

BREVE HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA A ANÁLISE DE POTÊNCIA NA PRODUÇÃO DE ANTIVENENOS

Lucas Tadeu Silva^{1,2*}, Luiz Guilherme Dias Heneine², Jenner Karlisson Pimenta dos Reis³.

¹Doutorando em Ciência Animal, Medicina Veterinária Preventiva – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: lucvetepidemi@gmail.com

²Analista e Pesquisador em Saúde e Tecnologia – Fundação Ezequiel Dias – Funed – Belo Horizonte/MG – Brasil

³Docente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

Os acidentes por animais peçonhentos são um importante problema de saúde pública tanto no Brasil quanto em outros países tropicais e subtropicais, e estão associados muitas vezes à ocorrência de óbitos e formação de sequelas nas vítimas. O tratamento desses acidentes varia conforme a condição clínica do paciente e engloba uma abordagem sintomática e uma específica baseada na administração do antiveneno¹. Os antivenenos ou soros hiperimunes representam a única medicação específica capaz de neutralizar a ação de venenos através da interação antígeno-anticorpo² e, por isso, a avaliação da qualidade e eficácia desses imunobiológicos são primordiais para o sucesso dos tratamentos³.

Com os avanços das questões éticas e de bem-estar dos animais, que se iniciou com a publicação do livro “*Principles of human experimental technique*”, pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch, em 1959, surgem diversas normas, guias e organizações com o objetivo de nortear o uso de animais em ensino e pesquisa e estimular o desenvolvimento de metodologias alternativas aos ensaios *in vivo*, com base no princípio dos 3 Rs (*Reduction, Replacement and Refinement*). Tal princípio baseia-se na redução do número de animais utilizados em ensaios, no refinamento de técnicas minimizando o estresse e o sofrimento, e na substituição de técnicas *in vivo* por técnicas alternativas que não utilizam animais⁴.

É importante considerar que a substituição de métodos *in vivo* por métodos *in vitro* vai além do bem-estar animal. Esses métodos eliminam a variabilidade de resposta decorrente das diferenças genéticas da espécie utilizada, eliminam a influência do estresse sobre o resultado e reduzem custos e tempo empreendido nos ensaios^{5, 6}.

As metodologias alternativas na produção dos antivenenos passaram a ser fortemente estimuladas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir do ano de 2001. Segundo a OMS, o desenvolvimento de testes alternativos ao uso de animais nos ensaios pré-clínicos de antivenenos deve ser encorajado e, quando o uso de animais for necessário, técnicas de analgesia e anestesia e a implementação de um *end-point* devem ser consideradas⁷.

No caso dos testes *in vivo* de Dose Letal 50% (DL 50) e Dose Efetiva 50% (DE 50), diversos estudos propondo técnicas alternativas foram desenvolvidos mundialmente, porém, nenhum foi validado⁷. Uma justificativa para essa ausência de metodologias alternativas validadas está relacionada à complexidade e variabilidade dos diferentes venenos existentes⁸.

Com base no exposto, o presente trabalho tem por objetivo apresentar um breve histórico de diferentes metodologias *in vitro* desenvolvidas a longo do tempo para substituição do teste *in vivo* de potência utilizado na produção de antivenenos e, com isso, estimular o desenvolvimento de novas pesquisas acerca desse tema altamente relevante.

MATERIAL

Esse trabalho foi desenvolvido a partir da busca ativa de artigos indexados relacionados ao tema proposto na plataforma PubMed. Além disso, buscou-se a legislação brasileira relativa ao Conselho Nacional de Experimentação Animal, o manual de acidentes por animais peçonhentos do Ministério da Saúde, o guia de produção de antivenenos da OMS e as monografias da ANVISA sobre antivenenos. Como o objetivo desse trabalho foi de apresentar um histórico da evolução dos testes alternativos na produção de antivenenos, alguns artigos mais antigos também foram incluídos.

RESUMO DE TEMA

Desde o surgimento do princípio dos 3 Rs, tanto a comunidade científica quanto as agências reguladoras vêm estimulando e trabalhando no desenvolvimento de metodologias *in vitro* alternativas às metodologias *in*

vivo. Segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), entende-se por método alternativo, qualquer técnica que possa ser usada para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na pesquisa biomédica, ensaios e ensino⁴.

Com a expansão mundial do conceito de bem-estar animal iniciou-se uma busca permanente por metodologias alternativas voltadas à imunização de animais e à produção de antivenenos^{9, 10}. A OMS recomenda, na produção desses imunobiológicos, a análise da capacidade ligante de um antiveneno ao veneno por meio de técnicas imunológicas como o ELISA para identificação de soros com baixo potencial de ligação, uma vez que esse achado sugere fortemente a incapacidade deste em neutralizar os efeitos tóxicos de um veneno. Para tanto, tais testes *in vitro* devem ser desenvolvidos e validados⁷.

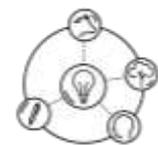
Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a OMS, o ensaio Dose Efetiva 50% (DE 50) objetiva determinar a dose neutralizante necessária de soro para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do veneno de referência. De posse do resultado de DE 50 é possível calcular a potência de um antiveneno^{7, 11}. Tal teste é caro, demorado, a reprodutibilidade é difícil de se alcançar e é fortemente dependente de pessoal treinado e qualificado¹². Além disso, variações genéticas e biológicas, fatores ambientais e o estresse podem influenciar diretamente os resultados, o que já não ocorre com os ensaios *in vitro*⁵. Tudo isso justifica a busca pelo desenvolvimento de novas metodologias *in vitro* substitutivas.

Como será demonstrado a seguir, várias metodologias substitutivas ao teste de Dose Efetiva 50% já foram propostas e diferentes resultados foram obtidos. Alguns estudos demonstraram concordância entre o teste *in vivo* e o *in vitro*, enquanto outros não.

Um dos testes mais realizados na análise da interação veneno-antiveneno, o ELISA, foi introduzido em 1977 para a identificação de venenos e antivenenos. Posteriormente, Theakston e Reid, em 1979, trabalhando com venenos e antivenenos de serpentes, avaliaram a correlação entre o teste *in vivo* de DE 50 e o ELISA obtendo correlação acima de 0,90 para todos os venenos testados. Segundo esses autores, o ELISA, se validado, poderia ser um procedimento padrão bastante útil para a análise de potência¹³. Alta correlação entre os testes *in vivo* e de DE 50 ($r = 0,95$) também foi verificada em trabalho posterior usando veneno e antiveneno botrópico¹². Outros autores também encontraram alta correlação entre o teste de DE 50 e o ELISA quando do uso da principal fração tóxica e letal purificada do veneno botrópico¹⁴ e quando do uso de frações com atividade hemorrágica purificadas desse mesmo veneno¹⁵, conforme trabalhos publicados na década de 1990. Por outro lado, em estudo realizado nesse mesmo período com o veneno e antiveneno de *Micrurus nigrocinctus*, não foi encontrada correlação entre o teste de DE 50 e ELISA¹⁶.

A análise da correlação entre ensaio *in vivo* de DE 50 e *in vitro* de inibição da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) também já foi estudada. Em estudo publicado no ano de 1988, várias doses de antiveneno foram testadas frente a uma quantidade fixa de veneno de *Bothrops asper*, o qual apresenta atividade fosfolipásica, em poços contendo gel de agarose, eritrócitos ovinos, lecitina e CaCl₂. Os autores observaram alta correlação, acima de 0,90, entre os dois testes¹⁷. De forma semelhante, outros autores obtiveram correlação superior a 0,80 entre o teste de DE 50 e o teste de inibição da atividade da fosfolipase A₂ trabalhando com o veneno e antiveneno de *Micrurus nigrocinctus*¹⁶. Por outro lado, em outro estudo avaliando a correlação entre os mesmos ensaios anteriores para veneno e antiveneno botrópico, não foi obtida alta correlação¹⁴.

No ano de 2015 foi publicado um estudo em que os autores avaliaram a correlação entre o teste *in vivo* de DE 50 e o *in vitro* de neutralização da atividade de coagulação do veneno pelo soro hiperimune. Tal teste foi realizado com uma quantidade fixa de veneno de *Bothrops asper*, o qual apresenta atividade coagulante, e diferentes diluições de antiveneno em



XIV Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente

plasma humano contendo citrato. Os autores obtiveram alta correlação entre esses testes¹⁸.

Em 2019, alguns autores desenvolveram um teste para análise da inibição da citotoxicidade causada por veneno botrópico em células Vero pelo antiveneno. Foi obtido um *cutoff* capaz de diferenciar amostras de soro com alta e baixa potência neutralizante¹⁹.

Recentemente, em 2023, um estudo propôs um teste ELISA de análise de avides do antiveneno escorpionico específico para a espécie *Tityus serrulatus* para substituição do teste *in vivo* de capacidade neutralizante de anticorpos. Os autores partiram do princípio de que soros contendo anticorpos com alta força de ligação às toxinas de venenos apresentam maior potencial para neutralizar essas toxinas. Resultados promissores foram obtidos, tendo sido definido um *cutoff* de avides acima do qual nenhum resultado *in vivo* negativo correspondente tenha sido encontrado, demonstrando excelente concordância entre o teste *in vitro* e o *in vivo*²⁰.

Nas últimas décadas vários testes alternativos ao uso de animais foram desenvolvidos para aplicação no processo produtivo de antivenenos, porém, apesar de técnicas *in vitro* substitutivas já terem sido desenvolvidas, nenhuma chegou ao ponto de implementação e nenhuma foi validada. Os ensaios de Dose Letal 50% (DL 50) e Dose Efetiva 50% (DE 50), que utilizam camundongos, por exemplo, são os únicos ensaios validados para a determinação da toxicidade de venenos e potência de antivenenos pelas instituições produtoras e agências reguladoras⁷. Um dos principais desafios ao desenvolvimento de testes *in vitro* substitutivos aos testes *in vivo* na produção de antivenenos está relacionado à complexidade dos diferentes venenos existentes⁸.

O desenvolvimento, a validação e a implementação de metodologias alternativas no estudo de venenos e produção de antivenenos deve ser incentivado e buscado pelas agências reguladoras, pesquisadores e instituições produtoras de antivenenos, conforme preconizado pelo princípio dos 3 Rs.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo desse trabalho foi possível observar que diversas metodologias *in vitro* substitutivas às metodologias *in vivo* utilizadas na produção de antivenenos já foram propostas e desenvolvidas. A aplicação de tais técnicas, além de reduzir o uso de animais nos testes, possibilita também a redução de tempo, custo e da variabilidade existente nos ensaios que utilizam animais. Todas essas vantagens dos testes *in vitro* justificam a continuidade das pesquisas que apresentam como foco propostas alternativas.

É importante considerar que, além do desenvolvimento de novas metodologias alternativas, é necessário que elas sejam validadas para, dessa forma, serem definitivamente implementadas no processo de produção de antivenenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- 2-CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. **Venoms, antivenoms and immunotherapy**. *Toxicon*, 36 (6): 823-846, 1998.
- 3-SELLS, P. G. **Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives**. *Toxicon*, 42: 115-133, 2003.
- 4-BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015. Baixa o capítulo "Introdução geral" do guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais para atividades de ensino ou pesquisa científica do Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA**. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Seção I, p. 4, 2015.
- 5-NUNDES et al., **Métodos alternativos para determinação da potência de veneno e antiveneno botrópico: aplicações e perspectivas para o controle da qualidade**. *Vigilância Sanitária Debate*, 10: 106-121, 2022.

6-CAJADO-CARVALHO, D., et al. ***Tityus serrulatus* scorpion venom: in vitro tests and their correlation with in vivo lethal dose assay**. *Toxins*, 9 (12): 1-14, 2017.

7-WHO. World Health Organization. **WHO guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. 2. Ed. Geneva: World Health Organization, 2016.

8-GUTIÉRREZ, J. M., et al. **In vitro tests for assessing the neutralizing ability of snake antivenom: toward the 3 Rs principles**. *Frontiers of Immunology*, 11, article 617429, 2021.

9-LAUSTSEN, A. H., et al. **Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development**. *Toxins*, 8 (226): 1-33, 2016.

10-CARMO, A. O. et al. **Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenom production**. *Toxicon*, 97: 64-74, 2015.

11-BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira volume 2 – Monografias produtos biológicos**. 6 ed. Brasília: Anvisa, 2019.

12-RIAL, A., et al. **A new ELISA for the determination of potency in snake antivenoms**. *Toxicon*, 48: 462-466, 2006.

13-THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in assessing antivenom potency**. *Toxicon*, 17: 511-515, 1979.

14-MARIA, W. S., et al. **Neutralizing potency of horse antithropic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods**. *Toxicon*, 36 (10): 1433-1439, 1998.

15-HENEINE, L. G. D., et al. **Development of an ELSA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antithropic antivenom**. *Toxicon*, 36 (10): 1363-1370, 1998.

16-ALAPE-GIRÓN, A., et al. **A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus***. *Toxicon*, 35 (4): 573-581, 1997.

17-GUTIERREZ, J. M., et al. **An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica**. *Toxicon*, 26 (4): 411-413, 1988.

18-CHACÓN, 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*, 93: 41-50, 2015.

19-LOPES-DE-SOUZA, L., et al. **Development of a cell-based in vitro assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency**. *Toxicon*, 170: 68-76, 2019.

20-SLVA, L. T., et al. **Analysis of antibodies avidity for *Tityus serrulatus* scorpion venom in antivenom production and its potential for application as a potency test**. *Toxicon*, 236: 1-9, 2023.

APOIO:

UFMG

FUNED
Fundação
Ezequiel Dias

RETROLAB

FAPEMIG