostraram dentro do limite aceitável de potência e aliado à necessidade da redução no uso de animais, em cumprimento aos 3Rs, podemos destacar a relevância deste método em substituição ao método *in vivo*.

Quadro 18: Avaliação das precisões inter e intraensaios para BRA/BOT/05

<b>VENENO</b>	<b>IN VIVO INCQS</b>	<b>IN VIVO Lab*</b>	<b>IN VITRO INCQS</b>
<b>gCV inter<sup>2</sup></b>	3,51%	3,25%; 4,71%; 25,11%	<b>27,79%</b>
<b>gCV intra<sup>3</sup></b>	-	-	<b>14,76%</b>

\*= três laboratórios produtores; gCV = coeficiente de variação geométrico; intra = precisão intraensaios; inter = precisão interensaios

Quadro 19: Avaliação das precisões inter e intraensaios para BRAAntiBOT/01

<b>SORO</b>	<b>IN VIVO INCQS</b>	<b>IN VIVO Lab*</b>	<b>IN VITRO INCQS</b>
<b>gCV intra<sup>2</sup></b>	4,38%	8,47%, 10,51%, 20,5%	<b>7,52%</b>
<b>gCV inter<sup>3</sup></b>	3,51%	9,65%; 18,03%; 20,23%	<b>7,59%</b>

\*= três laboratórios produtores; gCV = coeficiente de variação geométrico; intra = precisão intraensaios; inter = precisão interensaios

## 5 DISCUSSÃO

Em todas as etapas da produção de veneno até a liberação dos lotes de antiveneno são utilizados animais: serpentes para extração de veneno, roedores para alimentação destas serpentes, animais de grande porte como cavalos para produção das imunoglobulinas e camundongos para testar DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> tanto pelos produtores como pelo controle da qualidade. Oficialmente o INCQS é a Unidade da Fiocruz responsável pelo controle da qualidade da produção nacional de antivenenos. Segundo a OMS é incontestável a necessidade de mudança e implantação dos 3Rs visando o bem estar animal.

Em outubro de 2016, a OMS publicou uma revisão de seu *guideline* com as principais recomendações voltadas justamente para o desenvolvimento de métodos alternativos e bem-estar animal. Podemos destacar:

- ❖ Os laboratórios de produção e controle de venenos e antivenenos devem pesquisar métodos de redução ao uso de animais, da forma mais ética possível;
- ❖ As diretrizes e regulamentações disponíveis atualmente devem ser cumpridas visando o bem-estar animal;
- ❖ Procedimentos alternativos que diminuam a dor, o sofrimento e o estresse físico e psicológico do animal devem ser desenvolvidos e validados.
- ❖ Os 3Rs devem ser aplicados no desenvolvimento de protocolos de DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> padronizados e validados (WHO, 2016).

O documento cita ainda esforços feitos no passado em busca de métodos alternativos a DL<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> e que infelizmente não prosseguiram até serem validados e colocados em prática. Neste sentido, o estudo detalhado nesta dissertação é a continuação desses esforços, mas ainda necessitamos cumprir algumas etapas antes de uma validação formal, todavia o INCQS está cumprindo sua missão institucional de garantir o controle da qualidade realizando os ensaios com animais ao mesmo tempo em que avança com as pesquisas de métodos para redução, refinamento e substituição.

## 5.1 Ensaios *in vivo* x *in vitro*

Em função da variabilidade genética apresentada pelas espécies de animais experimentais em relação à espécie humana, e considerando as determinações referentes à ética na experimentação animal, novas alternativas são pesquisadas para substituir o uso de animais em ensaios toxicológicos e de segurança de fármacos e cosméticos. Nesse contexto, vários métodos *in vivo* deverão ser substituídos por modelos *in vitro* ou *in silico*, e na impossibilidade de exclusão de modelos animais, tem-se buscado utilizar um número menor de animais ou até mesmo utilizar os mesmos animais para diferentes ensaios (não permitido para ensaio com veneno).

Os ensaios biológicos são muito difíceis de padronizar. A seleção dos animais é muito importante, mas ainda assim esbarramos com muitos empecilhos como metabolismo individual diferente, estresse dos animais, influência de ruídos, condições diferentes de habitat. Desta forma observa-se muitas interferências que incidem diretamente no resultado dos ensaios (RICHMOND, 2002). O efeito do veneno medido nos animais não é o mesmo efeito em humanos (JORGE; RIBEIRO, 1997). Não é possível reproduzir a via de inoculação do veneno que nos acidentes atinge 80% os membros inferiores e nos camundongos a inoculação é pela via intraperitoneal (SOLANO, 2010)

Segundo Cavalcanti (2011), as principais atividades enzimáticas presentes no veneno botrópico, responsáveis pelo efeito citotóxico observado em células Vero foram inibidas. A ortofenantrolina (O-PHE) inibiu as metaloproteases e o brometo de p-bromofenacila (p-BPB) inibiu as fosfolipases A2. Utilizando esses inibidores, a DC<sub>t50</sub> aumentou indicando que houve inibição da atividade citotóxica do veneno botrópico. Estas classes de toxinas são sabidamente responsáveis pelos principais efeitos tóxicos do veneno botrópico, associadas tanto à clínica do acidente humano, quanto à letalidade em camundongos (CHACÓN, 2015).

Neste trabalho foi demonstrado que o método proposto é capaz de quantificar o efeito citotóxico de metaloproteases e fosfolipases A2 presentes no veneno de *B. jararaca*. Portanto, os resultados do nosso estudo demonstraram a aplicabilidade do ensaio de citotoxicidade no controle da qualidade do veneno e antiveneno botrópicos.

Uma importante vantagem do método *in vitro* se faz através da economia de Veneno e Soro de Referência. Para o ensaio de potência do veneno botrópico *in vivo*

são utilizados 5 mL de veneno. Para o ensaio *in vitro* são utilizados 500 µL por ensaio. Para o ensaio de potência do soro antitoxínico *in vivo* são utilizados 1,4 mL de soro + 9,6 de veneno. Para o ensaio *in vitro*, são necessários 200 µL de soro + 848,4 µL de veneno por ensaio. A economia destes insumos é expressiva e seria vantajoso estender essa técnica para outros venenos, como por exemplo o veneno laquétrico.

Quadro 20: Vantagens e desvantagens das metodologias *in vivo* x *in vitro*

<b><i>IN VIVO</i></b>	<b><i>IN VITRO</i></b>
Utiliza animais	Não utiliza animais
Maior influência de variações externas tais como: luminosidade, temperatura, umidade, etc.	Mais fácil controlar os parâmetros: luz, umidade, temperatura e troca de ar.
Necessita de amplo espaço	Menor necessidade de espaço
Desgaste físico do técnico ao inocular em animais	Treinamento de pessoal mais acessível
Ensaio dependente de animais vindos de outra unidade da Fiocruz	Ensaio independente
Maior tempo para liberação dos resultados	Resultados liberados em menos tempo
Alto custo de manutenção de biotério	Custo mais baixo após validação
Necessidade de maior volume de Veneno de Referência	Economia de Veneno de Referência
Avaliação do organismo como um todo	Avaliação de partes dos mecanismos de ação.
Já implantado	Necessita validação formal o que torna o processo lento

Fonte: Elaborado pela autora.

Após essa mudança na faixa de diluição os resultados do gCV intraensaios caíram para 1,73% e gCv interensaios para 5,52%. Estes resultados demonstram a boa precisão intralaboratorial dos resultados do ensaio de potência *in vitro* do BRA/BOT/05 tendo em vista que a precisão apresentou os gCV inferiores à variabilidade de 50% descrita para ensaios biológicos.

A avaliação de desvios de linearidade foi conforme em todos os ensaios válidos, demonstrando que o efeito tóxico nas células é diretamente proporcional a concentração de veneno, ou seja, quanto maior a concentração de veneno no inóculo maior o efeito citotóxico.

Foi realizado um estudo interlaboratorial entre o INCQS e todos os laboratórios brasileiros produtores do soro antibotrópico. Foram avaliadas as metodologias *in vivo* da determinação das potências do Veneno de Referência e do Soro Antibotrópico de Referência.

Os resultados para o ensaio da potência *in vivo* do BRA/BOT/05 foram: gCV interensaios de 3,25% no laboratório 1; 3,51% no INCQS; 4,71% no laboratório 3 e 25,11% no laboratório 2. Para a potência *in vitro* do BRA/BOT/05, o gCV interensaios foi de 5,52%. Ao compararmos os resultados, no ensaio *in vivo* a precisão foi um pouco menor em três laboratórios, todavia um gCV interensaio *in vitro* de 5,52% é um ótimo resultado (Quadro 18). Estes resultados representam, em termos de ensaios biológicos, um desempenho muito bom, considerando-se que um CV de até 20% para imunoensaios como em ensaio imunoenzimático (ELISA) é um valor aceitável (ARK et al., 2000).

Para a potência *in vivo* do BRAAntiBOT/01, o gCV intraensaios foi de 4,38% no INCQS; 8,47% no laboratório 2; 10,51% no laboratório 3; 20,5% no laboratório 1. Para a potência do BRAAntiBOT/01 *in vitro*, o gCV intraensaios foi de 7,52%.

Em relação as precisões interensaios, o gCV foi de 3,51% no INCQS; 9,65% no laboratório 2; 18,03% no laboratório 1 e 20,23% no laboratório 3. Para a potência *in vitro* o gCV interensaios foi de 7,59%.

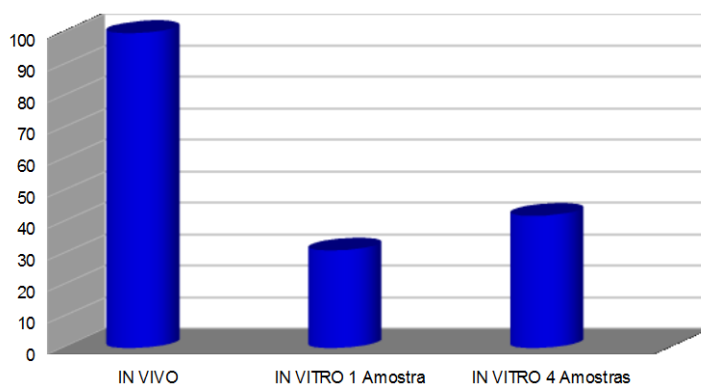
Ao compararmos os resultados obtidos no ensaio de potência do soro *in vivo* com os resultados obtidos *in vitro* podemos concluir que o gCV intraensaios *in vitro* foi um pouco acima do obtido no ensaio *in vivo* realizado pelo INCQS, mas mostrou uma precisão melhor do que as precisões dos três laboratórios produtores (Quadro 19).

## 5.2 CUSTOS

Foi feita uma avaliação de custos para as duas metodologias onde a metodologia *in vitro* se mostrou até 69% mais econômica, pois o custo unitário de uma determinação de potência do soro antibotrópico pelo método *in vivo* foi avaliado em R\$ 1.838,64 enquanto a determinação da potência de uma amostra de soro antibotrópico pelo método *in vitro* foi avaliada em R\$ 567,24 (Figura 37).

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\$ 1.838,64 para R\$ 801,96 por amostra e do ensaio *in vitro* de R\$ 567,24 para R\$ 332,52. Estes valores são de Maio de 2017.

Figura 37: Avaliação de custos do ensaio de determinação da potência do soro antibotrópico pelos métodos *in vivo* e *in vitro*.



## 5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisando os resultados das precisões intraensaios e interensaios, a metodologia proposta mostrou ser um bom candidato *in vitro* para a substituição do modelo murino na determinação da potência do veneno botrópico pela DC<sub>t50</sub> em substituição a Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>) e a Dose Inibitória 50% (DI<sub>50</sub>) que substituiria à Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>).

A aplicabilidade da metodologia da Potência Relativa *in vivo* foi avaliada em um estudo colaborativo com a participação de todos os laboratórios produtores nacionais. 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 BRA/BOT/05

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* de 0,126 µl/mL do mesmo soro de referência também corresponderia às mesmas 6,92 UN. Como a metodologia *in vitro* é mais sensível, utiliza uma quantidade menor de soro antibotrópico comparado ao utilizado *in vivo*, sendo assim, para fazermos a equivalência dos valores entre as metodologias devemos converter os valores para Unidades Neutralizantes.

Portanto, como a potência mínima para a liberação de lote do soro antibotrópico segundo a Farmacopeia 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 (ao Soro Antibotrópico de Referência - BRAantiBOT/01) em substituição à Potência Absoluta. Neste contexto, Fitzgerald et al (1978) recomenda a inclusão de 1 padrão de referência a cada ensaio como forma de controlar e auxiliar a medição desta variabilidade.

Portanto será necessário ainda finalizar os estudos da potência relativa ao soro antibotrópico e estudos interlaboratoriais antes de seguirmos para uma validação formal.



## 6 CONCLUSÕES

1 - Os resultados obtidos demonstram que o método proposto é um bom candidato a método alternativo ao ensaio murino, tanto para a determinação da potência do veneno botrópico quanto do soro antibotrópico.

2- Estes resultados credenciam a metodologia a prosseguir no processo de pré-validação (avaliação da potência relativa em amostras clínicas) e avaliação da reprodutibilidade interlaboratorial.

### DESCRIÇÃO DO PRODUTO TECNOLÓGICO

Ensaio de potência *in vitro* para o veneno botrópico e soro antibotrópico candidato a substituir o ensaio em camundongos, atualmente a metodologia oficial vigente na Farmacopeia Brasileira (2010). Este ensaio é utilizado no INCQS, conforme descrito no POP 65.3440.004, assim como pelos laboratórios produtores.

## REFERÊNCIAS

- ATCC. **VERO Cell**. Manassas, 2016. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 26 abr.2017.
- ANCHIETA, J. de. **Carta de São Vicente: 1560**. São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, 1997. (Série Documentos Históricos, 7). Disponível em: <[http://www.rbma.org.br/rbma/pdf/Caderno\\_07.pdf](http://www.rbma.org.br/rbma/pdf/Caderno_07.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- ANVISA. PORTARIA Nº 174, DE 11 DE NOVEMBRO DE 1996. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/324316/PORTARIA%2BN%25C2%25BA%2B174%2B96.pdf/fff9d152-6dbb-4436-a3e5-b184f6425d6e>>. Acesso em: 15 fev.2017.
- ARAUJO, H.P. et al. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. **Toxicon**, v. 51, p.502-514, 2008.
- ARK, van der A. et al. The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. **Biologicals**. v.28, p.105-118, 2000.
- BALLS, M. et al. 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.
- BALLS, M. et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, p. 129-147, 1995.
- BALLS, M; KARCHER, W. The validation of alternative methods. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.23, p. 884-886, 1995.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, Fev. 2003.
- BOCHNER, R. A. **Defesa Contra o Ophidismo: 100 anos depois: comentários**. Niterói: Instituto Vital Brazil, 2011.
- BORGES, R. C. **Serpentes Peçonhentas Brasileiras: Manual de identificação, prevenção e procedimentos em casos de acidentes**. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2001.
- BOURGUIGNON, S.C. et al. *Bothrops moojeni* venom peptides containing bradykinin potentiating peptides sequence. **Protein and Peptide Letter**, v. 8, p. 21-26, 2001.

BRASIL. Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília; 2011.

BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos sérums antipeçonhentos. **Revista Médica de São Paulo**, v.10, n.22, p. 457 - 462, 1907.

BRAZIL, V. **Ophidismo. Contribuição ao estudo do ophidismo**. São Paulo: Imprensa Médica. 1905. p. 241-7.

BURNOUF T. et al. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. **Biologicals**, v.32, p.115-128, 2004.

BURNOUF T. et al. Assessment of viral inactivation during pH 3.3 pepsin digestion and caprylic acid treatment of antivenoms. **Biologicals**, v. 35, p. 329-334, 2007.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, p.501-509. 2002.

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 do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.p. 367-379.

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 456-457.

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.

CAVALCANTI, D.F.B. **Avaliação da atividade citotóxica do veneno de *Bothrops jararaca***. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

CHACON, F. et al. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: Pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate *in vitro* assay. **Toxicon**. v. 93, p.41-50, 2015.

CHIPAUX, J. P. Snakes bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v.76, n.5, p. 515-524, 1998.

CONCEA. Normativas do CONCEA. Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008. Capítulo III. P. 12-13. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0238/238271.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238271.pdf)>. Acesso em: 10 fev.2017.

COUNCIL OF EUROPE. Assays depending upon quantal responses. (Chapter – General texts – 4). In: The European Pharmacopoeia, 5<sup>th</sup> ed. Strasbourg, France. 2005, p.484-486.

CURREN, R.D. *et al.* The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. **ATLA**, v. 23, p. 211-217, 1995.

FARMACOPEIA Brasileira. Soros Hiperimunes, 5<sup>a</sup> ed. Brasília, 2010. V.2; 1299p.

FITZGERALD, E. A. *et al.* Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. **Developments in biological standardization**, v. 40, p. 183, 1978.

FRANÇA, F. O. S.; MALAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.H. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, SP: Sarvier/FAPESP, 2003, p.72 – 86.

FRANCISCHETTI, I.M. *et al.* *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.

FUNASA. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

FUNED, Belo Horizonte, MG. 2014. **Cartilha Animais Peçonhentos**. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2010/03/cartilha.pdf>>. Acesso em 25 ago. 2015.

GUTIÉRREZ, J.M. *et al.* Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v.36 n. 11, p. 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 Myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. *et al.* Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v.56, p. 1223-123, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biological** v. 39, p. 129-142, 2011

HARMS, A. J. The purification of antitoxic plasma by enzyme treatment and heat denaturation. **Biochemical Journal**, v. 42, p.390-397, 1948.

HUANG, T.F. et al. 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.

IBAMA 2001, Instrução Normativa. Disponível em: <[http://www.zoo.ba.gov.br/wp-content/uploads/2015/01/2001\\_ibama\\_in\\_02-2001\\_marcacao-individual.pdf](http://www.zoo.ba.gov.br/wp-content/uploads/2015/01/2001_ibama_in_02-2001_marcacao-individual.pdf)> Acesso em: 14 abr.2017.

INSTITUTO BUTANTAN. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em 29 jun. 2015.

IVB. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <[http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/etapas\\_producao.html](http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/etapas_producao.html)>. Acesso em: 19 abr. 2017.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.43, n.1, p. , 1997.

LAZAR, A. et al. Inactivation of West-Nile virus during peptic cleavage of horse plasma IgG. **Biologicals**, v. 30, p. 163-165, 2002.

LI-GUO, J. et al. Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich domains of Atrolysin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 20, p.13094-13102, 1997.

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Quantification of Attached Cells in Tissue Culture Plates and on Microcarries. **Analytical Biochemistry**, v.181, p. 209-211, 1989.

MCT, RESOLUÇÃO NORMATIVA nº 17. Disponível em: <[http://www2.ib.usp.br/IB/files/Resolucao\\_Normativa\\_n\\_17.pdf](http://www2.ib.usp.br/IB/files/Resolucao_Normativa_n_17.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

MCT, RESOLUÇÃO NORMATIVA 18. Disponível em: <[http://www2.ib.usp.br/IB/files/RESOLUCAO\\_NORMATIVA\\_n\\_18](http://www2.ib.usp.br/IB/files/RESOLUCAO_NORMATIVA_n_18)>. Acesso em: 10 jan. 2017.

MELGAREJO-GIMÉNEZ. Animais de laboratório: criação e experimentação. ANDRADE, A.; PINTO, S. C. E; OLIVEIRA, R.S., (orgs). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 388. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-25.pdf>. Acesso em: 27 mai. 2017.

MELGAREJO. A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Cardoso et al. (Orgs.). Sarvier, São Paulo – SP. p. 33-61, 2003.

METZ, B. et al. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v.20, p. 2411-2430, 2002.

MPANDI M, SCHMUTZ P, LEGRAND E, DUC R, GEINOZ J, HENZELIN-NKUBANA C, et al. Partitioning and inactivation of viruses by the caprylic acid precipitation

followed by a terminal pasteurization in the manufacturing process of horse immunoglobulins. **Biologicals**, v. 35, p.335-341, 2007.

MS/SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>>. Acesso em: 23 abr.2017.

OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Handbook of Toxicology. New York, Marcel Decker 1990. p. 601-654.

POPE, C.G. Segregation of proteins by enzymes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 19, p.245-251, 1938.

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.

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.

RICHMOND, J. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. **ILAR Journal**, v. 43, suppl: S63-S68, 2002.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <[http://altweb.jhsph.edu/publications/humane\\_exp/het-toc.htm](http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm)>. Acesso em: 25 abr.2017.

SBCAL. Sociedade Brasileira de Ciências em animais de Laboratório. Princípios Éticos. Disponível em: [http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=65](http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65)>. Acesso em: 25 abr.2017.

SBH, 2014. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia COSTA, H.C.; BERNILS, R. S. (org). Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/repteis>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

SELLS, P.G. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. **Toxicon**, v. 42, p. 115-133, 2003.

SINITOX. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/media/serpentes.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

SOLANO, G. et al. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. **Biologicals**, v.38, p. 577-585, 2010.

THEAKSTON, R.D.G. et al. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p. 550–554, 1995.

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.

WHO, Geneva. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting**, January 2007.

WHO, Geneva. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenoms immunoglobulins. **Expert Committee on Biological Standardization**, 17 to 21 October 2016.

WHO, Geneva. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenoms immunoglobulins. **Technical Report Series 964**, p. 57-219, 2012.

WOOD, R.J.; DURHAM, T.M. Reproducibility of serological titers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 541-545, 1980.

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.

## APÊNDICE A – PREPARO DE SOLUÇÕES UTILIZADOS NO ENSAIO DE POTÊNCIA *IN VITRO* PARA O VENENO E ANTIVENENO BOTRÓPICO

a) PBS:

NaCl – 24 g

KCl – 0,6 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O – 3,43 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,6 g

H<sub>2</sub>O 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

H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 mL

Estocar a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

d) SDS 1%:

SDS – 10 g

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 mL

Estocar em geladeira.

Colocar em banho maria por 15 min ou retirar da geladeira 2h antes de usar.



## ANEXO A – Preparo de soluções utilizadas para manutenção das células

Soluções estoque para solução salina balanceada e solução salina balanceada livre de Cálcio e Magnésio (BSS.CMF)

Solução A - 20 vezes concentrada

Cloreto de Sódio (NaCl)	80g
Cloreto de Potássio (KCl)	4g
Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3,9g
Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	500mL

Estocar em refrigerador (2 a 8°C). Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos, como alternativa à filtração.

Solução B - 20 vezes concentrada

Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,16g
Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	3,9g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	500mL

Estocar em refrigerador (2 a 8°C). Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos, como alternativa à filtração.

Solução C - 20 vezes concentrada

Glicose (Glucose ou Dextrose)	11g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	500mL

Estocar em refrigerador (2 a 8°C).

Solução D - 400 vezes concentrada

Vermelho de Fenol	1g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	100mL

Solubilizar em água alcalinizada com NaOH 1N e completar o volume.

Estocar em refrigerador (2 a 8°C).

Esta solução não precisa ser estéril.

Solução E - 20 vezes concentrada

Sulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	1g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	500mL

Estocar em refrigerador (2 a 8°C). Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos, como alternativa à filtração.

a) BSS.CMF 1x

Solução A	50,0mL
Solução C	50,0mL
Solução D	0,25 mL
Solução E	50,0 mL
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	1000,0mL

Acertar pH para  $7,0 \pm 0,5$ . Estocar em refrigerador (2 a 8°C).

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1 \mu\text{m}$ .

b) Tripsina 0,05%(p/v) / EDTA 0,02%(p/v)

Solução A	50,0mL
Solução C	50,0mL
Solução D	0,25 mL
Solução E	50,0 mL
Tripsina 1:250	0,5g
EDTA	0,2g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	1000,0mL

Ajustar pH entre  $7,0 \pm 0,5$ . Estocar em freezer, em temperatura inferior a  $-15^{\circ}\text{C}$ .  
Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

c) Glutamina levógena (L-Glu) 200mM

L-Glutamina	29,23g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	1,0L

Estocar em freezer, em temperatura inferior a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

d) Penicilina sódica - PS 100x

Penicilina sódica ou potássica	1.000.000UI (corresponde aproximadamente a 0,6g)
Sulfato de estreptomicina	1,0g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	100,0mL

Estocar em freezer, em temperatura inferior a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

e) Anfotericina B 0,025% p/v

Anfotericina B	0,1g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	178,0mL

Estocar em freezer, em temperatura inferior a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

Nota: Esta formulação é específica para reagente do fabricante Sigma (código A9528).

f) HEPES 1M

HEPES	47,06g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	200,0mL

Estocar em refrigerador (2 a  $8^{\circ}\text{C}$ ).

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

g) Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 7,5% p/v

Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )	7,5g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	100,0mL

Estocar em refrigerador (2 a  $8^{\circ}\text{C}$ ).

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

h) Meio DMEM 1x

Meio base	134,7g
H <sub>2</sub> O deionizada q.s.p.	10L

Ajustar pH entre  $6,0 \pm 0,5$

Estocar em refrigerador (2 a  $8^{\circ}\text{C}$ ).

Esterilizar em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,1\mu\text{m}$ .

Nota: Esta formulação é específica para preparo de acordo com instruções do fabricante Sigma (Código D-7777).

Quando for necessário ajustar o pH das soluções utilizar:

j) Para aumentar o pH:

Hidróxido de Sódio 1N (NaOH 1N)

Hidróxido de Sódio (NaOH) 4g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 1L

Estocar em refrigerador (2 a 8°C).

j) Para abaixar o pH:

Ácido Clorídrico 1N (HCl 1N)

Acido Clorídrico (HCl) 37% (12N) 5mL

H<sub>2</sub>O ultrapurificada q.s.p. 60mL

Estocar em refrigerador (2 a 8°C).