

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

Rafaela Küster Gon

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS
IMUNOBiolÓGICOS NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2017

Rafaela Küster Gon

APLICAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS
IMUNOBIOLOGICOS NO BRASIL

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dra. Isabella Fernandes Delgado

Orientador: Dr. José Mauro Granjeiro

Rio de Janeiro

2017

Rafaela Küster Gon

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS
IMUNOBIOLÓGICOS NO BRASIL**

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

Orientadores: Dra. Isabella Fernandes Delgado
Dr. José Mauro Granjeiro

Rio de Janeiro

2017

Catlogação na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Gon, Rafaela Küster

Aplicação de Métodos Alternativos ao Uso de Animais no Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Produtos Imunobiológicos no Brasil. / Rafaela Küster Gon - Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2017.

Número Catalogação

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

1. Métodos alternativos. 2. 3 R's. 3. Laboratórios Públicos Oficiais 4. Controle da Qualidade. 5. Produtos Imunobiológicos.

Rafaela Küster Gon

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO
DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS
IMUNOBIOLÓGICOS NO BRASIL**

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

Aprovado em 30/05/2017

BANCA EXAMINADORA



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



Luciene Bottentuit Lopez Balottin (Doutora)
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia



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



Isabella Fernandes Delgado (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / FIOCRUZ



José Mauro Granjeiro (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia / Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Isabella Delgado e José Mauro Granjeiro por colaborarem com a orientação, confiando a mim este tema.

Aos colegas de trabalho pelo apoio na rotina do setor.

Aos colegas de classe pelos momentos vividos de muito aprendizado e companheirismo.

Aos coordenadores, professores e demais colaboradores do Programa de Pós-Graduação do INCQS, pela atenção, delicadeza e disponibilidade.

Aos respondentes do questionário e entrevistados, que tanto contribuíram para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

Aos participantes da banca examinadora.

A todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

“Quanto ao resto, nosso jovem investigador simplesmente chegou um pouco cedo à descoberta de que todo conhecimento é um monte de retalhos, e que cada passo à frente deixa atrás um resíduo não resolvido”.

Sigmund Freud

RESUMO

Nas últimas décadas, a prática de uso de animais no meio científico vem sendo alvo de muitas críticas por vários segmentos da sociedade, que questionam o sofrimento dos animais. Na busca por uma abordagem que reduza, refine e substitua o uso dos animais, surgem metodologias alternativas embasadas no conceito dos 3R's. Assim, neste trabalho, reúnem-se análises e discussões a respeito do tema nos Laboratórios Públicos Oficiais (LPO), que produzem produtos imunobiológicos (vacinas e soros hiperimunes), mapeando os testes *in vivo* utilizados no desenvolvimento e controle da qualidade, e verificando a aplicação do uso dos métodos alternativos. A pesquisa no presente trabalho foi realizada por coleta de informações dos LPOs e consistiu de duas etapas: um questionário de triagem, recebido e respondido por meio eletrônico e por uma entrevista presencial, no próprio LPO, gravada em áudio. Os LPOs apresentam suas peculiaridades em relação às suas realidades, como infraestrutura, pessoal, capacidade técnica, tempo de dedicação etc, mas no geral todos compartilham do interesse, e entendem a importância, da aplicação do conceito dos 3 R's e julgam necessário maior suporte, com maior investimento e fomento nesta área. Segundo os LPOs, os trâmites burocráticos e regulatórios precisam de uma maior discussão no que tange à aplicabilidade do conceito dos 3R's, com a finalidade de facilitar a validação e o uso de métodos alternativos, assim como, deve haver maior atuação da Farmacopeia Brasileira na atualização de métodos já aceitos e validados. No geral, é necessário deixar o cenário mais propício para o desenvolvimento e validação de métodos alternativos para a melhoria das ações de atividades de desenvolvimento, produção e controle da qualidade de produtos imunobiológicos dos LPOs.

Palavras-chave: Métodos Alternativos. 3 R's. Laboratórios Públicos Oficiais. Controle da Qualidade. Produtos Imunobiológicos.

ABSTRACT

Over recent decades, the use of animals in the scientific environment has been under criticism by various segments of society that question the animal suffering. In the pursuit of an approach that reduces, refines and replaces the use of animals, emerge alternative methodologies based on the 3R's concept. Thus, in this work, analysis and discussions about the subject are gathered from Official Public Laboratories (OPL), producing immunobiological (vaccines and immunosera), mapping the *in vivo* tests used in the development and quality control, and verifying the applicability of alternative methods. The research in this work was developed by collecting information from the OPLs and consisted of two stages: a questionnaire of sorting, that was received and answered through an electronic platform and by interview, at the OPL facility, with audio recording. The OPLs show their peculiarities in relation to their realities, such as infrastructure, personnel, technical capacity, working hours etc., however, in general, all share the interest, understand the importance of applying the concept of the 3R's and deem more support with greater investment and development in this area necessary. According to the OPLs, bureaucratic and regulatory procedures need to be further discussed with regard to the applicability of the 3R's concept, in order to facilitate the validation, the use of alternative methods and a higher acting of the Brazilian Pharmacopoeia in updating already validated and accepted methods. In general, it is necessary to leave an auspicious scenario to the development, production and quality control actions, of the immunobiological products of OPLs.

Keywords: Analytical Methods. 3 R's. Official Public Laboratories. Quality Control. Immunobiological Products.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Manifestações pacíficas de grupos de proteção animal no Brasil e no mundo 14
- Figura 2: Livro “*Animal Liberation*”, publicado em 1975 e Peter Singer em 2014 18
- Figura 3: Anúncios da campanha contra a realização do teste de Draize em produtos cosméticos publicada pelo *The New York Times* na década de 1980 20
- Figura 4: Demonstração de *Adverse Outcomes Pathway* - AOP (em português: Vias de Respostas Adversas) como uma sequência de eventos-chave que ligam um evento de iniciação molecular a um resultado adverso através de diferentes níveis de organização biológica 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Produtos biológicos (vacinas e soros) presentes no portfólio dos Laboratórios Públicos Oficiais (LPOs)	45
Tabela 2:	Análise dos questionários por Laboratório Público Oficial (LPO)	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ALFOB - Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil

AOP- *Adverse Outcomes Pathway*

BraCVAM - Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

Bio-Manguinhos - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

BPL - Boas Práticas de Laboratório

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CPPI - Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

EURL –*European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing*

FDA - *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FRAME - *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments*

FAP - Fundação Atauípho Paiva

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

GT-PB - Grupo Técnico de Produtos Biológicos

ICATM - *International Cooperation on Alternative Test Methods*

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IVB - Instituto Vital Brazil

JACVAM- *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*

KoCVAM – *Korean Centre for the Validation of Alternative Methods*

LAL - Lisado de Amébócitos de *Limulus*

LPO – Laboratório Público Oficial

LNC - Laboratório Nacional de Controle

MAT- Teste de Ativação de Monócitos

MCTIC - Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação e Comunicação

MS – Ministério da Saúde

PNI –Programa Nacional de Imunização

PASNI - Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

RFFIT - *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test*

SUS - Sistema Único de Saúde

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização Mundial da Saúde

TECPAR- Tecnologia do Paraná

ToBI – Teste de Inibição da Ligação da Toxina

ZEBET - *Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais	12
1.2 Princípio dos 3 R's e Métodos Alternativos	15
1.3 Exemplos de Aplicações do Princípio dos 3R's	24
1.4 Métodos Alternativos Reconhecidos no Brasil.....	30
1.5 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais.....	33
1.6 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais e a Produção para o SUS	34
1.7 Justificativa.....	36

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38

3 METODOLOGIA

3.1 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais.....	39
3.2 Coleta de Informações.....	39
3.2.1 Questionário de Triagem.....	40
3.2.2 Formulário e Entrevista.....	42

4 RESULTADOS

4.1 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais	44
4.2 Portfólio dos laboratórios farmacêuticos oficiais	44
4.3 Questionário de triagem.....	46
4.4 Entrevista.....	52

5 DISCUSSÃO	77
-------------------	----

6 CONCLUSÕES.....	84
-------------------	----

7 PRODUTO TECNOLÓGICO	85
-----------------------------	----

REFERÊNCIAS	87
ANEXO A - DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	102
ANEXO B - PUBLICAÇÃO EM DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO CBPF FAP.....	108
APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM.....	107
APÊNDICE B - OFÍCIO 781/2016.....	108
APÊNDICE C - FORMULÁRIO PARA ENTREVISTA.....	110
APÊNDICE D - OFÍCIO 1183/2016.....	111
APÊNDICE E - QUESTIONÁRIOS DE TRIAGEM PREENCHIDOS PELOS LABORATÓRIOS PÚBLICOS OFICIAIS.....	114
APÊNDICE F - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A utilização de animais em laboratórios, tanto para fins de pesquisa e desenvolvimento quanto para testes rotineiros de controle da qualidade, é um tema que tem sido razão de diversas discussões, entre as quais: a quantidade de animais utilizados, a real necessidade de sua utilização e a eficácia da inferência dos dados obtidos para seres humanos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; PEREIRA; dos SANTOS, 2016).

Animais de várias espécies são empregados em pesquisa científica e testes a fim de comprovar a segurança e a eficácia de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Com base na suposição tradicional de que os animais respondem da mesma forma que os seres humanos quando expostos a certos produtos, esses, principalmente coelhos, camundongos e ratos, estão sujeitos a testes que avaliam a segurança de cosméticos, medicamentos, produtos químicos, materiais médicos e seus componentes. As reações à exposição destes produtos variam entre as espécies, tornando difícil extrair dados de ensaios com animais e aplicá-los diretamente a situações em que os seres humanos são expostos. Como resultado, os métodos de testes baseados no uso de animais podem falhar e não corresponder à realidade quando comparado às necessidades humanas, enquanto novas descobertas no campo de alternativas levaram a técnicas novas e aprimoradas, que não envolvem animais vivos (AAVS, 2017).

De uma maneira mais ampla, qualquer animal pode ser utilizado em experimentação, entretanto, procura-se um modelo específico para cada desfecho estudado. Como exemplo, podemos citar o uso do gato para estudo do sistema circulatório, a utilização do cão como modelo para estudo geniturinário e os pequenos roedores para avaliações do sistema respiratório, entre outros. Os animais mais

constantemente utilizados em experimentos são os roedores (camundongos, hamsters, ratos e porquinhos da Índia) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Segundo estimativa atual, mais de 100 milhões de animais são usados em todo o mundo, que é de cerca de 274.000 por dia, ou três a cada segundo. No entanto, esta estimativa é apenas para vertebrados. Os números reais são possivelmente muito maiores, já que diversos países não mantêm registros da quantidade de animais utilizados. Embora não existam dados oficiais, pela ausência dos registros, a estimativa é realizada com base em modelos matemáticos e estatísticos (VIVISECTION INFORMATION, 2017; PETA, 2017).

As justificativas para tal massificação na utilização dos roedores são o custo baixo, o porte reduzido, o fato de serem animais dóceis, de fácil manutenção e exigirem pouca alimentação; além de ocuparem pouco espaço e produzirem prole numerosa. Embora sejam os mais empregados, muitas outras espécies de animais são utilizadas, como os coelhos, cães, gatos, porco-anões, aves, rãs, peixes, ovelhas e alguns primatas não-humanos (TRÉZ & GREIF, 2000).

Conforme descrito por PAIXÃO (2001a), observa-se no mundo, a diminuição gradual do número de animais utilizados em laboratório, e, algumas hipóteses têm sido sugeridas para tal acontecimento, tais como:

- A suposta melhora da qualidade dos animais de laboratório, conseqüentemente reduzindo o número de repetições de testes e experimentos;
- Os experimentos em animais tornaram-se onerosos, de tal forma que passaram a ser evitados;
- Os protestos contra experimentação animal cresceram, especialmente a partir da década de 1970, obrigando cientistas a planejarem melhor seus experimentos, levando em consideração os chamados métodos alternativos, (*e.g., in vitro, in silico, ex vivo*).

O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum, que vem sendo empregada desde a antiguidade e apesar da comprovada importância dos modelos animais para as pesquisas, é frequente ver a comunidade científica questionada por grupos (em especial grupos ativistas), que defendem o direito dos animais – Figura 1. Questões como dor e angústia de animais em testes e a pressão sobre os setores de pesquisas científicas e industriais, em relação às questões éticas deste uso, convergem para, sempre que possível, substituir a experimentação animal por metodologias alternativas (MORAES, 2012).

Figura 1 – Manifestações pacíficas de grupos de proteção animal no Brasil e no mundo



Fonte: <http://acaopelosdireitosdosanimais.blogspot.com.br>. Acesso em 12/12/2016

Embora seja comum a opinião de que metodologias *in vitro* possam representar uma opção promissora para a pesquisa em geral, e que essas alternativas possam vir a substituir um número considerável de métodos utilizando animais, há de se considerar que o processo de desenvolvimento e validação de novos métodos alternativos é laborioso e requer grande investimento de tempo, dinheiro e pessoal capacitado (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004; ABREU, 2008). Estes métodos se encontram em distintos estágios de desenvolvimento e validação e devem possuir a robustez necessária para a aceitação pelo órgão de regulamentação (PRESGRAVE, et al., 2010).

Via de regra, tais alternativas são consideradas vantajosas quando comparadas aos ensaios *in vivo*. O uso de métodos alternativos apresenta diversas vantagens, que vão desde a não utilização de animais, quando se trata de métodos

de substituição, até a redução de custos a resultados mais preditivos uma vez que métodos *in vitro* apresentam como benefício o fato de serem menos sujeitos a interferentes externos, já que os animais sofrem influência de presença de ruídos, alterações de metabolismo em função de alguma modificação de temperatura, ciclo de luz, umidade etc (PRESGRAVE, et al., 2010; VICTAL, et al., 2015), além da maior facilidade de disseminação para outros laboratórios de saúde pública (CERQUEIRA,2008).

Os métodos alternativos podem ser adotados como ferramentas complementares aos testes *in vivo*, onde ambos em conjunto, se tornarão ferramentas indispensáveis para a compreensão do comportamento de substâncias no organismo humano, dos mecanismos de ação para a análise de riscos e estabelecimento de limites considerados seguros (PEREIRA; dos SANTOS, 2016).

1.2 Princípio dos 3 R's e Métodos Alternativos

A questão do sofrimento animal associada à prática da experimentação, culminou no surgimento do que pode ser considerado como uma referência para a atual ciência que faz uso de animais de laboratório: o conceito dos 3R's, do inglês *Reduction, Refinement and Replacement* - Redução, Refinamento e Substituição- com a finalidade de minimizar o uso e o sofrimento animal em experimentos. Em 1959, Willian Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica este conceito, estabelecido pelo livro "*The Principles of Humane Experimental Technique*" (RUSSEL; BURCH, 1959), definindo os 3R's, cuja sigla significa respectivamente:

- Redução ("*reduction*"): um menor número de animais sendo utilizado para obter a mesma qualidade de informação, ou maximização da informação obtida, utilizando-se o mesmo número de animais do teste clássico. Reflete a procura por redução do número de animais utilizados em experimentos, o que é possível com a "escolha correta das estratégias";

- Refinamento ("*refinement*"): modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e/ou o estresse. A experiência da dor e do estresse tem, como resultado, mudanças psicológicas que interferem nos resultados obtidos. Sendo assim, o interesse dos cientistas é assegurar que as condições ambientais para os animais sejam as melhores possíveis. Promove o alívio ou a minimização do desconforto ou sofrimento animal, como o uso de anestésicos ou analgésicos, por exemplo. O termo refere-se também ao refinamento do método quanto ao seu desfecho. Como exemplo, podemos citar o emprego de um desfecho quantitativo (*i.e.*, mais preciso), ao invés de um desfecho qualitativo (*i.e.*, mais sujeito a erros); e:
- Substituição ("*replacement*"): estabelece a substituição de animais vertebrados vivos por métodos que utilizem outros materiais (RUSSEL; BURCH, 1959; PRESGRAVE, 2002).

A definição para métodos alternativos pode ser resumida como qualquer método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar a realização de experimentos com animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino como preconizado pela Resolução Normativa nº 17 publicada em 2014 (BRASIL, 2014). Assim, a noção dos 3R's representa o impulso inicial na comunidade científica do conceito de métodos alternativos. Tais princípios nortearam a busca por alternativas cientificamente válidas para os testes feitos em animais, uma vez que estudos posteriores também comprovaram a existência de diferenças teciduais e metabólicas entre humanos e animais, tornando evidente a necessidade de modelos *in vitro* apropriados (RENAMA, 2012; BRASIL, 2012).

As alternativas de substituição podem envolver os seguintes procedimentos: técnicas físico-químicas, uso de modelos matemáticos e computacionais, uso de organismos "inferiores" não protegidos pela legislação, incluindo invertebrados, plantas e microrganismos, uso de métodos *in vitro* e estudos em humanos, seja em

voluntários ou estudos epidemiológicos (BALLS; FENTEM, 1997). Algumas vantagens conhecidas dos ensaios *in vitro* são maior reprodutibilidade, períodos de testes mais curtos, em geral menor custo e maior facilidade de controle dos experimentos (CHIARI et al., 2012; SEHNEM et al., 2012).

Apesar da pouca atenção da comunidade científica durante a década de 1960 aos princípios dos 3R's, este conceito foi reconhecido como uma tendência mundial durante os anos seguintes, iniciando uma forte pressão quanto a implicações éticas para a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no trabalho da validação de novos métodos alternativos na área biomédica (ABREU, 2008).

Nas décadas de 1970 e 1980, o interesse pelos métodos alternativos se tornou bastante consistente. As discussões sobre o assunto ficaram mais frequentes, as legislações passaram a aderir ao princípio dos 3R's e as pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos se tornaram mais frequentes. Os métodos alternativos, inclusive, começaram a ter espaço também no campo dos testes toxicológicos preditivos e as indústrias passaram a financiar desenvolvimentos para métodos toxicológicos *in vitro* (ROWAN, 1997; ABREU, 2008).

Em 1975, Peter Singer, filósofo e professor australiano atuante na área da ética prática, lançou o livro intitulado de "*Animal Liberation*" – *Libertação Animal*– Figura 2. O livro denuncia práticas de crueldade aos animais de um ponto de vista ético, defendendo a extensão da noção de direito à vida digna, de não exploração e com movimento de proteção aos animais. Dessa forma, o livro foi um marco importante e um grande passo para trazer à tona a discussão a respeito do sofrimento animal (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

Figura 2: Livro “*Animal Liberation*”, publicado em 1975 e Peter Singer em 2014



Fonte: <http://decliniodaescola.blogspot.com.br/petersingeremaustratosanimais.html>. Acesso em 13 jan. 2017

Dentre as denúncias realizadas por Peter Singer, estava o teste de irritação ocular de Draize (teste de toxicidade preditiva para a determinação da irritabilidade oftálmica induzida por drogas, cosméticos e substâncias químicas nos olhos de coelhos), descrito por Draize; Woodard; Calvery em 1944, que foi um importante alvo de combate para os ativistas. Mediante esta publicação, o teste de Draize gerou muitos protestos, em especial contra a indústria de cosméticos, que fazia uso do teste em grande escala (WILHELMUS, 2001).

Na primavera de maio de 1980, Henry Spira, um defensor belga-americano dos direitos dos animais, dirigiu-se a uma loja da gigante de cosméticos Revlon®, em Manhattan com um caminhão cheio de coelhos albinos e, juntamente com trezentos manifestantes vestidos de coelho, protestaram contra os testes de Draize que aquela indústria realizava para testar os seus produtos. Ele já estava negociando com a Revlon® para que a empresa contribuísse financeiramente com o desenvolvimento de um teste alternativo que não utilizasse animais, mas a empresa ignorava as suas propostas, até que Spira conseguiu articular uma dezena de associações de defesa dos animais que financiaram um protesto em vários jornais, entre eles o *New York Times*, com a publicação dos anúncios: “*Cego pela beleza*” e “*Quantos coelhos a*

Revlon cega em nome da beleza?” (Figura 3), o que acabou por trazer a opinião pública para o seu lado (GORDILHO, 2014).

Como resultado dos protestos, a Revlon® começou a financiar pesquisas para alternativas não animais. Outras companhias, como AVON®, Mary Kay®, Amway® e Bristol-Myers®, seguiram o mesmo caminho e colaboram no fomento às pesquisas afins (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

Graças ao movimento iniciado por Spira hoje já existem mais de 60 métodos alternativos disponíveis, entre eles o *Eytex* e o *Matrex*, e aqueles que utilizam córneas de animais ou seres humanos mortos, além de células corneais cultivadas *in vitro* (GORDILHO, 2014).

Pode-se dizer que, somente nos anos 1980, o fomento por novas metodologias alternativas à utilização de animais na pesquisa científica se consolidou. Novas legislações, entre elas sanitárias, passaram a aderir ao conceito dos 3R's e as pesquisas em métodos alternativos aumentaram consideravelmente (PAIXÃO, 2001a; ABREU, 2008).

A primeira publicação oficial sobre a aplicação dos 3R's só surgiu em 1986, quando foi criada na Europa, a Diretiva 86/906/EEC - "*Animal welfare guideline*", que estabelece: "um experimento não poderá ser executado em animal se outro método cientificamente satisfatório, que não implique na utilização de um animal, seja razoável e possível" e descreve as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação científica (ROWAN; ANDRUTIS, 1990; ABREU, 2008).

Figura 3: Anúncios da campanha contra a realização do teste de Draize em produtos cosméticos publicada pelo *The New York Times* na década de 1980



Blinded for Beauty

The Draize Eye Irritation Test is one of the most common but most controversial product safety tests. In this procedure, irritating and harmful products are repeatedly placed in the eyes of rabbits often resulting in pain and inflammation. After reading the facts about the test and why it does not protect the public, we hope you will join with scientists, legislators, educators and others in working to eliminate the suffering of these animals. Your letter about this campaign may also help to end this cruelty.

WHAT IS THE DRAIZE TEST?

The Draize test is used to determine whether the irritative effects of new products in development are likely to be harmful to the eyes of humans. The original Draize test was developed in 1944 by Dr. John A. Draize, a toxicologist at the University of Cincinnati. The test involves placing a substance under the eye of a rabbit and observing the reaction. The test is used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHO IS DOING THE DRAIZE TEST?

Many major corporations in the food and drug industries, including Revlon, have used the Draize test to determine the irritative effects of their products on the eyes of humans. The test is also used by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHY IS THE TEST DONE?

The Draize test is done to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans. The test is used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHY SHOULD IT BE STOPPED?

The Draize test is a cruel and unnecessary test that causes pain and suffering to rabbits. It is not necessary to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans. There are many alternative tests that can be used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

New England Anti-Vivisection Society 307 Washington St., Suite 500 Boston, MA 02108-1000 617-552-6666

How many rabbits does Revlon blind for beauty's sake?



WHAT IS THE DRAIZE EYE IRRITATION TEST?

The Draize test is used to determine whether the irritative effects of new products in development are likely to be harmful to the eyes of humans. The original Draize test was developed in 1944 by Dr. John A. Draize, a toxicologist at the University of Cincinnati. The test involves placing a substance under the eye of a rabbit and observing the reaction. The test is used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHO IS DOING THE DRAIZE TEST?

Many major corporations in the food and drug industries, including Revlon, have used the Draize test to determine the irritative effects of their products on the eyes of humans. The test is also used by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHY IS THE TEST DONE?

The Draize test is done to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans. The test is used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

WHY SHOULD IT BE STOPPED?

The Draize test is a cruel and unnecessary test that causes pain and suffering to rabbits. It is not necessary to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans. There are many alternative tests that can be used to determine the irritative effects of new products on the eyes of humans.

Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Henry_Spira. Acesso em: 20 dez. 2016

As agências regulatórias passaram a se posicionar de forma mais efetiva nos anos 1990, com maior discussão a respeito da validação dos métodos alternativos. Vários esforços foram e têm sido efetuados para a busca de alternativas, com a criação de centros dedicados ao desenvolvimento e validação de métodos alternativos (CAMPOS et al., 2016). A validação consiste no processo através do qual é estabelecida a pertinência de um procedimento para um objetivo específico; significa estabelecer a confiabilidade e a relevância do método para um propósito (OECD, 2005).

A busca por métodos alternativos não se sustenta tão somente pelas implicações éticas relacionadas ao uso de animais, mas, sobretudo, pode significar importante avanço técnico-científico que resultará na utilização de métodos mais

confiáveis, isto é, mais eficazes e menos suscetíveis a erros, o que requer um processo de validação bem estruturado. O desenvolvimento de um método alternativo envolve uma série de etapas que se inicia no desenvolvimento do método em si e segue até o aperfeiçoamento do protocolo, o que inclui a garantia da facilidade de transferência da metodologia e a determinação das principais características do ensaio. Em que pese o processo de incorporação de novos métodos alternativos, cabe destacar o consenso mundial a respeito do tema, em que o processo de validação é considerado etapa prévia obrigatória à etapa de aceitação regulatória. De fato, o que diferencia um método alternativo válido de um método validado (passível de ser usado para fins regulatórios) é o resultado obtido após rígido processo de validação (PAUWELS; ROGIERS, 2004). Os métodos válidos são aqueles que não passaram, necessariamente, por um processo completo de validação, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS; ROGIERS, 2004). Isto significa dizer que são métodos ainda em estudo, entretanto, passíveis de serem usados, ou seja, com grande possibilidade de virem a ser validados (PRESGRAVE, 2012). Enquanto que os métodos validados são aqueles que a relevância e a confiabilidade estão estabelecidas para um propósito, de acordo com critérios previamente estabelecidos (PAUWELS; ROGIERS, 2004). Dessa forma, um método validado é aquele que já passou por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e prontos para serem aceitos oficialmente (PRESGRAVE, 2012; OECD 2005).

Os métodos alternativos devem possuir a robustez necessária para a aceitação pelo órgão de regulamentação. O processo de validação de métodos alternativos visa verificar a otimização, potencial de transferência, reprodutibilidade e relevância do método proposto, com o objetivo de ser submetido à apreciação da agência regulatória e, uma vez aprovado, tornar-se oficialmente disponível para a avaliação segurança ou no processo de controle da qualidade de matéria prima ou de um produto acabado. A disponibilização mundial dos métodos validados ocorre, via de regra, através dos guias da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e/ou de farmacopeias (OECD, 2005; FARMACOPEIA Brasileira, 2010). As

diretrizes de ensaios da OECD são uma coleção de métodos de ensaio, internacionalmente aceitos, utilizados por laboratórios independentes, governos e indústrias para determinar a segurança dos produtos químicos e preparações químicas, incluindo agrotóxicos e produtos químicos industriais (CAMPOS et al., 2016).

Desta forma, alguns países, mediante o cenário histórico e à complexidade de tal processo, criaram centros de pesquisa e fomento para o desenvolvimento e a validação de metodologias alternativas ao uso de animais, tais como: o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) na Inglaterra, o *Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments* (ZEBET) na Alemanha, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) nos EUA, o *European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing* (EURL-ECVAM) da Comunidade Europeia, o *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) no Japão, o *Korean Center for the Validation of Alternative Methods* (KoCVAM), entre outros. Existe ainda, o *International Cooperation on Alternative Test Methods* (ICATM), fórum de discussão para questões relativas ao desenvolvimento conjunto e validação de novos métodos alternativos. EURL-ECVAM, ICCVAM, Health Canada, JaCVAM, KoCVAM compõem o ICATM, que desde 2015 conta ainda com Brasil e China como observadores.

No Brasil, temos o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), que é parte integrante do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). O centro foi criado em 2012, a partir de uma parceria da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através de Portaria nº 49 publicada em 2012 e visa, principalmente, validar métodos alternativos ao uso de animais na experimentação e na educação (BRASIL, 2012).

Também no país, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa é do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este Conselho é responsável por credenciar as organizações que utilizem animais em seus trabalhos, além de criar as normas brasileiras de produção e uso de

animais. Em 2014, a Resolução Normativa nº 17 do CONCEA estabeleceu o processo de reconhecimento de métodos alternativos no Brasil e determinou o prazo para a substituição do uso de animais por métodos alternativos reconhecidos (CONCEA, 2015).

A Fiocruz também integra a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) ao uso de animais. A RENAMA, que foi instituída pela Portaria nº 491 de 03 de fevereiro de 2012 pelo Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC), promove ações para a redução de uso de animais no Brasil e favorece a existência de infraestrutura laboratorial e de quadro pessoal especializados, capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais e desenvolver e validar novos métodos no País. A rede visa: estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias; monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais; promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e contribuir para o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais (RENAMA, 2015).

A RENAMA disponibiliza, através de uma rede de laboratórios associados, os métodos alternativos ao uso de animais validados no Brasil, assim como métodos disponíveis na OECD, observando os princípios de BPL. Desta forma, contribui para a garantia da qualidade dos serviços ofertados ao setor produtivo e o aumento, natural, da sua competitividade internacional, uma vez que a inexistência de estratégias alternativas ao uso de animais representa, muitas vezes, barreiras técnicas à exportação e alimenta grupos extremistas de proteção animal; fato que coloca em risco atividades laboratoriais (RENAMA, 2015).

1.3 Exemplos de Aplicações do Princípio dos 3R's

Há um amplo escopo para a aplicação dos 3R's no uso de animais em estudos toxicológicos e em ensaios de controle da qualidade. Alguns métodos alternativos recentemente validados podem substituir por completo o uso de animais e outros podem reduzir seu uso. No entanto, é importante destacar que toda pesquisa na área de métodos alternativos é oportuna e recomendada pelas agências de validação internacionais, havendo diversos exemplos de estudos que geraram importantes contribuições em termos de refinamento das técnicas e/ou redução do número de animais por desfecho avaliado (ALVES; COLLI, 2006). Embora os métodos alternativos validados não substituam completamente os testes que utilizam animais, podem resultar na redução deste uso, pois estão definidos por seu desfecho (tipo de avaliação) independente da aplicação do produto. Isto quer dizer que, determinado método alternativo pode ser usado para teste de cosmético, agrotóxico, medicamento etc (dos SANTOS et al., 2015).

Uma importante área de aplicação das metodologias *in vitro* é a produção de anticorpos, inclusive monoclonais, que pode substituir o método tradicional de obtenção, através da injeção de antígenos em animais por produção em cultura (BRUCE et al., 2002). Novas alternativas à técnica tradicional de produção de anticorpos monoclonais em camundongos vêm sendo pesquisadas mundialmente. Estes vêm sendo produzidos através de cultivo dos hibridomas secretores em sistemas de cultivo *in vitro*, utilizando meios de cultura industrializados (ZANATTA, 2009). Estas novas metodologias são baseadas na utilização de sistemas mais sofisticados de cultivo, onde os hibridomas - que resultam da fusão de células de mieloma murino com linfócitos B produtores de um determinado anticorpo- alcançam altas concentrações celulares em poucos dias (três a cinco dias) e, por conseguinte, os anticorpos monoclonais chegam a concentrações máximas no sobrenadante de cultura neste período (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Além disso, o uso dos sistemas de cultivo *in vitro* permite utilizar meios de cultura quimicamente definidos e livres de componentes de origem animal, simplificando significativamente os métodos de purificação do produto (ZANATTA, 2009).

Um bom exemplo da aplicação da regra dos 3R's no laboratório de controle da qualidade é o uso dos métodos *in vitro* para avaliação da potência de produtos biológicos de uso humano. A potência dos componentes diftérico e tetânico, presentes em vacinas contra difteria, tétano e coqueluche (*e.g.*, DTP, DT, dT e DTP acelular) é determinada a partir de um teste de duas etapas (imunização e soroneutralização) que utiliza cobaias e/ou camundongos (MELANDRI, 2011). A etapa de soroneutralização é a que envolve maior número de animais, cerca de 80 a 90% do total utilizado no ensaio. Alguns métodos alternativos foram propostos com a finalidade de substituir os animais utilizados na etapa de soroneutralização. Neste contexto, temos o já validado teste de inibição de ligação da toxina (ToBI) realizado *in vitro* (ESAC/ECVAM, 2000). Assim, mesmo que permanecendo a necessidade de animais na etapa de imunização, a implementação de ensaios *in vitro* para avaliação da soroneutralização permite uma redução significativa do número de animais utilizados (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

A caráter de exemplo, o método LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus*) propõe a substituição do ensaio de pirogênios realizado em coelhos, tanto em ensaios que ocorrem em pesquisas, como na indústria farmacêutica, em produtos para saúde e outras, quando se quer descartar a possibilidade de contaminação pirogênica. Existem várias razões pelas quais o método LAL possa ser utilizado para a detecção de endotoxinas bacterianas, como: baixo limite de detecção, maior especificidade, menor custo, menor variabilidade dos resultados e a possibilidade de quantificar o conteúdo de endotoxinas (KOMSKI, 2015). No entanto, apesar das vantagens do teste LAL, ele não pode ser considerado como um substituto total do teste em coelhos, pois, detecta somente endotoxina, não sendo aplicável às contaminações por outros pirogênios (*e.g.* fungos, vírus) que poderiam causar sinais clínicos graves em pacientes. Em alguns produtos biológicos, tais como soros hiperimunes, algumas vacinas e hemoderivados, a endotoxina se liga às proteínas plasmáticas do produto, não sendo detectada no teste, que só quantifica endotoxina livre (SPREITZER et al, 2002, SCHINDLER, et al, 2006, SCHINDLER et al., 2009). Dessa forma, quando o teste foi oficializado pela Farmacopeia Americana, recebeu o nome de Ensaio de

Endotoxina, refletindo melhor a sua finalidade (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

O método MAT (Teste de Ativação de Monócitos) é também um exemplo apontado como método alternativo. Pode ser utilizado como opção ao teste de pirogênio em coelhos; ele é utilizado para detectar ou quantificar possíveis contaminantes presentes na amostra, que quando em contato com monócitos do sangue humano, induzem a liberação de citocinas. As citocinas têm um papel importante na patogênese da febre (HARTUNG et al., 2001; SCHINDLER et al, 2009; EUROPEAN FARMACOPOEIA, 2010). Já que o MAT é sensível para todos os tipos de pirogênios e tem o mesmo mecanismo biológico responsável pela reação de febre em humanos, o ICCVAM recomendou sua utilização desde que fique demonstrada a equivalência de seus resultados ao teste em coelhos, em conformidade com a regulamentação aplicável (ICCVAM, 2008). O MAT, entretanto, ainda não foi avaliado para um número suficiente de produtos, ainda faltam dados que possam garantir sua capacidade em detectar pirogênios não endotoxinas e deve ser realizada a validação do método para cada classe de produtos (DA SILVA et al., 2015).

Outra possibilidade relevante são culturas de células e tecidos humanos (de órgãos como pulmão, músculo, pele, olhos e membranas mucosas) que possibilitam a observação dos mecanismos biológicos pelos quais uma substância atua. Pode-se hoje reproduzir *in vitro* os processos bioquímicos gerados por uma substância. Em um futuro próximo, a tendência é que se possa prever as consequências funcionais - alterações nos genes, mudanças no crescimento celular etc - da exposição de uma célula no corpo humano a um determinado xenobiótico (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

Dentre os métodos alternativos mais importantes estão os ensaios de citotoxicidade (AZEVEDO et al., 2015). Estes ensaios avaliam os efeitos tóxicos do agente testado às funções celulares basais, fazendo parte do primeiro nível de testes para avaliar a biocompatibilidade de materiais e substâncias, requisito obrigatório para considerar um produto seguro (ROGERO et al., 2003). Os ensaios de citotoxicidade possibilitam a avaliação do potencial toxicológico *in vitro* do produto quando em

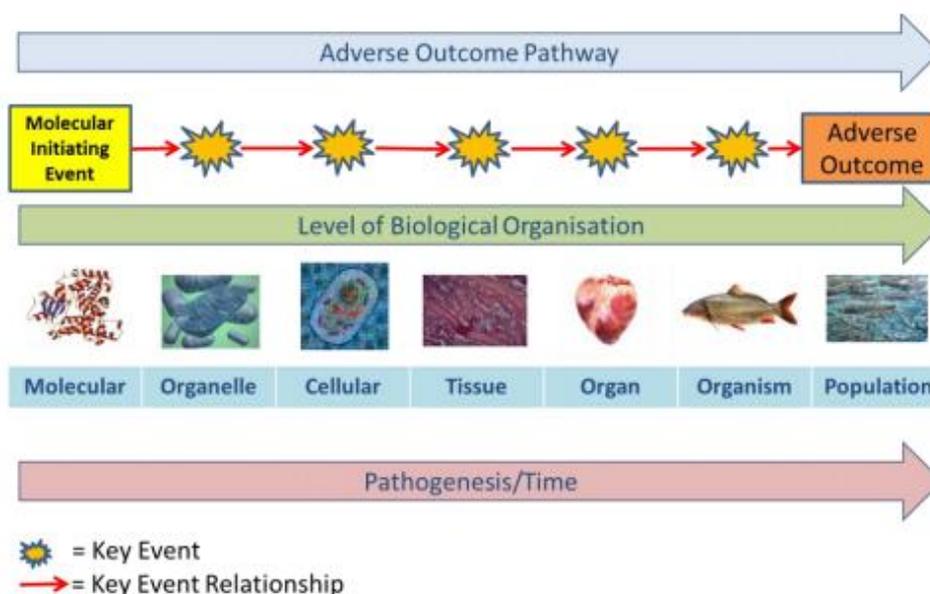
contato com a célula, indicando se o produto deve ser descartado ou objeto de estudos posteriores (AZEVEDO et al., 2015).

Em um contexto geral, através dos testes *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e em último caso *in vivo*, é possível agrupar uma série de dados e avaliá-los dentro de um sistema de teste integrado, de maneira a gerar informações concretas para a avaliação de toxicidade de uma substância química, a chamada *Integrated Approaches to Testing and Assessment* (IATA); em português: Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (OECD, 2016). Assim, através de uma forma integrada e sistemática de organização dos dados toxicológicos, as técnicas alternativas tornam-se não só testes substitutos autônomos à experimentação animal, mas vão suportar outros tipos de informação, ajudando, priorizando e otimizando a avaliação da toxicidade de uma substância (VICTAL et al., 2015). A estratégia IATA segue uma abordagem repetida para responder a uma pergunta definida em um contexto regulatório específico, levando em consideração o nível aceitável de incerteza associado ao contexto de decisão (OECD, 2017). As IATA's propiciam a avaliação de novos dados de abordagem e a compreensão da sua relevância para desfechos específicos, a fim de obter resultados reprodutíveis, compreensíveis e estatisticamente sólidos. Para aceitação regulatória de dados de toxicidade gerados por métodos alternativos, métodos confiáveis devem ser combinados com dados de modelagem computacional e conhecimentos de informações existentes, que juntos devem fornecer uma previsão toxicológica com um nível de confiança suficientemente elevado para a aceitação em uma avaliação da segurança (BENFENATI et al., 2016).

O AOP (*Adverse Outcomes Pathway*) é um conceito, de via de resposta adversa, no trabalho da OECD sobre toxicologia preditiva, melhorando os usos e aplicações de informações com mecanismos para necessidades de teste e avaliação. A estrutura da AOP constitui uma base para o desenvolvimento de novos métodos de ensaio que não envolvam animais. Ele também fornece contexto biológico para informações com mecanismos de ensaios existentes (KNAPEN et al., 2015). Este conceito aborda necessidades como: *i.* novos métodos de ensaio *in vitro* que podem se tornar diretrizes; *ii.* identificação de novos métodos para o agrupamento de

produtos químicos; *iii.* avaliação de riscos para o desenvolvimento de IATA's para fins de risco definidos; *iv.* abordagens para decisões sobre o efeito adverso de um produto químico usando informações existentes, métodos alternativos e estratégias de testes adaptados. A visão é que os resultados de combinações apropriadas de testes *in silico*, químicos e *in vitro*, que visam eventos-chave ao longo de AOP's bem definidos, poderiam fornecer informações suficientes para avaliação de riscos de novos testes (TOLLEFSEN, et al., 2014). Em resumo, um AOP é uma descrição detalhada de uma cadeia de eventos após um evento de iniciação molecular (uma interação direta de um produto químico com um alvo molecular) levando a um resultado adverso no nível individual ou populacional através de uma série de eventos-chave intermediários, abrangendo diferentes níveis de organização biológica (KNAPEN et al., 2015), como demonstrado na Figura 4 - Demonstração de *Adverse Outcomes Pathway* (AOP), em português: Vias de Respostas Adversas, como uma sequência de eventos-chave que ligam um evento de iniciação molecular a um resultado adverso através de diferentes níveis de organização biológica.

Figura 4: Demonstração de *Adverse Outcomes Pathway* - AOP (em português: Vias de Respostas Adversas) como uma sequência de eventos-chave que ligam um evento de iniciação molecular a um resultado adverso através de diferentes níveis de organização biológica



Fonte:[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/jm/mono\(2016\)67](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/jm/mono(2016)67). Acesso em 04 mai. 2017

Os eventos adversos são frequentemente os pontos finais reportados nos testes realizados utilizando as diretrizes de ensaio padrão *in vivo* da OECD ou podem servir para observações em outras investigações toxicológicas ou epidemiológicas. A estrutura do caminho de AOP pode ser utilizada para facilitar o desenvolvimento da IATA (OECD, 2017), proporcionando uma estrutura que retrata o conhecimento existente sobre a ligação entre um evento de iniciação molecular direta e um resultado adverso a um nível de organização biológica relevante para a avaliação de risco (TOLLEFSEN, et al., 2014). O AOP se torna necessário para avaliar o risco potencial de um produto químico específico e isto, por sua vez, pode se tornar a chave para as IATA's, incorporando resultados de ensaios em vários níveis de organização biológica, descrevendo a base biológica de toxicidade (KNAPEN, et al., 2015). Neste contexto, o AOP pode ajudar a definir as necessidades relevantes para a melhoria ou desenvolvimento de um teste (EDWARDS et al., 2016). Espera-se que os AOP's forneçam uma visão da relevância, confiabilidade e incertezas biológicas associadas aos resultados *in silico*, em abordagens químicas e *in vitro* (TOLLEFSEN et al., 2014).

1.4 Métodos Alternativos Reconhecidos no Brasil

No Brasil, foram reconhecidos em 2014, 17 métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa. O CONCEA, através da Resolução Normativa nº 18, listou os métodos, divididos em sete grupos, que servem para medir o potencial de irritação e corrosão da pele e dos olhos, fototoxicidade, absorção e sensibilização cutânea, toxicidade aguda e genotoxicidade (BRASIL, 2014).

Os 17 métodos reconhecidos pelo documento servem para avaliar:

- Potencial de irritação e corrosão da pele

OECD TG 430 – corrosão dérmica *in vitro*: teste de resistência elétrica transcutânea

OECD TG 431 – corrosão dérmica *in vitro*: teste da epiderme humana reconstituída

OECD TG 435 – teste de barreira de membrana *in vitro*

OECD TG 439 – teste de irritação cutânea *in vitro*

- Potencial de irritação e corrosão ocular

OECD TG 437 – teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina

OECD TG 438 – teste de olho isolado de galinha

OECD TG 460 – teste de permeação de fluoresceína

- Potencial de fototoxicidade

OECD TG 432 – teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU

- Absorção cutânea

OECD TG 428 – método *in vitro* de absorção cutânea

- Potencial de sensibilização cutânea

OECD TG 429 – sensibilização cutânea: ensaio do linfonodo local

OECD TG 442A – versão não radioativa do ensaio do linfonodo local

OECD TG 442B – versão não Radioativa do ensaio do linfonodo local

- Toxicidade aguda

OECD TG 420 – toxicidade aguda oral: procedimento de doses fixas

OECD TG 423 – toxicidade aguda oral: classe tóxica aguda

OECD TG 425 – toxicidade aguda oral: procedimento "*up and down*"

OECD TG 129 – estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica

- Genotoxicidade

OECD TG 487 – teste do micronúcleo em célula de mamífero *in vitro*.

A ANVISA determina que sejam utilizados métodos alternativos sempre que for possível, mas não impõe restrição quanto ao uso de animais. A agência deliberou pela aceitação dos 17 métodos alternativos validados ao uso de animais nas petições para registros e controle de serviços de produtos sujeitos a vigilância sanitária. A deliberação, ocorrida através da publicação da Resolução RDC nº 25 de 07 de agosto de 2015, foi motivada pelo CONCEA, que solicitou formalmente a manifestação da Agência (BRASIL, 2015; ANVISA, 2017). A medida garante que qualquer metodologia alternativa reconhecida pelo CONCEA será aceita pela agência, mesmo que não estejam previstos em normas específicas ou que a norma de algum produto exija teste com animais (BRASIL, 2015).

O CONCEA, através da Resolução Normativa nº 31 de 18 de agosto de 2016, reconheceu métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Esta Resolução Normativa reconhece o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa (BRASIL, 2016). Os 7 métodos alternativos agrupados nos 4 desfechos são mencionados a seguir:

- Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:

Método OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares

Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído

- Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:
Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea *in chemico*
Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea *in vitro*

- Avaliação de toxicidade reprodutiva:
Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento
Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva

- Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:
Teste de Endotoxina Bacteriana.

Como colocado anteriormente, é crescente a procura e aperfeiçoamento de métodos que substituam os animais vivos em experimentos. O aprimoramento do conhecimento e a divulgação de novas técnicas alternativas, que visam à substituição integral e de grande parte do uso de animais em testes de medicamentos é uma tendência notória e deve ser levada em consideração no campo da vigilância sanitária, principalmente ao que tange a parte de desenvolvimento e validação.

1.5 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais

Os laboratórios oficiais são instituições públicas que produzem medicamentos, soros e vacinas para atender às necessidades dos programas do Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo Bastos (2006), “os laboratórios farmacêuticos nacionais surgiram associados ao atendimento à assistência farmacêutica à população e à cobertura das lacunas existentes na produção nacional de vacinas e medicamentos essenciais”. Tais estruturas garantem à população o acesso aos medicamentos quando da impossibilidade de adquiri-los no setor privado. O Brasil possui 19

laboratórios oficiais, vinculados à Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil (ALFOB), os quais estão vinculados ao Ministério da Saúde (MS), às Forças Armadas, às Secretarias de Saúde e às Universidades. A produção total dos laboratórios públicos abastece o SUS com 80% das vacinas utilizadas e 30% dos medicamentos (HASENCLEVER et al., 2008).

Os Laboratórios Farmacêuticos Oficiais possuem importante papel na política nacional de saúde, tanto no abastecimento direto do MS e das secretarias estaduais e municipais de saúde, por meio da produção de medicamentos a baixo custo, quanto na regulação do mercado farmacêutico, possibilitando com isso uma melhoria no acesso da população aos medicamentos de que necessita. O governo brasileiro tem contribuído estimulando a produção pública de medicamentos, com a finalidade de minimizar os gastos com a aquisição de medicamentos. O governo federal tem destinado investimentos para modernização e ampliação de parques fabris dos laboratórios públicos (HASENCLEVER et al., 2008).

Das principais funções dos laboratórios oficiais destacam-se: produção de medicamentos; garantia de suporte à produção em casos de graves necessidades de saúde pública; implementação do desenvolvimento tecnológico do setor farmacêutico, por meio da criação, apropriação ou transferência de tecnologia; capacitação de recursos humanos; busca por novos fármacos, priorizando aqueles necessários ao enfrentamento das doenças negligenciadas; regulação de mercados via preços; indução de mercados e desenvolvimento tecnológico via políticas públicas (ALFOB, 2015).

Os laboratórios oficiais estão interligados às diversas estruturas de governo como o MS e o MCTIC, permitindo a realização de parcerias importantes que aliam saúde e inovação, além de permitir a aproximação dos laboratórios às instituições de ensino e pesquisa, por meio dos incentivos financeiros.

1.6 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais e a Produção para o SUS

Com o objetivo de coordenar as ações de imunizações no país, que até então se caracterizavam pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura, em 1973 foi formulado o Programa Nacional de Imunizações (PNI), por determinação do MS, a fim de estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, buscando a integridade das ações de imunizações realizadas. Assim, o PNI passou a coordenar as atividades de imunizações desenvolvidas rotineiramente na rede de serviços. A Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que trata sobre imunizações e vigilância epidemiológica deu ênfase às atividades permanentes de vacinação e contribuiu para fortalecer institucionalmente o Programa (PNI, 2015).

Hoje, o PNI é parte integrante do Programa da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), braço da OMS, o PNI brasileiro é citado como referência mundial, que procura não apenas cumprir sua missão, mas ser ação de governo caracterizada pela inclusão social, na medida em que assiste a todas as pessoas, em todos os recantos do País, sem distinção de qualquer natureza (MS, 2003).

O complexo público produtivo atende ao MS, abastecendo o SUS e seus programas, no âmbito de suas competências, produzindo medicamentos sob diversas formas farmacêuticas (comprimidos, líquidos, pomadas etc.) e classes terapêuticas diferentes (analgésicos, antirretrovirais, hipertensivos, antibióticos, vacinas etc.), atendendo ao PNI (na maioria de sua demanda) com a produção de imunobiológicos. O Estado procura estimular a inovação entre o complexo produtivo, os serviços de saúde e as instituições de ensino/pesquisa (TEMPORÃO; NASCIMENTO; MAIA, 2005).

Em 1985, foi criado o Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos (PASNI), visando estimular a produção nacional por um conjunto de instituições públicas que possuíam base tecnológica e tradição na produção de vacinas, como o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (Bio-Manguinhos)/Fiocruz, Instituto Butantan, Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), Fundação Ataulpho de Paiva (FAP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Instituto Vital Brazil (IVB). O governo federal investiu nessas instituições recursos para

infraestrutura, capacitação e qualificação com a finalidade de suprimento autossuficiente de imunobiológicos ao PNI. As metas de autossuficiência não foram alcançadas, no entanto, criou-se no País a maior capacidade de produção de vacinas da América Latina, liderada por Bio-Manguinhos e pelo Instituto Butantan, que respondem pela maioria da produção nacional - e atualmente atendem a maior parte da demanda do Programa. O PASNI permitiu, além do investimento na qualidade e expansão da produção nacional, a colaboração do INCQS, incorporado à Fiocruz, que cumpre papel essencial ao realizar provas nos lotes de vacina fabricados no País (MS, 2003).

Os medicamentos biológicos, dentre os quais destacamos os soros e vacinas, são produzidos a partir da purificação de fluidos biológicos e/ou tecidos de origem animal, gerados por processos biotecnológicos em que células vivas, mantidas em laboratório, atuam como fábricas em linha de produção.

Os processos de fabricação da substância farmacológica requerem cuidados especiais para garantir sua qualidade (ARAUJO, 2012). A combinação das características ímpares dos medicamentos biológicos com a dificuldade de sua avaliação, resultam na necessidade de um controle criterioso para assegurar a segurança, a eficácia e a qualidade do produto.

A produção e controle da qualidade de produtos biológicos são reconhecidos como áreas nas quais o uso de animais se dá em larga escala. Devido às particularidades dessa classe de produtos, os testes de controle da qualidade são realizados a cada lote produzido, pelo laboratório produtor, e retestados pelo Laboratório Nacional de Controle (LNC). No Brasil, o INCQS é órgão que possui a responsabilidade oficial exclusiva sobre a fiscalização e o controle da qualidade dos imunobiológicos. Exercendo essa função desde 1983, o Instituto analisa os protocolos de produção e executa ensaios laboratoriais em lotes de imunobiológicos nacionais ou importados, adquiridos pelo MS e utilizados no PNI. O Grupo Técnico de Produtos Biológicos (GT-PB) do INCQS viabiliza as decisões técnico-científicas relacionadas às análises laboratoriais e documentais de cada lote de produto (INCQS, 2015).

1.7 Justificativa

O avanço do tema métodos alternativos no âmbito científico, tecnológico e ético tem sido de intensa discussão. Mundialmente, observa-se que alguns fatores vêm produzindo um aumento significativo no número de grupos de pesquisa e de estudos voltados para o campo dos “Métodos Alternativos ao Uso de Animais”; entre esses fatores podemos citar: *i.* as novas tendências do mercado consumidor, *ii.* as recentes descobertas científicas que vem sendo colocadas em prática (como *e.g.* a era “*Omics* - genômica, proteômica, transcriptômica etc, as plataformas tecnológicas do tipo “*high throughput*” e “*high contentscreening*” e os modelos do tipo “*system-on-a-chip*”) (KANDPAL; SAVIOLA; FELTON, 2009; AMARAL et al., 2006; ABACI; SHULER, 2015), *iii.* a crescente validação e aceitação regulatória de abordagens alternativas na área preditiva e de controle da qualidade, e sobretudo, *iv.* as pressões exercidas por grupos organizados e pela opinião pública em geral a favor do banimento do uso de animais em experimentação científica (PAUWELS; ROGIER, 2004).

Todo processo de produção e controle da qualidade de produtos sujeitos à ação de Vigilância Sanitária e que necessitem em alguma de suas etapas, do uso de animais para experimentação, se beneficiará com estudos voltados à validação de métodos alternativos, uma vez que estes métodos poderão representar uma maior qualidade e especificidade na determinação de diversos efeitos, bem como uma redução de custo e de número de animais próximo a 70% (FREITAS, 2008), além da abertura para o mercado internacional.

No Brasil, com a recente criação da RENAMA, esta área de pesquisa vem ganhando destaque e recebendo apoio financeiro do governo federal, sendo várias as linhas de pesquisa e possibilidades de investigações neste campo do saber.

A discussão sobre a utilização de animais na pesquisa, a intenção de redução do seu uso e o desenvolvimento (e/ou validação) de novas metodologias têm sido aos poucos introduzidos na realidade brasileira. Por esta razão, torna-se de grande importância a discussão e a interação e a compilação de dados em torno deste tema.

Assim, o presente trabalho se propõe a contribuir com uma busca de sistematização dos dados a respeito do tema, subsidiando políticas públicas, como por exemplo, aquelas apoiadas pelo MCTIC, com informações relevantes para que haja priorização de ações e maior chance de sucesso na aplicação dos princípios dos 3R's na área de produção e controle da qualidade de produtos imubiológicos (vacinas e soros hiperimunes).

Esta proposta alinha-se com a RENAMA, que estimula a implantação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos. A proposta também está em consonância com as resoluções do CONCEA, que monitora e avalia a introdução de técnicas alternativas, assim como com o panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3R's.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Mapear os testes *in vivo* utilizados no desenvolvimento e no controle da qualidade de produtos imunobiológicos no Brasil, verificando a existência de métodos alternativos já validados e com aceitação regulatória, e na sua ausência, a possibilidade de desenvolvimento de novas alternativas.

2.2 Objetivos Específicos

- Apontar os laboratórios públicos fabricantes de produtos imunobiológicos no Brasil e elencar seus produtos;
- Verificar se no desenvolvimento ou nos testes de rotina destes produtos o uso dos animais é necessário, delineando cada etapa específica;
- Categorizar os testes que utilizam animais, com dados precisos quanto à: espécie animal, número de animais por teste, dificuldade de aquisição da espécie animal, manutenção dos mesmos e duração do teste;
- Examinar se há métodos alternativos validados para cada teste *in vivo* mapeado, analisando características de cada método alternativo encontrado;
- Compilar as informações adquiridas para oferecer à RENAMA subsídios para o estabelecimento de prioridades em pesquisa, no desenvolvimento e na validação de novos métodos alternativos no País.

3. METODOLOGIA

3.1 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais

Inicialmente foi realizado um levantamento dos LPOs que fabricam produtos biológicos, sendo limitados ao campo dos imunobiológicos – soros hiperimunes e vacinas - e foi também listado o portfólio de cada empresa. Para tal levantamento, foram utilizados os *websites* da ANVISA e dos laboratórios listados.

Foi realizado um contato prévio com os laboratórios oficiais selecionados para apresentação do projeto e da proposta da pesquisa. Neste contato, foi informado que, na condição de laboratórios centrais da RENAMA, o INCQS e o INMETRO estavam realizando o levantamento das oportunidades de desenvolvimento e/ou de implementação de métodos alternativos aplicados a testes de rotina (controle da qualidade / produção) ou desenvolvimento de produtos imunobiológico, sendo explicado ainda que a participação do laboratório seria essencial neste levantamento de dados.

3.2 Coleta de informações

Para coleta das informações necessárias de cada laboratório oficial, a pesquisa constou de duas etapas, um questionário de triagem na primeira fase, recebido e respondido através de meio eletrônico (*e-mail*) e, na segunda fase, com a intenção de aprofundar os dados coletados inicialmente, uma entrevista no próprio laboratório, com registro de áudio.

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI / Fiocruz – anexo A. O acesso e a análise dos dados coletados (tanto nos questionários respondidos quanto na entrevista) serão realizados apenas pela pesquisadora e/ou seus orientadores.

Todos os dados ficarão sob o domínio da pesquisadora responsável pelo estudo e sob a guarda da mesma.

3.2.1 Questionário de Triagem

Esta ferramenta foi escolhida para realizar uma triagem, a fim de se obter dados iniciais e fundamentais, que serviram de base para a segunda etapa da pesquisa.

A coleta de informações iniciais desta pesquisa se deu, então, através da aplicação de um questionário de triagem (Apêndice A) que foi respondido por responsáveis nos LPOs, com perspectiva de uma futura visita aos laboratórios que aceitassem participar deste levantamento, com o objetivo de aprofundar o entendimento do tema.

Nesta etapa, um convite de participação foi endereçado diretamente ao potencial participante selecionado do laboratório (respondente), através de *e-mail*, apresentando um ofício nº 781/2016 emitido pela diretoria do INCQS – Apêndice B. Este *e-mail*, que apresentava além do convite o próprio questionário para ser respondido também por via eletrônica, apontava as possíveis vantagens com esta discussão, tais como: avaliação e possível redução de custos, melhoria e maior implementação das políticas da RENAMA, sistematização de comparação de metodologias aplicadas em outros laboratórios públicos, orientação de futuras políticas públicas, possível criação de um fórum e uma rede entre os laboratórios selecionados e o próprio subsídio do Governo, mediante compilação dos dados obtidos na pesquisa.

Os critérios estabelecidos para o perfil do respondente foram: as atribuições de aquisição e utilização de animais pelos diversos setores dos laboratórios públicos, que em geral era o colaborador responsável pelo biotério, caso o laboratório o tivesse. A escolha se baseou no conhecimento e controle da saída dos animais para as áreas

específicas e testes necessários. Caso o laboratório não tivesse biotério próprio, o selecionado seria o responsável por este trâmite de animais.

O questionário de triagem consistiu de questões úteis para o mapeamento de métodos alternativos ao uso de animais. Os dados coletados inicialmente foram referentes a: *i.* quais produtos necessitavam do uso de animais; *ii.* se os testes necessários eram aplicados no desenvolvimento ou em testes rotineiros; *iii.* número de animais utilizados em cada teste, *iv.* valor associado ao uso destes animais, entre outras questões. Durante a redação das questões, foram tomados alguns cuidados, tais como, utilizar uma linguagem clara, de fácil entendimento, com termos técnicos de conhecimento geral para os laboratórios. Além disso, o questionário foi elaborado com poucas questões, sem redação pessoal, usando questões relacionadas e direcionadas à instituição pesquisada de modo a garantir que o tratamento dos resultados seria exclusivamente institucional e não pessoal.

O participante deveria preencher os dados solicitados e encaminhar novamente por *e-mail* ao pesquisador. Estes questionários foram salvos (identificados pelo tipo de documento seguido pelo nome do laboratório público; ex: questionário_BioManguinhos) também por meio eletrônico, onde as informações contidas nos formulários somente foram utilizadas para coleta de dados para o projeto.

O envio e recebimento do questionário por meio eletrônico se deu pelas vantagens do uso da Internet:

- conveniência: o respondente pode acessar o questionário de qualquer lugar, desde que tenha um dispositivo eletrônico conectado à Internet;
- custo: o acesso virtual torna-se mais barato;
- velocidade: é possível obter as respostas mais rapidamente.

Mediante coletas dos dados iniciais, foi realizada a categorização dos testes e das informações sobre a aplicabilidade do conceito dos 3R's.

3.2.2 Formulário e Entrevista

A técnica de pesquisa descritiva de formulário foi escolhida para a coleta de informações diretamente do entrevistado, com contato pessoal entre o pesquisador e o respondente, seguindo um roteiro de perguntas. A opção desta ferramenta é justificada para a mensuração do comportamento, sobretudo em relação às atitudes acerca de determinadas questões; desta forma, é possível a verificação da percepção dos entrevistados frente às questões levantadas na discussão.

Esta etapa objetivou a continuação do processo de identificação dos testes que fazem uso de animais no desenvolvimento, produção e controle da qualidade destes produtos, verificando, dentre eles, quais poderiam ser substituídos por métodos alternativos validados e ainda, identificar métodos alternativos, que não tenham sido validados ou que apresentem dificuldade no processo de validação, com o objetivo de aprofundar o entendimento do tema.

Para complementação da coleta de informações através de entrevista, foi editado um roteiro, em formato de formulário (Apêndice C), que consistiu de: *i.* protótipo de desenvolvimento de um novo método alternativo, *ii.* aplicação do princípio dos 3R's, e *iii.* percepção dos fabricantes em relação à tendência da substituição por métodos alternativos e demais aplicações de métodos alternativos, em consonância com as políticas do RENAMA. Além dos pontos do formulário, outras questões foram surgindo durante a discussão entre pesquisador e entrevistado, como: necessidade de capacitação, dificuldades em relação à ANVISA, papel da Farmacopeia Brasileira para implementação de métodos alternativos etc.

Assim como na primeira etapa de coleta de dados, nesta segunda fase, também foi encaminhado um convite de participação ao(s) potencial(is) participante(s) do laboratório (respondente), através de *e-mail*, apresentando o ofício nº 1183/2016 emitido pela diretoria do INCQS - Apêndice D.

Os critérios estabelecidos para o perfil do participante da entrevista foram: a presença do respondente da primeira etapa, para possíveis esclarecimentos sobre o preenchimento prévio do questionário de triagem e para dar continuidade à pesquisa,

juntamente com o colaborador responsável no laboratório pela aplicação, ou pelo fomento de métodos alternativos, ou que estivesse alinhado às políticas de associação à RENAMA. No caso dos laboratórios já associados à RENAMA, o pesquisador responsável pela associação foi entrevistado.

A entrevista foi concedida pelos selecionados, que aceitaram participar da pesquisa, de forma presencial, em seu laboratório de trabalho. Os representantes de cada laboratório foram entrevistados juntos, em datas e horários previamente agendados, onde o questionário foi utilizado como base para as perguntas. As informações coletadas pela entrevista foram gravadas em áudio, por mídia eletrônica e salvas com o nome do laboratório público (e.g. entrevista_BioManguinhos). Ficou decidido que o tratamento dos resultados seria exclusivamente institucional e não pessoal, conforme já havia sido esclarecido anteriormente, e que as informações coletadas nas entrevistas somente seriam utilizadas para coleta de dados.

4. RESULTADOS

4.1 Laboratórios Farmacêuticos Oficiais

Neste trabalho, a vertente dos laboratórios públicos foi restrita aos envolvidos na produção de produtos biológicos, limitando o cenário às vacinas e aos soros hiperimunes.

Entre os LPOs, foram identificados 6, que fabricam e /ou desenvolvem produtos imunobiológicos no país. Eles estão situados nas regiões Sudeste e Sul e estão listados abaixo:

- Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos (RJ)
- Instituto Vital Brazil - IVB (RJ)
- Fundação Ezequiel Dias - Funed (MG)
- Instituto Butantan (SP)
- Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos- CPPI (PR)
- Fundação Ataulpho de Paiva - FAP (RJ)

4.2 Portfólio dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais

Com a utilização da base de dados dos *websites* da ANVISA, da ALFOB e dos laboratórios acima listados, a Tabela 1 lista os produtos imunobiológicos presentes no portfólio destas empresas.

Tabela 1: Produtos biológicos (vacinas e soros) presentes no portfólio dos Laboratórios Públicos Oficiais (LPOs)

LABORATÓRIO	PRODUTOS BIOLÓGICOS (SOROS E VACINAS)
Bio-Manguinhos	Vacina DTP - Hib
	Vacina Haemophilus influenzae tipo b
	Vacina meningocócica AC
	Vacina pneumocócica 10-valente
	Vacina febre amarela
	Vacina inativada poliomielite
	Vacina poliomielite oral
	Vacina rotavírus
	Vacina varicela, sarampo, caxumba e rubéola
Vacina sarampo, caxumba e rubéola	
Instituto Vital Brazil	Soro antibotrópico
	Soro anticrotálico
	Soro antibotrópico-crotálico
	Soro antibotrópico-laquético
	Soro antilatrodéctico
	Soro antiescorpiônico
	Soro antitetânico
	Soro antirrábico
Soro antiapílico	
Fundação Ezequiel Dias	Soro antibotrópico (pentavalente)
	Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico
	Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético
	Soro anticrotálico
	Soro antielapídico (bivalente)
	Soro antiescorpiônico
	Soro antirrábico
	Soro antitetânico
Vacina adsorvida meningocócica C (conjugada)	
Instituto Butantan	Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis (DTP)
	Vacina adsorvida difteria e tétano adulto (dT)
	Vacina adsorvida difteria e tétano infantil (DT)
	Vacina adsorvida hepatite B (recombinante)
	Vacina influenza sazonal trivalente (fragmentada e inativada)
	Vacina raiva inativada (VR/VERO)
	Soro antiaracnídico (<i>Loxosceles</i> , <i>Phoneutria</i> e <i>Tityus</i>)
	Soro antibotrópico (pentavalente)

	Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotático
	Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquéutico
	Soro antibotulínico AB (bivalente)
	Soro antibotulínico E
	Soro anticrotático
	Soro antidiftérico
	Soro antielapídico (bivalente)
	Soro antiescorpionico
	Soro antilonômico
	Soro antirrábico
	Soro antitetânico
	Soro antiloxoscélico
Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos	Soro antibotrópico
	Antígeno de Montenegro
	Antígeno de Mitsuda
	Antígeno de <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>
Fundação Ataulpho Paiva	Imuno BCG® (Bacilo Calmette-Guériné intravesical)
	Vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin)

4.3 Questionário de Triagem

Todos os laboratórios elencados para participar da primeira etapa aceitaram o convite desta parte da pesquisa. O questionário foi encaminhado por meio eletrônico (por *e-mail*), endereçado diretamente ao participante e respondente da pesquisa. O participante preencheu os dados solicitados e encaminhou novamente por e-mail à pesquisadora. Estes formulários foram gravados (identificados pelo nome do laboratório público; ex: formulário_BioManguinhos) também por meio eletrônico, sob acesso com senha, guardados pela pesquisadora e somente foram acessados por ela e/ou seus orientadores. As informações contidas nos formulários somente foram utilizadas para coleta de dados para o projeto.

Na Tabela 2 (análise dos questionários por LPO) abaixo, os resultados desta triagem estão apresentados de forma compacta. No apêndice E, encontram-se todos os questionários preenchidos pelos laboratórios no formato completo.

Com a finalidade de resguardar os interesses dos participantes da pesquisa e para contribuir no desenvolvimento da mesma dentro de padrões éticos, o questionário de triagem foi submetido à apreciação do CEP do INI / Fiocruz e foi aprovado. Os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apresentado no Apêndice F.

Tabela 2: Análise dos questionários por Laboratório Público Oficial (LPO)

LPO	PRODUTOS IMUNOBIOLOGICOS (SOROS E VACINAS) em azul os que usam animais em testes	QUANTIDADE DE TESTES	QUANTIDADE DE ANIMAIS uso total	CUSTO RELACIONADO AO USO DE ANIMAIS	OBSERVAÇÃO
Bio-Manguinhos	Vacina DTP - Hib (teste de pirogenia <i>in vivo</i> ; teste de toxicidade inespecífica e toxicidade específica)	12 (CQ)	51 ANIMAIS* * por lote de cada produto (pirogenia <i>in vivo</i> - 3 a 5 coelhos por lote testado; toxicidade inespecífica – 5 camundongos e 2 cobaias por lote testado; teste de toxicidade específica – 40 camundongos por lote testado)	TOTAL: R\$ 6262,80* *dado parcial, não foi dado resposta para todos os testes teste de toxicidade: R\$ 2051,40 por teste; toxicidade específica: R\$ 2160,00 por teste	Os testes de toxicidade inespecífica estão aguardando liberação da ANVISA para serem abolidos. Produtos novos já não usam mais este teste. *Não foi especificada qual a relação da quantidade de animais utilizadas e do custo (no formulário diz ser por teste, mas como a quantidade é muito maior ao normalmente utilizado para a toxicidade inespecífica, por exemplo, será necessário rever estes dados na
	Vacina Haemophilus influenzae b - CQ (teste de pirogenio <i>in vivo</i> ; teste de toxicidade inespecífica e toxicidade específica)				
	Vacina meningocócica AC (teste de pirogenia <i>in vivo</i> ; teste de toxicidade inespecífica e toxicidade específica)				
	Vacina pneumocócica 10-valente				
	Vacina febre amarela				
	Vacina inativada poliomie lite				

	Vacina poliomielite oral			entrevista). Possuem dificuldade na aquisição de animais SPF pelo fornecedor da Fiocruz.
	Vacina rotavírus			
	Vacina varicela, sarampo, caxumba e rubéola			
	Vacina sarampo, caxumba e rubéola - CQ (teste de pirogenia <i>in vivo</i> ; teste de toxicidade inespecífica e toxicidade específica)			
Instituto Vital Brazil	<p>Soro antibotrópico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro anticrotálico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antibotrópico-crotálico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antibotrópico-laquéico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antilatrodéctico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antiescorpiônico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antitetânico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p>	27 (CQ) e produção (imunização de cavalos)	<p>933 ANIMAIS para liberação de lote - contando os 9 soros (50 camundongos por teste de potência de soros antipeçonhentos - são 7; 100 camundongos por teste de potência do soro antitetânico; camundongos por teste de potência do soro antirrábico; 360 camundongos para DL50 por teste/lote/produto - são 9 produtos; 3 coelhos para pirogênio por teste/lote/produto - são 9). (POR) PRODUTO/LOTE-soros antipeçonhentos: 90 camundongos e 3 coelhos cada soro; antitetânico: 140 camundongos e 3 coelhos; antirrábico: 160 camundongos e 3 coelhos)</p> <p>TOTAL: R\$ 9264,00 para liberação de lote - contando os 9 soros soros antipeçonhentos: R\$ 912,00 cada soro; antitetânico: R\$ 1352,00; antirrábico: R\$ 1528,00). Teste de potência para peçonhentos: R\$ 440,00 cada; potência antitetânico: R\$ 880,00; potência antirrábico: 1528,00; DL50: 352,00 cada produto; pirogênio: R\$ 120,00 cada produto)</p>	<p>O teste de toxicidade inespecífica é realizado em soros em estabilidade (10 camundongos por teste/produto - não utilizam mais para liberação de lote. O IVB está desenvolvendo a metodologia do <i>Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)</i> para substituição do teste de potência de soro antirrábico, porém encontra dificuldades de investimento para aquisição de alguns equipamentos para implantação desta técnica. Para produção, é utilizado cavalo (não foi relatada quantidade) e o teste tubo prova para análise do cavalo (6 camundongos por cavalo). A quantidade de</p>

	<p>Soro antirrábico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antiapílico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p>				<p>animais não está associada à quantidade de lote anual e sim por liberação de cada lote. Não possuem dificuldade na aquisição de animais. Em algumas situações, como períodos de obra por exemplo, possuem dificuldade no manejo e descartam uma quantidade alta (pelos animais estarem fora do padrão: peso, livre de doenças e etc)</p>
Fundação Ezequiel Dias	<p>Soro antibotrópico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antilaquéutico- CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antibotrópico e anticrotático - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antibotrópico e antilaquéutico- CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro anticrotático - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antielapídico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antiescorpiônico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antirrábico - CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Soro antitetânico- CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50)</p> <p>Vacina adsorvida meningocócica C (ainda em desenvolvimento_ testes não especificados)</p>	<p>27 testes de CQ (potência, pirogênio e determinação da DL50 dos soros hiperimunes)</p> <p>11 testes de produção Capacidade neutralizante de soros individuais de equideos na produção dos soros:</p> <p>antitetânico, antipeçonhentos, antirrábico. Determinação da presença de crotamina de venenos crotáticos: soro anticrotático. Pesquisa de vírus rábico: soro antirrábico</p>	<p>9891 ANIMAIS para liberação de lote - contando todos os produtos</p> <p>Para produzir um lote* de: Soro Antitetânico em média, 1305 camundongos e 6 coelhos. Soro Antipeçonhento (são 9) em média, 765 (*9 = 6885) camundongos e 6 (*9= 54) coelhos; Soro Antirrábico em média, 1905 camundongos e 6 coelhos</p>	<p>TOTAL: R\$ 154.395,00 para liberação de lote - contando todos os produtos</p> <p>Para produzir um lote* de Soro Antitetânico: R\$19.845,00. de Soro Antipeçonhento R\$11.745,00 (*9 = 105.705,00). Soro Antirrábico: R\$28.845,00.</p>	<p>Não há dificuldade em se adquirir camundongos, pois a própria FUNED os produz. Quanto aos coelhos, a dificuldade é a qualificação e disponibilidade de fornecedores.</p>

<p>Instituto Butantan</p>	<p>Vacina difteria, tétano e pertussis (DTP) - CQ (inocuidade, toxicidade específica para Pertussis, atividade imunogênica da fração diftérica, tetânica e pertussis)</p> <p>Vacina difteria e tétano adulto (dT) - CQ (inocuidade e atividade da fração diftérica e tetânica)</p> <p>Vacina difteria e tétano infantil (DT) - CQ (inocuidade e atividade da fração diftérica e tetânica)</p> <p>Vacina hepatite B - CQ (inocuidade e imunogenicidade)</p> <p>Vacina influenza sazonal trivalente - CQ (inocuidade)</p> <p>Vacina raiva - CQ (prova de inativação viral, pesquisa de agentes adventícios, potência, inocuidade e pirogênio)</p> <p>Soro antiaracnídico (<i>Loxosceles</i>, <i>Phoneutria</i> e <i>Tityus</i>) - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antibotrópico (pentavalente) - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antibotulínico AB (bivalente) - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antibotulínico E - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro anticrotálico - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antidiftérico - CQ (potência e pirogênio)</p>	<p>42 (CQ) - não foi (foram) citado (s) teste (s) de desenvolvimento, somente que o (s) fazem</p>	<p>1130 ANIMAIS para liberação de lote - contando os soros e vacinas POR LOTE: - vacina DT e dT: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias); atividade imunogênica da fração diftérica (38 cobaias) e tetânica (6 cobaias + 100 camundongos) - vacina DTP: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias), toxicidade específica para Pertussis (20 camundongos), atividade imunogênica da fração diftérica (38 cobaias), tetânica (6 cobaias + 100 camundongos) e pertussis (170 camundongos); - vacina Influenza sazonal trivalente: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias); - vacina Hepatite B: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias) e imunogenicidade (40 camundongos); - vacina raiva: prova de inativação viral (20 camundongos adultos + 20 camundongos lactentes), potência (144 camundongos), inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias), pirogênio (3 coelhos); - soros hiperimunes (13 tipos): potência (50 camundongos/fração de soro/lote: soro antibotrópico pentavalente, soro anticrotálico, soro antibotrópico-crotálico, soro antibotrópico-laquético, soro antielapídico, soro antilaquético, soro antiescorpiônico;</p>	<p>O custo desses animais não foi até então avaliado pois todos (camundongos, cobaias e coelhos) são produzidos e fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan</p>	<p>Testes realizados no produto a granel/terminado. Não possuem dificuldade na aquisição de animais. Número de animais/lote, sem considerar análises em processo, estudos de estabilidade, aferições de referências e qualificações de analistas. Não possuem dificuldade na aquisição e manuseio de animais.</p>
---------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>Soro antielapídico (bivalente) - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antiescorpionico - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antilonômico - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antirrábico - CQ (potência e pirogênio)</p> <p>Soro antitetânico - CQ (potência e pirogênio)</p>		<p>soro</p> <p>soro antitetânico: 110 camundongos; soro antidiftérico: 44 cobaias; soro antiaracnídico: 12 cobaias + 3 coelhos; soro antibotulínico: 100 camundongos; soro antilonômico: 55 camundongos; soro antiloxoscélico: 3 coelhos) e pirogênio (3 coelhos);</p>		
Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos	<p>Soro antiloxoscélico - CQ (potência, pirogênio e toxicidade inespecífica); produção (determinação da dose mínima necrosante - DMN)</p> <p>Soro antibotrópico - CQ (potência, pirogênio, determinação da DL50 e toxicidade inespecífica)</p> <p>Antígeno de Montenegro</p> <p>Antígeno de Mitsuda</p> <p>Antígeno de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></p>	<p>10 (7 CQ, 1 produção e 2 Des). Desenvolvimento não especificado</p>	<p>165 ANIMAIS para liberação de lote - contando os 2 soros</p> <p>POR LOTE: Soro antiloxoscélico - CQ (potência: 12 coelhos, pirogênio: 8 coelhos e toxicidade inespecífica: 10 camundongos e 4 cobais); produção (DMN: 9 coelhos)</p> <p>Soro antibotrópico - CQ (potência: 5 camundongos, pirogênio: 8 coelhos, determinação da DL50: 50 camundongos e toxicidade inespecífica: 10 camundongos e 4 cobais)</p>	<p>TOTAL: R\$ 4353, 28 por liberação de lote - contando os 2 soros (coelhos R\$ 80,00/an, camundongos R\$ 11,88/an e cobaias R\$ 62,66/ani.</p> <p>O custo não é exato, pois não dispõem de um sistema de determinação do custo total.</p> <p>Estão adquirindo o sistema ERP (ENTERPRISE RESOURCE PLANNING), o qual permitirá a obtenção dos valores totais. op citado é só para aquisição dos animais.</p>	<p>Possuem dificuldades quanto a aquisição: localização de fornecedores, transporte dos animais, animais em quantidade suficiente e adequação dos fornecedores às condições de pagamento utilizadas pelos órgãos públicos. Quanto ao manuseio: uso de coelhos (possuem porte maior, é necessário um funcionário apenas para a contenção dos animais em teste. A estrutura e serviços envolvidos da manutenção de coelhos: espaço, gaiolas, higienização de materiais e descarte.</p>
Fundação Ataulpho Paiva	<p>Imuno BCG - CQ (reatividade cutânea, ausência de virulência e sensibilidade cutânea)</p>	<p>6 (CQ)</p>	<p>20 ANIMAIS para liberação de lote contando os 2 produtos</p> <p>Reatividade</p>	<p>TOTAL: R\$ 766, 83 por liberação de lote R\$ 23005,00 por mês (30 lotes)</p>	<p>Não possuem dificuldade de aquisição e manuseio.</p>

Vacina BCG - CQ
(reatividade cutânea,
ausência de virulência e
sensibilidade cutânea)

Cutânea: 4 Cobaías,
Ausência de
Virulência e
sensibilidade
Cutânea – 6
Cobaías

CQ: controle da qualidade

4.4 Entrevista

Dos seis laboratórios elencados para participar da segunda etapa, os quais participaram também da primeira etapa, cinco aceitaram o convite desta parte da pesquisa. O LPO que não aceitou o convite foi a FAP por estarem, no momento da pesquisa, com a planta sem atividades por haver exigências de Boas Práticas de Fabricação. O Anexo B apresenta a publicação em Diário Oficial da União da situação de intervenção deste laboratório.

O registro das entrevistas foi realizado mediante gravação, ampliando, assim, o poder de registro e captação de elementos de comunicação de extrema importância, pausas de reflexão, dúvidas ou entonação da voz, aprimorando a compreensão da narrativa; o gravador preserva o conteúdo original e aumenta a precisão dos dados coletados. A entrevista foi concedida pelo participante da pesquisa, de forma presencial, em seu laboratório de trabalho, à pesquisadora responsável por este projeto. As informações coletadas pela entrevista, com áudio registrado em mídia eletrônica, foram gravadas com o nome do laboratório público (ex: entrevista_BioManguinhos), protegidas com senha de acesso. As informações coletadas nas entrevistas somente serão utilizadas para coleta de dados. O acesso e a análise dos dados coletados nas entrevistas foram somente realizados pela pesquisadora e/ou seus orientadores. Todos os dados ficarão sob a propriedade da pesquisadora pertinente ao estudo e sob a guarda da mesma para prevenir a perda de confidencialidade dos dados obtidos pela entrevista.

Abaixo seguem as questões abordadas e a respectiva resposta de cada laboratório.

QUESTÃO 1: Já houve a verificação na literatura de algum método alternativo ao uso de animais para este teste?

Todos os 5 laboratórios participantes responderam que sim.

QUESTÃO 2: Por qual motivo não houve a implantação do teste alternativo? Quais as dificuldades apontadas?

IVB:

“O IVB está desenvolvendo a metodologia do RFFIT para futura substituição do teste de potência por soroneutralização do soro antirrábico, mas no momento há dificuldades de investimento para aquisição de alguns equipamentos essenciais para a implantação dessa técnica (incubadora, meio de cultura) e etc. Estamos estudando a bibliografia da metodologia do ToBI para a substituição do teste de potência do soro antitetânico; o ToBI ainda não é preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5^o edição e está sendo implantada pelo INCQS. Estamos aguardando o INCQS desenvolver o padrão. Não verificamos em outro compêndio oficial a possibilidade de outros métodos alternativos, pois agimos em conjunto com outros laboratórios produtores de soro e só cogitamos a implementação somente depois do INCQS dar ‘start’. Para a instituição, o INCQS está à frente dos novos testes e acabamos não preconizando o desenvolvimento e/ou validação antes deste Instituto.”

FUNED:

“Já foram verificados novos testes (alternativos) para serem trazidos para a FUNED, porém houve perda do histórico do controle da qualidade: os funcionários que trabalhavam há mais tempo aqui no laboratório se aposentaram e os novos que entraram não foram preparados para ocupar o cargo. Ou seja, tivemos que começar

a entender o funcionamento do controle da qualidade do zero. Com esta situação, ficou difícil trazer as metodologias alternativas (pois nem os padrões com uso de animais estavam bem definidas). Há problemas com falta de pessoal, falta de tempo e falta de dinheiro. Já foram verificados para o teste de pirogênio, os métodos alternativos MAT e LAL (foi verificado inclusive se o próprio pessoal da instituição possuía experiência em métodos alternativos - o pessoal da microbiologia tem experiência com LAL realizado em água). O LAL foi testado para os produtos, mas não deu certo com os soros; portanto falta desenvolver um método LAL que seja adequado ao nosso produto. O problema é que não há pessoal para se dedicar a este desenvolvimento e estudo: estão mais dedicados para desenvolvimento de nova vacina, que é prioridade, e não para soro. A FUNED ainda está no limbo; não possui demanda e dinheiro para investir no MAT, por exemplo (como a demanda é pouca, comprar os materiais necessários acaba ficando mais caro do que usar os animais). No caso do RFFIT, o problema é a falta de material (o estado de MG está com problemas financeiros e administrativos e não supre com as necessidades materiais básicas - para este método, tem técnico, pessoal treinado, mas ainda falta reagente). Para os soros anti-peçonhentos estamos bem atrasados (nem a literatura estamos conseguindo verificar se há ou não métodos alternativos). ”

BUTANTAN:

“Os testes que avaliamos são:

(a) Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis (Resolução Normativa Nº 31, de 18/08/2016) factível para análises de soros hiperimunes, no nosso entendimento.

(b) Ensaio de potência *in vitro* de soros hiperimunes pelo método ToBI.

Alguns desafios na implementação de a) o CONCEA foi consultado quanto ao entendimento da análise de pirogênio *in vitro* para soros em agosto de 2016 e até o momento, não obtivemos retorno. Quanto ao item b) estudo interlaboratorial - processo lento de finalização. Estamos com dificuldades em relação à oficialização do

método. Já foram desenvolvidos e validados, mas temos entraves para colocar na Farmacopeia Brasileira e/ou dar continuidade para utilização do método. Falta entendimento em relação ao BRACVAM e RENAMA para verificar como irão poder implementar. O RENAMA tem percepção diferente de validação que a instituição tem (não usa só a legislação da ANVISA, como a RE 899); teríamos que fazer testes interlaboratoriais para considerar o método validado. Temos que entrar no BRACVAM para assim este nomear o INCQS para obter resultados semelhantes aos nossos. Não fomos direto à ANVISA, pois achávamos que iríamos atropelar o trâmite, já que existe uma rede nacional para os métodos alternativos. Por conta do trâmite da RENAMA, estamos engessados para implementar os métodos que já validamos.

Falta respaldo das pessoas que trabalham com métodos alternativos no país. Os métodos que conseguimos validar foram apresentados ao BRACVAM, mas nada foi feito para a continuidade do processo. Nosso próximo passo é enviar questionamento à ANVISA sobre os produtos intermediários, pois já que não conseguimos usar no produto acabado, utilizaríamos nos intermediários e isso reduziria o número de animais. Estamos aguardando desenrolar o trâmite para que o teste entre na Farmacopeia Brasileira; estamos amarrados por falta de gente no BRACVAM e RENAMA (há percepção de que os técnicos destes órgãos ficam sobrecarregados com todas as atribuições). Falta organização para os trâmites necessários e entre os próprios órgãos envolvidos na questão de métodos alternativos. Quem faz o quê? Não sabemos.... Não possuímos dificuldades econômicas, de equipamento e/ou de pessoal e sim de não implementar por questões burocráticas de métodos alternativos, de trâmite, da parte burocrática. ”

CPPI:

“Entre os testes realizados pelo controle da qualidade biológico, como previamente informado no questionário de triagem, está o teste de pirogênio *in vivo*. Na Farmacopeia Europeia é apresentado o teste MAT como método alternativo ao teste de pirogênio *in vivo*. O CPPI buscou informações junto ao fornecedor comercial do teste para adquirir o kit e o *software* de análise dos resultados. O teste ainda não foi

implantado, pois será necessária a aquisição de equipamentos, que permitam ser qualificados, como o leitor de microplacas e estufa de CO₂. Estamos providenciando as especificações de equipamentos para a aquisição por licitação. Além do mais, a equipe é bem pequena e para verificar as especificações e qualificações dos equipamentos; também falta recurso financeiro para a compra. Não há pessoas dedicadas, há encaixe na rotina e nem sempre sobra tempo.”

BIO-MANGUINHOS:

“Já foi verificado e quando há a opção do método alternativo em compêndios oficiais, o método é implementado. A vacina febre amarela já substitui o teste de pirogênio pelo LAL (USP e Farmacopeia Europeia), por exemplo. O MAT está sendo verificado para as vacinas de meningite. A poliomielite inativada nunca utilizou coelho, e a poliomielite trivalente atenuada usava coelho e cobaia para toxicidade inespecífica (e em 2011 foi abolido por conta da consistência de produção; o ensaio nunca foi reprovado). Este teste de toxicidade inespecífica foi retirado para febre amarela, poliomielite, DTP-Hib e apesar de não estar no escopo deste estudo, também foi praticamente retirado do biofármaco interferon (só é realizado uma vez por ano e em um lote). Alguns produtos estão aguardando análise na ANVISA para também abolirem este teste: tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) e meningite AC; para estes produtos, os testes ainda estão na Farmacopeia Brasileira, o que entrava um pouco a liberação total do teste. Achamos que a tendência é que o teste deixe de existir, pelo menos nas etapas de produção. Outro teste que foi substituído foi a potência dos insumos ativos de sarampo, caxumba e rubéola da vacina tríplice viral: eram utilizados animais e agora usam cultura de células. ”

QUESTÃO 3: Houve algum protótipo de desenvolvimento de um novo método alternativo?

Os laboratórios IVB e FUNED não possuem protótipo de desenvolvimento.

BUTANTAN:

“Temos o LAL para soros (cinético turbidimétrico), mas aguardamos posicionamento do CONCEA sobre poder usar o LAL para soros hiperimunes. Mais uma vez, se há uma rede nacional, não achamos que devemos ir direto à ANVISA. Estamos em desenvolvimento com o teste de coagulação e testes para ver o veneno (abelha, escorpião), verificando atividade *in vitro*. ”

CPPI:

“Temos projetos para o desenvolvimento de metodologias *in vitro* para o teste para o soro antixocélico - avaliação do veneno (avaliação da dose mínima necrosante em orelhas de coelhos – Farmacopeia Brasileira); este teste *in vivo* é bem difícil, pois há dificuldade de definir a lesão (depende da subjetividade do observador, a lesão assume diversas formas e fica difícil medir com paquímetro). Há desenvolvimento de um teste que não dependa do animal, em cultura de células; há trabalhos em veneno de cobra, que queremos testar no veneno loxocélico (mas precisamos de pessoas envolvidas, estufa, área dedicada). Também em desenvolvimento, está o teste determinação da potência do soro antixocélico (hoje realizado no coelho) –seriam utilizados o ELISA e a cromatografia (já em teste com bons resultados). Muito no começo (são mais por associações destes testes já feitos em outros produtos). Para o soro antibotrópico, há vontade de extrapolar os testes em desenvolvimento para antiloxocélico. Estamos realizando as atividades à medida que a rotina nos permite. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Quando não há em compêndios, olhamos a literatura e procuram desenvolver. Há verba do CAPES e RENAMA para desenvolvimento. Estamos em processo de substituição de uso de camundongos para potência de eritropoetina. Fazemos a validação segundo ANVISA e pedimos suporte do BRACVAM. ”

QUESTÃO 4: Neste teste, há aplicação de análise de não aleatoriedade dos resultados? (É realizado uso de gráficos de controle, tendência, análise de

dados? Ou há algum procedimento operacional de gráficos de controle da qualidade* para reduzir o número de testes?)

IVB:

“Não. Não achamos que haja uma linearidade para que isso seja possível, pois há muitas análises durante a produção. Mesmo no produto final, não há aplicabilidade de gráficos de controle / aleatoriedade dos resultados. Não conseguimos ter uma estatística exata. ”

FUNED:

“Não há análise de não aleatoriedade dos dados. Como o CEUA atua na limitação da quantidade de testes que podem ser realizados (por exemplo, só pode fazer 3 repetições em alguns casos); caso o resultado ainda esteja fora, pelo CEUA não permitir, procuramos verificar o resultado na estatística. Antes fazíamos até dar certo; hoje já olhamos melhor a estatística e desta forma reduzimos o número de testes. ”

BUTANTAN:

“Utilizamos gráficos de controle e de tendência para resultados para algumas ideias, para diminuir testes e número de animais por teste, mas temos sempre que, no caso de a proposta sugerir alguma mudança no método farmacopeico, realizar uma validação analítica primeiro, de acordo com a legislação da ANVISA (RE 899 e RDC 27). Para aleatoriedade, não conseguimos. As mudanças na ANVISA requerem CBPF e o instituto está sem em algumas áreas. A única é a influenza (tanto que retiramos a toxicidade inespecífica para este produto) porque está tudo controlado. Soros, o processo ainda não está controlado. A produção deveria estar primeiro em controle e não está. ”

CPPI:

“Nos diferentes testes executados, não realizamos análise de não aleatoriedade dos resultados. Não há possibilidade destas análises ajudarem. Há análise estatística de

potências, veneno, mas para acompanhamento somente e para problemas internos, para o laudo não é utilizado. O que se faz é reduzir o número de lotes de venenos na programação da produção, para assim diminuirmos os testes. ”

BIO-MANGUINHOS:

“O uso de gráfico de controle foi utilizado para dados de consistência para pedir a abolição do teste de toxicidade inespecífica. Como exemplo, temos a potência para eritropoietina (citamos mesmo não sendo escopo deste trabalho). A farmacopeia diz que deve usar 8 animais, mas a análise de tendência já nos possibilitou a redução para 7 (provou-se que houve consistência de resultado com esse número). O teste de aleatoriedade também é utilizado no teste de toxicidade inespecífica: era usado 40 camundongos por teste (foi solicitado a ANVISA redução do número de testes). A consistência de dados também foi utilizada para retirada do teste de toxicidade inespecífica para: febre amarela, poliomielite, alfapoetina; interferon (se faz uma vez por ano e em um lote) e DTP Hib. Ainda faz para tríplice viral e meningite (ainda estão na farmacopeia). A meningite C (em desenvolvimento) deve usar MAT para liberação. Para teste de toxicidade específica para as vacinas contra meningites (40 camundongos por lote de polissacarídeo) foi solicitado à ANVISA para fazer pior caso (aumento expressivo da dose), reduzindo o número de ensaios. O teste de potência de tríplice viral (não usa mais animais): Bio-Manguinhos desenvolveu o teste para substituir. ”

QUESTÃO 5: De alguma forma o uso da análise de tendência contribui na aplicação da Regra dos 3R's? A implementação de um *software* contribuiria para esta análise? Atualmente, de qual forma é realizado o gráfico de controle?

IVB:

“Não. Não. Atualmente utilizamos o programa computadorizado COMBISTAT (dá um limite de confiança superior ou inferior, curva de regressão e a DE 50 - para fazer o cálculo de potência). ”

FUNED:

“O COMBISTAT é usado. Por conta do histórico da produção (por ser antiga), o intervalo já está fechado, então na produção o número já foi reduzido por uma análise de tendência (porque olhamos sempre o lote anterior). Um *software* poderia auxiliar bastante, seria viável para redução. Quando o soro é da FUNED, a análise de tendência é usada para saber a especificação da faixa. ”

BUTANTAN:

“Entendemos que essa avaliação deve ser feita principalmente em relação a consistência de produção e não apenas em relação aos testes de controle. A sugestão de diminuição ou alteração nos testes precisa ser acompanhada por uma validação de processo adequada e um acompanhamento da produção robusto (RPP). O *software* ajudaria, desde que servisse com um ‘poder utilizar’, como vindo pela Farmacopeia Brasileira (FB) ou pelo INCQS, por exemplo. Ajudaria para análise estatística, mas se a FB diz a quantidade mínima de testes necessários, não tem como reduzir somente pela análise estatística. Não adianta o *software* se a FB não acompanhar. Por estatística, se pudesse fazer um teste qualitativo ao invés de quantitativo, ao invés de usar 5 pontos (50 animais), usaria 1 (10 animais). ”

CPPI:

“Não, pois os testes realizados são farmacopeicos e, dessa forma, devem ser executados como descrito em compêndios oficiais, sem possibilidade de reduzir o número de testes ou de animais. A substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro* requer que os testes realizados hoje *in vivo* sejam primeiro validados/verificados. Da mesma maneira, a implantação de um *software* não traria contribuições. Não são realizados gráficos de controle. ”

BIO-MANGUINHOS:

“As análises de tendência auxiliam na redução; já usamos um *software* estatístico para estas análises. ”

QUESTÃO 6: De forma geral, há alguma questão para que a substituição não tenha sido levantada a e/ou realizada?

IVB:

“Dificuldades de investimentos para aquisição de alguns equipamentos essenciais para a implantação da técnica RFFIT, falta de tempo para validação de novos métodos na rotina; para promover algo novo dentro da rotina. ”

FUNED:

“Nossa percepção é de que a área de assuntos regulatórios é muito engessada a mudanças; ficam resistente a solicitações de alteração (para farmacopeia, para ANVISA). A aplicação de métodos alternativos não é prioridade para a instituição; só irão dar notoriedade quando for mandatório; não há interesse. Se a produção sair de qualquer forma, não tem porque fazer método alternativo.

A equipe do controle da qualidade preza muito pela confiabilidade do resultado e acham que o teste *in vitro* (alternativo) é mais confiável e seria muito bom trazê-los para a rotina. ”

BUTANTAN:

“Entendemos que o processo de implementação de métodos alternativos deva apresentar-se de forma mais clara, pois muitas vezes não temos clareza sobre quais entidades buscar e seus responsáveis. Por exemplo, se realizarmos validação interna do método, é possível implementá-lo após consulta à ANVISA ou há necessidade de estudo interlaboratorial? Os métodos alternativos podem ser utilizados para análises intermediárias ou também para liberação de produto terminado? Não há problemas com equipamento ou capacitação de pessoal e nem com a validação em si, pois a documentação está robusta, com o sistema da qualidade implementado. ”

CPPI:

“Os testes biológicos, além da dificuldade do próprio emprego dos animais em testes, também apresenta outras dificuldades, como falta de reprodutibilidade dos resultados e a aquisição de animais. O CPPI busca métodos alternativos como forma de reduzir o uso de animais ou mesmo substituí-los e obter resultados mais precisos e corretos em suas análises. O primeiro passo para isso será a validação/verificação dos métodos *in vitro* e essa etapa é ainda obscura para nós, como imaginamos ser também para as demais instituições produtoras de biológicos. Nesse momento, nosso esforço está na tentativa de encontrar informações sobre validação/verificação de métodos biológicos. Impede a validação de um método alternativo, pois não há como comprovar que ele pode ser comparado com o método *in vivo* biológico, para usar como padrão comparativo. A validação dos métodos biológicos deveriam ser mais bem esclarecidos (precisam de um norte, de um procedimento de como fazer).”

BIO-MANGUINHOS:

“Dentro do possível, todas as melhorias foram aplicadas. O efetivo que não teria seria eritropoetina, mas aplicou redução e refinamento (evitamos o sofrimento do animal) e estamos sempre buscando a substituição. Procuramos sempre diminuir os animais. Há dificuldades de estrutura, mas até então os problemas estão em relação à aplicação do MAT (pois há uso de sangue humano). Não há entraves, só o comum a todos (uso de sangue no MAT), inclusive estamos em busca de uma nova matriz. ”

QUESTÃO 7: Há algum método alternativo que substitua, refine ou reduza o uso de animais em desenvolvimento neste laboratório que apresente dificuldade para ser validado? Quais são as dificuldades?

IVB:

“O IVB está desenvolvendo a metodologia do RFFIT para futura substituição do teste de potência por soroneutralização do soro antirrábico, mas como dissemos, mesmo

este método que já está na Farmacopeia Brasileira, não conseguimos implementar por problemas de infraestrutura: falta material, equipamento (incubadora, meio de cultura), pessoal capacitado, além da equipe ser pequena para deslocar uma pessoa somente para esta tarefa. Estamos estudando a bibliografia da metodologia do ToBI, aguardando o INCQS desenvolver o padrão. Achamos que o INCQS está à frente dos novos testes e devem desenvolver e/ou validar antes. ”

FUNED:

“Dificuldade técnica temos com o LAL (resposta não dá fiel no soro como dá para análise de água; questão do produto e precisaríamos desenvolver um método adaptável aos soros que temos). E dificuldade financeira temos com o RIFFIT (perspectiva de melhora em 2017 para compra de material - falta o conjugado que ainda está no pregão). Achamos que quando mostrarmos que a liberação de lote for mais rápida e com maior confiabilidade, o teste será implementado. ”

BUTANTAN:

“Sim, além do RFFIT e LAL (que já discutimos anteriormente), temos o ToBI validado para vacinas tríplice e dupla viral: doseamento da fração diftérica, doseamento da fração tetânica, para potência do soro antitetânico e para potência da fração botrópica - mas não são utilizados pelos mesmos entraves burocráticos que citamos. Utilizamos estes testes para ter uma noção dos valores e depois utilizamos a cobaia como método oficial. Usamos também como indicativos para diminuir o uso de animais, mas como não está na Farmacopeia Brasileira não usamos para liberar o lote. Os testes estão validados mediante RE 899/2003. O estudo interlaboratorial é um processo lento de finalizar. ”

CPPI:

“A principal dificuldade está na validação/verificação dos métodos biológicos implantados na instituição, para que após métodos alternativos possam ser validados (para assim fazermos o comparativo *in vivo* x *in vitro*). Nós do CCPI sentimos falta de

um norte, um auxílio de um outro órgão, uma outra instituição para um melhor entendimento sobre os métodos alternativos. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Não há. Os que foram e são desenvolvidos, conseguimos validar. Tentamos sempre seguir com a linha biológica e físico-químicos para alinhamento dos resultados. ”

QUESTÃO 8: Qual a percepção da empresa em relação aos métodos alternativos?

IVB:

“Achamos importante e temos vontade de implementar. No entanto, vemos inúmeras dificuldades (como infraestrutura, dificuldade na validação e implementação do método), achamos que o ministério (ou alguém responsável), devesse investir mais em políticas relacionadas ao uso de métodos alternativos. Os ministérios (da Saúde ou MCTI) ou a FAPERJ, ao invés de bancar biotério ou uso de animal, deveria também investir em métodos alternativos com políticas mais específicas para a redução do uso de animais. Por exemplo, deveria ser pago um ‘imposto’, uma ‘taxa’ de, por exemplo, 2 reais por produto comprado para investir em métodos alternativos (como incentivo financeiro), pois as condições atuais de infraestrutura e equipe não permitem que o laboratório atue nesta área com mais veemência. ”

FUNED:

“Os métodos alternativos estão engessados porque nem o básico está sendo feito pela instituição. Os antigos métodos ainda não foram totalmente verificados, como implementar o novo? Não há nenhum método alternativo sendo utilizado. Falta apoio da instituição; e percebemos que estamos atrasados em relação ao Butantan e demais laboratórios. Aqui, ainda não foi feito o RFFIT porque a instituição não dá prioridade a este método. Precisamos de força, mais união das equipes. ”

BUTANTAN:

“Há uma forte percepção do instituto em relação a aplicação dos 3 R's, mas na verdade, a empresa não está com vontade de continuar com estudos voltados aos métodos alternativos, pois desenvolvemos muitas coisas e esbarramos em dificuldades fora e dentro da instituição, que nos fizeram não utilizar tudo que desenvolvemos. Estamos achando mais fácil o INCQS fazer o método, colocar na Farmacopeia Brasileira e somente depois utilizar, desenvolver e etc.”

CPPI:

“A instituição tem preocupação com a aplicação dos métodos alternativos. Todos estão cientes das dificuldades apresentadas pelo uso de animais (principalmente para as respostas e resultados do controle da qualidade). Há apoio da diretoria e se mostram a favor. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Temos suporte, pois há entendimento da empresa para aplicação dos métodos alternativos, pois sabem das dificuldades e custo do uso de animais. Há entrave em treinamentos, busca de capacitação (pois fazemos algo em paralelo à rotina; não somos dedicadas a métodos alternativos e isto fica complicado). Se sobrar tempo, fazemos o curso, senão a rotina é preferencial. Também temo entraves com obtenção de insumos (kits) para o desenvolvimento e validação. Não há subsídio por uma agência de fomento. O dinheiro sai do montante usado para liberar produtos (e isso dificulta, pois nem sempre sobra). Já solicitamos kits em 2013 e só chegou em 2016 (para o MAT, por exemplo, para febre amarela e meningites). É usado o que sobrar e deve ser feita uma programação muito bem detalhada, pois não há dinheiro dedicado aos desenvolvimentos. Usamos às vezes materiais do INCQS, IOC.”

QUESTÃO 9: Como está a política de associação ao RENAMA? O que impede a associação?

IVB:

Não são associados e não souberam responder a razão que os impede de associar.

FUNED:

Não são associados e não sabem dizer sobre o assunto. Não sabem como fazer a associação (a instituição não conseguiu verificar por qual motivo não são associados). Desconhecimento em relação ao RENAMA.

BUTANTAN:

“Somos associados, mas não vemos porta de entrada por sermos. Ser associado ao RENAMA, somente facilita participar dos editais. A criação da RENAMA deveria ter sido faseada, haveria mais organização. Estão avançados em testes, mas para a rotina mesmo, que é o que nos interessa, não está. Está mais voltada para parte de pré-clínico, desenvolvimento do que no controle da qualidade (que realmente usa mais animais). Efetivamente não levantam os testes de rotina e achamos até que falta dinheiro para isto. Na aplicabilidade dos laboratórios públicos, o que levantam não interessa e não fazem tudo de uma vez. Uma rede com vários laboratórios associados só faz uma validação de vez? Por que não faz todos de uma vez? O INCQS que seria o laboratório. Achamos que há pouco dinheiro investido nos projetos.”

CPPI:

Conhece o RENAMA pela apresentação do INCQS. Faz dois anos que enviaram o formulário, receberam de volta com exigências, responderam de volta à RENAMA e não obtiveram mais resposta. Acham que RENAMA poderia ser uma instituição que junte os laboratórios. Querem saber o que precisam, o que está faltando para se associarem; a empresa tem interesse.

BIO-MANGUINHOS:

“Somos associados desde que a RENAMA foi fundada, mas a percepção é que não há contato. Associar não fez diferença e não vejo vantagens, além de participar do

edital. A quem eu busco? BRACVAM? RENAMA? Me associei, mas não sei minha função, não há feedback. A comunicação é um pouco complicada (no início inclusive não recebemos retorno, nem mesmo da associação). O papel do RENAMA e da instituição e o próprio fluxo não estão claros. Hoje quando temos alguma proposta, procuramos o BRACVAM e por conhecimento das pessoas de lá. Também achamos que o RENAMA deveria dar mais suportes em legislações e assuntos regulatórios (principalmente de outros países). ”

QUESTÃO 10: Há alguma cooperação nacional ou internacional na área de métodos alternativos?

IVB:

“Temos cooperação com os laboratórios públicos nacionais produtores de soro, mas geralmente são trocas de informações e desenvolvimento em conjunto de um método (como o RFFIT por exemplo), uma cooperação técnica. ”

FUNED:

“Não há cooperação formal, mas como passamos pelas mesmas dificuldades que outros fabricantes, fazemos uma atividade de cooperação, dependendo da dificuldade. ‘Apertou o calo e procuramos!’. Achamos que poderia haver uma maior interação; há harmonização com outros laboratórios, mas como produtores de soro, com a finalidade de métodos alternativos não há.”

BUTANTAN:

“Não há cooperação. ”

CPPI:

“Não há cooperação. As ideias são da própria equipe, que tem vontade de colocar em prática. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Como cooperação nacional temos o INCQS e internacional, temos um biofármaco (eritropeotina): com Cuba. ”

QUESTÃO 11: Existe uma sistemática de busca de métodos alternativos? (ex: TSAR ou outros bancos de dados?)

IVB:

“Não há. Em caráter pessoal, alguns técnicos procuram, mas não é sistemático. Ficamos cientes das novas propostas de métodos alternativos, através de reuniões com o INCQS e demais produtores de soro. ”

FUNED:

“Não há. Alguns funcionários fazem por conta própria, por fazerem parte da CEUA, mas não há sistemática. É difícil colocar na rotina, falta pessoal. E também como não há aplicabilidade no laboratório (por falta de interesse na instituição), não há incentivo para pesquisar. ”

BUTANTAN:

“Não há. ”

CPPI:

“Há busca em banco de dados, mas não é sistemático. A medida que o tempo permite. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Sempre fazemos com alunos envolvidos em tese, procuramos ler sobre o assunto de inovação de métodos voltados a nossos produtos, mas sistemática não há. ”

QUESTÃO 11: O laboratório conhece alguma instituição que trabalhe com métodos alternativos?

IVB:

“Conhecemos para soro (os laboratórios do país) e o INCQS. O próprio INCQS ou RENAMA poderiam apresentar um protocolo de validação mais simples e que fosse aceito pelas autoridades sanitárias. Como se fosse um modelo padrão a ser seguido para conseguir validar o método de uma forma mais simples. ”

FUNED:

“Só o Butantan. ”

BUTANTAN:

“Conhecemos um laboratório na Costa Rica, que também trabalha com soros”.

CPPI:

“O Instituto Butantan. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Cuba, UFF, Butantan. Falta interface feita pelo RENAMA. Se eu valido um produto novo, no Brasil, posso liberar para exportação? Como saber estas informações? Queria uma diretriz para estas informações...temos receio de gastar dinheiro na liberação e o produto não ser aceito em outros países. O gasto anual só para alfapoetina (só com animal) é de dois milhões por ano. ”

QUESTÃO 12:Qual a percepção em relação ao CONCEA?

IVB:

“Achamos que o CONCEA não vê de fato a real quantidade de animais que são usados, por exemplo: o que é descartado pelo biotério, pois há desperdício de animais (descartamos muitos sem nem utilizarmos, pois perdem o padrão de peso e etc.). Outro exemplo: foram utilizados 15.718 camundongos de janeiro a outubro/2016 para alimentar as cobras. O CONCEA deveria ter mais políticas de incentivo a substituição de animais: como homenagear e premiar simbolicamente quem trabalhou se destacou na área, como forma de estímulo aos laboratórios.”

FUNED:

“O CONCEA está muito distante dos laboratórios. Não vemos colocação, participação e não nos sentimos parte do contexto, estamos fora do ciclo (somos pequenos e engolidos); só nos falamos com Butantan e INCQS. Precisa haver uma harmonização e reunião com todos (para participação das leis, das validações, das propostas, como a ANVISA faz, por exemplo. Não há laço com o CONCEA. Precisa englobar todo mundo e colocar tarefas e obrigações definidas para cada). Deveria haver mais propostas de participação para que cada um exponha as dificuldades e em cima disso, criar validações e legislações. ”

BUTANTAN:

“Decepção com órgão. Na primeira tentativa em relação a normativa 31, sobre o uso do LAL, fizemos uma consulta ao CONCEA sobre usar a técnica para soros hiperimunes e não tivemos nenhum posicionamento (poderíamos, ao implementar este método, substituir 45 coelhos por semana). Achávamos que teria um interesse maior do órgão para com a instituição. Como ficar sabendo das reuniões? Das pautas? Poderia ser como a DICOL (Diretoria Colegiada – ANVISA) que divulga melhor esta parte de reuniões e pautas. A pauta poderia ser divulgada e as discussões deveriam ser de interesse dos laboratórios que de fato usam animais. ”

CPPI:

“Na verdade, não temos tempo de verificar os conteúdos apresentados pelo CONCEA. A instituição está aberta e disponível para qualquer informação que o CONCEA possa trazer. O CONCEA pode trazer um norte, veem com o propósito importante. ”

BIO-MANGUINHOS:

“A percepção é de que as políticas não são relevantes; não há muito envolvimento da instituição com o CONCEA. O LAL já estava na nossa rotina, então não fez muita diferença, pois usávamos a Farmacopeia Brasileira. Não há auxílio do CONCEA. Se o método já está em outras farmacopeias, o CONCEA deveria se posicionar (mesmo que não esteja na Brasileira) para prazo e frente a ANVISA. ”

QUESTÃO 13: Como anda a necessidade de capacitação?

IVB:

“Faltam pessoas capacitadas e faltam pessoas disponíveis para se capacitarem. Não possuímos pessoal suficiente para que haja um colaborador ou equipe dedicado (s) a esta área. ”

FUNED:

“A instituição promove, mas há má vontade de pessoal (principalmente para os antigos). Como o incentivo é pouco (as pessoas não são utilizadas em sua capacitação), as pessoas mais qualificadas acabam saindo por não se sentirem úteis. Geralmente toda a qualificação do pessoal não é aproveitada. Quem quer se qualificar, consegue. Mas as pessoas antigas não querem. A instituição apoia (sempre dá oportunidade); as pessoas que não se mobilizam.”

BUTANTAN:

“Não há necessidade; temos uma equipe multidisciplinar, bem capacitada. ”

CPPI:

“Há algumas limitações. Muitas pessoas estão se aposentando e há poucas pessoas para substituir; estas precisam se capacitar. Faltam mais pessoas do que incentivo (a instituição procura promover capacitação). Por exemplo, o setor de garantia da qualidade só tem 1 pessoa. Há busca de novas pessoas, mas só entram concursados (o que reduz o número de disponibilidade). ”

BIO-MANGUINHOS:

“Há dificuldade, falta tempo e liberação de verba para cursos fora da instituição. Não conseguimos participar de congresso para ver o que anda em busca em outros lugares. ”

QUESTÃO 14: Há rodada interlaboratorial?

IVB:

“As reuniões em relação aos métodos alternativos no INCQS (foram 4, com os produtores de soro) propuseram rodada e também a busca pela sistemática, mas o andamento da proposta não foi adiante. Sabemos que outros laboratórios e o INCQS usam o RFFIT, mas não foram visitar. Fazem desenvolvimento em parceria com outros laboratórios e com o INCQS: soro antitetânico foi levado ao INCQS para ser padrão do ToBI. Trabalhamos sempre em paralelo ao INCQS (que verifica como os resultados dos métodos saem em cada instituição). ”

FUNED:

“Não há rodada atualmente, mas sabemos que já houve (mesmo sem ser em métodos alternativos). Achamos que os últimos 3 anos foram atípicos, pois ficamos esporadicamente sem produção. Perdeu-se um pouco a unidade entre os fabricantes públicos. Há a rede mineira de biotérios (há rodada para dados de compra de animais e produção de animais - do uso de animais propriamente dito).”

BUTANTAN:

“Há, mas de forma muito lenta, o que prejudica a implementação dos métodos já validados pela instituição. ”

CPPI:

“Não há. Achamos que há um fechamento na parte das instituições. Ficamos só nas reuniões. ”

BIO-MANGUINHOS:

“Não há, cada laboratório faz sua etapa. ”

QUESTÃO 15: Há alguma dificuldade apontada em relação à ANVISA e /ou Farmacopéia Brasileira para que haja a implementação dos métodos alternativos?

IVB:

“Julgamos que há dificuldade na troca do método em relação ao pós-registro da ANVISA; a área de imunológicos não facilita a análise, pela complexidade do produto (a empresa julga que qualquer mudança de pós registro pode ser encarada pela agência como uma alteração no produto - um novo produto. Achamos que a ANVISA não irá liberar um método alternativo, a não ser que seja mandatório (estiver na Farmacopeia, por exemplo).O aumento do tamanho do lote poderia reduzir o número de testes (e o uso dos animais), mas há dificuldade em validar (falta de tempo em encaixar na produção de rotina) para cumprir os requisitos da ANVISA e não há infraestrutura para aumentar o tamanho de lote em todas as etapas (formulação e envase).“

OBSERVAÇÕES:

- Foram utilizados 21 mil camundongos para controle da qualidade em 2016.

- Há boa vontade nos laboratórios, mas falta investimento e falta de percepção do quanto é deixado de economizar deixando de usar (ou usando menos) animais
- Caso o RFFIT fosse implantado a economia do uso de camundongos seria de 4400 por ano para soro antirrábico
- Caso o ToBI fosse implantado (para soro antitetânico), a economia seria de 3810 animais (camundongos).
- Todos os outros produtos totalizam 9500 animais
- Coelho: 987 coelhos em 2016 (MAT)

PROPOSTAS:

- maiores políticas de incentivo e de financeiro
- maiores rodadas interlaboratoriais (aumentar as reuniões com o INCQS)
- reuniões mais incisivas (que não fiquem só na ata)

FUNED:

“Mexer com a farmacopeia é muito difícil e não costuma ser a abordagem da instituição. O controle da qualidade julga que a ANVISA é aberta, mas a empresa no geral diz que há dificuldade com a agência e as mudanças por ela aprovadas (há pontos de vistas diferentes). Para a empresa, enquanto a farmacopeia se posicionar com o *in vivo*, a instituição não irá mudar (querem manter o que está na farmacopeia).”

OBSERVAÇÕES:

O problema grave no estado de Minas. A Fundação está cheia de processos políticos. Não há presidente. O cenário político está influenciando a rotina; ninguém assina para responsabilizar a mudança (responde juridicamente). A bola de neve política e econômica está caindo sobre a área técnica. Ninguém quer pegar chefia (os técnicos estão parados).

Método alternativo não entra porque não está longe de ser assunto da pauta. Achrom que vai fechar, muitos problemas internos, sem planejamento de produção (não possui material).

A produção de soro está parada pela ANVISA por causa de água (como podem não ter água e ter método alternativo?). Teria que ter uma política separada. O dinheiro tem que ser exclusivo para os métodos alternativos (não é necessidade); há coisas mais importantes para investir (não tem salário, não tem funcionário). Caso haja competição de verba, o dinheiro nunca sobrar  para os métodos alternativos. O problema não está no método, a dificuldade está muito além.

BUTANTAN:

“Usar métodos que não estejam na Farmacopeia Brasileira   complicado; para altera es na ANVISA, não possuímos CBPF para todas as áreas e, por enquanto, não conseguem mexer nos processos (solicitar altera es de métodos, por exemplo. E para quem se reportar quando possui os métodos? Qual o esquema? Qual a sequência do processo? ”

OBSERVA ES:

Deixar de usar 1320 cobaias por semana (caso LAL e ToBI fossem implementados).

CPPI:

“A ANVISA se mostra aberta quanto a apresenta o de métodos alternativos. Para isso, seria necessário, primeiramente, mostrar que o método alternativo concorda em resultados com o método biológico utilizado, depois validar o método alternativo, em seguida preparar uma documenta o que será enviada a ANVISA para após fazer a modifica o pós-registro do produto. A Farmacopeia Brasileira   difícil, o próprio pirogênio   complicado de aplicar (a linguagem da Farmacopeia   complicada, de difícil compreensão). ”

BIO-MANGUINHOS:

“Nossa dificuldade para transferência: vemos o que está amarrado na transferência de tecnologia e por não poder mudar, não conseguimos colocar novos métodos, pois temos que fazer tudo igual à transferência, mas no geral achamos a ANVISA aberta, basta darmos respaldos técnicos. A Farmacopeia Brasileira está bem desatualizada mediante aos demais compêndios. Nós temos uma característica diferente e falta legislação específica para nossos tipos de produtos, principalmente em relação a validação de métodos biológicos. ”

OBSERVAÇÕES:

Vejo dificuldades nos trâmites. Já posso utilizar antes de estar na Farmacopeia Brasileira, preciso fazer interlaboratorial? Se estiver em outra farmacopeia, eu posso usar ou preciso passar pelo BRACVAM, RENAMA e etc.? A partir de quando posso substituir?

5. DISCUSSÃO

Mediante análise da primeira fase deste estudo, que tange o questionário de triagem (Tabela 2), verifica-se a quantidade de animais utilizados e o custo associado a este uso pelos LPOs fabricantes de soros hiperimunes e vacinas no Brasil. Além

disso, verifica-se que os LPOs apresentam dificuldades na aquisição, manutenção e manipulação dos animais utilizados nos testes.

Com relação aos testes de controle da qualidade apresentados pelos LPOs participantes da pesquisa, nota-se que alguns laboratórios já utilizam métodos alternativos, como por exemplo, o teste *in vitro* para avaliação da potência do soro antirrábico - RFFIT (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) validado em estudo com INCQS e Instituto Butantan (MOURA et al. 2008), o teste *in vitro* para avaliação da potência do componente antitetânico – ToBI (FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2008) e o teste de pirogênio *in vitro* LAL (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser livres de pirogênios, uma vez que este tipo de contaminação pode ser considerado um grave problema de saúde pública e pode provocar desde alterações vasculares até um quadro de choque e óbito (POOLE; DAS, 2001). Os produtos em questão são injetáveis de uso humano (LOPES, 2014), portanto, os testes de detecção de contaminação pirogênica são imprescindíveis e estão previstos para todos os produtos relacionados neste estudo.

Em nosso levantamento, os três métodos presentes em compêndios oficiais e utilizados para detecção da presença de pirogênios, *i.e.* o teste de pirogênios *in vivo*, LAL e MAT, foram citados por pelo menos um LPO. Dos 57 produtos imunobiológicos verificados no presente estudo, 40 são avaliados pelo teste de pirogênio *in vivo*.

O teste de pirogênios *in vivo*, apesar de ser um ensaio seguro, capaz de detectar um amplo espectro de contaminações pirogênicas, e ser aplicável a um grande número de produtos, não pode ser utilizado para algumas classes de medicamentos, como por exemplo, aqueles que interferem na resposta imune e no mecanismo da febre, tais como, antitérmicos, analgésicos e anti-inflamatórios; além de produtos farmacêuticos modernos, tais como radiofármacos, biofármacos, drogas imunomodulatórias e drogas contra câncer que também não podem ser testados em coelhos devido aos efeitos interferentes (DA SILVA et al., 2015). Segundo o ICCVAM (ICCVAM, 2008), dentre os fatores limitantes do teste *in vivo* estão relacionados a confiabilidade dos ensaios, o fato deste teste não contar com desfecho quantitativo, não utilizar controle positivo e não possuir diferencial de sensibilidade aos pirogênios,

além da limitação relativa à extrapolação interespécies (coelho/homem). Coelhos são susceptíveis à interferência de variáveis relacionadas ao ambiente externo como temperatura, ruídos, umidade e ventilação. Fatores relacionados ao animal como diferenças de resposta entre raças, sexo e a variabilidade biológica também contribuem para possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos (SPREITZER et al., 2002; HOCHSTEIN, MUNSON, OUTSCHOORN, 1990; PEARSON, 1985; HARTUNG et al., 2001). Essas e outras importantes limitações do teste *in vivo*, tais como, implicações éticas e dificuldades no manejo dos animais, estimularam o desenvolvimento de métodos alternativos (LEVIN; BANG, 1964).

Assim, o debate sobre a possibilidade de desenvolver cientificamente alternativas válidas aos experimentos em animais - principalmente os sencientes - e com a capacidade de detecção de um amplo espectro de pirogênios ganhou destaque nas últimas décadas. Como resultado desse esforço, em 1980, o LAL foi incluído como monografia oficial da Farmacopeia Americana (MELANDRI, 2011). Desde então, é um modelo amplamente utilizado, inclusive no Brasil, sobretudo no controle da produção de água para hemodiálise e diluentes de vacinas.

No entanto, como citado anteriormente, o LAL não pode ser considerado um método pleno na substituição do modelo *in vivo* (HARTUNG et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005). Segundo Schindler et al. (2009), em contrapartida ao fato da endotoxina ter sido muito investigada nas últimas décadas e o LAL amplamente utilizado, as contaminações por Gram-positivas e fungos foram negligenciadas, apesar destas compreenderem a maioria dos formadores de esporos, o que representa risco à saúde humana e um diferencial na contaminação pirogênica (SCHINDLER et al., 2009).

As limitações do teste de pirogênios *in vivo* e do LAL, e o acúmulo de conhecimento científico no campo da Imunologia contribuíram para o desenvolvimento do MAT, método alternativo baseado no mecanismo de reação da febre no mamífero (GAINES DAS et al., 2004). Algumas importantes características do MAT, tais como aplicação *in vitro*, alta sensibilidade e a detecção de um vasto espectro de agentes pirogênicos levaram à sua aceitação regulatória e sua inclusão na Farmacopeia

Europeia como terceiro método para o teste de pirogênio no ano de 2010 (MAT, 2.6.30, 2010).

Apesar de ser um método promissor, os dados do presente estudo corroboram argumentos do ICCVAM e demonstram que na prática laboratorial algumas dificuldades relacionadas à aplicação do MAT ainda devem ser superadas, tais como, obtenção e qualificação das matrizes celulares, necessidade de validação produto-específica e maior robustez científica (NAVEGA et al., 2015).

Neste sentido, um dos obstáculos técnico-científicos mais relevantes e que vem impactando negativamente e inibindo a ampla utilização do MAT para fins regulatórios, é o fato dos estudos de validação terem sido conduzidos exclusivamente com endotoxina (LPS) como estímulo pirogênico padrão (SPREITZER et al., 2007; NAVEGA et al., 2015). Há na literatura científica uma abundância de dados que demonstram a reatividade de monócitos humanos frente ao ácido lipoteicoico - LTA (HERMANN et al., 2001; OPITZ et al., 2001) e outros agentes pirogênicos não-endotoxinas (HASIWA et al., 2013). No entanto, para as agências regulatórias mundiais e para os centros de validação permanece a necessidade de estudos adicionais, sobretudo aqueles que demonstrem a aplicabilidade do MAT para diferentes produtos de uso humano.

Até o momento, o ICCVAM e o FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) aprovaram a utilização do MAT para cloreto de sódio 0,9%, glicose 5%, etanol 13%, ocitocina, metoclopramida, ampicilina, maleato de dimetindeno, ranitidina e tartarato de metoprolol, sendo necessária uma análise caso-a-caso para a detecção de endotoxina em outros produtos (ICCVAM, 2008, 2009; FDA, 2009). Outras farmacopeias não incorporaram o MAT, apesar do esforço para aceitação deste teste em países como Brasil e Cuba (HARTUNG, 2015; CALDEIRA et al., 2016; NAVEGA, 2016).

No Brasil, estudos recentes conduzidos por grupos de pesquisadores que atuam no controle da qualidade de soros hiperimunes (tais como, soro antirrábico, soro antidiftérico, soro antitetânico, soros antipeçonhentos) e vacinas (tais como, vacina contra febre amarela e meningocócica) demonstraram resultados promissores

quanto à aplicabilidade do LAL e do MAT (NAVEGA et al., 2015; SILVA, 2017; FINGOLA et al., 2013; CALDEIRA et al., 2016).

Apesar desse esforço, até a presente data não há descrição do uso do MAT na FB e apenas dois produtos imunobiológicos (vacina contra a febre amarela e anti-poliomielite 1, 2, 3 inativada) fazem uso exclusivamente do LAL para a detecção de pirogênio (SILVA et al., 2015). Esta lacuna regulatória – citada por LPOs no presente estudo, representa grande dificuldade para os laboratórios produtores, pois via de regra somente a FB é utilizada como referência para a maioria dos LPOs.

Na segunda etapa da pesquisa, onde houve visitas e entrevistas aos LPOs, elencamos as principais causas para a não adoção de métodos alternativos já consagrados mundialmente pelo uso e publicados na literatura científica; entre eles os métodos *in vitro* para determinação da potência biológica (*i.e.*, RFFIT e ToBI). As dificuldades específicas apontadas pelos LPOs vão desde a aquisição de alguns equipamentos essenciais para a implementação da técnica, falta de pessoal dedicado ao tema, falta de tempo e de investimentos, problemas com infraestrutura e dificuldades técnicas relativas a questões mais burocráticas, como a oficialização do método mediante os órgãos regulatórios.

Segundo o presente levantamento, o teste de toxicidade inespecífica para a liberação dos lotes de produtos biológicos está sendo abolido pela maioria dos LPOs, mediante aprovação da ANVISA. O banimento deste teste dos compêndios oficiais é baseado em estudos internacionais (GARB et al., 2014) e acompanha a tendência mundial de banimento de testes conduzidos em animais que pouco contribuem para a avaliação de segurança e eficácia de produtos, como por exemplo o teste de avaliação de toxicidade aguda por DL50%. Neste sentido, o INCQS – após apreciação retrospectiva de seus resultados e com mais de 25 anos de experiência na emissão de laudos analíticos para a liberação de lotes de soros hiperimunes e vacinas para o PNI/MS, encaminhou no ano de 2016 ao CONCEA, recomendação pelo banimento do teste toxicidade inespecífica em vacinas (RELATÓRIO DE GESTÃO DA FIOCRUZ, 2017).

Pode-se observar também que muitos dos produtos aqui avaliados, para os quais são utilizados métodos alternativos no processo de controle da qualidade, são aqueles oriundos de transferência de tecnologia de outros países, ou seja, a metodologia analítica aplicada neste caso é - via de regra - a mesma já utilizada pela empresa multinacional matriz do produto. Podemos usar como exemplo, os testes de potência biológica aplicados para as vacinas como DTP-acelular (componente acelular), rotavírus, HPV, sarampo, caxumba, rubéola e varicela atenuada, influenza, entre outros. Tal fato demonstra que há um atraso desta área tecnológica no Brasil em relação a outros países. Para outros produtos biológicos, tais como vacinas contra febre amarela, sarampo, caxumba e rubéola, os testes de potência são antigos, mas desde sua origem são realizados *in vitro* (NETTO et al., 2010; NETTO et al., 2011). Em poucos casos, estudos nacionais levaram à substituição do modelo *in vivo* por modelo *in vitro* (COSTA et al., 2011; MOURA, 2009; MOURA et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Segundo alguns entrevistados, dados provenientes de alguns estudos nacionais já seriam suficientes para que alguns métodos alternativos fossem aceitos e difundidos para os demais LPOs, como por exemplo, a análise de pirogênio *in vitro* pelo LAL (para soros hiperimunes), teste da potência biológica de soros hiperimunes pelo método ToBI, doseamento da fração diftérica e doseamento da fração tetânica, além da avaliação da potência do soro antitetânico e da fração botrópica, pelo método ToBI, todos propostos pelo Instituto Butantan. Caso o LAL e ToBI sejam implementados por este LPO, cerca de 1.320 cobaias deixarão de ser utilizadas por semana.

Há algumas propostas de alternativas em desenvolvimento que precisam ser subsidiadas, como o ensaio de avaliação da dose mínima necrosante do veneno loxocélico em cultura de células e ensaio de potência do soro antiloxocélico por ELISA e cromatografia, ambos propostos pelo CPPI. Além da atenção que precisa ser despendida para os LPOs que ainda não implementaram os métodos alternativos já preconizados na FB (como o RFFIT) por falta de investimento em equipamentos e materiais, como é o caso da FUNED e IVB. Só no IVB, por exemplo, caso o RFFIT

seja implementado para a potência do soro antirrábico, cessaria o uso de aproximadamente 4.400 camundongos por ano e com a implementação do ToBI para o ensaio de potência do soro antitetânico, cessaria o uso de 3.810 camundongos por ano.

A falta de assistência dos órgãos que atuam na área de fomento, desenvolvimento, validação e regulamentação de métodos alternativos no Brasil (BraCVAM, RENAMA e CONCEA) é uma dificuldade amplamente citada pelos LPOs para adesão à política dos 3Rs e implementação dos métodos alternativos. Os laboratórios apontam que os trâmites necessários para validar e implementar um método alternativo em potencial não estão bem definidos, faltando maior orientação, melhores orientações relacionadas ao tema e maior relacionamento, de modo a encurtar a distância entre os LPOs e os órgãos. A necessidade de maior ênfase da FB nesta área, em conjunto com os órgãos envolvidos nos trâmites burocráticos, também é citada.

Cabe ressaltar que os soros hiperimunes e as vacinas são produtos largamente utilizados pela população brasileira, sendo considerados produtos de grande interesse pelo MS. Além do controle da qualidade efetuado pelos LPOs, o INCQS faz análises lote a lote de soros e vacinas para o PNI, antes da distribuição destes produtos. Portanto, uma vez reconhecida a aplicabilidade de potenciais métodos alternativos, o número de animais pode ser reduzido, ratificando os conceitos éticos e reduzindo o custo e o tempo das análises.

Também é importante destacar que os produtos imunobiológicos produzidos pelos LPOs, além do interesse nacional, podem também ser exportados e, desta forma, é importante ratificar o papel do BraCVAM em estimular a condução dos estudos de métodos alternativos em consonância às tendências mundiais, pois, em termos internacionais, refletirá a credibilidade do país no processo de produção e exportação destes produtos analisados dentro de padrões éticos e de qualidade.

A substituição da experimentação animal pelas metodologias alternativas existentes, realizadas pelos LPOs dependerá do contexto em que estas metodologias e estes laboratórios estejam inseridos. O desenvolvimento e difusão de métodos e

abordagens alternativas e sua aplicação no controle da qualidade e aceitação pelos órgãos reguladores está em uma fase inicial, mas é possível verificar importantes avanços.

6. PRODUTO TECNOLÓGICO

Relatório técnico com os dados levantados, que será apresentado ao conselho gestor da RENAMA, e deverá subsidiar a tomada de decisões e o planejamento da Rede no desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite constatar, que:

- Os LPOs produtores de imunobiológicos no Brasil são: Bio-Manguinhos, Instituto Vital Brazil, Fundação Ezequiel Dias, Instituto Butantan, Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos e Fundação Atauípho Paiva. Os produtos imunobiológicos presentes no escopo dos LPOs são vacinas e soros hiperimunes.
- Todos os LPOs elencados fazem uso de animais em testes de rotina, mais especificamente no controle da qualidade para liberação do lote produzido. Poucos laboratórios estão com produtos em fase de desenvolvimento, mas mesmo nesta fase animais são utilizados para controle da qualidade e não para teste de toxicidade.
- Alguns testes in vivo utilizados pelos LPO's possuem métodos alternativos como teste de pirogênio LAL, teste de potência do soro antirrábico (RFFIT) e teste de potência do soro antitetânico (ToBI).
- A implementação dos métodos alternativos pelos LPOs é dificultada por falta de infraestrutura, pessoal qualificado, aspectos técnicos e falta de tempo para implementação dos testes, entre outras. Contudo, os representantes dos LPOs julgam ser necessário maior investimento nesta área.
- Os métodos de: *i.* avaliação de dose mínima necrosante por cultura de células para soro antiloxocélico e *ii.* potência por ELISA e cromatografia para o soro antiloxocélico e soro antibotrópico possuem potencial para serem desenvolvidos; e
- Os métodos *iii.* potência de soros hiperimunes, doseamento da fração diftérica, doseamento da fração tetânica, para potência do soro

antitetânico e para potência da fração botrópica pelo método ToBI, *iv.* teste de pirogênio *in vitro* para soros (MAT e LAL) possuem potencial para serem validados.

Destarte, conclui-se que promover um cenário mais propício para o desenvolvimento, validação e implementação de métodos alternativos contribuirá significativamente para o maior desenvolvimento, produção e controle da qualidade de produtos imunobiológicos dos LPOs com significativa redução de custo e tempo na liberação de lotes dos produtos imunobiológicos.

REFERÊNCIAS

AAVS. Testing. **AAVS – American Anti-Vivisection Society.**

Disponível em:

<<http://www.aavs.org/laboratories02.htm>>. Acesso em: 10 ago.2015.

AAVS. Testing. **AAVS – American Anti-Vivisection Society.**

Disponível em:

<<http://aavs.org/animals-science/how-animals-are-used/testing/>> Acesso em: 04 mai. 2017.

ABACI, H. E.; SHULER, M. L. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. **Integrative Biology (Camb)**, .v.7, n. 4, p.383-391, abr. 2015.

ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3.** Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104 f., 2008.

ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELAGDO, I. F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. **Revista CFMV**, Ano XIV, Nº 45. Brasília/DF, 2008.

ALFOB. Associação de Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil.

Disponível em:

<[http:// www.alfob.org/](http://www.alfob.org/)>. Acesso em: 13 out. 2015.

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico. **Ciência Hoje**, v.39, n. 231, p. 24, 2006.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: **EPSJV**, v.2, p. 215-253, 2010.

AMARAL, et al. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cístico: genômica, transcriptômica e proteômica. **Melhoramento e Biotecnologia**. LARANJA, Cordeirópolis, v.27, n.2, p. 355-372, 2006.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Orgs.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/conceitos-e-definicoes7>>. Acesso em: 13 dez 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **CONCEA Publica Métodos Alternativos ao Uso de Animais**.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/=concea-publica-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais&inheritRedirect=true>>. Acesso em: 04 mai 2017.

ARAUJO, R. Medicamentos biológicos, no Brasil: desafios e perspectivas. **Pharmacia Brasileira**, n. 84, p. 69-70, fev. 2012.

AZEVEDO, A. P. G. B. et al. Uso da Informação de Patentes para Estudo dos Métodos de Avaliação de citotoxicidade in vitro como alternativa ao Uso de Animais. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 2, p. 213, 2015.

BALLS M.; FENTEM, J. Progress towards the validation of alternatives tests. Alternatives to laboratory animals. **ATLA-NOTTINGHAM**, v.25, p. 33-44, 1997.

BALLS M. et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. **ATLA**, v. 23, p. 192-147,1995.

BASKETTER, D. A. et al. A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing. **ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation**, v. 29, n. 1, p. 3-91, 2012.

BASTOS, V. D. Laboratórios farmacêuticos oficiais e doenças negligenciadas: perspectivas de política pública. **Revista do BNDES**, v. 13, n. 25, p.. 269-298, Rio de Janeiro, jun. 2006.

BENFENATI, E. et al. Novel chemical hazard characterisation approaches. **EFSA Journal**, v. 14, n. S1, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 dez 2012. Seção 1, p. 19.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA. Resolução Normativa Nº 17, de 03 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 jul 2014. Seção 1, p. 51.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 set 2014. Seção 1, p. 9.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. DIRETORIA COLEGIADA. Resolução RDC Nº 35, de 7 de agosto de 2015. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 ago 2015. Seção 1, p. 39.

BRASIL. Ministério da Ciência, tecnologia, Inovação e Comunicação. CONCEA. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 ago 2016. Seção 1, p. 4.

BUTANTAN. **Instituto Butantan.**

Disponível em:

<<http://www.butantan.gov.br/producao/soros/Paginas/default.aspx>>. Acesso em: 04 dez. 2016.

BRUCE, M.P. et al. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 264, n. 1, p. 59-68, 2002.

CAMPOS, A. S., et al. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral.** Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2016.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 47-49, 2008.

CHIARI, B. G. et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

CORRADO, M. C. **Uso do HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

DA SILVA, N. A. P. NOVAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS. **Revista Educação-UNG**, v. 8, n. 2 Esp, p. 58, 2013.

DA SILVA, C. C., et al. Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 3, p. 41-46, 2015.

DOS SANTOS, E. R. et al. Panorama Brasileiro do Programa de Boas Práticas de Laboratório. Impacto na redução do uso de animais. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 20-28, 2015.

DE MATTIA, F. et al. The consistency approach for quality control of vaccines—a strategy to improve quality control and implement 3Rs. **Biologicals**, v. 39, n. 1, p. 59-65, 2011.

DHOLAKIYA, S. L.; BARILE, F. A. Alternative methods for ocular toxicology testing: validation, applications and troubleshooting. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 9, n. 6, p. 699-712, 2013.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, O.H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377-390, 1944.

EDWARDS, S. W. et al. Adverse outcome pathways—organizing toxicological information to improve decision making. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 1, p. 170-181, 2016.

ECVAM - European Centre for the Validation of Alternative Methods. Statement on the application of the ToBI test for the batch potency testing of tetanus vaccines for human use. **ATLA**, n. 29, p. 94–96, 2001.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7th ed. Monocyte-Activation Test. In: European Pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe, v.1, 2010.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FINGOLA, F. et al. Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-biotherapeutic serum. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 85, p. 93-98, 2013.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com soros hiperimunes sujeitos à Vigilância Sanitária**. 2008. n° de folhas 60 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

GELLER, N. L. Statistical strategies for animal conservation. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 406, n. 1, p. 20-31, 1983.

GOLDBERG, A. M. ; HARTUNG, T. **Bom para os animais, bom para nós**. Scientific America Brasil, v. 276, p. 48-55, 2006.

GORDILHO, H. J. D. S. Visissecção, crueldade contra os animais e a nova ordem jurídica brasileira. **Anais do XVIII Encontro Nacional do Conpedi**, v. 20, 2014. Disponível em: <http://www.conpedi.org.br/anais/36/08_1150.pdf>. Acesso em 08 mai 2017.

HALDER, M. Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals. **Altex**, v. 18, n. Suppl 1, p. S13-S47, 2001.

HARTUNG, T. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLANTIC NOTTINGHAM**, v. 29, n. 2, p. 99-124, 2001.

HASENCLEVER, L. et al. Diagnóstico e papel dos laboratórios públicos na capacitação tecnológica e atividades de P&D da indústria farmacêutica brasileira. **Buss PM, Carneiro JR, Casas CPR, organizadores. Medicamentos no Brasil: inovação e acesso**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 199-234, 2008.

HOCHSTEIN, H. D.; MUNSON, T. E. Comparison of rabbit responses of 2 *Escherichia coli* endotoxin preparations in the usp rabbit pyrogen test. In: **Pharmacopeial Forum**.

12601 TWINBROOK PKWY, ROCKVILLE, MD 20852: US PHARMACOPEIAL CONVENTION, 1990. p. 346-351.

HOFFMANN, S. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **Journal of immunological methods**, v. 298, n. 1, p. 161-173, 2005.

INCQS. **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**. Ministério da Saúde.

Disponível em: <<http://incqs.fiocruz.br>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Test method evaluation report: In Vitro Pyrogen test Methods**. 2009.

Disponível em:

<<http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=82013354-9C2E-17F9-9F75FE7717C6BEBB>>.

Acesso em: 10 jan. 2016.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Test method evaluation report: Validation status of five in vitro test methodsd proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products**. 2008. (NIH publication, n. 08-6392).

Disponível em:

<<http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=82013354-9C2E-17F9-9F75FE7717C6BEBB>>.

Acesso em: 10 jan. 2016.

JAWORSKA, J; HOFFMANN, S. Integrated testing Strategy (ItS)–Opportunities to better use existing data and guide future testing in toxicology. **Altex**, v. 27, n. 4, p. 231-242, 2010.

KANDPAL, R. P.; SAVIOLA, B.; FELTON, J. The era of omics unlimited. **Biotechniques**, v. 46, n. 5, p. 351, 2009.

KNAPEN, D. et al. The potential of AOP networks for reproductive and developmental toxicity assay development. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 52-55, 2015.

KONGSBAK, K. et al. A computational approach to mechanistic and predictive toxicology of pesticides. **Altex**, v. 31, n. 1, p. 11-22, 2014.

KOMSKI, L. **Comparando o método de LAL com o ensaio de pirogênio em coelhos**, EUA: Wako Chemicals USA, Inc, fevereiro, 2015.

Disponível em: <<http://www.wakopyrostar.com/blog-pt/post/comparando-o-metodo-de-lal-com-o-ensaio-de-pirogenio-em-coelhos/>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

LOPES, I. G. **Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos na determinação da contaminação pirogênica com ácido lipoteicóico em produtos injetáveis**. 2014. n° de folhas 77 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

MELANDRI, V. C. R. **Padronização e validação do método de inibição de ligação da toxina (ToBI) para determinação da potência de vacinas e soros antidiftéricos e antitetânicos**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações: 30 anos**. Ministério da Saúde, 2003.

MORAES, P. L. **Animais de Laboratório**. Brasil Escola, 2012.

Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/animais/animais-laboratorio.htm>>. Acesso em: 13 jul 2015.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

NAVEGA, E. C. A. et al. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos biológicos. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 4, 2016.

OECD. **Organization for Economic Co-operation and Development.**

Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>> Acesso em: 10 abr 2017.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals. In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (435)**, 19, 2006.

Disponível em:

<<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg435.pdf>>. Acesso em: 16 set 2014.

OECD. **Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.** OECD Series on Testing and Assessment, Number 34. ENV/JM/MONO. Organization for Economic Co-operation and Development, 2005.

OECD. **Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).** OECD Series on Testing and Assessment, Number 67. ENV/JM/MONO. Organization for Economic Co-operation and Development, 2016.

PAIXÃO, R.L. **Experimentação Animal: Razões e Emoções para Uma Ética**. 2001. 189f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001a.

PAIXÃO, R. L. Bioética e medicina veterinária: um encontro necessário. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano 7, v. 7, p. 20-26, 2001b.

PAIXÃO, R. L. As comissões de ética no uso de animais. **Revista CFMV**, v. 10, p. 13-20, 2004.

PAUWELS, M.; ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetics in the EU: reality and challenges for the toxicologist. **Toxicology letters**, v. 151, n. 1, p. 7-17, 2004.

PEREIRA, L. C.; dos SANTOS, A. G. Utilização de métodos alternativos à experimentação animal em pesquisa. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 4, n. 1, p. 22-31, 2016.

PEARSON, F. C. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and depyrogenation**. Marcel Dekker Incorporated, 1985.

PETA. People for the Ethical Treatment of Animals. **Mice and Rats in Laboratories**. Disponível em:
<<http://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/animals-laboratories/mice-rats-laboratories>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

PNI. **Programa nacional de Imunizações**. Ministério da Saúde. Disponível em <http://pni.datasus.gov.br/> Acesso em: 03 de dezembro de 2015.

PRESGRAVE, O. A. F. **Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2002.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs.) **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. p. 361-367.

PRESGRAVE, O. A. F. et al. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, p. 106-117, 2010.

PRESGRAVE, O. A. F. **Proposta de criação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos: formação, estrutura e funcionamento**. 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

POOLE S, Das R.E.G. Towards a 'human pyrogen test'. **Eur J Parenteral Sciences**, v. 6, n. 2, p. 63-64, 200.1

RAYMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista Bioética**, v. 10, n. 1, 2009.

RENAMA. **Rede Nacional de Métodos Alternativos, 2015**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.
Disponível em: <<http://renama.org.br>>. Acesso em: 03 dez. 2015.

ROGERO, S. O.; et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROWAN, A. D. The three R's (reduction, refinement and replacement) of animals in experimentation: a historical perspective. **Jenkintown. PA: America Anti-Vivisection Society**, p. 6-12, 1997.

ROWAN, A.N.; ANDRUTIS, K.A. Alternatives: A socio-political commentary from the USA. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, 1990.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. **The principles of humane experimental technique.**, 1959.

SCHINDLER, S. et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **Journal of immunological methods**, v. 316, n. 1, p. 42-51, 2006.

SCHINDLER, S. et al. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. **Journal of immunological methods**, v. 294, n. 1, p. 89-100, 2004.

SCHINDLER, S. et al. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. **Altex**, v. 26, n. 4, p. 265-277, 2009.

SEHNEM, D. P. et al. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, 2012.

SILVA, V. F. **Padronização do teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênios *in vitro* em substituição ao teste *in vivo*: verificação da aplicabilidade do ensaio à vacina meningocócica C conjugada.** 2017. Tese (Mestrado em Tecnologias de Imunobiológicos). Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

SPREITZER, I. et al. Comparative study of rabbit pyrogen test and human whole blood assay on human serum albumin. **Altex**, v. 19, n. Suppl 1, p. 73-75, 2002.

TEMPORÃO, J. G. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. Supl 2, p. 601-17, 2003.

TEMPORÃO, J. G.; NASCIMENTO, M. V. L.; MAIA, M. L. S. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. In: **Vacinas, soros & imunizações no Brasil**. p. 101-123. Fiocruz, 2005.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Pyrogen test**. In: U.S. Pharmacopeia 32./ National Formulary 27: 2009. Rockville.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Pyrogen test**. In: U.S. Pharmacopeia 24. National Formulary 19: 2001. Maryland.

TOLLEFSEN, K. E. et al. Applying adverse outcome pathways (AOPs) to support integrated approaches to testing and assessment (IATA). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 629-640, 2014.

TREZ, T.; GREIF, S. A verdadeira face da experimentação animal: a sua saúde em perigo. 2^a edição. **Rio de Janeiro: Sociedade Educacional Fala Bicho**, 2000.

VICTAL, J. C. et al. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, 2015.

VIVISECTION INFORMATION NETWORK. **Update: How many animals are used?**

Disponível em:

<http://vivisectioninformation.com/index4561.html?p=1_76_UPDATED-How-many-animals-are-used>. Acesso em: 04 mai. de 2017.

WILHELMUS, K. R. The Draize eye test. **Survey of ophthalmology**, v. 45, n. 6, p. 493-515, 2001.

ZANATTA, A. S. **Obtenção de anticorpo monoclonal anti-dengue tipo 2 em diferentes meios e sistemas de cultivo**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009. **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MAPEAMENTO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS

Pesquisador: RAFAELA KUSTER GON

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61167716.2.0000.5262

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.828.973

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, com o intuito de mapear os testes in vivo utilizados no desenvolvimento e no controle da qualidade de produtos biológicos.

Mundialmente, observa-se que alguns fatores vêm produzindo um aumento significativo no número de grupos de pesquisa e de estudos voltados para o campo dos "Métodos Alternativos ao Uso de Animais". No Brasil, com a criação da RENAMA, esta área de pesquisa vem ganhando destaque e recebendo apoio financeiro do governo federal, sendo várias as linhas de pesquisa e possibilidades de investigações neste campo do saber.

ANEXOS

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho busca sistematizar dados a respeito do uso de métodos alternativos ao emprego de animais no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos biológicos, subsidiando políticas públicas, como por exemplo, aquelas apoiadas pelo MCTI, com informações relevantes para que haja priorização de ações e maior chance de sucesso na aplicação da regra dos 3R's na área de produção e controle da qualidade de produtos biológicos.

valiação dos Riscos e Benefícios:

pesquisador responsável afirma não haver riscos para a execução da pesquisa. Na verdade há

101

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

UF: RJ

Telefone: (21)3865-9585

CEP: 21.040-360

Município: RIO DE JANEIRO

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

Continuação do Parecer 1.828.973

riscos, dentre os quais podemos citar a perda de confidencialidade dos dados obtidos durante as entrevistas, visto que os questionários contêm nome do entrevistado e da empresa sobre a qual os dados dizem respeito. Também serão realizadas gravações: como as gravações serão feitas? Armazenadas? Quem irá ter acesso a ver/ouvir as gravações? O que será feito das mesmas ao fim do projeto?

Como benefícios, o pesquisador responsável coloca a sistematização de dados a respeito do tema, subsidiando políticas públicas, como por exemplo, aquelas apoiadas pelo MCTI, com informações relevantes para que haja priorização de ações e maior chance de sucesso na aplicação da regra dos 3R's na área de produção e controle da qualidade de produtos biológicos, principalmente para os laboratórios públicos oficiais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão levantados os laboratórios públicos que fabricam produtos biológicos, listando o portfólio de cada um deles. Para tal, serão utilizados os websites da ANVISA e das empresas listadas, a saber: Bio-Manguinhos, Instituto Vital Brasil, FUNED, Instituto Butantã, Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos e Fundação Ataulpho de Paiva.

Para coleta das informações necessárias de cada empresa, primeiramente será editado um questionário de triagem, que será encaminhado por email às empresas. Este questionário constará de dados que deverão ser coletados, referentes a: quais produtos necessitam do uso de animais; se os testes necessários são para desenvolvimento ou testes rotineiros; número de animais utilizados em cada teste e outros.

Após estes dados será editado um formulário, que será aplicado por meio de entrevista. Este formulário constará de dados que deverão ser coletados, referentes a: protótipo de desenvolvimento de um novo método alternativo, aplicação da Regra dos 3R's, percepção dos fabricantes em relação à tendência da substituição por métodos alternativos, dentre outros.

Mediante a categorização dos testes e das informações sobre a aplicabilidade da Regra dos 3R's, será examinada na literatura e em compêndios oficiais a pré-existência de método alternativo para cada desfecho identificado, bem como a possibilidade da substituição do teste convencional e também a possibilidade de desenvolvimento e validação de um novo método.

A partir da coleta das informações, haverá uma compilação e análise crítica dos dados que serão utilizados como base para a edição de um documento que subsidie a RENAMA quanto à possibilidade de fomento e necessidade de investimento no desenvolvimento e validação de cada método alternativo ao uso de animais.

Endereço: Aven da Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer 1.828.973

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória não foram apresentados. O pesquisador responsável informa na folha de informações básicas do projeto que não será utilizado TCLE, e não apresenta justificativa para tal. Pelo entendimento deste colegiado, o TCLE é necessário, onde o entrevistado deverá concordar em participar da pesquisa e ser informado do risco de perda de confidencialidade dos dados, além dos procedimentos utilizados pelos responsáveis pela pesquisa para que tal risco seja potencialmente nulo. Vale ressaltar que o entrevistado precisa, no questionário, fornecer informações sobre a empresa que ele trabalha; com a perda de confidencialidade, as consequências podem ser brutais!

Recomendações:

O projeto (brochura do pesquisador) deve ser atualizado, o mesmo está datado em 2015, o cronograma prevê a submissão ao CEP em fevereiro de 2016 e já estamos em novembro. Além disso, pelo cronograma do projeto detalhado/brochura do investigador, os formulários e questionários já teriam sido aplicados. Isso procede?

É fortemente recomendado também que sejam coletadas autorizações das seis empresas envolvidas, consentindo no uso das informações levantadas no projeto de dissertação ao qual esse projeto está relacionado, a fim de evitar problemas jurídicos futuros para o participante do projeto que respondeu ao questionário e até para o pesquisador responsável, quando liberar os dados na dissertação final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- 1) Fornecer o TCLE a ser assinado pelos entrevistados. No TCLE devem ser informados obrigatoriamente o risco de quebra de sigilo tanto dos questionários respondidos por escrito como pelas gravações, e o que os pesquisadores farão para minimizar esses danos, citando por exemplo, quem tem acesso aos questionários, como serão armazenados questionários e gravações, o que será feito desse material ao final do estudo. Também deve ser fornecido um número de telefone celular para que o entrevistado possa, a qualquer momento, entrar em contato com o pesquisador responsável para tirar suas dúvidas, relatar problemas ou mesmo tirar seu consentimento em participar do estudo.
- 2) Detalhar procedimentos e cuidados ao manusear e analisar os dados dos questionários, e dos arquivos gerados nas gravações para que não haja perda de confidencialidade.
- 3) Atualizar cronograma de execução do projeto.

104

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

UF: RJ

Telefone: (21)3865-9585

CEP: 21.040-360

Município: RIO DE JANEIRO

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI FIOCRUZ



Continuação do Parecer 1.828.973

Considerações Finais a critério do CEP

Recomenda-se que as pendências acima sejam solucionadas o quanto antes a fim de evitar problemas com o andamento do projeto e defesa da dissertação no prazo regentado.

Situação do Parecer:

Previdente

Necessita Apreciação da CONEP

Não

RIO DE JANEIRO 8 de Novembro de 2016

**Assinado por:
Léa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador)**

Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

UF: RJ Município RIO DE JANEIRO

Telefone: (21) 3865-9585

CEP: 21.040-360

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

105

ANEXO B. PUBLICAÇÃO EM DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO CBPF FAP

Nº 244, quarta-feira, 21 de dezembro de 2016

Diário Oficial da União - Seção 1

ISSN 1677-7042

93



AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR
DIRETORIA COLEGIADA

DECISÕES DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

A Diretoria Colegiada da AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR - ANS, no uso de suas atribuições legais, e tendo em vista o disposto no inciso VI do artigo 10 da Lei nº 9.961, de 28 de janeiro de 2000, em deliberação através da 455ª Reunião de Diretoria Colegiada - DC Ordinária, realizada em 09 de novembro de 2016, votou pelo deferimento do pedido de parcelamento de débito - Ressarcimento ao SUS, nos seguintes processos administrativos de ressarcimento ao SUS:

Processo ANS n.º	Nome da Operadora	Registro ANS	Natureza do Débito	Valor do Débito
33902.529273/2016-01	Medisanitas Brasil Assistência Integral à Saúde S/A	348520	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10196139	R\$ 503.300,87 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 8.388,35).
33902.539108/2016-59	Centro Transmontano d e São Paulo	303623	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10316322	R\$ 526.398,40 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 8.773,31).
33902.533592/2016-11	Samp Espirito Santo Assistência Médica Ltda	342033	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10215515	R\$ 883.023,13 (pagáveis em 22 parcelas de R\$ 40.137,55).
33902.533602/2016-18	GEAP Autogestão Em Saúde	323080	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10195787	R\$ 7.774.123,54 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 129.568,73).
33902.533641/2016-15	Unimed Serapê Cooperativa de Trabalho Médico	337668	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10081804	R\$ 700.893,78 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 11.681,56).
33902.539669/2016-58	Unimed de Belém Cooperativa de Trabalho Médico	303976	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10223425	R\$ 613.793,75 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 10.229,90).
33902.534318/2016-51	Unimed Recife Cooperativa de Trabalho Médico	344885	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10251687	R\$ 770.352,12 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 12.839,20).
33902.536901/2016-04	Memorial Saúde Ltda	373010	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10276243	R\$ 645.049,93 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 10.750,83).
33902.544367/2016-00	Unimed-Rio Cooperativa de Trabalho Médico do Rio de Janeiro	393321	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10203443	R\$ 3.731.568,15 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 62.192,80).
33902.529277/2016-81	Santamalia Saúde S.A.	339245	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10254075	R\$ 897.943,97 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 14.965,73).
33902.529283/2016-38	Caixa de Previdência e Assistência dos Servidores da Fundação Nacional de Saúde - CAPESESP	324477	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10208671	R\$ 1.266.916,10 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 21.115,27).
33902.531178/2016-69	Associação de Saúde Portuguesa de Beneficência	417530	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10196595	R\$ 611.872,89 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 10.197,88).
33902.529302/2016-26	São Francisco Sistemas de Saúde Sociedade Empresária Ltda.	302091	Parcelamento de Débito - Ressarcimento ao SUS - RPD nº 10195508	R\$ 1.213.832,76 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 20.230,55).

Os autos dos processos em epígrafe encontram-se à disposição dos interessados na sede da ANS.

A Diretoria Colegiada da AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR - ANS, no uso de suas atribuições legais, e tendo em vista o disposto no inciso VI do artigo 10 da Lei nº 9.961, de 28 de janeiro de 2000, em deliberação através da 455ª Reunião de Diretoria Colegiada - DC Ordinária, realizada em 09 de novembro de 2016, aprovou os Despacho 2855/2016, pelo deferimento do pedido de parcelamento de débito - multa pecuniária, nos seguintes processos administrativos:

Processo ANS n.º	Nome da Operadora	Registro ANS	Natureza do Débito	Valor do Débito
25779.020289/2012-55	GEAP Autogestão em Saúde	323080	Parcelamento de Débito - multa pecuniária - RPD nº 10288703	R\$ 866.731,08 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 14.445,52).
33902.287590/2013-93	GEAP Autogestão em Saúde	323080	Parcelamento de Débito - multa pecuniária - RPD nº 10283166	R\$ 593.737,21 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 9.895,62).
33902.139409/2008-76	Unimed Noroeste Fluminense - Cooperativa de Trabalho Médico	360414	Parcelamento de Débito - multa pecuniária - RPD nº 10302132	R\$ 517.650,00 (pagáveis em 60 parcelas de R\$ 8.627,50).

Os autos dos processos em epígrafe encontram-se à disposição dos interessados na sede da ANS.

JOSÉ CARLOS DE SOUZA ABRAHÃO
Diretor-Presidente

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DIRETORIA DE AUTORIZAÇÃO E REGISTRO SANITÁRIOS GERÊNCIA-GERAL DE MEDICAMENTOS E PRODUTOS BIOLÓGICOS

RESOLUÇÃO - RE Nº 3.405, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

O Gerente-Geral Substituto de Medicamentos e Produtos Biológicos no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria nº 921, de 15 de abril de 2016, aliado ao disposto no art. 54, I, § 1º da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016, tendo em vista o disposto no art. 229-C da Lei nº 9.279, de 1996, e na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 45, de 20 de junho de 2008, considerando a decisão judicial proferida nos autos do Mandado de Segurança nº 1009743-75.2016.4.01.3400, em tramitação na 22ª Vara Federal da Seção Judiciária do Distrito Federal - 1ª Região, no sentido de deferir liminarmente a antecipação dos efeitos da tutela para determinar que a Anvisa "... analise, no prazo de 15 (quinze) dias, o requerimento administrativo da impratante relativo ao pedido de patente PI0409250-3, sem se adentrar nos critérios de patenteabilidade", resolve:

Art. 1º Conceder prévia anuência ao pedido de patente PI 0409250-3, nos termos da decisão judicial liminar proferida nos autos do Mandado de Segurança nº 1009743-75.2016.4.01.3400, em tramitação na 22ª Vara Federal da Seção Judiciária do Distrito Federal - 1ª Região, sem considerar a análise dos requisitos de patenteabilidade.

Art. 2º Determinar a remessa dos autos do pedido de patente PI 0409250-3 para o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

RICARDO FERREIRA BORGES

ANEXO

NÚMERO DO PEDIDO PI 0409250-3
DEPOSITANTE NOVARTIS AG., MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION
PROCURADOR LICKS ADVOGADOS

DIRETORIA DE CONTROLE E MONITORAMENTO SANITÁRIOS GERÊNCIA-GERAL DE INSPEÇÃO E FISCALIZAÇÃO SANITÁRIA

RESOLUÇÃO-RE Nº 3.403, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

O Gerente-Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria nº 2.198, de 30 de novembro de 2016, aliado ao disposto no art. 54, I, § 1º do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016, considerando o art. 7º da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976;

Considerando que a Fundação Ataulpho de Paiva não cumpre com os requisitos técnicos de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos estabelecidos pela Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, resolve:

Art. 1º Determinar, como medida de interesse sanitário, a suspensão da fabricação dos produtos Imuno BCG e Vacina BCG, fabricados pela Fundação Ataulpho de Paiva (CNPJ: 33.485.939/0002-23), localizada à Avenida Pedro II, números 260 e 270, São Cristóvão, RJ.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

MARCELO VOGLER DE MORAES

RESOLUÇÃO-RE Nº 3.404, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

O Gerente-Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria nº 2.198, de 30 de novembro de 2016, aliado ao disposto no art. 54, I, § 1º do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016;

considerando os arts. 12, 59 e 67, I, da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976;

considerando o art. 7º, XV, da Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999;

considerando o relatório de inspeção da Vigilância Sanitária do Município de Aparecida de Goiânia, Auto de Infração nº 22777, Auto de Imposição de Penalidade nº 98652 e Auto de Apreensão nº 94747;

considerando a comprovação da fabricação e comercialização dos produtos Aspiradores Cirúrgicos e Nebulizadores sem registro/ cadastro na Anvisa, pela empresa MRM Equipamentos e Serviços Hospitalares Ltda - Me, resolve:

Art. 1º Determinar, como medida de interesse sanitário, em todo o território nacional, a proibição da fabricação, distribuição, divulgação, comercialização e uso dos produtos Aspiradores Cirúrgicos e Nebulizadores fabricados sem registro/ cadastro na Anvisa pela empresa MRM Equipamentos e Serviços Hospitalares Ltda - Me (CNPJ: 20.920.517/0001-06).

Art. 2º Determinar que a empresa promova o recolhimento do estoque existente no mercado, relativo ao produto descrito no art. 1º.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

MARCELO VOGLER DE MORAES

RESOLUÇÃO-RE Nº 3.406, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

O Gerente-Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria nº 2.198, de 30 de novembro de 2016, aliado ao disposto no art. 54, I, § 1º do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016 e,

considerando os arts. 12, 59 e 67, I, da Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976;

considerando o art. 7º, XV, da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999;

considerando a Portaria SVS nº 056, de 08 de março de 2016 expedida pela Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, que determinou a interdição, suspensão da venda e uso de todos os lotes de todos os produtos cosméticos rotulados como fabricados pela empresa JFL Batista Produtos Cosméticos Ltda.-ME, no Estado do Rio de Janeiro, resolve:

Art. 1º Proibir a fabricação, distribuição, divulgação, comercialização e uso de todos os produtos sujeitos à vigilância sanitária, fabricados por JFL BATISTA PRODUTOS COSMÉTICOS LTDA.-ME, (CNPJ 03.256.950/0001-70), localizada à Rua Inoc, nº 89, Irajá, Rio de Janeiro/RJ, CEP 21.231-010.

Art. 2º Determinar, ainda, a apreensão das unidades do produto descrito no art. 1º encontradas no mercado.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

MARCELO VOGLER DE MORAES

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE

PORTARIA Nº 2.125, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2016

Deferir a Renovação do Certificado de Entidade Beneficente de Assistência Social, na área de Saúde, da Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, com sede em Araçatuba (SP).

O Secretário de Atenção à Saúde, no uso de suas atribuições,

Considerando a Lei nº 12.101, de 27 de novembro de 2009 e suas alterações, que dispõe sobre a certificação das entidades beneficentes de assistência social, regulamentada pelo Decreto nº 8.242, de 23 de maio de 2014;

Considerando a competência prevista no art. 3º da Portaria nº 834/GM/MS, de 26 de abril de 2016, que redefine os procedimentos relativos à certificação das entidades beneficentes de assistência social na área de saúde; e

Considerando o Parecer Técnico nº 934/2016-CGCR/DCE-BAS/SAS/MS, constante do Processo nº 25000.210476/2015-72/MS, que concluiu pelo atendimento dos requisitos constantes da Portaria nº 834/GM/MS de 26 de abril de 2016, do Decreto nº 8.242 de 23 de maio de 2014 e da Lei nº 12.101 de 27 de novembro de 2009, suas alterações e demais legislações pertinentes, resolve:

Art. 1º Fica deferida a Renovação do Certificado de Entidade Beneficente de Assistência Social, na área de Saúde, pela prestação anual de serviços ao SUS no percentual mínimo de 60% (sessenta por cento), da Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, CNPJ nº 43.751.502/0001-67, com sede em Araçatuba (SP).

Parágrafo único. A Renovação tem validade pelo período de 1º de janeiro de 2016 à 31 de dezembro de 2018.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

FRANCISCO DE ASSIS FIGUEIREDO

APÊNDICES

APÊNDICE A. QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM (DE INFORMAÇÕES)

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	
ENDEREÇO	
PRODUTOS BIOLÓGICOS	
RESPONDENTE	
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais que necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle da qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto)
2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais?

3. OBSERVAÇÕES

APÊNDICE B. OFÍCIO 781/2016

Rio de Janeiro, xx de yyyyyyy de 2016.

Ao Senhor (a)
Endereço:
E-mail:

Assunto: Pesquisa sobre o uso de métodos alternativos

Prezado (a) Senhor (a),

1. Pretendemos identificar os testes que fazem uso de animais no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos biológicos a fim de verificar, dentre eles, quais poderiam ser substituídos por métodos alternativos validados. Ainda, identificar métodos alternativos, utilizados ou não na rotina do laboratório, mas que não tenham sido validados ou que apresentem dificuldade no processo de validação. Os métodos alternativos são definidos como métodos que permitam substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentos científicos. A compilação destes dados permitirá a edição de um documento a ser submetido a reguladores e governo visando contribuir com a decisão informada de gestores públicos no que se refere a futuros investimentos em métodos alternativos.
2. Esta proposta alinha-se com a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA), que estimula a implantação, desenvolvimento e validação de métodos alternativos. A proposta também está em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que monitora e avalia a introdução de técnicas alternativas, e também com o panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs (Refinamento, Redução ou Substituição).
3. A coleta de informações desta pesquisa se dará através da aplicação de um questionário (anexo) a ser respondido por responsáveis por Laboratórios Públicos Oficiais que fazem uso de animais em seus experimentos. Em etapa futura, há a perspectiva de visitar os

laboratórios que aceitarem participar deste levantamento com o objetivo de aprofundar o entendimento do tema.

4. Tendo em vista a relevância do **XXXX** no cenário nacional e internacional, o convidamos a participar deste estudo.
5. Informamos que o caráter ético desta pesquisa assegura a preservação da identidade dos participantes e dos dados fornecidos.
6. Agradecemos a sua compreensão e a colaboração no processo de desenvolvimento da pesquisa científica nesta Instituição, que visa a melhoria em conjunto da aplicação dos princípios dos 3R's nos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil.
7. Em caso de dúvida você pode procurar a Vice Diretoria de Ensino e Pesquisa do INCQS, Isabella Delgado (e-mail: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br; telefone: (21) 3865-5148 / 5151 / 5163) e/ou Rafaela Gon (e-mail: rafaela.gon@bio.fiocruz.br; telefone: (21) 3882 70052 / (21) 996574554).

Atenciosamente,



RAFAELA KÜSTER GON
Aluna / Pesquisadora
Pós-Graduação em VISA / INCQS



ISABELLA DELGADO
Vice-Diretora de Ensino e Pesquisa
INCQS / FIOCRUZ



JOSÉ MAURO GRANJEIRO
Pesquisador Sênior
INMETRO

APÊNDICE C. FORMULÁRIO PARA ENTREVISTA

FORMULÁRIO PARA ENTREVISTA

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	
ENDEREÇO	
PRODUTOS BIOLÓGICOS	
RESPONDENTE	
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	

2. QUESTÕES

As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento) (continuação dos dados após triagem prévia)
2.6. Já houve a verificação na literatura de algum método alternativo ao uso de animais para este teste? () SIM () NÃO
2.6.1 Caso sim, por qual motivo não houve a implantação do teste alternativo? Quais as dificuldades apontadas?
2.6.2 Caso não, houve algum protótipo de desenvolvimento de um novo método alternativo?
2.7. Neste teste, há aplicação de análise de não aleatoriedade dos resultados? (É realizado uso de gráficos de controle, tendência, análise de dados? Ou há algum procedimento operacional de gráficos de controle da qualidade* para reduzir o número de testes?)
2.8. De alguma forma o uso da análise de tendência contribui na aplicação da Regra dos 3R's? A implementação de um <i>software</i> contribuiria para esta análise? Atualmente, de qual forma é realizado o gráfico de controle?
2.9. De forma geral, há alguma questão para que a substituição não tenha sido levantada e/ou realizada?
2.10. Há algum método alternativo que substitua, refine ou reduza o uso de animais em desenvolvimento neste laboratório que apresente dificuldade para ser validado? Quais são as dificuldades?

3. OBSERVAÇÕES

* Gráficos de controle da qualidade: são gráficos para examinar se o processo está ou não sob controle. Sintetiza um amplo conjunto de dados, usando métodos estatísticos para observar as mudanças dentro do processo, baseado em dados de amostragem. Pode nos informar em determinado tempo como o processo está se comportando, se ele está dentro dos limites preestabelecidos, sinalizando assim a necessidade de procurar a causa da variação, mas não nos mostrando como eliminá-la.

APÊNDICE D. OFÍCIO 1183/2016

Rio de Janeiro, xx de yyyyyyy de 2016.

Ao Senhor (a)

Endereço:

E-mail:

Assunto: Pesquisa sobre o uso de métodos alternativos - entrevista

Prezado (a) Senhor (a),

1. Em primeiro lugar, informamos que o Laboratório XXXX participou de nossa pesquisa intitulada de “Mapeamento de métodos alternativos ao uso de animais no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos biológicos”. No primeiro passo, contamos com o colaborador Sr (a). YYYY (cargo) que nos respondeu um questionário de triagem sobre o uso de animais por XXXX. Como laboratórios centrais da Rede Nacional de Métodos Alternativos, RENAMA, estamos levantando as oportunidades de desenvolvimento e/ou de implementação de métodos alternativos para análise de produtos imunobiológicos. Neste sentido, ratificamos que a participação de XXXX é um diferencial em nosso levantamento.
2. E, com a finalidade de continuarmos o processo de identificação dos testes que fazem uso de animais no desenvolvimento e controle de qualidade destes produtos, verificando, dentre eles, quais poderiam ser substituídos por métodos alternativos validados e ainda, identificar métodos alternativos, que não tenham sido validados ou que apresentem dificuldade no processo de validação, pretendemos avançar a pesquisa para a etapa de visitação aos Laboratórios Públicos Oficiais, que aceitaram participar deste levantamento, com o objetivo de aprofundar o entendimento do tema.
3. A coleta de informações desta etapa da pesquisa será através de uma entrevista, a qual terá os questionamentos, segundo anexo deste ofício, a serem respondidos por

responsáveis por Laboratórios Públicos Oficiais, que fazem uso de animais em seus experimentos. Com sua colaboração, iremos compilar os dados já obtidos pelo preenchimento do questionário, juntamente a esta entrevista com você, colaboradora de XXXX alinhada às políticas de associação a RENAMA, que nos responderá sobre a aplicação de métodos alternativos, juntamente ao Sr (a). YYYYY, participante da fase inicial.

4. A compilação destes dados permitirá a edição de um documento a ser submetido a regulamentadores e governo, visando contribuir com a decisão informada de gestores públicos no que se referem a futuros investimentos em métodos alternativos.
5. Esta proposta alinha-se com a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais (RENAMA), que estimula a implantação, desenvolvimento e validação de métodos alternativos. A proposta também está em consonância com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que monitora e avalia a introdução de técnicas alternativas, e também com o panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3R's (Refinamento, Redução ou Substituição).
6. Portanto, tendo em vista a relevância de XXXX no cenário nacional e internacional, a convidamos a participar de mais esta etapa do estudo, junto ao colaborador participante da fase inicial, para nos receber e nos conceder esta entrevista.
7. Entraremos em contato, assim que constar o recebimento deste ofício, para alinharmos uma data favorável a XXXX para nos receber.
8. Informamos que o caráter ético desta pesquisa assegura a preservação da identidade dos participantes e dos dados fornecidos.
9. Agradecemos a sua compreensão e a colaboração no processo de desenvolvimento da pesquisa científica nesta Instituição, que visa à melhoria em conjunto da aplicação dos princípios dos 3R's nos *Laboratórios Farmacêuticos Oficiais* do Brasil.
10. Em caso de dúvida você pode procurar a Vice Diretora de Ensino e Pesquisa do INCQS, pelo e-mail: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br. Ou Rafaela Gon (e-mail: rafaela.gon@bio.fiocruz.br; telefone: (21) 3882 70052 / (21) 996574554).

Atenciosamente,



RAFAELA KÜSTER GON
Aluna / Pesquisadora
Pós-Graduação em VISA / INCQS



ISABELLA DELGADO
Vice-Diretora de Ensino e Pesquisa
INCQS / FIOCRUZ



JOSÉ MAURO GRANJEIRO
Pesquisador Sênior
INMETRO

APÊNDICE E. QUESTIONÁRIOS PREENCHIDOS PELOS LABORATÓRIOS PÚBLICOS OFICIAIS (LPOs)

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM - Bio-Manguinhos

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS / BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ
ENDEREÇO	Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ
PORTFÓLIO	Vacinas: DTP e Hib <i>Haemophilus influenzae</i> B Meningite A e C Pneumocócica Febre amarela Poliomielite inativada Poliomielite Oral Rotavirus humano Tetra valente viral Tríplice viral
RESPONDENTE	ALESSANDRA SANTOS ALMEIDA - RODRIGO MÜLLER
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	Chefe da Seção de Controle Biológico - Chefe do Laboratório de Experimentação Animal

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
DTP e Hib; <u>Haemophilus influenzae B</u> ; Meningite A e C; Tríplice viral
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?
Na seção de Controle biológico, os animais são utilizados para controle de qualidade.
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?
Teste de controle de qualidade das vacinas mencionadas (teste de pirogenia in vivo; teste de toxicidade inespecífica e toxicidade específica)
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)
Teste de Pirogenia in vivo- 3 a 5 coelhos por lote testado; Teste de Toxicidade Inespecífica – 5 camundongos e 2 cobaias por lote testado; teste de toxicidade específica – 40 camundongos por lote testado.
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste). Caso não haja a informação discriminada por teste, favor disponibilizar o dado disponível (valor geral por uso se animais por anos, por exemplo).
2.7 Para cada teste (rotina ou desenvolvimento), para qual setor é destinado e qual a pessoa responsável pelo setor?
Para o próprio setor
2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais? Caso positivo, quais?
Sim, dificuldade de aquisição de animais com status sanitário desejável.

--

3. OBSERVAÇÕES

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM - IVB

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	Instituto Vital Brazil
ENDEREÇO	Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil- CEP: 24230-410- Niterói- RJ
PRODUTOS BIOLÓGICOS	Soros hiperimunes

RESPONDENTE	Bárbara Carino Guimarães
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	Veterinária responsável pelo Departamento de Controle Biológico -Biologia

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
Soros Hiperimunes.
2.2 Uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?
Controle de Qualidade / Produção.
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?
Teste de Potência, Toxicidade Inespecífica, Dose Letal 50%, Pirogênio e Tubo Prova.
2.4 Quantos animais são utilizados nestes testes? (Citar individualmente para cada teste)
Teste de Potência de soros hiperimunes anti-peçonhentos utiliza 50 camundongos de 18-22g.
Potência de soro hiperimune antitetânico utiliza 100 camundongos de 17-22g.
Potência de soro hiperimune antirrábico utiliza 120 camundongos de 10-15g.
Toxicidade Inespecífica utiliza 10 camundongos de 17-22g e 04 cobaias de 250-350g. (Somente em soros em Estabilidade)
Dose Letal 50% utiliza 40 camundongos de 18-22g.
Tubo Prova utiliza 06 camundongos de 18-22g por cavalo a ser analisado.
Pirogênio utiliza 03 coelhos albinos acima de 1500g.
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto)
Estimativa na unidade dos animais:
Camundongo → R\$ 8,80
Cobaia → R\$ 45,00
Coelho → R\$ 40,00
Teste de Potência anti-peçonhentos → R\$ 440,00.
Potência soro hiperimune antitetânico → R\$ 880,00.

Potência soro hiperimune antirrábico → R\$ 1.056,00.
Toxicidade Inespecífica → R\$ 268,00.
Dose Letal 50% → R\$ 352,00.
Tubo Prova → R\$ 52,80.
Pirogênio → R\$ 120,00.
2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou a manuseio dos animais?
Não, pois o Instituto possui Biotério próprio.

3. OBSERVAÇÕES

O teste de Toxicidade Inespecífica somente está sendo realizado nos soros hiperimunes que estão em Estabilidade ou no caso de um novo produto, não sendo mais um teste obrigatório para liberação de um soro hiperimune, desde 07 de março de 2016.
Todos os testes estão em conformidade com as especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume 2 e foram submetidas a avaliações do CEUA do IVB.
O IVB está desenvolvendo a metodologia do RFFIT para futura substituição do teste de Potência por soroneutralização do soro antirrábico mas no momento nos encontramos com dificuldades de investimentos para aquisição de alguns equipamentos essenciais para a implantação dessa técnica.
Cavalos são imunizados para obtenção do plasma (anticorpos).

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM - FUNED

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	Fundação Ezequiel Dias – FUNED
ENDEREÇO	Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gameleira – Belo Horizonte/MG

PRODUTOS BIOLÓGICOS	Soro antirrábico, Soro antitetânico, Soro antiescorpiônico, Soro anticrotálico, Soro antielapídico, Soro antibotrópico, Soro antilaquético. Soro antibotrópico-laquético, soro antibotrópico-crotálico.
RESPONDENTE	Amanda Soriano Araújo Barezani
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	Coordenação do Serviço de Controle Biológico, Cargo Analista em Saúde e Tecnologia - Biólogo

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).			
Soro antirrábico, Soro antitetânico, Soro antiescorpiônico, Soro anticrotálico, Soro antielapídico, Soro antibotrópico, Soro antilaquético. Soro antibotrópico-laquético, soro antibotrópico-crotálico. Também entrará para o portfólio, a Vacina Meningocócica C (previsão para execução de testes biológicos com uso de animais: a partir de 2020).			
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?			
Ambos.			
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)			
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?			
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA PARA SOROS ANTITETÂNICOS	90 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	270 camundongos Swiss/amostra
DETERMINAÇÃO DO LIMITE MORTE DE TOXINA TETÂNICA	50 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	150 camundongos Swiss /amostra
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA PARA SOROS ANTIPEÇONHENTOS	45 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	135 camundongos Swiss /amostra
DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL50) DE VENENOS DE ANIMAIS PEÇONHENTOS	50 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	150 camundongos Swiss /amostra
TESTE DE PIROGÊNIO "IN VIVO" PARA SOROS HIPERIMUNES	3 coelhos Nova Zelândia /teste	1 teste/amostra + 5 coelhos se necessário reteste	3 a 8 coelhos/ amostra
CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE SOROS INDIVIDUAIS DE EQUÍDEOS	5 camundongos Swiss/teste	Cada amostra só é testada uma vez	5 camundongos Swiss /amostra
TITULAÇÃO IN VIVO DE VÍRUS RÁBICO TRABALHO	50 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	150 camundongos Swiss /amostra
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE SOROS ANTIRRÁBICOS	140 camundongos Swiss/teste	3 repetições/amostra	420 camundongos Swiss /amostra
DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CROTAMINA EM VENENOS CROTÁLICOS	3 camundongos Swiss/teste	Cada amostra só é testada uma vez	3 camundongos Swiss /amostra
PESQUISA DE VIRUS RÁBICO INFECTIVO RESIDUAL APÓS INATIVAÇÃO.	10 camundongos Swiss/teste	Cada amostra só é testada uma vez	10 camundongos Swiss /amostra
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)			
Supracitado			
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto)			
O custo de cada camundongo é de R\$15,00 (custo total) e custo de cada coelho é de R\$45,00 (só o animal, sem adicionar custos com alimentação, acondicionamento e promoção da saúde).			

<p>Para produzir um lote* de Soro Antitetânico são utilizados, em média, 1305 camundongos e 6 coelhos. Custo de R\$19.845,00.</p>	CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE SOROS INDIVIDUAIS DE EQUÍDEOS	5 camundongos Swiss X 15 amostras de plasma equino (em média)	75 camundongos
	DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA PARA SOROS ANTITETÂNICOS	270 camundongos SwissX 4 amostras (4 produtos intermediárias, denominados PPD 1, PPD 2, SCG e SPAG)	1080 camundongos
	DETERMINAÇÃO DO LIMITE MORTE DE TOXINA TETÂNICA	150 camundongos SwissX 1 amostra de Toxina	150 camundongos
	TESTE DE PIROGÊNIO "IN VIVO" PARA SOROS HIPERIMUNES	3-8 coelhos X2 amostras (1 SPAG e 1 PF, produto final)	De 6 a 16 coelhos
<p>Para produzir um lote de Soro Antipeçonhento** são utilizados, em média, 765 camundongos e 6 coelhos. Custo de R\$11.745,00.</p>	CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE SOROS INDIVIDUAIS DE EQUÍDEOS	5 camundongos Swiss X 15 amostras de plasma equino (em média)	75 camundongos
	DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA PARA SOROS ANTIPEÇONHENTOS	135 camundongos SwissX 4 amostras (4 produtos intermediárias, denominados PPD 1, PPD 2, SCG e SPAG)	540 camundongos
	DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL50) DE VENENOS DE ANIMAIS PEÇONHENTOS	150 camundongos Swiss X 1 amostra de Veneno	150 camundongos
	TESTE DE PIROGÊNIO "IN VIVO" PARA SOROS HIPERIMUNES	3-8 coelhosX 2 amostras (1 SPAG e 1 PF, produto final)	De 6 a 16 coelhos
<p>Para produzir um lote de Soro Antirrábico são utilizados, em média, 1905 camundongos e 6 coelhos. Custo de R\$28.845,00.</p>	TITULAÇÃO IN VIVO DE VÍRUS RÁBICO TRABALHO	150 camundongos SwissX 1 amostra de vírus	150 camundongos
	DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE SOROS ANTIRRÁBICOS	420 camundongos Swiss X 4 amostras (4 produtos intermediárias, denominados PPD 1, PPD 2, SCG e SPAG)	1680 camundongos
	TESTE DE PIROGÊNIO "IN VIVO" PARA SOROS HIPERIMUNES	3-8 coelhos X 2 amostras (1 SPAG e 1 PF, produto final)	De 6 a 16 coelhos
	CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DE SOROS INDIVIDUAIS DE EQUÍDEOS	5 camundongos SwissX 15 amostras de plasma equino (em média)	75 camundongos
<p>Para padronizar o veneno crotálico utilizado na imunização dos equinos produtores de soro Anticrotálico</p>	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE CROTAMINA EM VENENOS CROTÁLICOS	3 camundongos SwissX amostra	Depende do número de serpentes a serem avaliadas
<p>Para preparar o antígeno rábico utilizado na imunização dos equinos produtores de soro Antirrábico</p>	PESQUISA DE VIRUS RÁBICO INFECTIVO RESIDUAL APÓS INATIVAÇÃO.	10 camundongos Swiss /amostra	Depende do número de partidas virais a serem avaliadas

2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais?

Não há dificuldade em se adquirir camundongos, pois a própria FUNED os produz. Quanto aos coelhos, a dificuldade é a qualificação e disponibilidade de fornecedores.

3. OBSERVAÇÕES

**São soros antipeçonhentos: Soro antiescorpiônico, Soro anticrotálico, Soro antielapídico, Soro antibotrópico, Soro antilaquético. Soro antibotrópico-laquético, soro antibotrópico-crotálico

*Para cada lote de soro hiperimune produzido são amostrados 4 produtos intermediários: PPD1 (Pool de plasma diluído 1ª torta), PPD2 (Pool de plasma diluído 2ª torta), SCG (soro concentrado a granel) e SPAG (soro padronizado a granel) e um PF (produto final).

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM - BUTANTAN

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA

Instituto Butantan

ENDEREÇO	Avenida Vital Brasil, 1500 – São Paulo – SP – CEP 05579-010
PRODUTOS BIOLÓGICOS	Vacinas DT, dT, DTP, hepatite B (recombinante), Influenza sazonal trivalente (fragmentada e inativada), vacina raiva inativada e 13 tipos de soros hiperimunes (antiaracnídico, antibotrópico, antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquéutico, antibotulínico AB, antibotulínico E, anticrotálico, antidiftérico, antielapídico, antiescorpiônico, antilonômico, antirrábico e antitetânico).
RESPONDENTE	Patrícia dos Santos Carneiro
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	Responsável pelo Controle Biológico e Gerente de Desenvolvimento Analítico

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
Todos.
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?
Sim, tanto na rotina quanto no desenvolvimento.
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?
- vacina DT e dT: inocuidade; atividade imunogênica da fração diftérica e tetânica;
- vacina DTP: inocuidade, toxicidade específica para Pertussis, atividade imunogênica da fração diftérica, tetânica e pertussis;
- vacina Influenza sazonal trivalente: inocuidade;
- vacina Hepatite B: inocuidade e imunogenicidade;
- vacina raiva: prova de inativação viral, pesquisa de agentes adventícios, potência, inocuidade, pirogênio;
- soros hiperimunes (13 tipos): potência e pirogênio;
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)
- vacina DT e dT: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias/lote); atividade imunogênica da fração diftérica (38 cobaias/lote) e tetânica (6 cobaias + 100 camundongos/lote);
- vacina DTP: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias/lote), toxicidade específica para Pertussis (20 camundongos/lote), atividade imunogênica da fração diftérica (38 cobaias/lote), tetânica (6 cobaias + 100 camundongos/lote) e pertussis (170 camundongos/lote);
- vacina Influenza sazonal trivalente: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias/lote);
- vacina Hepatite B: inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias/lote) e imunogenicidade (40 camundongos/lote);
- vacina raiva: prova de inativação viral (20 camundongos adultos + 20 camundongos lactentes/lote), potência (144 camundongos/lote), inocuidade (6 camundongos + 3 cobaias/lote), pirogênio (3 coelhos/lote);
- soros hiperimunes (13 tipos): potência (50 camundongos/fração de soro/lote: soro antibotrópico pentavalente, soro anticrotálico, soro antibotrópico-crotálico, soro antibotrópico-laquéutico, soro antielapídico, soro antilaquéutico, soro antiescorpiônico; soro antitetânico: 110 camundongos/lote; soro antidiftérico: 44 cobaias/lote; soro antiaracnídico: 12 cobaias + 3 coelhos/lote;

soro antituberculínico: 100 camundongos/lote; soro antilonômico: 55 camundongos/lote; soro antiloxoscélico: 3 coelhos/lote) e pirogênio (3 coelhos/lote);
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto)
O custo desses animais não foi até então avaliado pois todos (camundongos, cobaias e coelhos) são produzidos e fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan a todos os laboratório de pesquisa e da área produtiva (controle de qualidade)
2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais?
Não

3. OBSERVAÇÕES

OBS. 1: testes realizados no produto a granel/terminado.
OBS. 2: Número de animais/lote, sem considerar análises em processo, estudos de estabilidade, aferições de referências e qualificações de analistas.
OBS. 3: Todos os testes aqui mencionados constam em compêndio oficial "Farmacopéia Brasileira"

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM - FAP

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME DA EMPRESA	Fundação Ataulpho de Paiva
ENDEREÇO	Av. Pedro II, 260 – São Cristóvão – Rio de Janeiro

PRODUTOS BIOLÓGICOS	Vacina BCG – ID e Imuno BCG
RESPONDENTE	Marcelo Mendonça de Oliveira
PERFIL DO RESPONDENTE (CARGO, ÁREA DE OCUPAÇÃO, ETC)	Coordenador do Biotério

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
Vacina BCG – ID e Imuno BCG
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos?
Somente no Controle de Qualidade
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais?
Reatividade Cutânea, Ausência de Virulência e Sensibilidade Cutânea
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)
Reatividade Cutânea – 4 Cobaios, Ausência de Virulência e sensibilidade Cutânea – 6 Cobaios (os mesmos)
Total 10 Cobaios por Lote testado
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto)
POR MÊS (30 Lotes) - Cobaios + Maravalha + Ração = R\$ 23 005,00 + Custos salariais dos funcionários, Eletricidade e Água, Materiais descartáveis.
2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais?
Raramente, pois temos um fornecedor fixo.

3.OBSERVAÇÕES

QUESTIONÁRIO DE TRIAGEM CBPI

2. QUESTÕES

2.1 Dos produtos listados no portfólio, quais necessitam do uso de animais? (Com perspectiva dos próximos 5 anos).
Soro Antiloxoscélcio e Soro Antibotrópico.
2.2 O uso dos animais é aplicado em testes de rotina (controle de qualidade e /ou produção), para desenvolvimento ou ambos? O uso de animais é aplicado em testes de rotina de controle de qualidade dos produtos, na produção dos soros e para desenvolvimento.
As questões abaixo devem ser aplicadas para cada teste que envolva o uso de animais (para rotina ou desenvolvimento)
2.3 Quais são os testes que fazem uso de animais? Teste de determinação da potência de soro antiloxoscélcio, teste de determinação da dose mínima necrosante (DMN) para veneno loxoscélcio, teste de pirogênio in vivo, teste de determinação da DL50 para veneno botrópico, teste de determinação da potência para soro antibotrópico e teste de inocuidade (toxicidade inespecífica).
2.4 Quais e quantos animais são utilizados neste teste? (Citar individualmente para cada teste)
- Teste de determinação da potência de soro antiloxoscélcio: usam-se quatro coelhos para cada dose. Considerando que para cada amostra são testadas três doses, são necessários doze coelhos por amostra. Podem ser necessárias repetições.
- Teste de determinação da dose mínima necrosante (DMN) para veneno loxoscélcio: usam-se três coelhos por dose. Considerando que para cada amostra são testadas três doses, são necessários nove coelhos por amostra. Podem ser necessárias repetições.
- Teste de pirogênio in vivo: usam-se de três a oito coelhos por amostra.
- Teste de determinação da DL50 para veneno botrópico: usam-se dez camundongos por dose. Considerando que para cada amostra são testadas cinco doses, são necessários cinquenta camundongos por amostra. Podem ser necessárias repetições.
- Teste de determinação da potência para soro antibotrópico na fase de soros individuais de equinos: usam-se cinco camundongos por amostra. Para cada teste são usados cinco camundongos para controle positivo. Podem ser necessárias repetições.
- Teste de determinação da potência para soro antibotrópico em fase de processo: usam-se oito camundongos por dose. Considerando que para cada amostra são testadas cinco doses, são necessários quarenta camundongos por amostra. Para cada teste são utilizados oito camundongos para controle positivo. Podem ser necessárias repetições.
- Teste de inocuidade (toxicidade inespecífica): usam-se dez camundongos e quatro cobaias por amostra. Podem ser necessárias repetições.
- O uso de animais em produção se refere ao emprego de cavalos para produção de anticorpos anti-veneno. - O uso de animais em desenvolvimento se refere ao emprego de coelhos na produção de anticorpos policlonais, em que se usam quatro animais por amostra, ou estudos de dose mínima necrosante (DMN) para veneno loxoscélcio, em que se usam três coelhos por dose.
2.5 No geral, qual o custo associado ao uso destes animais? (Citar individualmente para cada teste e associar o teste ao produto) Neste momento, não podemos fornecer essa informação, pois não dispomos de um sistema de determinação de custos envolvidos na realização de testes. Estamos na fase de aquisição do sistema ERP (ENTERPRISE RESOURCE PLANNING), o qual nos permitirá a obtenção dos valores associados a um processo ou produto.

2.6 Há dificuldade relacionada à aquisição ou ao manuseio dos animais?

Sim. Quanto a aquisição, essas dificuldades se referem a localização de fornecedores, transporte dos animais a longa distâncias, animais em quantidade suficiente e adequação dos fornecedores às condições de pagamento utilizadas pelos órgãos públicos. Quanto ao manuseio, as maiores dificuldades são encontradas com o uso de coelhos. Esses animais possuem porte maior comparado àquele de camundongos e dessa forma, é necessário um funcionário apenas para a contenção dos animais em teste. A estrutura e serviços envolvidos da manutenção de coelhos, como por exemplo, espaço, gaiolas, procedimentos de higienização de materiais e procedimentos de descarte, assumem proporções maiores quando comparado a estrutura e serviços envolvidos da manutenção de animais menores.

3. OBSERVAÇÕES

APÊNDICE F. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu....., CPF....., declaro, por meio deste termo, que concordei em participar da pesquisa referente ao projeto intitulado “Mapeamento de métodos alternativos ao uso de animais no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos biológicos”, desenvolvido por Rafaela Küster Gon.

Declaro saber que a pesquisa consta de duas etapas, um questionário de triagem, recebido e respondido através de e-mail e por uma entrevista presencial, que será gravada em áudio. Minha colaboração se fará por meio do preenchimento do questionário e pela concessão de entrevista a ser gravada por mídia eletrônica, a partir da assinatura desta autorização. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pela pesquisadora e/ou seus orientadores. Os questionários preenchidos e as gravações de voz serão salvos por meio eletrônico (sob senha de acesso), identificados e ficarão sob a propriedade da pesquisadora pertinente ao estudo e sob a guarda da mesma. As informações somente serão utilizadas para coleta de dados.

Estou ciente dos riscos inerentes a esta pesquisa, que são da perda de confidencialidade dos dados obtidos pelo questionário e/ou pela entrevista, além dos procedimentos utilizados pelos responsáveis pela pesquisa, acima descritos, para que tal risco seja potencialmente nulo. Estou ciente também dos benefícios desta pesquisa, sobre a sistematização de dados a respeito do tema, subsidiando políticas públicas, como por exemplo, aquelas apoiadas pelo MCTIC, com informações relevantes para que haja priorização de ações e maior chance de sucesso na aplicação da regra dos 3R's na área de produção e controle da qualidade de produtos biológicos, principalmente para os laboratórios públicos oficiais.

Fui informado (a), ainda, de que a pesquisa é orientada pela Dra. Isabella Delgado, a quem poderei contatar / consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone nº 21 3882 70052 ou pelo e-mail isabella.delgado@incqs.fiocruz.br. Ou consultar a pesquisadora: Rafaela Gon (e-mail: rafaella.gon@bio.fiocruz.br; telefones: 21 3882 7052).

Rio de Janeiro, XX de YYYYYY de ZZZZ.

Assinatura do (a) participante: _____
Assinatura da pesquisadora: _____