

Métodos alternativos para determinação da potência de veneno e antiveneno botrópico: aplicações e perspectivas para o controle da qualidade

Alternative methods for potency evaluation for *Bothrops* venom and antivenom: applications and perspectives for quality control

RESUMO

Renata Norbert Costa Nundes^{I,II,*} 

Humberto Pinheiro de Araújo^I 

Gutemberg Gomes Alves^{III} 

Isabella Fernandes Delgado^I 

Octavio Augusto França Presgrave^{I,IV} 

Wlamir Corrêa de Moura^{I,IV} 

Marcelo Salabert Gonzalez^{V,VI,VII} 

Introdução: Acidentes com animais peçonhentos são classificados como doenças tropicais negligenciadas e são atualmente a mais frequente causa de intoxicação em humanos no Brasil. O único tratamento disponível é a rápida administração de antivenenos específicos e de qualidade garantida. Para assegurar a eficácia e a segurança desses produtos, são realizados ensaios de determinação da potência *in vivo* para veneno e antiveneno, desde as etapas de produção até sua liberação final. Apesar dos diversos estudos sobre métodos alternativos ao ensaio murino, nenhum método foi efetivamente validado. **Objetivo:** Compilar os métodos alternativos desenvolvidos para os antivenenos botrópicos, avaliando sua disponibilidade, perspectivas e aplicações em laboratórios de produção e controle da qualidade. **Método:** Foi realizada uma busca nas bases PubMed, BVS e Scopus entre novembro de 2021 e junho de 2022. Foram identificados 89 trabalhos, dos quais 31 foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade. **Resultados:** Nos métodos alternativos identificados, observamos a preferência de 42,80% dos estudos por metodologias que utilizem linhagens celulares como método alternativo aos ensaios murinos, sendo que a maioria destes trabalhos 58,30% optou pela linhagem celular Vero. **Conclusões:** Pela diversidade das toxinas encontradas em cada gênero de serpentes, entende-se que é de extrema importância que o ensaio de potência dos antivenenos tenha como base a avaliação e a quantificação precisa da inibição da atividade biológica dos venenos. Ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados e têm acumulado evidências de sua adequação como importante ferramenta alternativa ao ensaio murino para o controle da qualidade de veneno e antiveneno antibotrópico.

PALAVRAS-CHAVE: Métodos Alternativos; Veneno Botrópico; Antiveneno Botrópico; Controle da Qualidade

ABSTRACT

Introduction: Accidents with venomous animals are classified as neglected tropical diseases and are currently the most frequent cause of intoxication in humans in Brazil. The only available treatment is the rapid administration of specific, quality-assured antivenoms. To ensure the efficacy and safety of these products, *in vivo* potency determination tests for venom and antivenom are performed during the production stages, until final release. Despite several studies on alternative methods to the murine assay, no method has been effectively validated. **Objective:** To compile alternative methods developed for *Bothrops* antivenoms, assessing the availability of the methods and the prospects and applications in *Bothrops* venom and antivenom production and quality control laboratories. **Method:** A search was conducted in PubMed, BVS, and Scopus databases between November 2021 and June 2022. 89 articles were identified, of which 31 were selected according to the eligibility criteria. **Results:** We observed in the alternative methods identified a preference of 42.80% of the studies for methodologies that use cell lines as an alternative

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

^{III} Departamento de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

^{IV} Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^V Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{VI} Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{VII} Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Física Aplicada, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

* E-mail: renata.nundes@incqs.fiocruz.br

Recebido: 29 mar 2022

Aprovado: 10 ago 2022

Como citar: Nundes RNC, Araújo HP, Alves GG, Delgado IF, Presgrave OAF, Moura WC, Gonzalez MS. Métodos alternativos para determinação da potência de veneno e antiveneno botrópico: aplicações e perspectivas para o controle da qualidade. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 10(3):106-121, agosto 2022. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.02055>



method to the murine assays, and most of these works (58.30%) opted for a VERO cell line. **Conclusions:** Due to the diversity of toxins found in each genus of snakes, it is understood that the potency assay for antivenoms should be based on the evaluation and precise quantification of the inhibition of biological activity of venoms. Cytotoxicity assays are widely used and have been accumulating evidence of their suitability as an important alternative tool to the murine assay for quality control for *Bothrops* venom and antivenom.

KEYWORDS: Alternative Methods; Bothrops Venom; Bothrops Antivenom; Quality Control

INTRODUÇÃO

Serpentes de importância médica responsáveis pelos acidentes com envenenamento em humanos são encontradas em cerca de 160 países e observa-se uma incidência elevada, o que é um grave problema de saúde pública na África, Oriente Médio, Ásia, Oceania e América Latina¹. Ocorrem no mundo anualmente cerca de 2,7 milhões de envenenamentos por picada de serpentes, acarretando de 81 mil a 138 mil mortes por ano. Quase 7.400 homens, mulheres e crianças são picados diariamente e, dentre os acidentados, cerca de 380 morrem². Segundo os últimos dados disponíveis no Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, acidentes com animais peçonhentos ultrapassaram as intoxicações por medicamentos e já são a primeira causa de intoxicação em seres humanos, com 35,25% dos casos notificados no Brasil³. O envenenamento por picadas de serpentes pode matar até seis vezes mais pessoas se comparado a outras doenças existentes nos países tropicais em desenvolvimento⁴. Atualmente os acidentes ofídicos continuam negligenciados ainda que as taxas de incidência e mortalidade sejam superiores às das outras doenças tropicais negligenciadas. Embora haja uma série de fatores contribuindo para a elevada incidência, somente em 2018 os acidentes por picadas de serpentes foram elevados para a Categoria A na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas². A ocorrência desses acidentes ofídicos predominantemente em países pobres soma-se com outros problemas de saúde pública como doenças endêmicas causadas por vetores, doenças parasitárias e tuberculose⁴.

Nos objetivos da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável⁵, é previsto fomentar esforços internacionais visando melhorar a disponibilidade e acessibilidade de antivenenos seguros e eficazes para todos. Nesse sentido, é imprescindível que a produção e a qualidade de antivenenos atendam aos padrões internacionalmente aceitos, através da cooperação entre academia, indústria, instituições públicas e privadas para inovação e modernização^{6,7,8}.

Os antivenenos são classificados como produtos biológicos por serem produzidos a partir das imunoglobulinas obtidas de animais hiperimunizados com antígenos específicos de uma ou mais espécies de serpente. Consequentemente, estes produtos podem apresentar variações que tornam imprescindível a análise de cada lote produzido⁹. Em relação ao gênero *Bothrops*, cada mililitro do antiveneno deve conter imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg do veneno. No Brasil, o Instituto Butantan (IB) em São Paulo, o Instituto Vital Brazil (IVB) em Niterói/Rio de Janeiro, a Fundação Ezequiel Dias (Funed) em Belo Horizonte (MG) e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CCPI) do Paraná são os laboratórios públicos responsáveis pela produção de antivenenos,

dentre outros imunobiológicos. Já o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS - Fiocruz) no Rio de Janeiro é o laboratório público de referência nacional responsável pelo controle da qualidade dos antivenenos e produtos sujeitos a vigilância sanitária^{10,11,12}.

Em todas as etapas da produção de veneno até a liberação dos lotes de antivenenos, são utilizados animais, tanto pelos produtores como pelo controle da qualidade oficial: serpentes para extração de veneno, roedores para alimentação destas serpentes, animais de grande porte como cavalos para produção das imunoglobulinas e camundongos para a testagem de Dose Letal 50% (DL₅₀) e Dose Efetiva 50% (DE₅₀). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é incontestável a necessidade de mudança e a implantação de métodos 3Rs visando o bem-estar animal^{5,13}. Importantes questões ligadas à experimentação animal incluem também: (i) a variabilidade genética apresentada pelas espécies de animais experimentais em relação à espécie humana; (ii) as determinações referentes à ética na experimentação animal; (iii) o desenvolvimento de novas alternativas para substituir o uso de animais em ensaios toxicológicos; e (iv) a segurança de fármacos. 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 uma quantidade menor de animais ou até mesmo utilizar os mesmos animais para diferentes ensaios (procedimento não permitido para ensaios com venenos)^{8,13}.

Desde 2001, a OMS recomenda o desenvolvimento de métodos alternativos ao modelo de letalidade murina DL₅₀ e DE₅₀. É consenso que os ensaios murinos *in vivo* causam sofrimento aos animais, são onerosos e apresentam pequena ou nenhuma correlação com o envenenamento e terapia em humanos. Assim, o Comitê de Padronização Biológica da OMS considera 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”¹⁴.

Há décadas, existem 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 DL₅₀ e DE₅₀. 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 utilizam sistemas *in vitro* em substituição ao ensaio de letalidade murina para a determinação



da potência de antivenenos. Infelizmente, estes sistemas não são ainda oficialmente validados como substitutos aos ensaios murinos^{15,16}. Deve-se, no entanto, considerar que ensaios *in vivo* ou *in vitro* apresentam limitações técnicas inerentes. Os protocolos de inoculação de veneno e veneno/antiveneno por via intraperitoneal em camundongos não reproduzem a situação natural. Os acidentes atingem os membros inferiores em 80% dos casos, além de envolverem inoculação por via intradérmica e/ou intramuscular, enquanto nos camundongos, o ensaio é realizado pela via intraperitoneal ou endovenosa¹⁷. Portanto, cuidados devem ser tomados para evitar extrapolações simplistas destes ensaios para a situação clínica. Além disso, a resposta fisiológica de roedores ao envenenamento e terapia pode diferir significativamente do ocorrido em humanos. Estas limitações fazem com que o modelo murino reproduza o envenenamento e o tratamento em humanos aquém do ideal¹⁸. Entretanto, os ensaios de DL₅₀ e de DE₅₀ permanecem os métodos oficiais para a determinação da potência sendo ainda amplamente utilizados por serem os únicos ensaios descritos na Farmacopeia Brasileira^{11,15,16,19} e em vários estudos clínicos demonstraram que a DE₅₀ é bastante útil, porém não infalível ao prever a eficácia dos antivenenos na prática clínica.

O desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais na avaliação da potência dos antivenenos deve ser encorajado, fazendo-se necessário que as potenciais alternativas sejam 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 das 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 propostos¹⁶.

Ainda que não tenham ocorrido iniciativas coordenadas e padronizadas de validação dos testes *in vitro* para a substituição do uso de animais em antivenenos botrópicos, a literatura científica apresenta diversos estudos independentes, apresentando avaliações de diferentes métodos. Conhecer essas evidências pode trazer uma maior compreensão sobre sua adequabilidade, eficácia e limitações, apontando caminhos para futuros estudos de validação. Nesse contexto, esta revisão pretendeu compilar os métodos alternativos desenvolvidos para os antivenenos botrópicos, avaliando a disponibilidade dos métodos, as suas perspectivas e aplicações no controle da qualidade de veneno e antiveneno botrópico.

MÉTODO

Uma pesquisa foi realizada entre novembro de 2021 e junho de 2022 nas bases de dados: PubMed (Medline), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Scopus. Durante a busca eletrônica, os seguintes termos livres foram usados: “*Bothrops*”, “*Bothrops jararaca*”, “antivenom”, “*in vitro*”, “cell based”, “potency”, “potency evaluation” e “neutralizing potency”, gerando as seguintes chaves de busca:

- PubMed: (*Bothrops jararaca* or *Bothrops* or jararaca) [tiab] AND (*in vitro* or cell based) [tiab] AND (potency or neutralizing potency) [tiab];

- BVS: (*Bothrops jararaca* or *Bothrops* or jararaca) AND (*in vitro* or cell based) AND (potency or neutralizing potency);
- Scopus: (*Bothrops* AND “*in vitro*” AND neutralizing potency).

Crítérios de elegibilidade

Os critérios de elegibilidade para inclusão de estudos abrangem artigos em inglês, espanhol ou português, de acordo com os critérios modificados de PIO, em que: P (população) = cultura de células, plasma, ovos; I (intervenção) = testes *in vitro*; O (desfecho) = determinação da potência de antiveneno botrópico.

Os seguintes critérios de exclusão foram aplicados aos estudos: estudos sobre o efeito do veneno em outros organismos, estudos nos quais o ensaio *in vitro* consistia apenas de pré-incubação para o ensaio *in vivo*, estudos nos quais a finalidade era avaliação de moléculas, mediadores de inflamação, efeito de um componente do veneno e alvos terapêuticos, estudos de refinamento do método *in vivo*, além de artigos fora de tópico.

Seleção e extração de dados

Todos os títulos e resumos dos artigos foram avaliados e selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade. As duplicatas foram excluídas usando o gerenciador de referências Zotero® que compara os títulos, o *International Standard Book Number* (ISBN) e o *Digital Object Identifier* (DOI). Em seguida, os artigos que não foram excluídos durante a avaliação dos resumos foram lidos e julgados de acordo com os critérios de elegibilidade, tipo de metodologia realizada, principais resultados obtidos e perspectivas para implantação. Para extração de dados, itens de informação científica e técnica foram tabulados e analisados no Microsoft Office Excel 2013. Os dados extraídos incluíram o ano de estudo de publicação, autor, matrizes biológicas, países de origem das serpentes, metodologia utilizada, finalidade do estudo e desfechos dos estudos.

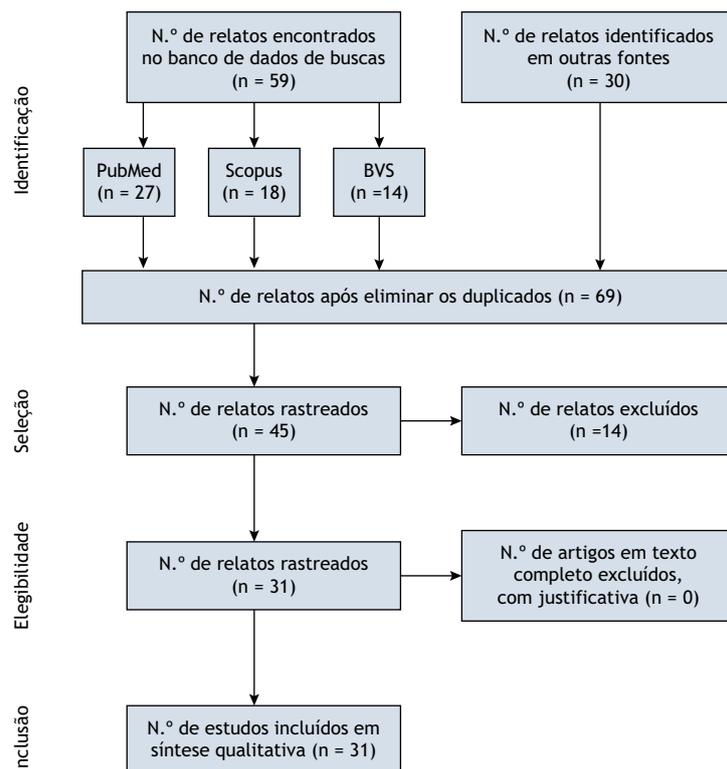
RESULTADOS

Pesquisa de banco de dados

A busca eletrônica encontrou 89 trabalhos científicos. Um registro de patente foi encontrado em outra fonte de pesquisa e incluído manualmente nos artigos selecionados. Após a exclusão das duplicatas, um total de 69 trabalhos foi avaliado para elegibilidade aplicando os critérios de exclusão. Destes, 24 não atenderam aos critérios definidos previamente e 45 trabalhos foram posteriormente analisados. Após a leitura completa, 31 trabalhos foram selecionados. Portanto, 58 foram excluídos do estudo porque não atenderam aos critérios de elegibilidade (Figura 1).

Análise dos artigos selecionados

No Quadro, encontram-se descritas as características dos estudos incluídos, como: autor, ano de publicação, objetivo do estudo e os principais achados.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.
N.º: número; BVS: Biblioteca Virtual em Saúde.

Figura 1. Fluxograma do processo de triagem e seleção dos artigos utilizando modelo Prisma²⁰.

Analisando os 31 artigos selecionados, três deles são de revisão^{7,9,49}, portanto 28 efetivamente utilizaram matrizes biológicas em testes. Observamos a preferência de 42,80% dos estudos por metodologias que utilizem linhagens celulares como método alternativo aos ensaios em murinos (12 de 28 artigos)^{13,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31}, 25,00% utilizaram plasma^{32,33,34,35,36,37,38}, 14,28% utilizaram venômica^{42,43,44,49}, 10,70% utilizaram gelatina^{39,40,41}, 7,10% utilizaram enzimas^{45,46}, enquanto um único estudo (3,50%) utilizou anticorpos⁴⁷ e outro utilizou sangue em papel filtro⁴⁸.

Outra abordagem são os ensaios encontrados que medem a coagulação sanguínea^{32,33,34,35,38}. Destes, quatro estudos utilizaram plasma humano^{32,33,35,38}, um estudo utilizou plasma aviário³⁴ e um trabalho de plasma humano realizou em paralelo um ensaio com fibrinogênio bovino³³. Outros três ensaios mediram o diâmetro do halo hemolítico na degradação de gel de agarose^{39,40,41}. Encontramos ensaios comparando dois métodos^{24,25,48} e até três métodos^{34,45,47}.

No entanto, novas técnicas de venômica estão sendo investigadas buscando elucidar a complexidade na composição dos venenos, na identificação das variações interespecies e intra-especies observadas a partir da origem geográfica e do estágio de desenvolvimento das serpentes^{42,43,44}. O estudo das proteínas e peptídeos do veneno bruto chama-se proteômica e, aliados a essa técnica, estão os bancos de dados e algoritmos facilitando o mapeamento da composição de cada veneno⁴⁹.

Convém destacar que a maioria dos autores realizou estudos de citotoxicidade, por meio do qual avaliaram a função metabólica ou a integridade da membrana em células viáveis expostas previamente ao veneno botrópico, enquanto outros trabalhos abordaram a quantidade de células vivas após a exposição. Foram utilizadas linhagens de células musculares (C2C12), mimetizando a ação do veneno nos músculos; linhagens de células renais (Vero) que podem simular os efeitos tóxicos dos venenos botrópicos; células de macrófagos murinos obtidas da cavidade peritoneal (RAW 264.7) sabidamente envolvidas nos processos inflamatórios e de necrose, células endoteliais de camundongo que formam o epitélio de revestimento interno de veias e do coração (tEND), células tumorais (MGS0-3), além de células já padronizadas em estudos de viabilidade como HeLa.

As metodologias utilizadas foram: I) Método de redução MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio) no qual o corante é reduzido a formazan apenas nas células vivas; II) Método azul de tripan que avalia o número de células viáveis; III) Medição da liberação de lactato desidrogenase (LDH), enzima esta que é liberada quando ocorre dano à membrana plasmática; IV) Método de conversão de resazurina em resorufina por células vivas; V) Técnica de quantificação de células com corante Azul Brilhante de Coomassie (CBB R-250) que cora proteínas e lipídios celulares.

Dentre os 28 trabalhos, 18 compararam métodos *in vitro* com o método *in vivo*^{13,21,22,23,24,26,29,30,31,33,34,35,37,39,40,41,47,48} (Figura 2).



Quadro. Artigos incluídos na revisão e suas características de acordo com autor, ano de publicação, objetivo do estudo e principais achados.

Autor	Ano	Objetivo do estudo	Principais achados
Williams et al. ⁷	2019	Revisão sobre os desafios e as estratégias a serem adotadas para prevenção, controle e redução dos acidentes com serpentes.	Compilaram as principais ações globais a serem coordenadas pela OMS com base em quatro pilares: I) garantir tratamento seguro, eficaz, acessível a todos; II) capacitar e engajar as comunidades; III) fortalecer os sistemas de saúde; IV) captação de recursos para implantação do roteiro.
Nundes ¹³	2017	Pré-validar ensaio <i>in vitro</i> para determinação da potência de veneno e antiveneno botrópico.	O método proposto demonstrou a capacidade do veneno botrópico de provocar efeito citotóxico em células Vero e comprovou confiabilidade nas precisões intra-ensaios e interensaios. Os resultados credenciam a metodologia a seguir no processo de validação (reprodutibilidade interlaboratorial).
Lomonte et al. ²¹	1994	Ensaio de citotoxicidade em células endoteliais baseado na liberação de LDH para veneno de <i>Bothrops asper</i> .	A toxina BaH-1, apesar de sua potente ação hemorrágica <i>in vivo</i> , não induziu a citotoxicidade significativa, no entanto, a miotoxina II foi citotóxica para condições de ensaio idênticas.
Lomonte et al. ²²	1999	Realizar ensaio de citotoxicidade em miotubos de C2C12 baseado na liberação de LDH para veneno de <i>Bothrops asper</i> .	Miotubos de músculo esquelético, obtidos após diferenciação de mioblastos C2C12, foram significativamente mais suscetíveis à ação citotóxica das miotoxinas do que as células endoteliais.
Oliveira et al. ²³	2002	Correlacionar a dose citotóxica 50% (CT ₅₀) de oito venenos em células Vero com a dose letal 50% (DL ₅₀) e correlacionar a CT ₅₀ com DPM (dose proteolítica mínima).	<i>B. neuwieddi</i> mattogrossensis e <i>B. leucurus</i> foram os mais citotóxicos, enquanto <i>B. atrox</i> e <i>Bothrops</i> sp foram os venenos menos citotóxicos. Uma correlação significativa foi obtida entre CT ₅₀ e DL ₅₀ por injeção intravenosa, exceto para <i>B. n. mattogrossensis</i> . Também foi encontrada uma correlação positiva entre CT ₅₀ e LD ₅₀ e entre a CT ₅₀ e a DPM.
Zobiole et al. ²⁴	2015	Realizar ensaio de citotoxicidade (MTT) e genotoxicidade em células Vero para o veneno de <i>Bothrops moojeni</i> .	O veneno apresentou citotoxicidade dependente da concentração de células com valor de CC ₅₀ obtido de 4,09 ± 0,04 µg/mL, e também foi genotóxico para células Vero a 4 µg/mL.
Menezes et al. ²⁵	2016	Realizar ensaio de citotoxicidade MTT e LDH para o veneno de <i>Bothropoides insularis</i> .	O veneno causa morte celular e proliferação em macrófagos, dependendo da concentração e do tempo de exposição. A citotoxicidade também foi confirmada pela dosagem de LDH, tanto em amostras clínicas como experimentais.
Lopes-Souza et al. ²⁶	2019	Desenvolvimento de um método <i>in vitro</i> para determinação da potência do antiveneno antibotrópico.	A concentração de veneno capaz de reduzir 50% da viabilidade celular foi 11,79 µg/mL. Houve diminuição da viabilidade celular dependente da concentração de veneno.
Rodrigues et al. ²⁷	2018	Analisar a composição do veneno de <i>B. brazili</i> . As atividades enzimáticas foram analisadas <i>in vitro</i> .	Foi identificado um total de 189 proteínas. O veneno de <i>B. brazili</i> apresentou alta atividade de SVSP, mas baixa atividade de PLA 2, quando comparado a outros venenos de <i>Bothrops</i> . Além disso, o veneno de <i>B. brazili</i> reduziu a viabilidade em células VERO.
Rodrigues et al. ²⁸	2020	Analisar os componentes do veneno de <i>B. brazili</i> . A citotoxicidade do veneno foi testada em células Vero.	Foram identificadas cerca de 37 proteínas de <i>B. brazili</i> . Este trabalho fornece uma visão geral da composição do veneno de <i>B. brazili</i> e demonstra a eficácia dos antivenenos peruanos e brasileiros no tratamento de acidentes com esta espécie.
Mora-Obando et al. ²⁹	2014	Estudar o sinergismo existente entre duas enzimas fosfolipases do veneno de <i>B. asper</i> em células C2C12.	Em ambos os estágios de diferenciação celular, a combinação das miotoxinas induziu a uma citotoxicidade significativamente maior em comparação com o efeito de qualquer uma das toxinas sozinha. O efeito observado foi claramente sinérgico e não apenas aditivo.
Lopes-Souza et al. ³⁰	2015	Testar a citotoxicidade de cinco venenos em células MGSO-3. A atividade proteolítica foi testada <i>in vitro</i> e correlacionada com dados <i>in vivo</i> previamente publicados.	O estudo confirmou que as toxinas do veneno de <i>Bothrops</i> são distribuídas de forma diferente nas diversas espécies. O conhecimento de tais diferenças pode ser de grande relevância para o entendimento dos efeitos do envenenamento por picada de cobra e produção de antivenenos. Os resultados obtidos indicam que uma bateria de métodos <i>in vitro</i> pode ser utilizada para determinar as principais atividades tóxicas de <i>Bothrops</i> .
Guerra-Duarte et al. ³¹	2015	Caracterizar 11 venenos de serpentes peruanas do gênero <i>Bothrops</i> através de ensaio de citotoxicidade com três linhagens celulares (MGSO3, Vero e HeLa).	Os venenos foram capazes de reduzir a viabilidade celular em todas as linhagens testadas. Cada veneno apresentou um padrão específico de toxicidade, por isso foram divididos em quatro grupos de acordo com sua composição. Os venenos do grupo um foram os menos citotóxicos e apresentavam menor quantidade de LAAO, enquanto os do grupo quatro foram os mais tóxicos e com maiores quantidades de LAAO. Houve uma correlação entre esses valores, enquanto que para outras atividades enzimáticas não foi encontrada correlação.
Demple et al. ³²	1990	Analisar e comparar um quadro de envenenamento humano em paralelo com ensaio de coagulação <i>in vitro</i> .	O veneno de <i>B. neuwieddi</i> causa a coagulação do fibrinogênio dependente da concentração. Os resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mostraram redução nos Fatores II, V e X em plasma humano após picada de serpente <i>B. neuwieddi</i> . A administração de antiveneno acelera a eliminação das proteases do veneno da circulação sanguínea do paciente.
Laing et al. ³³	1992	Comparar a eficácia de três lotes de antivenenos botrópicos em ensaios <i>in vivo</i> e ensaios de coagulação <i>in vitro</i> .	Os antivenenos foram igualmente eficazes na neutralização da atividade coagulante do plasma <i>in vitro</i> , da coagulação do fibrinogênio <i>in vitro</i> e atividade necrosante <i>in vivo</i> .

Continua



Continuação

Oguiura et al. ³⁴	2014	Determinar a dose mínima coagulante, atividade pró-coagulante do veneno e a dose efetiva do antiveneno usando o ensaio ROTEM.	As concentrações dos venenos botrópicos que induzem à coagulação do plasma de frango citrato em 60 seg são significativamente maiores se comparadas às apresentadas quando dosadas em plasma humano.
Chacón et al. ³⁵	2015	Comparar o ensaio de neutralização da atividade coagulante em plasma humano citrato ao ensaio de neutralização da letalidade murina.	Houve uma correlação significativa entre a neutralização da letalidade e a neutralização da atividade coagulante <i>in vitro</i> para o veneno de <i>B. asper</i> .
Martins et al. ³⁶	2009	Avaliar a atividade hemolítica <i>in vitro</i> do veneno e da fosfolipases A2 de <i>B. lanceolatus</i> .	Tanto o veneno de <i>B. lanceolatus</i> como as fosfolipases A2 isoladas podem causar hemólise indireta de eritrócitos em ovelhas, camundongos, vacas e cavalos. Sendo que os cavalos são os mais susceptíveis. A incubação do veneno em diferentes temperaturas indicou que o componente do veneno responsável pela hemólise é termolábil.
Rial et al. ³⁷	2006	Determinar a potência do antiveneno de <i>B. alternatus</i> em amostras de sangue de cavalos hiperimunizados com antivenenos e frações Fab'2.	Uma correlação significativa foi encontrada entre os valores de Elisa e o ensaio <i>in vivo</i> . A principal vantagem do método foi conseguir analisar a capacidade de neutralização do plasma hiperimune e antiveneno, independentemente se for IgG total ou fração Fab'2.
Estevão-Costa et al. ³⁸	2016	Avaliar a eficácia do antiveneno botrópico produzido no Instituto Nacional de Salud (INS, Peru) e na Fundação Ezequiel Dias (Funed, Brasil), para neutralizar as principais atividades tóxicas de cinco venenos Botrópicos.	Os padrões eletroforéticos das proteínas desses venenos mostraram diferenças significativas na composição, número e intensidade das bandas. Ambos os antivenenos são igualmente eficazes para neutralizar o veneno de <i>Bothrops</i> e apresentaram reação cruzada a venenos não incluídos na formulação como veneno de <i>B. atrox</i> .
Gutiérrez et al. ³⁹	1988	Realizar ensaio com veneno/antiveneno pré-incubados e inocular em gel de agarose contendo eritrócitos de ovelha e gema de ovo para medir o diâmetro do halo hemolítico e a correlação com ensaio <i>in vivo</i> .	Observou-se uma dose-resposta linear. Vários lotes de antiveneno neutralizaram a atividade hemolítica, indicando que a neutralização ocorre devido a uma reação imunológica específica. Apresentou ainda uma correlação significativa em 15 amostras de antivenenos capazes de neutralizar a hemólise indireta e a neutralização da letalidade.
Heneine et al. ⁴⁰	1988	Desenvolver imunoenensaio Elisa para a determinação da potência de antiveneno botrópico e a correlação com o ensaio <i>in vivo</i> .	Duas frações do veneno com atividade hemorrágica e duas frações com atividade de fosfolipases exibiram uma correlação com o antiveneno. Os resultados indicam que o uso de antígenos menos complexos pode ser aplicado no desenvolvimento de métodos alternativos para a determinação da potência de antiveneno botrópico.
Maria et al. ⁴¹	1988	Correlacionar o ensaio <i>in vivo</i> com a neutralização da atividade hemolítica de fosfolipases A2.	Nenhuma correlação entre a neutralização da letalidade e os títulos de Elisa contra o veneno bruto foi observada para antivenenos botrópicos brasileiros. Porém uma alta correlação foi encontrada entre os títulos de Elisa e a neutralização da letalidade ao usar a fração tóxica do veneno.
Sanz et al. ⁴²	2020	Realizar venômica e antivenômica de <i>B. brazili</i> .	Além de contribuir com a caracterização do veneno de <i>B. brazili</i> , este estudo demonstrou imunorreação específica do antiveneno botrópico brasileiro com todas as toxinas de <i>B. brazili</i> .
Gutierrez et al. ⁴³	2009	Revisão antivenômica.	A proteômica caracteriza os venenos em relação aos perfis toxicológicos de cada espécie. Isto pode ajudar muito na concepção de testes personalizados para cada veneno. Pode contribuir para introdução de diferentes testes <i>in vitro</i> e na redução de uso de animais associado aos ensaios <i>in vivo</i> . Uma vez que as tecnologias proteômicas não são disponíveis em muitos países, a organização de parcerias acadêmicas e de saúde pública devem ser promovidas, envolvendo laboratórios com tecnologia e recursos, mas, ao mesmo tempo, capacitando países de baixa renda da Ásia, África e América Latina.
Mora-Obando et al. ⁴⁴	2021	Aplicação de antivenômica para comparar a imunorreatividade específica e paraespecífica de seis antivenenos botrópicos contra três venenos colombianos.	Os resultados concordam com estudos anteriores ao revelar a capacidade de antivenenos botrópicos se neutralizarem em testes pré-clínicos, venenos de <i>Bothrops</i> da América Central e do Sul, e destacam diferenças quantitativas em seus DE ₅₀ . A combinação de antivenômica e ensaio de neutralização <i>in vivo</i> fornece informações relevantes para delinear as espécies e a faixa geográfica de aplicabilidade clínica de um antiveneno.
Mendoza et al. ⁴⁵	2008	Analisar a inibição das atividades das fosfolipases A2, LAAO e hialuronidase como um indicador da potência de antivenenos <i>in vitro</i> .	A exposição do antiveneno a temperaturas superiores a 25 °C mostrou que o antiveneno no estado líquido sofreu alterações. Concluiu que uma dose das três enzimas estudadas, mas principalmente da hialuronidase, poderia servir como um indicador <i>in vitro</i> da potência do antiveneno produzido pelo INS.
Avila et al. ⁴⁶	2010	Desenvolver ensaio <i>in vitro</i> utilizando a enzima LAAO do veneno de <i>B. jararaca</i> como antígeno para Elisa e determinar a potência do antiveneno botrópico.	Patente: PI 1004449-3 A2 ⁵¹ .

Continua



Continuação

Rafael et al. ⁴⁷	2008	Realizar ensaio Elisa com anticorpos mono e policlonais anti-jararhagin capazes de detectar metaloproteases em um <i>pool</i> de venenos de <i>B. jararacussu</i> .	Obteve uma correlação significativa entre as amostras de atividade hemorrágica e sua reatividade com o MAJar 3, demonstrando o potencial do método Elisa como uma alternativa aos testes hemorrágicos <i>in vivo</i> . Sugere que o imunoenensaio pode ser uma ferramenta confiável na determinação dos níveis hemorrágicos de metaloproteases em vítimas de mordidas de serpentes.
Maria et al. ⁴⁸	2001	Determinar a potência de 16 antivenenos em amostras de sangue em papel-filtro pelo método Elisa e sua correlação com ensaio <i>in vivo</i> .	Os resultados indicam que o ensaio Elisa com amostras de sangue em papel-filtro pode ser um método alternativo para avaliar a potência dos antivenenos durante a imunização de equinos. Esta metodologia já é comumente usada em testes sorológicos, pois facilita muito a coleta, transporte e armazenamento de amostras.
Tan ⁴⁹	2022	Revisão antivenômica.	Caracteriza as diferentes metodologias de venômica: I) Proteômica - o estudo das proteínas e peptídeos do veneno bruto; II) Transcriptômica - o estudo do RNA ou DNA extraído a partir da glândula secretora de veneno e III) Genômica - o estudo do genoma sequenciado a partir da extração de qualquer tecido da serpente. Discute ainda os desafios ao avanço dessas técnicas pela necessidade constante de aprimoramento da metodologia, atualização dos bancos de dados e inclusão de espécies menos conhecidas.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2022.

OMS: Organização Mundial da Saúde; LDH: lactato desidrogenase; B.: *Bothrops*; MTT: brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio; LAAO: L-aminoácido oxidase; Elisa: ensaio imunoenzimático; CT50: dose citotóxica 50%; DL50: dose letal 50%; DPM: dose proteolítica mínima; SVSP: serina proteases; ROTEM: tromboelastometria; seg: segundos; DE50: dose efetiva 50%; INS: *Instituto Nacional de Salud*.

A maioria dos trabalhos apresentou boa correlação entre o método *in vitro* e *in vivo*, entretanto, Maria et al.⁴¹ não obtiveram correlação para antivenenos botrópicos brasileiros, apesar da alta correlação entre os títulos de Elisa (ensaio imunoenzimático) e a neutralização da letalidade ao usar a fração tóxica para revestir as placas. De acordo com Oliveira et al.²³, há uma correlação significativa entre a dose citotóxica (CT₅₀) e a dose letal mediana (DL₅₀) por injeção intravenosa, exceto para venenos de *Bothrops neuwieddi* matogrossensis e *Lachesis muta*. Analisando a correlação entre CT₅₀ e a DL₅₀ por via intraperitoneal ou entre CT₅₀ e a dose proteolítica mínima (MPD) também foi encontrada uma correlação positiva, porém duas espécies não se ajustaram em ambos os casos: *Bothrops atrox* e *Bothrops* sp. Esses resultados são corroborados pelos trabalhos^{23,35,39} que reforçam a especificidade dos venenos e a necessidade de ensaios diferenciados.

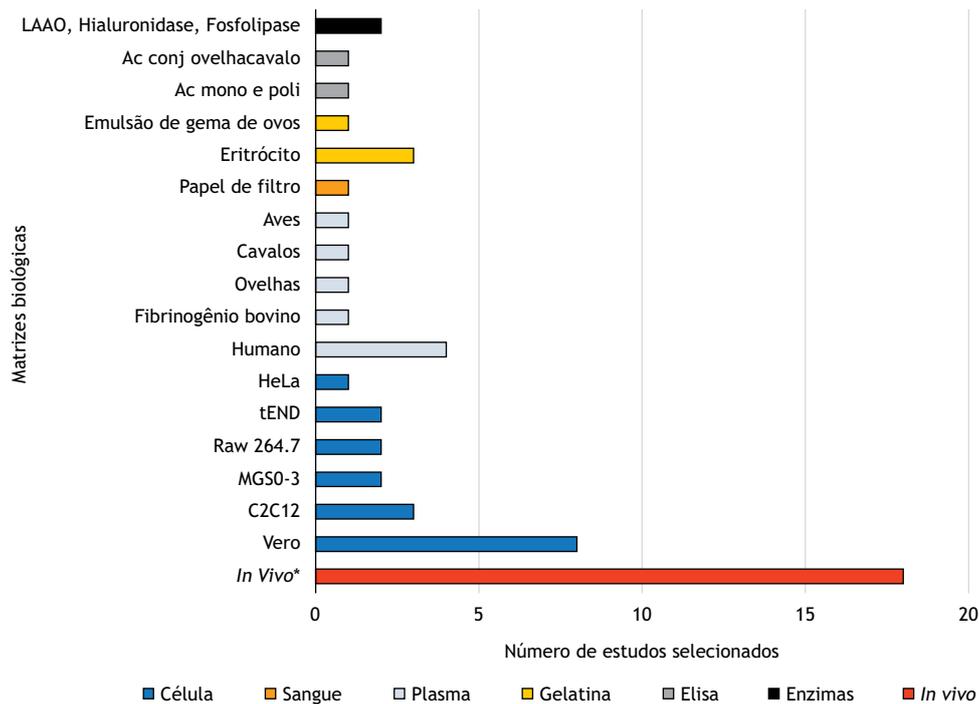
Mora-Obando et al.²⁹ observaram que o efeito tóxico de duas miotoxinas do veneno causou um aumento significativo do efeito citotóxico em mioblastos, miotubos e em camundongos em comparação ao efeito de qualquer uma das toxinas isoladamente. Este trabalho defende que seja analisada não apenas a ação de toxinas purificadas, mas também o sinergismo que ocorre entre as diferentes toxinas do veneno potencializando seu efeito tóxico.

Dos 31 trabalhos apresentados neste estudo, 17 trabalhos utilizaram exclusivamente o veneno bruto, o *pool* de venenos ou as frações do veneno de uma única espécie de serpente^{13,21,22,24,25,26,32,33,35,36,39,40,41,45,46,47,48}, 12 trabalhos foram feitos com serpentes da espécie *Bothrops jararaca*^{13,23,26,30,33,34,38,40,41,42,46,48}, seis trabalhos, com serpentes da espécie *Bothrops asper*^{21,22,29,35,39,44}. Alguns autores utilizaram mais de uma espécie no mesmo trabalho. Apenas 11 dos 31 trabalhos realizaram estudos com antivenenos^{13,21,23,24,25,26,27,28,38,42,44}. Três trabalhos foram realizados com anticorpos de cavalos hiperimunizados^{36,37,48} (Figura 3).

Podemos observar que, dos 31 trabalhos selecionados, 15 trabalhos utilizaram veneno de serpentes do Brasil^{13,23,24,25,26,28,33,34,38,40,41,42,46,47,48} e um trabalho utilizou veneno de *Bothrops jararaca* como controle³¹, seis trabalhos utilizaram veneno de serpentes da Costa Rica^{21,22,35,39,44,29}, sete trabalhos foram realizados com veneno de serpentes do Peru^{23,27,28,31,38,44,45}. Três trabalhos foram realizados com veneno de serpentes de diferentes países da América Latina: Argentina, Peru, Brasil e Bolívia²³, Peru e Bolívia³⁸ e Colômbia⁴⁴.

Dos 31 trabalhos relacionados, 15 são de desenvolvimento de métodos alternativos^{21,22,24,25,27,28,29,31,32,33,36,38,42,43,44}, 12 trabalhos selecionados têm como objetivo a substituição do ensaio com animais na produção/indústria^{23,26,30,34,35,37,39,40,41,45,46,47}. A maioria destes trabalhos sugeriu a substituição parcial apenas durante as primeiras etapas de produção de antivenenos: na imunização de cavalos e nos processos de fracionamento do plasma. Sugeriram ainda que o ensaio de DL₅₀ permaneça nas últimas etapas da produção do antiveneno e para o controle da qualidade do produto final³⁵, e ainda recomendaram o ensaio em camundongos para liberação de lotes de antivenenos⁴¹. Apenas dois trabalhos tiveram como objetivo a substituição para o controle da qualidade^{13,34} (Figura 4).

Os métodos alternativos para potência de antivenenos encontrados nessa seleção avaliaram os anticorpos específicos contra as toxinas do veneno ou as toxinas que mostraram uma correlação entre o acidente botrópico, a atividade de neutralização *in vivo* e os resultados *in vitro*. A maioria dos testes *in vitro* foi realizada em triplicata intraensaios, exceto por: Maria et al.⁴¹, Guerra-Duarte et al.³¹ e Rodrigues et al.²⁸, que fizeram apenas duplicatas intraensaios. Outra exceção foi a utilização da fórmula da Farmacopeia Europeia⁵⁰ por Heneine⁴⁰ enquanto o ensaio padrão *in vivo* utiliza a Farmacopeia Brasileira¹¹. Foi observada uma grande variedade de controles negativos utilizados nos estudos: salina, solução salina tamponada com fosfato (PBS), água, soro não imune e antivenenos.



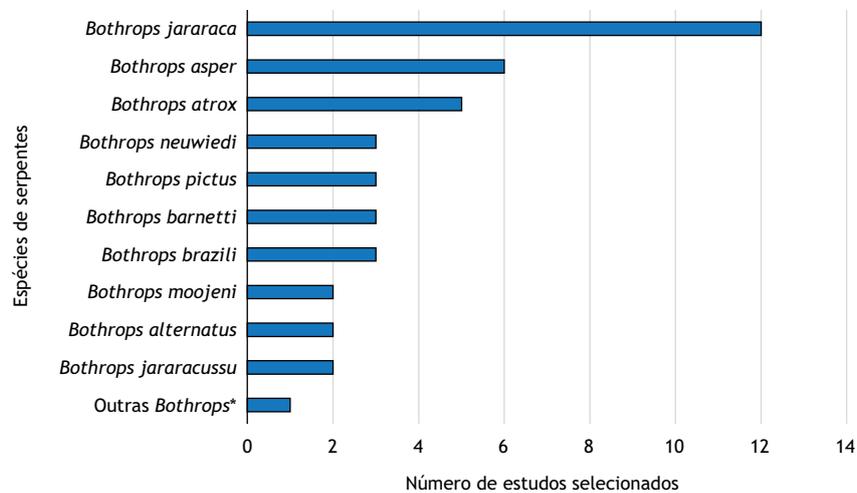
Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

**in vivo*: corresponde aos 18 trabalhos selecionados que compararam os ensaios *in vitro* com ensaios *in vivo*.

Obs: Alguns trabalhos utilizaram mais de uma linhagem celular.

LAO: L-aminoácido oxidase; Ac conj ovelhacavalo: anticorpo conjugado ovelhacavalo; Ac mono e poli: anticorpo monoclonal e policlonal.

Figura 2. Matrizes biológicas utilizadas nos artigos selecionados.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

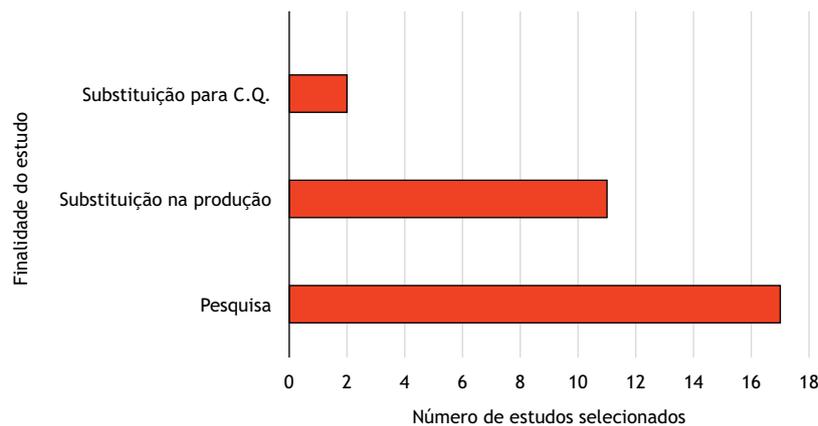
Outras *Bothrops**: *Bothropoides insularis*, *Bothriopsis bilineata smaragdina*, *B. nummifer*, *B. godmani*, *B. lanceolatus*, *B. pubescens*, *B. leucurus*, *B. rhombeatus*, *B. ayerbeii*, *B. andianus*, *B. castelnaudi*, *B. chloromelas*, *B. microphthalmus*, *B. oligolepis*, *B. peruviana*, *B. taeniata*. Os venenos destas espécies foram utilizados uma única vez.

Figura 3. Espécies de serpentes *Bothrops* nos trabalhos selecionados.

DISCUSSÃO

Os primeiros dados compilados pela OMS sobre mortalidade mundial devido ao envenenamento por picada de serpentes foram publicados em 1954, com estimativa de 30 mil a 40 mil mortes por ano no mundo. Daquela época até os dias atuais, sabe-se que o número de casos é bem maior, porque muitos

dados são subnotificados⁵¹. Somente 55 anos depois da primeira publicação⁵¹ foi dada a devida importância aos envenenamentos por picadas de serpentes, sendo estes incluídos pela OMS na lista de doenças tropicais negligenciadas. Em 2010, a OMS definiu antivenenos como medicamentos essenciais e publicou as diretrizes para sua respectiva produção.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.
C.Q.: Controle da Qualidade.

Figura 4. Finalidade dos estudos selecionados.

A partir desta publicação, surgiram as primeiras orientações acerca da necessidade de se melhorar a qualidade, a segurança e a regulamentação dos antivenenos - único tratamento disponível para envenenamento por picadas de serpentes. Nela, há uma ênfase para os esforços realizados por vários grupos na implantação do conceito dos 3Rs no desenvolvimento e controle da qualidade de antivenenos e, em 2017, houve uma revisão dessa publicação^{1,2,6,16}.

A primeira vez que a OMS citou a importância dos métodos alternativos para substituição de roedores nos ensaios para determinação da potência de antivenenos foi em 2001¹⁴. Embora o objetivo almejado seja a substituição dos animais, enquanto as validações ocorrem, esforços devem ser feitos para garantir o refinamento da técnica e a redução do número de animais nesses ensaios. Ainda em 2017, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA)⁵² publicou um Guia para aceitação regulatória de ensaios com abordagens dos 3Rs no controle em processo para medicamentos humanos e veterinários. Esta publicação teve como objetivo orientar e incentivar o desenvolvimento de testes baseados na substituição, redução e refinamento da experimentação animal. Neste documento são elencados os critérios para aceitação regulatória de adaptações em ensaios já existentes em compêndios oficiais ou novos ensaios desde que um dos 3Rs seja aplicado. Mesmo assim, é necessário atestar a metodologia através de protocolos padronizados com parâmetros cientificamente aceitos, demonstrar a precisão e relevância do método, ou seja, o método deve ser efetivo para a finalidade biológica que o ensaio se propõe a comprovar. Em seguida, deve-se ratificar a metodologia como confiável, robusta e reproduzível por meio de estudos interlaboratoriais e, finalmente, comprovar que o método é útil para o propósito criado, sendo tão bom ou melhor do que a metodologia vigente atual na predição dos efeitos testados. Apesar da grande diversidade de artigos encontrados, nenhum destes métodos foi submetido a um estudo interlaboratorial ou de validação frente à metodologia oficial vigente (modelo letal murino) para a determinação da potência de antiveneno botrópico. Os estudos selecionados foram apenas até os estágios de desenvolvimento, padronização

ou pré-validação. Atualmente, o desafio é realizar um estudo de validação adequado para conseguir sua aceitação regulatória.

Desde então a OMS tem demonstrado uma grande preocupação com este problema de saúde pública, tanto que convocou especialistas da área para desenvolver estratégias a serem implantadas nos próximos anos até 2030. Dentre todas as definições está a redução de 50% das mortes e sequelas incapacitantes através da disponibilidade de antivenenos seguros e eficazes que são garantidos pelo controle da qualidade^{2,5}.

Nesta revisão, foi possível identificar que existem trabalhos publicados sobre métodos alternativos para antivenenos com resultados promissores: apresentando uma correlação significativa entre a atividade biológica do veneno estudado e a neutralização da atividade *in vitro*^{13,23,27,30,31,35,37,39,40,41,47,48}. Porém, devido à especificidade dos venenos de cada gênero de serpentes e da sua importância médica relacionada à sua localização geográfica, foram realizados estudos com várias metodologias, utilizando controles distintos e tempo de exposição heterogêneos. Esta diversidade possibilita identificar os eventos chaves e dessa forma sugerir uma estratégia de testes integrados. Além das publicações, observa-se a existência de muitos grupos de trabalho em diferentes instituições de pesquisa e ensino ampliando as possibilidades de parcerias para preencher as lacunas desse grande desafio.

Gutiérrez et al.⁸ trouxeram uma importante revisão sobre a complexidade relacionada aos testes *in vitro* quanto à finalidade e à eficácia pré-clínica de antivenenos. A fisiopatologia do envenenamento botrópico ocorre pela ação das toxinas isoladas ou sinergicamente na qual seu efeito tóxico é potencializado. Existem ainda duas vias de ação das toxinas: no local da picada (edema firme, dor, sangramento, necrose) e/ou sistêmico (hemorragia, hipotensão, insuficiência renal). Além disso, após a inoculação do veneno, cada organismo reage à introdução do veneno com uma cascata de reações inflamatórias. Já para ensaios para controle da qualidade em processo são recomendados os ensaios *in vitro* tanto para as etapas de produção de anticorpos em equinos



quanto para análise quantitativa de anticorpos neutralizantes durante o fracionamento do plasma.

As descobertas dos mecanismos de imunidade para soros datam de 1890, quando Behring e Kitasato publicaram o primeiro trabalho sobre o desenvolvimento da imunidade à difteria e ao tétano em animais. Apenas dois anos após esta publicação foi realizado o primeiro ensaio em humanos com soro antidiftérico^{53,54,55}. Na prática, a utilização do soro antitetânico foi consolidada em 1914 devido à necessidade de administração em soldados feridos na Primeira Guerra Mundial⁵⁶. O método de inibição da ligação entre toxina e antitoxina (ToBI) é um exemplo bem-sucedido de método alternativo validado e incluído na Farmacopeia Europeia tanto para as etapas de produção de vacinas antitetânicas como para o controle da qualidade^{57,58}. O INCQS e o IB validaram o teste de potência para soro antirrábico (RFFIT)^{11,59}.

Soros hiperimunes são produtos biológicos que, por consequência, sofrem variações a cada lote produzido. Nas últimas décadas foram desenvolvidos vários métodos alternativos ao uso de animais baseados nos conceitos dos 3Rs. Já para os antivenenos, embora tenham sido desenvolvidos vários métodos, nenhum conseguiu finalizar o processo de validação.

Os estudos relacionados abaixo podem ser divididos em duas áreas: (i) a área de pesquisa, com a visão clínica e o desenvolvimento de medicamentos para outros fins e (ii) estudos relacionados com uma visão regulatória, como estudos pré-clínicos para o registro de novos produtos para o controle da qualidade em processo nas etapas de produção de antivenenos e liberação de lotes.

Para o controle da qualidade, foi encontrado um depósito de patente número PI 1004449-3 A2⁴⁶ referente a um kit para determinação da potência *in vitro*. Este kit consiste em placas semeadas com a enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) do veneno da serpente *B. jararaca* responsável por efeitos tóxicos do veneno como: hemorragia, inflamação e edema. Esta enzima foi utilizada como antígeno para sensibilizar placas de Elisa e determinar a potência neutralizante dos antivenenos botrópicos.

Seels desenvolveu um ensaio em ovos embrionados com seis dias de incubação, ou seja, no período inicial de desenvolvimento embrionário que é sabidamente um período em que os embriões não sentem dor. Este teste é amplamente estudado para outros desfechos como método alternativo para irritação ocular e aceito pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) se realizado até o 9º dia de incubação. O ensaio é realizado pela inoculação da mistura de veneno e antivenenos na região vascularizada do saco vitelino. A vantagem desse método é a observação do efeito hemorrágico nos discos contendo veneno e a neutralização do efeito hemorrágico pelo disco contendo antiveneno. Além da visualização dos efeitos tóxicos do veneno, esse método proporciona a gravação para posterior análise e comparação. Como os ovos embrionados estão no período antes do desenvolvimento neurológico não se pode testar venenos neurotóxicos^{15,60,61}.

Chacon et al.³⁵, em concordância com Pornmuttakun e Ratana-banangkoon⁶² e Oguiura et al.³⁴, descreveram como a neutralização dos efeitos coagulantes tem correlação com a potência de

antivenenos. Estes estudos levam em consideração que o extravasamento induzido por metaloproteases parece ser o principal fator por trás do efeito letal do veneno de *Bothrops asper*, por consequência os anticorpos contra metaloproteases hemorrágicas também seriam eficazes contra esta enzima pró-coagulante. Embora tenham observado a correlação entre neutralização dos efeitos coagulantes *in vitro* e atividade letal para o veneno de *B. asper*, esse efeito poderá não acontecer para todos os venenos. Portanto, deve-se realizar os ensaios para cada veneno/antiveneno respeitando sua especificidade intrínseca.

Algumas técnicas já foram desenvolvidas pelos laboratórios que trabalham com venenos e antivenenos para substituição dos animais no controle da qualidade nos processos de produção, tais como métodos imunológicos (antivenômica e Elisa) para rastrear antivenenos e avaliar anticorpos em cavalos hiperimunizados, além de métodos *in vitro* que avaliem as atividades tóxicas dos venenos que apresentem boa correlação com métodos *in vivo* (atividades enzimáticas, cultura de células, teste de coagulação, ligação de receptores e preparação neuromuscular)^{4,63,64,65}. Apesar da variedade de atividades fisiopatológicas presentes nos venenos de *Bothrops* e *Lachesis*, foi demonstrado que existe uma correlação, para alguns venenos, entre a CT₅₀ e a DL₅₀ e CT₅₀ e a DPM^{24,66}.

Chacon et al.³⁵ correlacionaram o ensaio *in vivo* com o ensaio *in vitro* de atividade coagulante de plasma humano. Esta inovação quando colocada em prática também possibilitará uma redução do número de animais para controle da qualidade nas etapas de produção. As técnicas para redução devem ser encorajadas e validadas enquanto buscamos a substituição por métodos *in vitro*.

Guerra-Duarte et al.³¹ testaram a viabilidade celular utilizando o reagente Alamar Blue® em três linhagens celulares (Vero, MGS03, HeLa) após exposição a dosagens seriadas de venenos. Os resultados demonstraram que cada veneno apresentou um padrão específico de toxicidade com curvas dose-reposta apresentando formato semelhante para todas as linhagens testadas. Desde os anos 1990 se observou os primeiros estudos alternativos para veneno em cultura de células, mas, a partir da década de 2000, ocorreu o ressurgimento dessa abordagem demonstrando ser uma metodologia promissora. Alguns fatores podem contribuir para essa abordagem tanto pelo custo baixo como por serem metodologias já amplamente utilizadas no controle da qualidade. Como exemplo temos o fato de vacinas contra dengue, HPV, febre amarela e tríplice viral serem analisadas em células¹³.

Lopes-Souza et al.³⁰ realizaram ensaio de citotoxicidade em células MGS03 com o veneno das cinco principais espécies de *Bothrops* brasileiras. A atividade proteolítica dos venenos foi testada *in vitro* e correlacionada com dados *in vivo* previamente publicados⁶⁷; assim como Nundes¹³ correlacionou o estudo de citotoxicidade em células Vero com estudo *in vivo* de Araújo et al.^{66,68}. Rodrigues et al.²⁷ compararam os resultados obtidos com estudos anteriores que utilizaram a mesma metodologia^{27,31}. A utilização de dados pré-existentes fazendo-se uma análise retrospectiva dos dados *in vivo* parece ser uma forte tendência para evitar a realização de mais ensaios com animais.



Foram utilizados métodos estatísticos para determinação dos resultados de ensaios tais como: análise de regressão linear de curva dose-resposta^{13,23,24,26,30,31,34,47} ou transformação de Probitos^{35,37,41}.

A maioria dos autores fez a análise estatística pela determinação das precisões, intra e interensaios, por meio 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. Alguns estudos compararam os grupos tratados com controles positivos e negativos por análise de variância (ANOVA)^{24,26,30,34,35}, teste de comparação Newman-Keuls^{24,34}, teste t de Student's^{26,35}, teste de Bonferroni's²⁶, Teste t Pareado³³, Teste de Tukey³⁵ e coeficiente de correlação de Pearson's^{37,47}.

Para calcular as precisões foram utilizados os programas GraphPad Prism^{13,24,26,30,31,34}, SigmaStat⁴⁰ para a regressão e a análise estatística e CombiStats¹³.

Com base em todos os resultados encontrados, foram avaliadas as precisões intraensaios, ou seja, avaliação da concordância entre os resultados de um mesmo analista, no mesmo dia e em um ensaio. Também foi calculada a precisão interensaios através da avaliação dos resultados executados em dias diferentes. Para ensaios biológicos um coeficiente de variação de até 20% como em Elisa é um valor aceitável⁶⁹. Sendo assim, é imprescindível a realização de uma próxima etapa para avaliação da reprodutibilidade interlaboratorial.

Os métodos mais usados para comparar duas medidas da mesma variável são: o gráfico de Bland-Altman, a Regressão de Deming e o coeficiente de correlação de concordância de Lin (CCC). Isso é especialmente importante se o objetivo for introduzir um novo método de medição que tenha algumas vantagens (redução de custos ou por biossegurança) em relação a uma técnica de medição existente (o "padrão ouro").

Uma abordagem moderna para comparação de ensaios é o entendimento de que o método substituto não deve ser obrigado a ter uma correlação significativa com o método de referência, uma vez que tanto o ensaio *in vivo* como os ensaios *in vitro* possuem variabilidade inerente. O novo teste deve estar em concordância de resultados com a potência *in vivo* e deve ser capaz de discriminar entre lotes potentes e subpotentes (verdadeiro-negativo). É por isso que alguns autores se referem à "concordância" em vez de "correlação"^{70,71}.

Os três pilares essenciais para garantir a segurança e a eficácia de um produto são: estudos pré-clínicos, boas práticas de fabricação e controle da qualidade. Para validar um método, é imprescindível seguir com o estudo interlaboratorial comparativo à metodologia oficial vigente neste momento, neste caso, o ensaio *in vivo* descrito na Farmacopeia e realizado por laboratórios produtores e de controle da qualidade. Para que o processo de validação deixe de ser uma intenção e vire realidade são necessários: investimento, padrões de referência e atuação integrada entre os profissionais de laboratório até as autoridades regulatórias. É necessário separar a finalidade do

ensaio (pré-clínico, desenvolvimento, controle de qualidade) para avançarmos. Isto fica bem evidente no importante projeto colaborativo entre *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) e OMS sobre o porquê de usar um grupo tão grande de animais para controle da qualidade de produtos já licenciados⁷². Em contrapartida, nos ensaios pré-clínicos, se um único ensaio não é capaz de mimetizar os efeitos em um organismo completo como se fosse um ser vivo, deve-se avaliar a possibilidade de usar uma estratégia integrada de mais de um ensaio *in vitro* em substituição ao ensaio *in vivo*¹⁰. A venômica, ou seja, o estudo da proteômica dos venenos pode contribuir na identificação das principais toxinas do veneno e a relação com a fisiopatologia dos envenenamentos. Enquanto a antivenômica detecta quais toxinas do veneno se ligam ao antiveneno^{42,43,44}. Devido à grande diversidade mundial de venenos é necessário realizar testes singulares para cada país ou localização geográfica, tanto para ensaios pré-clínicos como para desenvolvimento de métodos alternativos⁴³.

O ensaio *in vivo* não representa com fidelidade o que ocorre nos acidentes ofídicos. A principal diferença está no fato de que no ensaio *in vivo* é feita uma pré-incubação de veneno e antiveneno para inoculação intraperitoneal, enquanto nos acidentes a inoculação precede a soroterapia e a maioria das pessoas é acometida nos membros inferiores, mas a mistura veneno e antiveneno é administrada pela via endovenosa ou intraperitoneal de camundongos. A variabilidade genética e biológica dos animais, além da influência de fatores externos como ambiente e estresse é um problema de qualidade que pode influenciar diretamente nos resultados. Para ensaios *in vitro*, o processo de controle dos parâmetros de ambiente, temperatura, espaço físico, treinamento de pessoal e reprodutibilidade é uma grande vantagem, pois têm resultados liberados em menos tempo e são menos onerosos do que os ensaios com animais. Ainda assim, ensaios *in vitro*, de modo geral, necessitam passar por um processo longo e de custo elevado como a validação que compreende cinco etapas e pode levar cerca de 15 anos para ser concluído. Hartung⁶³ evidencia alguns problemas que precisam ser levados em consideração em cultivos celulares, porém o principal ponto é a implantação nos laboratórios de boas práticas em cultivo celular.

O INCQS tem sistema de garantia da qualidade implantado com base na norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2017⁷³ visando obter resultados confiáveis e precisos. A implementação desta norma na rotina mitiga grande parte dos problemas citados por Hartung⁶³. Portanto, é imprescindível que os laboratórios implantem um sistema de Garantia da Qualidade, realizando a calibração dos equipamentos, fazendo o monitoramento ambiental e mantendo equipe capacitada, tudo rigorosamente registrado e com fácil rastreabilidade. Ainda que o ensaio não seja credenciado, é recomendável a implementação de sistemas de acreditação de laboratórios de análise, com base na norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2017⁷³.

Vale ressaltar que existem outras metodologias desenvolvidas⁶⁸ e pré-validadas¹³ que continuam atualmente em fase de



validação. Apesar de não terem sido publicadas, se baseiam na propriedade do veneno botrópico provocar efeito citotóxico em células Vero e na propriedade do soro antibotrópico inibir essa citotoxicidade. Este método visa ser validado para o controle da qualidade em processo e para fins regulatórios. Os critérios definidos para aceitação do ensaio como válido são o controle do veneno e o controle de células; o efeito citotóxico deve apresentar uma relação linear, ou seja, ser proporcional às concentrações de veneno em pelo menos três diluições consecutivas.

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 veneno botrópico.

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 UN^{13,14,68}. 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*). Conforme Araújo et al.⁶⁶ demonstraram em 2017, o melhor caminho para correlacionar dois métodos é através do uso de padrões de referência bem estabelecidos e preferencialmente validados. Para ensaios com veneno vale destacar que uma das vantagens do método *in vitro* é justamente a economia de veneno e soro de referência.

Como parte do processo de validação do ensaio de citotoxicidade em células Vero, foi realizado um ensaio *in vitro* com inibidores enzimáticos⁷⁴. A ortofenantrolina (O-PHE) inibiu as metaloproteases, enquanto o brometo de p-bromofenacila (p-BPB) foi capaz de inibir as fosfolipases A2, comprovando que houve inibição das atividades citotóxicas das principais enzimas presentes no veneno botrópico responsáveis tanto pela toxicidade em humanos como pela letalidade em camundongos.

É importante destacar que, devido às características do envenenamento ofídico, é necessária a avaliação do efeito biológico tanto do veneno quanto do antiveneno. Vale ressaltar que não fez parte desta pesquisa a avaliação *in vitro* dos efeitos neurotóxicos, o que, a princípio, limita essa proposta às serpentes que não tenham neurotoxicidade. Além disso, devido à complexidade da composição dos venenos ofídicos, são fundamentais a correlação estatística e a comprovação da habilidade de quantificar o efeito biológico tanto dos venenos quanto dos antivenenos para a aceitação dos métodos propostos.

Dos 31 trabalhos selecionados nesta revisão, 15 foram realizados utilizando venenos de serpentes do Brasil, demonstrando que pesquisadores brasileiros estão engajados na busca por métodos alternativos. Apesar dos números expressivos, é necessária uma intensa atuação e colaboração entre

as diversas instituições, tais como: laboratórios acadêmicos, de pesquisa, produção e controle a fim de promover os avanços necessários para validação desses estudos. Além de serem escassos, os estudos referentes aos métodos alternativos ao uso de animais encontram-se muito segmentados. Atualmente há uma grande dificuldade para encontrarmos os dados referentes às metodologias, os compêndios oficiais e os avanços nessa área, uma vez que não existe uma compilação dos mesmos em sites oficiais^{75,76}.

Através de 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 e que tem como objetivo validar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação. A criação do BraCVAM representa para a comunidade científica brasileira uma oportunidade de orientação e apoio para a validação de métodos alternativos. Em se tratando de antivenenos que são específicos em cada país e por consequência requerem testes diferenciados, esse protagonismo é imprescindível para que novas metodologias tenham credibilidade e possam ser aceitas mundialmente.

Revisões são necessárias para sumarizar os dados existentes na área, refinar hipóteses e definir estratégias para inovação e implantação de metodologias alternativas. Apesar de termos feito uma busca incessante de artigos, provavelmente não foram encontrados todos os artigos relacionados ao tema.

Os resultados deste estudo quando considerados em conjunto com as vantagens do ensaio *in vitro* (redução do tempo para liberação de lotes de antiveneno, redução de custos, reprodutibilidade e robustez) e sua utilidade em testes de eficácia de antiveneno apresentam-se como um forte candidato para seu uso como uma alternativa para o ensaio de letalidade em murinos.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as metodologias identificadas na revisão se baseiam nas propriedades tóxicas dos venenos correlacionadas aos efeitos nos acidentes botrópicos. Pela diversidade das toxinas encontradas em cada gênero de serpentes, entende-se que é de extrema importância que o ensaio de potência dos antivenenos tenha como base a avaliação e a quantificação precisa da inibição da atividade biológica dos venenos. Outra questão importante ao propor um método substituto é o ponto de corte que deve ser considerado na aprovação do lote.

Os métodos que são baseados em citotoxicidade devem ser priorizados dentro da estratégia de métodos alternativos, justamente porque ensaios de citotoxicidade para análise de produtos biológicos são metodologias simples, de baixo custo e com exemplos exitosos de implantação nos laboratórios de controle da qualidade para fins regulatórios. No entanto, ainda é necessário que esforços sejam realizados em ensaios interlaboratoriais de validação, permitindo o uso regulatório e a permeabilização destes testes na pesquisa e produção de antivenenos botrópicos.



REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Snakebites. Genebra: World Health Organization; 2017[acesso 15 out 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/snakebites/disease/en/>
2. World Health Organization - WHO. WHO launches global strategy for prevention and control of snakebite envenoming. Genebra: World Health Organization; 2019[acesso 22 nov 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/23-05-2019-who-launches-global-strategy-for-prevention-and-control-of-snakebite-envenoming>
3. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde - ICICT. Sistema nacional de informação tóxico-farmacológica Sinitox. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2021[acesso 22 nov 2021]. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>
4. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, Vargas M et al. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: state-of-the-art and challenges ahead. *Toxins*. 2017;9(5):1-22. <https://doi.org/10.3390/toxins9050163>
5. World Health Organization - WHO. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021-2030: overview. Geneva: World Health Organization; 2020 [acesso 21 out 2020]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332094>
6. World Health Organization - WHO. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Geneva: World Health Organization; 2018[acesso 21 out 2020]. Disponível em: https://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/
7. Williams DJ, Faiz MA, Abela-Ridder B, Ainsworth S, Bulfone TC, Nickerson AD et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: snakebite envenoming. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(2):1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007059>
8. Gutiérrez JM, Vargas M, Segura A, Herrera M, Villalta M, Solano G et al. *In vitro* tests for assessing the neutralizing ability of snake antivenoms: toward the 3rs principles. *Front Immunol*. 2021;11:1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617429>
9. Patra A, Herrera M, Gutiérrez JM, Mukherjee AK. The application of laboratory-based analytical tools and techniques for the quality assessment and improvement of commercial antivenoms used in the treatment of snakebite envenomation. *Drug Test Anal*. 2021;13(8):1471-89. <https://doi.org/10.1002/dta.3108>
10. Araujo HP, Bourguignon SC, Boller MA, Dias AA, Lucas EP, Santos IC et al. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon*. 2008;51(4):502-14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.002>
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
12. Fan HW, Natal VMA, Augusto PJC, Gutiérrez JM. Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. *Rev Panam Salud Publica*. 2019;43:1-9. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.92>
13. Nundes RNC. Pré-validação do ensaio de potência *in vitro* do veneno botrópico e do soro antibotrópico [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Controle da Qualidade em Saúde; 2017.
14. Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 2003;41(5):541-57. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00393-8)
15. Sells PG. Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives. *Toxicon*. 2003;42(2):115-33. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00125-9)
16. World Health Organization - WHO. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenoms immunoglobulins. Geneva: World Health Organization; 2012.
17. Solano G, Segura A, Herrera M, Gómez A, Villalta M, Gutiérrez JM 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*. 2010;38(5):577-85. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.05.006>
18. Jorge MT, Ribeiro LA. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43(1):74-6. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100016>
19. Theakston RDG, Laing GD, Fielding CM, Lascano AF, Touzet JM, Vallejo F et al. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89(5):550-4. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90105-1)
20. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D et al. Prisma extension for scoping reviews (Prisma-ScR): checklist and explanation. *Ann Intern Med*. 2018;169(7):467-73. <https://doi.org/10.7326/M18-0850>
21. Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon*. 1994;32(4):505-10. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90302-6)
22. Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon*. 1999;37(1):145-58. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00171-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00171-8)



23. Oliveira JCR, Oca HM, Duarte MM, Diniz CR, Fortes-Dias CL. Toxicity of south american snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*. 2002;40(3):321-5. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00229-X)
24. Zobiolo NN, Caon T, Bertol JW, Pereira CAS, Okubo BM, Moreno SE et al. *In vitro* and *in vivo* genotoxic evaluation of *Bothrops moojeni* snake venom. *Pharm Biol*. 2015;53(6):930-4. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.950385>
25. Menezes RRPB, Mello CP, Lima DB, Tessarolo LD, Sampaio TL, Paes LCF et al. Involvement of nitric oxide on *Bothropoides insularis* venom biological effects on murine macrophages *in vitro*. *PLoS ONE*. 2016;11(3):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151029>
26. Souza LL, Costal-Oliveira F, Stransky S, Freitas CF, Guerra-Duarte C, Braga VMM et al. Development of a cell-based *in vitro* assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. *Toxicon*. 2019;170:68-76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.010>
27. Rodrigues CR, Teixeira-Ferreira A, Vargas FFR, Guerra-Duarte C, Costal-Oliveira F, Stransky S et al. Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* ("loro machaco"), a pitviper snake from Peru. *J Proteomics*. 2018;15(187):171-81. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.016>
28. Rodrigues CR, Molina DA, Assis TCS, Liberato C, Melo-Braga MN, Ferreyra CB et al. Proteomic and toxinological characterization of Peruvian pitviper *Bothrops brazili* ("jergón shushupe"), venom. *Toxicon*. 2020;184:19-27. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.016>
29. Mora-Obando D, Fernández J, Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*. 2014;9(10):1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846>
30. Souza LL, Stransky S, Guerra-Duarte C, Flor-Sá A, Schneider FS, Kalapothakis E et al. Determination of toxic activities in *Bothrops* spp. snake venoms using animal-free approaches: correlation between *in vitro* versus *in vivo* assays. *Toxicol Sci*. 2015;147(2):458-65. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv140>
31. Guerra-Duarte C, Lopes-Peixoto J, Fonseca-de-Souza BR, Stransky S, Oliveira D, Schneider FS et al. Partial *in vitro* analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. *Toxicon*. 2015;108:84-96. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.007>
32. Dempfle CE, Kohl R, Harenberg J, Kirschstein W, Schlauch D, Heene DL et al. Coagulopathy after snake bite by *Bothrops neuwiedi*: case report and results of *in vitro* experiments. *Blut*. 1990;61:369-74. <https://doi.org/10.1007/BF01738552>
33. Laing GD, Theakston RDG, Leite RP, Silva WDD, Warrell DA. Butantan Institute Antivenom Study Group - BISG. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. *Toxicon*. 1992;30(10):1219-25. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90438-B](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90438-B)
34. Oguiura N, Kapronezai J, Ribeiro T, Rocha MMT, Medeiros CR, Marcelino JR et al. An alternative micromethod to access the procoagulant activity of *Bothrops jararaca* venom and the efficacy of antivenom. *Toxicon*. 2014;90:148-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.004>
35. Chacón FAO, Escalante T, Solano G, Rucavado A, Gutiérrez JM. 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*. 2015;93:41-50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.223>
36. Martins LJ, Araújo PMF, Bom C, Hyslop S, Araújo AL. *In vitro* hemolytic activity of *Bothrops lanceolatus* (fer-de-lance) venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2009;15(3):498-508. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000300011>
37. Rial A, Morais V, Rossi S, Massaldi H. A new Elisa for determination of potency in snake antivenoms. *Toxicon*. 2006;48:462-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.004>
38. Estevão-Costa MI, Gontijo SS, Correia BL, Yarleque A, Vivas-Ruiz D, Rodrigues E et al. Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon*. 2016;122:67-77. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.010>
39. Gutiérrez JM, Avila C, Rojas E, Cerdas L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 1988;26(4):411-3. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)
40. Heneine LGD, Carvalho Jr. AD, Barbosa CF, Santos MRA. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antithrombotic antivenom. *Toxicon*. 1998;36(10):1363-70. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00014-2)
41. Maria WS, Cambuy MO, Costa JO, Velarde DT, Chávez-Olórtegui C. Neutralizing potency of horse antithrombotic antivenom: correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon*. 1998;36(10):1433-9. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00077-4)
42. Sanz L, Pérez A, Quesada-Bernat S, Diniz-Souza R, Calderón LA, Soares AM et al. Venomics and antivenomics of the poorly studied Brazil's lancehead, *Bothrops brazili* (Hoge, 1954), from the Brazilian state of Pará. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26:1-14. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0103>
43. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L et al. Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*. 2009;72(2):165-82. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>



44. Mora-Obando D, Pla D, Lomonte B, Guerrero-Vargas JA, Ayerbe S, Calvete JJ. Antivenomics and *in vivo* preclinical efficacy of six latin american antivenoms towards south-western colombian *Bothrops asper* lineage venoms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(2):1-36. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009073>
45. Mendoza JC, Fanny L, Liliana Y, Cecilia RN, Armando Y, Silvia P et al. Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades de fosfolipasa a2, l-aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*. 2008;25(2):174-8.
46. Avila RAM, Ciscotto PH, Maria CWS, Sanches EOF, Olórtegui CDC. Patente PI 1004449-3 A2. Kit para testar a potência neutralizante de soro anti-botrópico *in vitro*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
47. Rafael AI, Tanjonib I, Fernandesb I, Moura-da-Silvab AM, Furtado MFD. An alternative method to access *in vitro* the hemorrhagic activity of snake venoms. *Toxicon*. 2008;51(4):479-87. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.014>
48. Maria WS, Pacheco BG, Barbosa CF, Velarde DT, Chávez-Olórtegui C. Determination of the neutralizing potency of horse antithrotophic and anticrotalic antivenoms in blood samples collected on filter paper. *Toxicon*. 2001;39(10):1607-9. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00130-1)
49. Tan CH. Snake venomics: fundamentals, recent updates, and a look to the next decade. *Toxins*. 2022;14(4):247. <https://doi.org/10.3390/toxins14040247>
50. Council of Europe. European Pharmacopeia. Sainte Ruffine: Council of Europe; 1982.
51. Swaroop S, Grab B. Snakebite mortality in the world. *Bull World Health Org*. 1954;10(1):35-76.
52. European Medicine Agency - EMA. Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches. Amsterdam: European Medicine Agency; 2017[acesso 5 jan 2022]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/regulatory-acceptance-3r-replacement-reduction-refinement-testing-approaches>
53. Behring E, Kitasato S. Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität bei thieren. *Dtsch Med Wschr*. 1890;16(49):1-6. <https://doi.org/10.17192/eb2013.0164>
54. Behring E. Die geschichte der diphtherie; mit besonderer berücksichtigung der immunitätslehre. Leipzig: G. Thieme; 1893[acesso 22 out 2021]. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/29160>.
55. Pucca M, Cerni F, Janke R, Bermúdez-Méndez E, Ledsgaard L, Barbosa JE et al. History of envenoming therapy and current perspectives. *Frontiers Immunol*. 2019;10(1):1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01598>
56. Kaufmann SHE. Remembering Emil von Behring: from tetanus treatment to antibody cooperation with phagocytes. *mBio*. 2017;8(1):1-6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00117-17>
57. European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM. Statement on the application of the TOBI test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use. 15th meeting at the European Centre for the validation of Alternative Methods; 2000 Dec 5-6; Ispra, Itália. Brussels: European Comission; 2000.
58. Council of Europe. European pharmacopeia. 6a ed. Strasbourg: Council of Europe; 2008.
59. Moura W, Frazatti-Gallina NM, Fuches RMM, Romijn P, Leite JPG. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J Virol Meth*. 2008;154(1-2):7-13. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.010>
60. Sells PG, Richards AM, Laing GD, Theakston RDG. The use of hen's eggs as an alternative to the conventional *in vivo* rodent assay for antidotes to haemorrhagic venoms. *Toxicon*. 1997;35(9):1413-21. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00022-6)
61. Sells PG, Laing GD, Theakston RDG. An *in vivo* but insensate model for the evaluation of antivenoms, (ED₅₀) using fertile hens' eggs. *Toxicon*. 2001;39(5):665-8. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00191-4)
62. Pornmuttakun D, Ratanabanangkoon K. Development of an *in vitro* potency assay for antivenom against Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Toxicon*. 2014;77:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.021>
63. Hartung T. From alternative methods to a new toxicology. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(3):338-49. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.027>
64. Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidance document on an Integrated Approach on Testing And Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2017
65. European Centre for the validation of Alternative Methods - ECVAM. Biologicals. EU Science Hub. 2020[acesso 20 dez 2021]. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/biologicals>
66. Araújo HP, Lucas EPR, Moura WC, Barbosa FC, Rodrigues RJ, Morais JF et al. Interlaboratory study for the establishment of Brazilian *Bothrops* reference venom and antivenom for potency evaluation of *Bothrops* antivenom. *Biologicals*. 2017;49:1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.08.006>
67. Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992;30(1):95-103. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90505-y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90505-y)
68. Araújo HP. Avaliação da metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição de citotoxicidade *in vitro* para a determinação da potência do soro antibotrópico [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2008.



69. Ark A, Kappelle IS, Olander RM, Enssle K, Jadhav S, Donk H et al. The pertussis serological potency test collaborative study to evaluate replacement of the mouse protection test. *Biologicals*. 2000;28(2):105-18. <https://doi.org/10.1006/biol.2000.0247>
70. European Partnership for Alternative Approaches - EPAA. Application of the 3Rs and the consistency approach for improved vaccine quality control. Brussels: European Partnership for Alternative Approaches; 2012 [acesso 12 set 2014]. Disponível em: https://circabc.europa.eu/sd/a/6cfc6e14-4c81-4981-a424-5b51b982da1d/flash-report-vaccines-workshop-october2012_en.pdf
71. Moreira WC, Freitas JFS, Machado NS, Almeida AECC, Moura W. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. *J Virol Methods*. 2019;263:54-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.003>
72. Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals. *Biologicals*. 2021;74:24-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.10.002>
73. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR ISO/IEC 17025:2017: requisitos gerais para competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2017.
74. Cavalcanti DFB. Avaliação da atividade citotóxica do veneno de *Bothrops jararaca* [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
75. Araújo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J Pharm Sci*. 2014;50(1):1-8. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
76. Presgrave O, Caldeira C, Moura W, Cruz M, Méier G, Santos E et al. Participation of Brazil in the world congresses on alternatives and animal use in the life sciences: an increase in commitment to the Three Rs. *Altern Lab Anim*. 2015;43(1):69-72. <https://doi.org/10.1177/026119291504300109>

Contribuição dos Autores

Nundes RNC - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Araújo HP, Alves GG, Gonzalez MS - Concepção, planejamento (desenho do estudo) e redação do trabalho. Delgado IF, OAF Presgrave, Moura WC - Redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.