

JOÃO CARLOS BORGES ROLIM DE FREITAS

**A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE
PIROGÊNIO COM SOROS HIPERIMUNES SUJEITOS À
VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

MESTRADO PROFISIONAL

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2008

A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE
PIROGÊNIO COM SOROS HIPERIMUNES SUJEITOS À
VIGILÂNCIA SANITÁRIA

JOÃO CARLOS BORGES ROLIM DE FREITAS

Mestrado Profissional

Programa do Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro
2008

A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE PIROGÊNIO COM SOROS HIPERIMUNES SUJEITOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA

João Carlos Borges Rolim de Freitas

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

Aprovado

Prof^a. Dra Helena Pereira da Silva Zamith

Prof^a. Dra Ana Luiza Palhares de Miranda

Prof^a. Dra Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Orientadora: Dra Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro
2008

Freitas, João Carlos B.R. de
A reutilização de coelhos submetido ao Teste de Pirogênio com
soros hiperimunes sujeito à Vigilância Sanitária/ João Carlos
Borges Rolim de Freitas. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008.
xviii,60 p., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Fundação Oswaldo Cruz,
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa
de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.
Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

1.Pirogênio. 2. Teste de Pirogênio “*in vivo*”. 3. Reutilização de
coelhos.

The reuse of rabbits subjected to the Test Pirogeny with organic
products subject to the Health Surveillance.

O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.

A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes

Cora Coralina

*Aos meus filhos, Clarice, Mariana e João
e minha netinha Brenda*

Homenagem especial
Aos amigos Sonia Regina, Nilo Duarte Dória e Héctor Tomás Araldi
in memoriam

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado os meus passos e dado força nos momentos de incerteza, mostrando-me o caminho que deveria seguir.

Aos meus pais pela educação e o exemplo que me deram.

As minhas irmãs Anna Neide, Nilze e Isabel que se sacrificaram para que eu pudesse me formar em Farmácia

A minha irmã Neide, com muitas saudades, mas creio que deve estar muito contente onde estiver.

As minhas filhas Clarice e Mariana e meu filho João Carlos pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Nuno Álvares Pereira, meu grande mestre, que me iniciou na Farmacologia e a quem devo os meus conhecimentos.

A Dra. Adela Rosenkranz, consultora da OPAS, que me orientou no começo do INCQS.

A Dra. Isabella Delgado, minha orientadora pelo o incentivo e apoio nesta tese.

Ao companheiro Antônio Luiz Rocha Cavalcante que ao meu lado começamos os primeiros Ensaio de Pirogênio.

Ao meu amigo Octávio Augusto F. Presgrave, por ter sempre acreditado em mim e pela inestimável ajuda na elaboração dessa tese.

A Cristiane Caldeira da Silva, minha amiga e meu anjinho da guarda, pela paciência e incentivo e grande ajuda nesta tese.

As amigas Rosaura de Farias Presgrave, Eloisa Nunes Alves pelo apoio e incentivo.

Aos colegas, Saulo de Tasso Borges Nogueira, Adigerson Ferreira Pires da Costa por terem participado ativamente para concretização deste trabalho.

A minha netinha Brenda que com seu brilho me transmitiu alegria de viver.

Ao colega Diego da Informática pela sua ajuda nos levantamento no SGA.

Aos colegas da Biblioteca do INCQS pela atenção e ajuda quando precisei.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta dissertação.

Resumo

Todos produtos injetáveis devem estar livres de pirogênio. Existem dois métodos oficiais para a detecção da contaminação pirogênica: o teste em coelhos e o teste do Lisado do Amebócito de *Limulus* (LAL), também denominado como ensaio de endotoxina. Entretanto, o LAL tem como limitação detectar somente endotoxinas e sofrer interferências do ajuste do pH, por cátions que neutralizam as cargas negativas das endotoxinas, das altas concentrações de sais, por quelantes que capturam cátions bivalentes e etc. No caso das análises de produtos biológicos (soros hiperimunes, hemoderivados etc), não há reação, possibilitando a resposta de resultados falsos negativos. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) analisa diversos produtos injetáveis, entre eles, os soros hiperimunes (antivenenos, anti-rábico, anti-tetânico etc) que são distribuídos pelo Programa Nacional de Imunização(PNI/MS) aos postos de saúde. Pela Farmacopéia Brasileira, coelhos que tenham recebido estes produtos no teste de pirogênio não podem ser reutilizados com outros produtos biológicos. Este fato implica na utilização de um grande número de animais para estas análises. Diante deste fato, e da escassez de dados na literatura sobre a reutilização de coelhos em teste de pirogênio, este trabalho foi elaborado, utilizando um desenho experimental onde os animais foram divididos em 4 grupos que receberam desde uma única injeção de soro contaminado com a concentração de 1 ng/mL até o grupo que recebeu 3 injeções de soros negativos, em intervalos de 48 horas, e desafiados no dia 7 com o mesmo soro positivado. Os resultados mostraram que a resposta ao estímulo positivo não induziu diferença estatisticamente significativa em relação a resposta a uma única administração, independente da quantidade de amostras negativas recebidas. Desta forma, foi possível concluir que, para os soros antitetrápico, anti-rábico e antitetânico é possível reutilizar os coelhos até 4 vezes no período de uma semana.

Abstract

Injectable products must to be free of any kind of pyrogenic contamination. Two methods are the official ones for testing this contamination: the Rabbit Test and the Limulus Amoebocyte Lysate Test (LAL) or so called, Endotoxin Assay. However, LAL is limited only for detecting endotoxin, besides suffering some kind of interferences, it is not possible to test biological products, such as hyperimmune sera, blood derivates etc), since these products produce false-negative results. The National Institute of Quality Control in Health (INCQS) perform analysis of a great variety of injectable products, among them, we find anti-venom, anti-rabies and anti-tetanus sera. The Brazilian Pharmacopoeia states that rabbit which have received previous injection of a biological products is not allowed to be re-used in another assay for the same kind of product. This fact implies on using a great number of animals. Due to the lack of information in the scientific literature about the re-use of rabbits which have received previous injection of hyperimmune sera, this study was elaborated using an experimental design where animals were divided into four groups that received from a single injection of 1ng/mL spiked sera up to a group that received 3 negative sera injections in a 48 hours interval and challenged on day 7 with spiked serum. Results showed that the response to the positive stimulus did not presented significant statistical difference, independently of the amount of negative sera previously injected. So, it was possible to conclude that for *Anti-Bothrops*, *Anti-rabies* and *Anti-tetanus* sera it is possible to reuse rabbits for 4 times within a 7-day period.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório (Fundação Oswaldo Cruz)
CGPNI	Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
CONASS	Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde
CONASSEMS	Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde
COX	Ciclo-oxigenase
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
d.C.	depois de Cristo
DST	Doenças Sexuais Transmissíveis
ECVAM	<i>European Commmittee for Validation of Alternative Methods.</i>
e.g.	Por exemplo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACENS	Laboratório Centrais de Saúde
LAL	Lisado de Amebócitos de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunização
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PVC	Policloreto de vinila
SAA	Soro anti-aracnídico
SAB	Soro anti-botrópico
SABC	Soro anti-botrópico-crotálico
SABL	Soro antibotrópico-laquétrico
SABo	Soro anti-botulínico

SAC	Soro anti-crotálico
SAD	Soro anti-diftérico
SAEI	Soro anti-elapídico
SAEs	Soro anti-escorpiônico
SALox	Soro anti-loxoscélico
SAL	Soro anti-laquélico
SALon	Soro anti-lonômico
SAR	Soro anti-rábico
SAT	Soro anti-tetânico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIH-SUS	Sistema Informação Hospitalar – Sistema Unificado de Saúde
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T _c	Temperatura controle
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
UE	Unidades de Endotoxinas
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopoeia</i>)
VISA	Vigilância Sanitária
VIT	Variação Individual de Temperatura

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da seqüência de eventos que envolvem a ação de Vigilância Sanitária com a participação do Laboratório Oficial.(Adaptado da Fundação Oswaldo Cruz, 1998)	04
FIGURA 2 – Mecanismo de febre (Adaptado de ENDRES <i>et al</i> , 1987 e DINARELLO <i>et al</i> , 1988)	13
FIGURA 3 – (a) <i>Limulus polyphenus</i> (Caranguejo –Ferradura) e (b) Extração da hemolinfa do caranguejo	15
FIGURA 4 – Casos de intoxicação com animais peçonhentos no Brasil no período de 2001 a 2005	19
FIGURA 5 – Distribuição dos soros hiperimunes analisados no Setor de Pirogênio no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2007	20
FIGURA 6 – Seqüência de fotos do Teste de Pirogênio “ <i>in vivo</i> ”.	25
FIGURA 7 – Esquema do procedimento do Teste do sangue Total.	31
FIGURA 8 – Esquema de diluição da curva-padrão de IL-1 β .	31
FIGURA 9 – Esquema de diluição da curva-padrão de IL-6.	32
FIGURA 10 – Procedimento para dosagem de IL-1 β .	33
FIGURA 11 – Procedimento para dosagem de IL-6.	34
FIGURA 12 – Curva dose-resposta nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 ng/mL/kg de LPS de E.coli em coelhos .	37
FIGURA 13 – Liberação de IL-1 β em sangue total humano criopreservado.	38
FIGURA 14 – Liberação de IL-6 em sangue total humano criopreservado.	39
FIGURA 15 – Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo. Experimento 1 (n=3).	40
FIGURA 16 – Demonstração do efeito da administração repetida de Soro Antibotrópico negativo, seguida de SAB contaminado com 1 ng/mL.	41

FIGURA 17 – Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo. Experimento 2 (n=3)	42
FIGURA 18 – <i>Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB</i> negativo e positivo Experimento 3 (n=5).	42
FIGURA 19 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo. Média dos 3 experimentos (n=11).	43
FIGURA 20 – Administração de SAB contaminado com 1 ng/mL demonstrando que não ocorre elevação de resposta quando da segunda aplicação de SAB (média de n=2).	44
FIGURA 21 – Comparação das variações individuais de temperatura, apresentando os resultados obtidos de animais que receberam SAB positivado somente no dia 1, SAB positivado no dia 3 ou no dia 5, tendo recebido previamente SAB negativo e SAB positivado no dia 5, tendo recebido SAB negativo somente no dia 1.	44
FIGURA 22 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAR negativo e positivo (n=6).	45
FIGURA 23 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAT negativo e positivo (n=6).	46
Figura 24 – Resultados de levantamento em base de dados Scirus, usando palavras-chave “Animal Testing Alternatives & Use of Laboratory Animals & Refinement/Replacement/Reduction” (Reinhardt, 2008).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos registrados de Intoxicação humana, de intoxicação animal, e de solicitação de informação por agente tóxico no Brasil no ano 2005	18
Tabela 2: Resultados do LAL cromogênico <i>end-point</i> de endotoxina de <i>E. coli</i> de referência e de soros hiperimunes	38
Tabela 3: Conclusão dos testes de pirogênio <i>in vivo</i> em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% e soro anti-botrópico.	39
Tabela 4: Custo de 1 amostra e de 5 amostras (GEMOC)	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Produtos sujeitos a Vigilância Sanitária analisados pelo Ensaio de Pirogênio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e os principais tipos de análise estabelecidos pelos Programas dos laboratórios oficiais	6
QUADRO 2 – Esquema das administrações, nos coelhos, das amostras contaminadas com 1 ng/mL de LPS de <i>Escherichia coli</i> (A+) e não contaminadas (A) nos grupos experimentais.	27
QUADRO 3 – Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão	28
QUADRO 4 – Etapas do Procedimento de análise do LAL Cromogênico	29

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Controle da Qualidade de Produtos Injetáveis	5
1.2 – O Teste de Pirogênio “in vivo”	7
1.3 – Mecanismo da Febre	10
1.5 – Métodos Alternativos	14
1.4 – Soros Hiperimunes	16
1.6 - Justificativa	20
2 - OBJETIVO	22
2.1 – Objetivo geral	22
2.2 – Objetivo específico	22
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 - Animais	23
3.2 – Amostras e Soluções	23
3.2.1 – Curva dose-resposta	23
3.2.2 – Soros Hiperimunes	24
3.3 – Teste de Pirogênio “in vivo”	24
3.3.1 – Curva dose-resposta	26
3.3.2 – Avaliação da contaminação das amostras(spike)	26
3.4 – Desenho Experimental do Estudo de Reutilização de Coelhos	26
3.5 – Ensaios complementares	28
3.5.1 – Teste de Endotoxinas	28
3.5.1.1 – Preparo da curva padrão e procedimento de analise	28
3.5.2 – Teste do Sangue Total	30
3.5.2.1 – Doadores de Sangue	30
3.5.2.2 – Procedimento do Teste do Sangue Total	30
3.5.2.3 – Dosagem de citocinas(Interleucina -1 β , Interleucina-6)	31
3.6 – Análise Estatística	35
3.7 – Avaliação da Redução de Custo do Ensaio de Pirogênio “in vivo”	35
4 - RESULTADOS	36
4.1 – 1ª Etapa:Curva Dose-Resposta	36
4.2 – 2ª Etapa:Teste de Endotoxina	37
4.3 – 3ª Etapa:Teste do Sangue Total	38
4.4 – 4ª Etapa:Teste de pirogenicidade da dose limite de LPS	39
4.5 – 5ª Etapa:Estudo sobre a reutilização de animais submetendo a administrações anteriores de soros hiperimunes	40
4.5.1 – soro anti-botrópico	40
4.5.2 – soro anti-rábico	45
4.5.3 – soro anti-tetânico	46
4.6 – Avaliação de redução de custo do Ensaio “in vivo”	46
5 - DISCUSSÃO	48
6 - CONCLUSÕES	54
7 - REFERÊNCIAS	55

1 – INTRODUÇÃO

A Lei nº 8.080/90, em seu Artigo 6º, parágrafo 1º, define Vigilância Sanitária como sendo “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990). Este conjunto de ações é desenvolvido pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), onde diversas etapas devem ser realizadas, indo desde a coleta das amostras até a ação de Vigilância propriamente dita, passando pelas análises laboratoriais (PRESGRAVE, 2003).

A Vigilância Sanitária visa à promoção, à proteção, à recuperação e à reabilitação da saúde. Para isso, ela atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambiente, transportes, cargas e pessoas. Para esta atuação tão diversificada, a Vigilância Sanitária se vale de uma multidisciplinaridade que envolve diversas áreas do conhecimento técnico-científico que inclui a química, a farmacologia, a engenharia civil, a epidemiologia, a biossegurança e a bioética, entre outras (COSTA e ROZENFELD, 2000).

Fazem parte do SNVS, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS), o Conselho Nacional de Secretários Municipais de Saúde (CONASSEMS), os Centros de Vigilância Sanitárias Estaduais, do Distrito Federal e Municipais (VISAS), os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e os Conselhos Estaduais, Distrital e Municipais de Saúde (INCQS, 2004).

A criação da ANVISA, por Medida Provisória em 1998 (MP nº 1.791-1, posteriormente transformada na Lei nº 9.782/99), impôs novos desafios ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, levando o INCQS a ter um papel mais efetivo como referência nacional (INCQS, 2004).

O Decreto nº 4.725, de 9 de junho de 2003 no seu artigo 28, parágrafo 2º define como uma das competências do INCQS o “estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde”. Além disso, tem como missão: “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária”. E como órgão público federal, de caráter técnico-pericial, assume atividades exclusivas de Estado. Atua em todo território nacional, atendendo ao SNVS e interagindo com organizações internacionais, vinculadas à qualidade de produtos ofertados à população (INCQS, 2004).

A natureza das atividades do INCQS é eminentemente de caráter técnico-científico, abrangendo as áreas de alimentos; medicamentos; soros e vacinas; saneantes domissanitários; kits, reagentes e insumos diagnósticos; cosméticos; artigo e insumo de saúde; sangue e hemoderivados; saúde ambiental; artigos e insumo para diálise. Seu trabalho busca assegurar a prevenção da ocorrência de possíveis efeitos indesejáveis à saúde humana, decorrentes da utilização de insumos, produtos ou serviços inadequados (INCQS, 2004).

Existem três diplomas legais que norteiam, até a presente data, parte das ações de Vigilância Sanitária no país, além de alguns parâmetros de identidade, juntamente com as Portarias e resoluções específicas para cada produto. Em 1976, surge a Lei 6360/77, denominada a Lei de Vigilância Sanitária que foi regulamentada através do Decreto 79094, de 05/01/77. Neste ano surge também, a Lei 6437/77 que determina as infrações sanitárias, as sanções, estabelece regras para coleta de amostras, defesa etc (COSTA e ROZENFELD, 2000).

Competem aos Laboratórios Oficiais três tipos de análises laboratoriais: **Análise Prévia**, a que é realizada antes do produto ganhar o mercado determinando se o registro será ou não concedido; **Análise de Controle**, após a colocação do produto no mercado, para verificação da conformidade do mesmo em relação aos dados apresentados por ocasião da solicitação do registro; e **Análise Fiscal**, que é

efetuada em amostras de produto, em caráter de rotina para apuração de infração ou verificação de ocorrência de desvio quanto à qualidade, segurança e eficácia dos produtos ou matéria-primas. Existe, também, a **Perícia de Contraprova** que é realizada em amostras de produtos sob o regime de Vigilância Sanitária, quando ocorrer discordância do resultado condenatório da análise fiscal (BRASIL, 1977a; BRASIL, 1977b).

Além desses tipos de análises estabelecidas pela legislação sanitária, os Laboratórios Oficiais podem realizar outros tipos de análises não previstas na legislação: **Análise de Orientação**, que é efetuada em amostras de insumos ou produtos, encaminhados por órgãos públicos responsáveis pela execução de programas nacionais e/ou regionais de saúde (e.g. análises de imunobiológicos para a Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização/Secretaria de Vigilância a Saúde (CGPNI/SVS), kit diagnósticos para o Programa de Doenças Sexualmente Transmissível (DST/Aids etc); **Análise Especial**, que é de iniciativa do laboratório oficial, efetuada em amostras de insumos ou produtos, que visa atender a programas de pesquisa e desenvolvimento de metodologias analíticas, estabelecimentos de materiais de referência etc e **Estudo Colaborativo** que é realizado em amostras ou produtos, para fins de validação interlaboratorial de metodologias analíticas e para a determinação de parâmetros em amostras ou substâncias de referências (INCQS, 2004).

Os Laboratórios Oficiais quer seja no nível federal (INCQS) ou no nível estadual (Lacens) têm um importante papel no sentido de efetuarem as análises laboratoriais que irão, de acordo com a legislação, subsidiar as ações de Vigilância Sanitária pelos órgãos competentes. Desta maneira, as amostras de produtos para análise são coletadas pelo órgão de fiscalização, enviadas ao laboratório oficial que, após as análises laboratoriais emite um boletim analítico (laudo) que servirá para as ações de Vigilância Sanitária por parte das Secretarias ou da ANVISA, conforme o esquema na Figura 1.

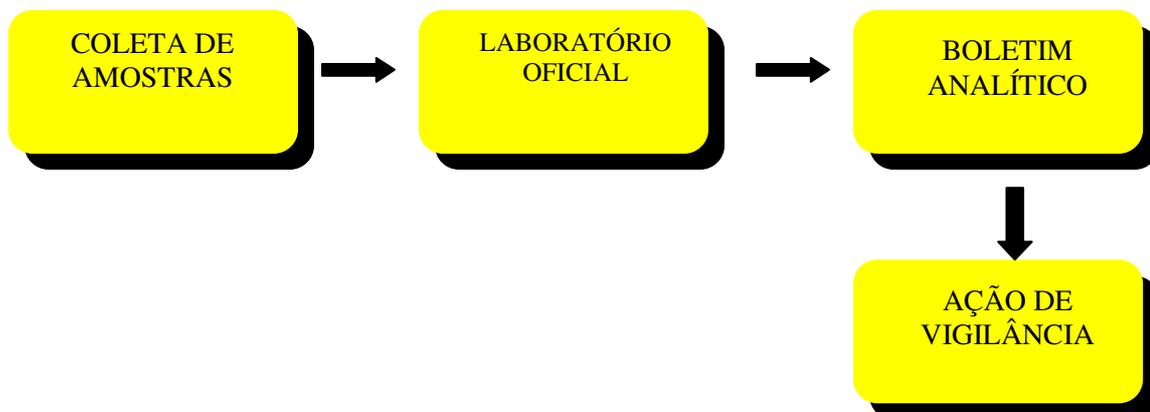


FIGURA 1 – Esquema da seqüência de eventos que envolvem a ação de Vigilância Sanitária com a participação do Laboratório Oficial (Adaptado de FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 1998).

O órgão de fiscalização (municipal, estadual ou federal) apreende e coleta a amostra de acordo com o estabelecido na legislação sanitária vigente (Lei 6.437/77, Art. 27). A amostra é encaminhada ao laboratório oficial para proceder às análises laboratoriais, conforme descritas nos compêndios, Farmacopéias, portarias ou quaisquer outros dispositivos oficiais, de acordo com a natureza do produto e com a denúncia feita; se for o caso, para a verificação do possível desvio da qualidade. O laboratório oficial emite um Boletim Analítico (laudo), que será enviado aos órgãos de Vigilância Sanitária competentes, para que estes procedam a ação adequada (INCQS, 2004).

Para que todo esse processo seja eficiente, se faz necessária uma perfeita integração entre os diversos órgãos, havendo clareza nos termos de apreensão da amostra, para que o laboratório possa adequadamente definir as análises a serem realizadas, visando ações justas, transparentes e eficazes (PRESGRAVE, 2003)

1.1 - Controle da Qualidade de Produtos Injetáveis

Todos os produtos injetáveis de uso humano, sujeitos à Vigilância Sanitária, que se encontram no mercado, devem ser livres de pirogênio (PRESGRAVE, 2003). Medicamentos e hemoderivados somente chegam para análise nos Laboratórios Oficiais através de denúncias ou de programas estabelecidos com Secretarias Municipais ou Estaduais de Saúde. No caso específico de soros e algumas vacinas, as análises são realizadas lote a lote, como parte do Programa Nacional de Imunização, requisito básico para a efetivação da compra dos mesmos pela SVS. Além destes, também sofrem análises todos os dispositivos médicos que servirão como instrumento de administração de fluídos ou soluções (Quadro 1) (INCQS, 2004).

QUADRO 1 – Produtos sujeitos à Vigilância Sanitária analisados pelo Ensaio de Pirogênio *in vivo* a *in vitro* e os principais tipos de análise estabelecidos pelos Programas dos laboratórios oficiais

PROGRAMA	PRODUTOS	Modalidade Predominante	“In vivo”	“In vitro”
MEDICAMENTOS fiscal Solução de Gelatina	Sol. Glicose a 5%	fiscal	X	X
	Sol. NaCl a 0,9%	fiscal	X	X
	Sol. Glico-fisiológica	fiscal	X	X
	Solução de diálise peritoneal	fiscal	X	X
VACINAS E SOROS HIPERIMUNES	Vacina anti-hepatite B	orientação	X	*
	Vacina anti-meningocócica AC	orientação	X	*
	Vacina anti-pneumocócica	orientação	X	*
	Soro anti-botrópico	orientação	X	*
	Soro anti-crotálico	orientação	X	*
	Soro anti-botrópico-crotálico	orientação	X	*
	Soro anti-láquético	orientação	X	*
	Soro anti-botrópico-láquético	orientação	X	*
	Soro anti-aracnídico	X	*	*
	Soro anti-eláptico	orientação	X	*
	Soro anti-diftérico	orientação	X	*
	Soro anti-escorpiônico	orientação	X	*
	Soro anti-loxoscélico	orientação	X	*
	Soro Anti-lonômico	orientação	X	*
	Soro anti-rábico	Orientação	X	*
	Soro anti-tetânico	orientação	X	*
SANGUE E HEMODERIVADOS	Albumina a 25%	orientação	X	*
	Fator VIII	orientação	X	*
	Fator IX	orientação	X	*
	Imunoglobulinas Humanas	orientação	X	*
ARTIGOS E INSUMOS DE SAÚDE	Bolsa de Sangue	fiscal/prévia	X	X
	Seringas descartáveis	fiscal	X	X
	Agulhas descartáveis	fiscal	X	X
	Cateter	fiscal	X	X
	Kit Aférese	fiscal/prévia	X	X

* LAL não aplicável

A contaminação pirogênica destes produtos pode trazer sérios riscos à saúde humana causando desde febre até a morte, passando por alterações vasculares e choque pirogênico. No caso da contaminação por endotoxinas, a sua característica termolábil pode ser um grave problema, já que o processo de esterilização

tradicional não é suficiente para evitar estas reações que são passíveis de prevenção através da observância das Boas Práticas de Fabricação e do controle da qualidade destes produtos (HARTUNG *et al*, 2001; HOFFMANN *et al*, 2005a).

1.2 – O Teste de Pirogênio “*in vivo*”

A maior parte das informações científicas sobre pirogênios e substâncias capazes de induzir febre surgiram nos últimos cinquenta anos, enquanto o estudo da febre e seus sintomas são tão antigos quanto a própria medicina, com relatos de até dois mil anos a.C. (PEARSON, 1985).

Na Grécia antiga a febre já era considerada por médicos como um agente terapêutico e não como uma patologia. Parmênides (500 a.C.) e Rhupos de Épheso (100 d.C.) compartilhavam deste conceito e acreditavam que, se a febre pudesse ser produzida artificialmente, certamente poderia curar grande parte das doenças. A noção de que a elevação de temperatura poderia estar relacionada à administração intravenosa de uma substância surgiu em 1642, com Ulahrendorf que relacionou experimentos sujeitando cães a injeções de vinho com o surgimento de reações de febre (PEARSON, 1985).

Em 1822, Gaspar publicou um trabalho verificando que infusões intravenosas de diversas substâncias, como leite de vaca fresco e urina humana, causavam uma reação febril de menor intensidade quando comparado a pequenas infusões de material putrefeito. Pannum, 1874 em seus estudos sobre o mecanismo através do qual um material putrefeito causava febre, concluiu que a substância responsável pela indução de febre era termoestável, solúvel em água e insolúvel em álcool, diferente de bactérias vivas. Poucos miligramas desta substância em injeção intravenosa eram suficientes para provocar uma elevação de temperatura (PEARSON, 1985).

Em 1862, Billbroth, foi provavelmente o primeiro pesquisador a usar o termo pirogênio (do grego *pyro* que significa fogo e *genesis* que significa criar) para designar as substâncias capazes de induzir reações febris. A partir de então, muitos autores usaram este termo em diversos trabalhos e muito foi estudado sobre este fenômeno. Foi Burdon-Sanderson o que mais escreveu sobre os mecanismos da febre, quando, em 1876, lançou a discussão indagando se a origem da resposta febril estava nos agentes exógenos ou em agentes endógenos liberados por células do hospedeiro. Estas idéias estavam muito próximas do que atualmente entendemos sobre esse mecanismo (PEARSON, 1985).

Outro evento importante foi a descoberta do sistema de classificação de Gram, pois assim, Hort e Penfold em 1912 dividiram as bactérias Gram-negativas como sendo pirogênicas e as Gram-positivas como não-pirogênicas, quando aplicadas em coelhos. Este fato mais tarde foi descaracterizado por Co Tui (1942), que demonstrou que a resposta pirogênica não estava ligada somente a um ou outro grupo, mas se tratava de uma resposta dissociada da patogenicidade dos microorganismos (PEARSON, 1985).

Em meados de 1930, Seibert completa uma série de estudos clássicos, que comprovaram que a “febre de injeção”, terminologia da época, estava associada à terapêutica intravenosa de produto bacteriano filtrado, comumente referida como pirogênio (PEARSON, 1985). Para detectar a presença ou ausência de reações febris causadas pelas suas soluções teste, Seibert selecionou o coelho como sendo o animal modelo. Desde então, várias espécies foram testadas para a resposta febril quando se injetava pirogênio bacteriano. Macacos, cavalos, cães e gatos, assim como os coelhos reproduziram uma resposta similar à do homem. Em outros animais como ratos, cobaias, camundongos, hamsters e galinhas a resposta ao pirogênio foi irregular, prejudicando a interpretação dos resultados. Por razão de conveniência e economia, a seleção final do animal modelo para pirogênio ficou com o cão e o coelho (PEARSON, 1985).

Ainda nesta década de 1930, soluções de dextrose e salina (parenterais de grande volume) foram pela primeira vez avaliadas nas indústrias quanto à presença

de pirogênio. A grande vantagem anunciada para estes produtos era a exigência no rótulo da ausência de pirogênio. A afirmação de ausência de pirogênio era resultado das análises realizadas nos lotes dos produtos acabados pelo controle da qualidade, baseado no teste em coelhos desenvolvidos por Seibert e seus colaboradores (WILLIAMS, 2001).

Em 1942, Co Tui, pesquisador de grande experiência com cães e coelhos, relatou vantagens e desvantagens de ambas as espécies na realização do ensaio de pirogênio e concluiu que o coelho era o melhor animal para o teste de ausência de pirogênio e o cão responderia melhor a presença de pirogênio. Desta forma, o coelho tornou-se o animal modelo para o ensaio de pirogênio (WILLIAMS, 2001).

Com a II Guerra Mundial surgiu uma grande demanda na terapia de parenterais de grande volume o que atraiu a necessidade de garantir um ensaio para ausência de pirogênio em preparação intravenosa no compêndio oficial da Farmacopéia Americana. Assim, em 1941, o Comitê de Revisão da USP autorizou o Subcomitê 3 em Ensaio Biológicos a iniciar o primeiro estudo colaborativo para o Ensaio de Pirogênio sob a direção de Henry Welch. Os resultados destes estudos foram publicados em 1943 (WILLIAMS, 2001).

Portanto, o primeiro método oficial para detecção de pirogênio foi incorporado à décima segunda edição da Farmacopéia Americana sendo utilizado na sua forma original até recentemente. Apenas em 2001, a Farmacopéia dos Estados Unidos (USP XXII) modificou os critérios de satisfatoriedade do teste, tornando-os mais rigorosos, considerando como febre a variação individual de temperatura igual ou superior a 0,5°C, substituindo o critério anterior de igual ou superior a 0,6°C. Em 2003, a Farmacopéia Brasileira mudou o seu critério também, no fascículo 5º da 4ª edição.

O teste de pirogênio *in vivo* fundamenta-se na medida do aumento de temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, onde se toma a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas (PEARSON, 1985; BRASIL, 2003; ESTADOS UNIDOS, 2007).

É um ensaio que pode aprovar ou rejeitar uma amostra sendo utilizado para produtos que podem ser tolerados por coelhos em doses que não excedam 10 mL/kg de peso corporal, quando administrado dentro do período não superior a 10 minutos. Para produtos que necessitem preparação preliminar ou diluições apropriadas, estas condições são estabelecidas nas monografias das farmacopéias (BRASIL 2003; ESTADOS UNIDOS, 2007; INGLATERRA, 2004). A resposta pirogênica em coelhos tem uma característica bem marcante, pois se inicia cerca de 45 minutos após a injeção intravenosa, atingindo o seu pico na faixa de 60 a 90 minutos, iniciando uma descida ao nível basal (perfil monofásico) (WILLIAMS, 2001). Cabe ressaltar que os coelhos respondem à mesma concentração limite que o homem, ou seja, 1 ng/kg, o que equivale a 5 EU/kg (HOESCHSTEIN, 1990).

No que tange a reutilização de animais, todas as farmacopéias internacionais preconizam que, quando o ensaio é considerado negativo, os animais podem ser reutilizados, respeitando interstício de 48 horas. No caso de teste positivo, deve-se obedecer a um intervalo de 14 dias para que os mesmos tornem a serem usados, para qualquer produto (ESTADO UNIDOS, 2007; INGLATERRA, 2004). A Farmacopéia Brasileira na sua última edição não recomenda a reutilização de coelhos para soros hiperimunes devido à falta de estudos anteriores, porém mantém as condições de reutilização de animais para os demais produtos (BRASIL, 2003). Isto significa que, no caso de produtos não biológicos, e. g., parenterais de grande volume, não há restrição quanto à reutilização dos animais, podendo os mesmos ser utilizados novamente em novos testes. Entretanto, quando os coelhos receberem um produto biológico, só é permitida uma única administração.

1.3 - Mecanismo da Febre

A febre é definida como sendo uma elevação da temperatura corpórea acima do normal. Entretanto, devemos diferenciá-la de hipertermia. A febre ocorre quando há uma mudança no termostato hipotalâmico, enquanto que a hipertermia é uma elevação da temperatura sem interferência do hipotálamo e ocorre quando os mecanismos periféricos de dissipação do calor estão bloqueados, tanto por razões ambientais quanto por razões fisiológicas (DINARELLO, 1988; PRESGRAVE, 2003).

Todos os processos enzimáticos são afetados pela variação de temperatura no organismo. A temperatura normal do corpo humano varia entre 35,9^o e 37,4^oC e deve-se ao resultado da diferença entre a produção e perda de calor e pode sofrer variações com exercícios e com temperaturas ambientais muito elevadas. A maior parte do calor é produzida por tecidos internos como músculos e vísceras que são isolados e protegidos do meio externo por tecidos subcutâneos, pele e tecido adiposo (DINARELLO, 1988).

As principais fontes de produção de calor do corpo são as reações de metabolismo. Neurotransmissores como epinefrina e norepinefrina agem na célula aumentando a produção de energia liberada na forma de calor. Reações involuntárias como calafrios e “bater os dentes” são desencadeadas por impulsos vindos do hipotálamo e toda a energia produzida é liberada na forma de calor (DINARELLO, 1988).

A perda de calor pelo organismo ocorre, em sua maior parte, sob a superfície da pele onde há diversas junções arterio-venosas, que quando abertas permitem que o sangue arterial passe diretamente para o sistema venoso, por onde o calor é dissipado para o meio externo (DINARELLO, 1988).

Os pirogênios podem ser divididos em dois grupos: exógenos, que têm sua origem fora do organismo e endógenos, que são produzidos pelo hospedeiro. Os pirogênios exógenos podem se originar de diversas fontes como bactérias, vírus, fungos, materiais antigênicos e alguns medicamentos. Os pirogênios endógenos são produzidos pelo organismo como resposta às infecções. São secretados por fagócitos mononucleares (neutrófilos, monócitos e macrófagos) e pertencem a uma classe de imunopeptídeo chamada citocina (BEUTLER, 2002; HOFFMANN *et al*, 2005b).

A endotoxina, principal pirogênio exógeno, também designado como lipopolissacarídeo (LPS), proveniente de bactérias Gram-negativas é responsável

pela maior parte das contaminações importantes encontradas em produtos injetáveis e também a mais estudada. É um composto termo-estável que resiste aos ciclos normais de esterilização, havendo a necessidade de se proceder a sua inativação (despirogenização) através de diferentes métodos tais como, ciclos longos em calor seco em altas temperaturas (acima de 180°C), condições altamente alcalinas ou ácidas e, em alguns casos, com o uso de polimixina B. Além da pirogenicidade, a endotoxina pode, dependendo da dose apresentada, ativar o sistema de coagulação, alterar o metabolismo de carboidratos, ativar o sistema complemento, causar agregação plaquetária, liberar aminas vaso-ativas, causar choque, entre outros efeitos (PEARSON, 1985; WILLIAM, 2001).

Os pirogênios exógenos quando entram na corrente sangüínea ativam células de defesa principalmente monócitos, que liberam mediadores inflamatórios, (IL-1 β ; IL-6; TNF- α) que, através da via de ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) levam à transformação do ácido aracdônico em prostaglandinas (PGs). A produção de prostaglandinas pode ser inibida por medicamentos da classe dos antiinflamatórios não esteroidais que interferem no processo enzimático através da inibição por ligação reversível (ou não) às enzimas ciclo-oxigenases (NETEA *et al*, 2000, LEWIS, 1986; ENDRES *et al*, 1987; DINARELLO, 1988; DINARELLO, 2004, SAPER e BREDER, 1994; COCEANI e AKARSU, 1988). Na Figura 2 podemos observar o esquema da patogênese da febre, onde os pirogênios exógenos atuam sobre macrófagos induzindo a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas). Estes mediadores atuam no hipotálamo alterando o “set-point” e desencadeando mecanismos de produção e conservação de calor, resultando na febre (ENDRES *et al*, 1987 e DINARELLO *et al*, 1988). Todo este mecanismo, associado ao aumento de cobre e redução de ferro visa à defesa do organismo contra microorganismos invasores (HAAR e MOGENSEN, 1978; de RUIJTER *et al*, 1988).

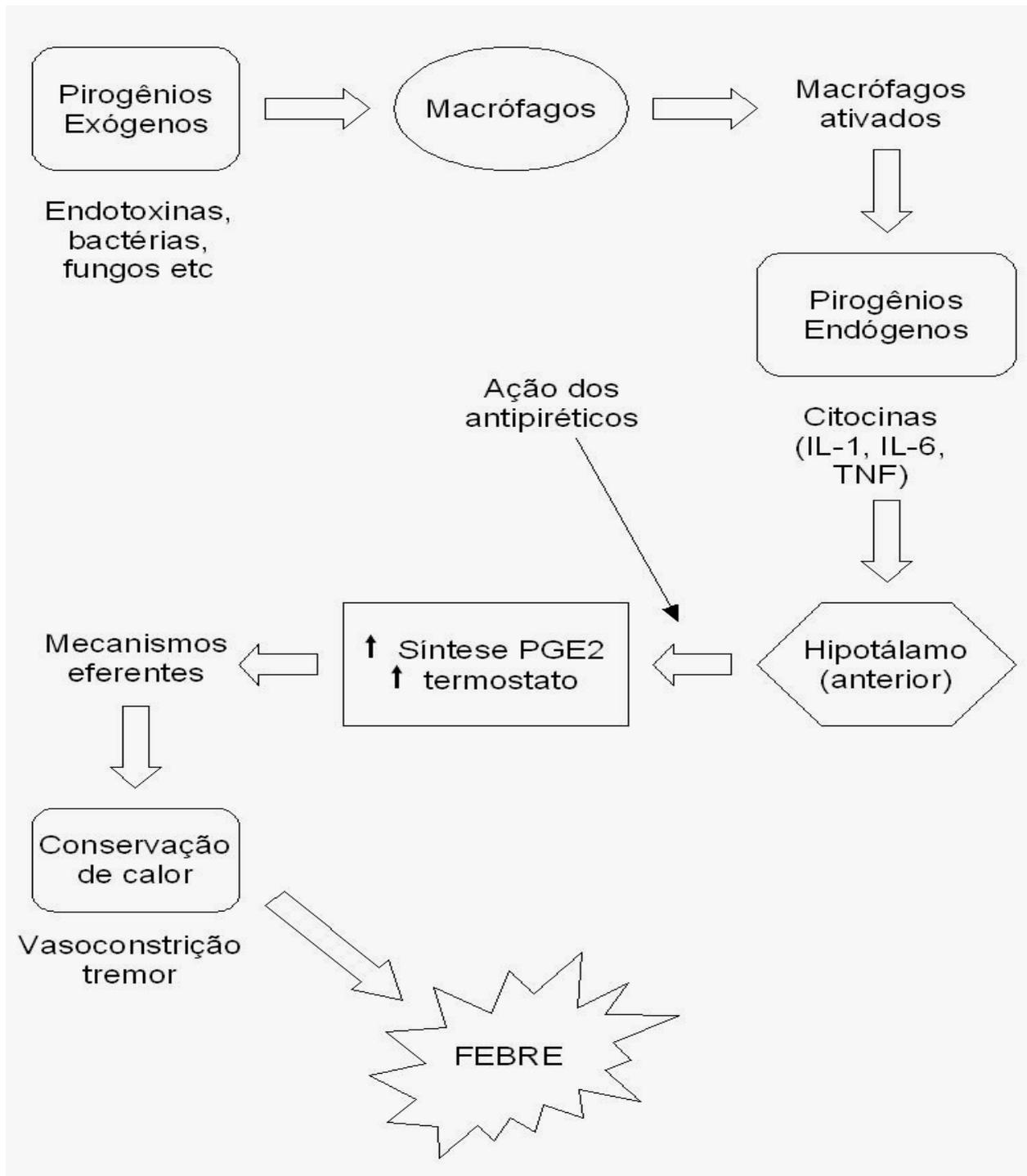


FIGURA 2 - Mecanismo da febre (Adaptado de ENDRES et al, 1987 e DINARELLO et al, 1988).

1.4 - Métodos Alternativos

Nos últimos anos, as campanhas contra a utilização de animais de laboratório têm obtido muito espaço na mídia, da mesma forma que tem crescido o número de grupos anti-vivisseccionistas e, com eles, as pressões para a não realização de experimentos em animais.

Com a publicação do livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*” por Russel e Burch, em 1959, foi introduzido o conceito dos 3Rs (“*Reduction, Refinement and Replacemen*”) no meio científico, que consiste na **redução** do número de animais, no **refinamento** das técnicas experimentais minimizando o sofrimento do animal e preservando o seu bem estar, e quando possível a **substituição** dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro* (PRESGRAVE, 2002). Este conceito evoluiu como uma tendência mundial, iniciando uma forte pressão com implicações éticas quanto a não utilização ou diminuição do número de animais em pesquisas científicas (BALLS *et al*, 1995).

Um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao teste de pirogênio *in vivo*. Desde a década de 1970, com o desenvolvimento do Teste do Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL)¹, se busca alternativa ao teste em coelhos. Entretanto, o Ensaio de endotoxinas só foi considerado método farmacopéico em 1985, em alguns produtos onde o teste em animal não poderia ser utilizado (e.g. anestésicos, radio-fármacos etc), numa tentativa de substituir o uso de coelhos em produtos que não tenham interferência com o LAL (e.g. parenterais de grande volume, água para injeção etc).

O teste de LAL se baseia na reação da endotoxina com o lisado do amebócito do *Limulus polyphemus* - caranguejo-ferradura (Figura 3). É um ensaio *in vitro* muito sensível e foi implementado para um grande número de produtos, entretanto, possui a limitação de detectar somente endotoxinas, não detectando a presença de outras substâncias pirogênicas (MOESBY *et al*, 2000; HARTUNG *et al*, 2001).

¹ O teste de LAL está denominado na Farmacopéia como Ensaio de Endotoxinas.

Além disso, como mencionado anteriormente, este teste não é preconizado para algumas vacinas, soros hiperimunes e hemoderivados, em função das interferências provocadas por esses produtos na reação de gelificação (HARTUNG *et al*, 2003, PRESGRAVE, 2003).

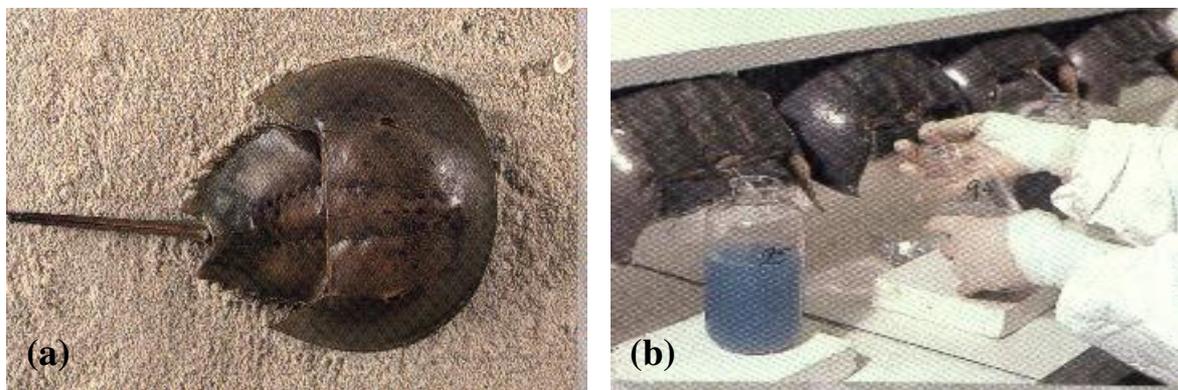


FIGURA 3 – (a) *Limulus polyphemus* (Caranguejo-Feradura), (b) Extração da hemolinfa do Caranguejo (Foto extraída do folder da Whitaker Bioproduct, Inc.)

Seguindo a tendência mundial na busca por métodos alternativos ao uso de animais, o teste de liberação de citocinas utilizando linhagens celulares ou sangue humano foi desenvolvido no final da década de 1980 e início dos anos 1990, tomando por base o princípio do mecanismo da febre. Este método quantifica mediadores inflamatórios envolvidos neste processo (IL-1 β , IL-6, TNF- α), que atingem o centro termorregulador hipotalâmico, levando à febre através de transformação do ácido aracdônico em prostaglandina E₂ no hipotálamo anterior (POOLE *et al*, 1988; HARTUNG e WENDEL, 1995; HARTUNG e WENDEL, 1996; NETEA *et al*, 2000; HARTUNG, 2001; CALDEIRA, 2005; PRESGRAVE, 2005). As perspectivas de uso do método de liberação de citocinas *in vitro* incluem a sua utilização tanto por órgãos reguladores quanto pelas indústrias, uma vez que abrange todos os pirogênicos, além de não representar gastos com a manutenção de animais. Este método passou recentemente pelo processo de validação envolvendo estudo colaborativo, avaliando-se a variação intra-e interlaboratorial para alguns medicamentos. (HOFFMANN *et al*, 2005b; SCHINDLER *et al*, 2006; ECVAM, 2006). Porém os estudos não incluem produtos biológicos de importância nacional como os soros hiperimunes. Assim, o coelho permanece como única alternativa para avaliação da contaminação pirogênica de imunobiológicos (FREITAS, 2005).

Em alguns casos onde a substituição ainda não é possível, a concepção da redução (3 Rs) é uma alternativa estratégica ao uso de animais. Esta primeira concepção pode ser aplicada ao teste de pirogênio, já que o Ensaio de Endotoxinas e a Liberação de citocinas são modelos de substituição que no momento ainda não podem ser aplicados para produtos biológicos. Apesar da carência de dados na literatura, foi apresentado um estudo durante a “Primeira Oficina de Ensaio Biológicos” em Cuba onde foi comprovada a possibilidade de reutilização dos animais nos testes de pirogênio para a vacina anti-hepatite B até três ou quatro vezes em um período de uma semana, reduzindo em até um terço o número de animais (BOURG *et al*, 1997).

1.5- Soros Hiperimunes

Soros são produtos de origem biológica e fazem parte do grupo dos imunobiológicos. São utilizados para tratar intoxicações provocadas pelo veneno de animais peçonhentos (serpentes, escorpiões, aranhas etc) ou por agentes infecciosos e suas toxinas, como os causadores da difteria, botulismo e tétano. Os soros anti-peçonhentos são produzidos a partir da imunização do cavalo, o qual recebe o veneno específico. No caso dos soros contra difteria, botulismo e tétano são usados os toxóides preparados com material das próprias bactérias. Para a produção do soro anti-rábico, é usado o vírus rábico inativo (INSTITUTO BUTANTAN, 2008)

No final do século XIX, a descoberta dos agentes causadores de doenças infecciosas representou um passo fundamental no avanço da medicina experimental. Houve um grande desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento de doenças como a difteria, tétano e cólera. Um dos principais aspectos deste avanço foi o desenvolvimento da soroterapia, que consiste na aplicação no paciente de um soro contendo um concentrado de anticorpos. A soroterapia tem a finalidade de combater uma doença específica no caso de moléstias infecciosas, ou um agente tóxico específico, como venenos ou toxinas (INSTITUTO BUTANTAN, 2008).

Os acidentes por animais peçonhentos constituem um importante problema de saúde pública para os países em desenvolvimento, dadas a incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nos doentes. No Brasil existem pelo menos quatro sistemas de informação que tratam do registro de acidentes por animais peçonhentos: o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), o Sistema de Internação Hospitalar (SIH-SUS) e o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Cada um destes sistemas possui características próprias, foram criados para atender demandas diferentes, e ao invés de se completarem, muitas vezes se contradizem (BOCHNER, 2008).

No Brasil, dos quase 100.000 casos de intoxicação humana, animal, e de solicitação de informação registrada pelo SINITOX no ano de 2005, 26,71% ocorreram com animais peçonhentos. Estes índices são ainda mais altos do que os casos envolvendo medicamentos (25,20%) que correspondem à principal causa de intoxicação humana conforme descrito na Tabela 1 (SINITOX, 2008).

Tabela 1: Casos registrados de intoxicação humana, de intoxicação animal, e de solicitação de informação por agente tóxico no Brasil no ano 2005 (extraído do site do SINITOX, URL< http://www.fiocruz.br/sinitox/2005/tab4_brasil.pdf>).

Agente	Vítima	Humana	Animal	Informação	Total	
		nº	nº	nº	nº	%
Medicamentos		21926	150	3103	25179	25,20
Agrotóxicos/Usos Agrícola		5577	130	1163	6870	6,87
Agrotóxicos/Usos Doméstico		2590	205	647	3442	3,44
Produtos Veterinários		877	115	78	1070	1,07
Raticidas		3213	181	472	3866	3,87
Domissanitários		6506	62	801	7369	7,37
Cosméticos		808	1	76	885	0,89
Produtos Químicos Industriais		4831	63	875	5569	5,57
Metais		720	5	102	827	0,83
Drogas de Abuso		2942	4	273	3219	3,22
Plantas		1765	96	355	2216	2,22
Alimentos		833	8	56	897	0,90
Animais Peç./Serpentes		4944	100	386	5430	5,43
Animais Peç./Aranhas		4661	20	1352	6033	6,04
Animais Peç./Escorpiões		8208	7	560	8775	8,78
Doutros Animais Peç./Venenosos		5834	38	587	6459	6,46
Animais não Peçonhentos		5146	15	1458	6619	6,62
Desconhecido		2005	111	426	2542	2,54
Outro		1270	39	1353	2662	2,66
Total		84456	1350	14123	99929	100
%		84,52	1,35	14,13	100	

} 26,71 %

Fonte: MS / FIOCRUZ / SINITOX

Ainda segundo dados do SINITOX, entre 2001 e 2005 (Figura 4,) os principais casos de acidentes foram com escorpiões, seguidos por aranhas e serpentes, sendo que apenas em 2005 pode ser observado um ligeiro aumento envolvendo picadas de aranha por um problema pontual na região sul do Brasil (SINITOX, 2008).

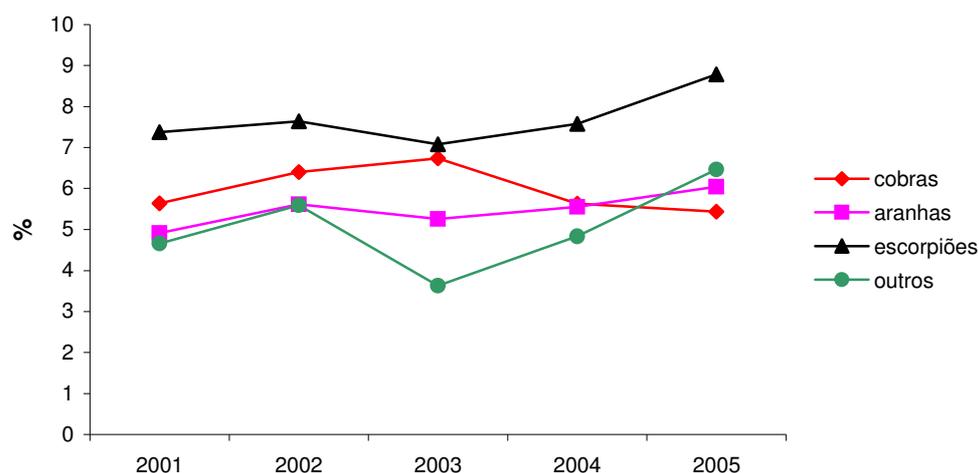
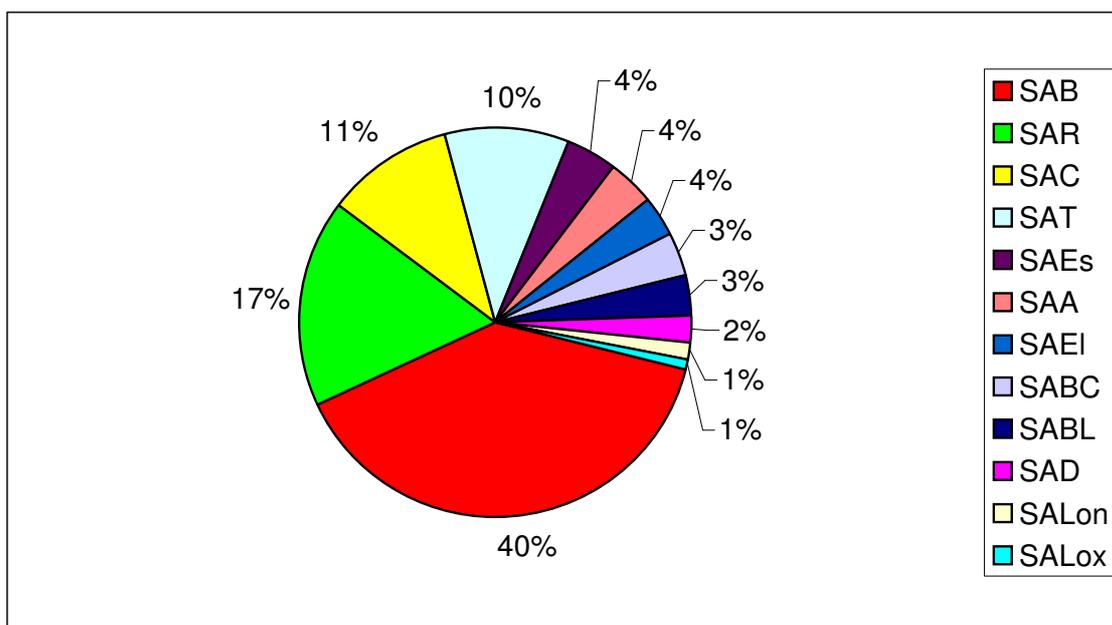


Figura 4: Casos de Intoxicação com animais peçonhentos no Brasil no período de 2001 e 2005. Percentual em relação ao total de casos. Fonte SINITOX

As três maiores instituições produtoras de soros e vacinas no país são o Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e a Fundação Ezequiel Dias (MG). As produções são compradas pelo Ministério da Saúde e utilizadas pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), através do envio às Secretarias de Saúde para serem distribuídas aos postos de aplicação de soro e vacinações. Além das Secretarias de Saúde, somente os Serviços de Saúde das Forças Armadas recebem o soro, que pode ser encontrado nos postos de saúde e em hospitais que foram aprovados pelo Ministério da Saúde. Cabe ao INCQS, desde de 1983, a responsabilidade pela avaliação da qualidade dos mesmos antes de serem distribuídos às secretarias de saúde.

No Brasil, a legislação vigente preconiza que o controle da contaminação pirogênica utilize o teste em coelhos para hemoderivados (BRASIL, 2000), soros hiperimunes e algumas vacinas (BRASIL, 2003) sendo que, somente nos casos de parenterais de grande volume é facultado o uso de testes em animais ou o Ensaio de Endotoxinas (BRASIL, 1997). No período de 2000 a 2007, o Setor de Pirogênio do INCQS analisou 2100 amostras de produtos injetáveis e dispositivos médicos, dos quais, 994 (47,33%) corresponderam a soros hiperimunes. Dos soros analisados, os de maior incidência são os soros anti-botrópico, anti-rábico, anti-crotálico e antitetânico conforme demonstrado na Figura 5.



SAB=Soro Anti-botrópico; SAR = Soro Anti-rábico; SAC = Soro Anti-crotálico; SAT = Soro Anti-tetânico; SAEs = Soro Anti-escorpiônico; SAA – Soro Anti-aracnídico; SAEI = Soro Anti-elapídico; SABC = Soro Anti-botrópico-crotálico; SABL = Soro Anti-botrópico-laquéutico; SAD = Soro Anti-diftérico; SALon = Soro Anti-lonômico; SALox = Soro Anti-loxoscélico

Figura 5 - Distribuição dos Soros hiperimunes analisados no Setor de Pirogênio no período de janeiro 2000 a dezembro 2007.

1.6 – JUSTIFICATIVA

O teste de pirogênio em coelhos é preconizado nas Farmacopéias como teste de segurança imprescindível para a avaliação da qualidade de produtos injetáveis. Estes compêndios, no âmbito internacional, apenas apresentam monografias para alguns medicamentos, instrumentos de saúde e hemoderivados, não considerando produtos de interesse nacional como os soros hiperimunes.

O Setor de Pirogênio do INCQS, seguindo consultores da OPAS, adotou como procedimento não reutilizar os coelhos para produtos biológicos como questão de segurança, devido à possibilidade do desenvolvimento de resposta cruzada ao pirogênio em coelhos administrados sucessivamente para este tipo de produto.

Considerando (I) os resultados obtidos no estudo de Cuba, (II) a competência do INCQS para o estabelecimento de normas e (III) a limitação dos métodos alternativos hoje existentes, surgiu a necessidade de se verificar a possibilidade de reutilização dos animais, através de um modelo consistente de redução principalmente para soros hiperimunes. A possibilidade de reutilização dos animais reduz o custo dos ensaios e o tempo de análise, além de estar em consonância com o preceito dos 3Rs.

O presente trabalho pretende contribuir significativamente como alternativa à atual situação, uma vez que a escassez de dados na literatura sobre a possibilidade de reutilização dos coelhos no teste de pirogênio para produtos antigênicos gera a necessidade de estudos mais rigorosos e que incorporem um maior número de produtos de uma forma segura e confiável.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a redução do número de coelhos utilizados no teste de pirogênio, através da reutilização destes animais para soros hiperimunes sujeitos à ação da Vigilância Sanitária, verificando se animais que receberam amostras não contaminadas, ainda apresentam a capacidade de responder ao estímulo febril, quando do recebimento de amostras contaminadas com a dose limite de endotoxina (5UE/Kg).

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a reutilização de animais em diferentes intervalos de tempo;
- Avaliar a reutilização de animais com diferentes produtos imunobiológicos (soro anti-botrópico, anti-rábico e anti-tetânico);
- Avaliar a redução de custo do ensaio *in vivo* em função da possibilidade de reutilização.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados 122 (cento e vinte e dois) coelhos albinos da raça Nova Zelândia, machos ou fêmeas, pesando acima de 1.500 gramas. Sendo que 20 animais foram utilizados para a curva dose-resposta e 102 para o estudo de reutilização.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em temperatura ambiente de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de 50% a 70%, com água filtrada e ração apropriada *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Foi fornecido feno autoclavado como enriquecimento ambiental.

Os coelhos eram provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Após os experimentos, todos os animais foram submetidos à eutanásia por administração intravenosa de tiopental na concentração de 100 mg/kg.

3.2 – Amostras e Soluções

3.2.1 – Curva dose-resposta

A curva dose-resposta foi construída com as doses de 0,5; 1; 2; e 4 ng/kg de LPS de *Escherichia coli* (SIGMA-Sorotipo 055B5), além de um grupo com solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%. Foram utilizados 5 (cinco) coelhos para cada ponto da curva, que receberam 1 mL/kg de solução pela veia marginal da orelha.

3.2.2 – Soros hiperimunes

As amostras selecionadas para este estudo tiveram como critério a representatividade dos produtos biológicos analisados nos últimos anos pelo Setor de Pirogênio. Entre os soros hiperimunes, selecionou-se o soro anti-botrópico, o anti-rábico e o anti-tetânico por terem maior demanda. Todas as amostras utilizadas foram provenientes da rotina de análise, do mesmo produtor e os lotes foram previamente testados, apresentando resultado satisfatório. Além disso, foram utilizados os mesmo lotes de cada produto nos três experimentos.

As amostras positivas foram obtidas através da contaminação com a concentração de 1 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (SIGMA-Sorotipo 055B5).

3.3 – Teste de Pirogênio *in vivo*

Os animais foram treinados 24 horas antes do início do teste, simulando o mesmo procedimento do ensaio, sem haver, entretanto, a administração de qualquer produto. Aqueles que apresentaram variação individual de temperatura (VIT) igual ou menor que 0,3°C foram considerados aptos a entrarem em teste. Para o ensaio propriamente dito, os animais foram pesados, para o cálculo da dose a ser administrada, e colocados em gaiolas de contenção de PVC, para a colocação do eletrodo no reto do animal (6-7 cm) e registro da temperatura individual. Foi feita a tricotomia da orelha, antes da injeção, para facilitar a visualização da veia marginal e a introdução da agulha. Os animais foram mantidos em repouso por pelo menos 30 minutos antes da administração das amostras e após este período, a temperatura controle (Tc) foi registrada pelo equipamento. Foram utilizados os animais com temperatura igual ou inferior a 39,8°C no momento do ensaio e que não apresentaram variação superior a 1,0°C no mesmo grupo. As soluções-teste foram administradas pela veia marginal da orelha (Figura 6). Após a administração, os animais foram mantidos por três horas, com registro contínuo da temperatura em intervalos de 30 minutos. A medida de temperatura e o cálculo da VIT (variação individual de temperatura) foram realizados utilizando o sistema de monitoramento de pirogênio PyroMon® da Ellab. (INCQS, 2007; BRASIL, 2003; HOCHSTEIN *et al*, 1990). Durante o período do ensaio os animais foram privados de água e ração. A

avaliação foi realizada automaticamente pelo equipamento a partir dos critérios da Farmacopéia Brasileira. O cálculo foi determinado automaticamente pelo equipamento, subtraindo-se a temperatura controle da maior temperatura individual registrada, obtendo-se a variação individual de temperatura (VIT).

Seguindo critério descrito na Farmacopéia Brasileira, no primeiro ensaio são utilizados 3 (três) animais por dose, considerando-se o produto satisfatório quando nenhum animal apresentou a VIT igual ou superior a 0,5°C. O produto é considerado duvidoso se pelo menos 1 (hum) dos 3 (três) animais alcança esta variação. Neste caso o ensaio foi repetido com 5 (cinco) animais sendo o produto considerado satisfatório se no máximo 3 (três) dos 8 (oito) animais apresentarem VIT igual ou superior a 0,5°C e se o somatório das variações individuais de temperatura dos 8 (oito) animais não for superior a 3,3°C. Caso contrário, a amostra é considerada pirogênica (Brasil, 2003). (O teste de pirogênio em coelhos foi licenciado pela CEUA/FIOCRUZ através da Licença nº 137/02.)



Figura 6 – Sequência de fotos do teste *in vivo*. Os animais são colocados em gaiolas de contenção (A), os eletrodos são colocados no reto dos animais (B) e o produto é injetado na veia marginal da orelha após 30 minutos de repouso (C). O registro das temperaturas é feito pelo equipamento Pyromon®, ELLAB, durante um período de três horas (D).

3.3.1 - Curva Dose-resposta:

A curva foi realizada seguindo os mesmos critérios do teste de pirogênio, (item 3.3) excetuando-se o fato de se utilizar 5 animais por grupo e não se repetir o ensaio com novos animais, considerando apenas a VIT (variação individual de temperatura) como critério de resposta febril.

3.3.2 – Avaliação da contaminação das amostras (*spike*²)

Esta etapa foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela Farmacopéia e foi elaborada com a finalidade de se demonstrar que um produto contaminado com concentração não pirogênica de LPS, não produz resultado positivo. Quando o mesmo é positivado com a concentração limite de LPS, isso é detectado no resultado do ensaio. Para tal, amostras de SAB foram contaminadas com 0,5 e 1 ng/mL de LPS de *E. coli*.

3.4 – Desenho Experimental do Estudo de Reutilização de Coelhos

Foram realizados no total nove experimentos independentes, incluindo SAB (N=5 experimentos, SAT (N=2 experimentos) e SAR (N=2 experimentos). No caso do SAB, foi realizado um número maior de experimentos devido à necessidade de esclarecer questões que surgiram a partir do primeiro ensaio de reutilização. Portanto, foi considerado para o SAB três experimentos independentes com dois desdobramentos que serão detalhados posteriormente.

O esquema geral da reutilização é apresentado no Quadro 2, onde os animais foram divididos em quatro grupos seguindo as administrações com intervalo de 48 horas durante 7 dias. Nestes ensaios, foi seguida metodologia do teste de pirogênio em coelhos, excetuando-se o fato de que não houve repetição com novos animais e somente as VITs foram consideradas como critério de resposta febril.

² *Spike* = contaminação provocada, com concentração conhecida, de forma a medir um determinado efeito.

QUADRO 2 – Esquema das administrações, nos coelhos, das amostras contaminadas com 1 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (A+) e não contaminadas (A) nos grupos experimentais para SAB, SAR e SAT.

	Dia1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
Grupo I	A+			
Grupo II	A	A+		
Grupo III	A	A	A+	
Grupo IV	A	A	A	A+
SAB {	Grupo V	0,5ng/mL		
	Grupo VI	negativo	negativo	0,5ng/mL
	Grupo VII	negativo		0,5ng/mL

Para o SAB, cada grupo foi composto de 11 animais e, para SAT e SAR, os grupos foram de 6 animais cada. O Grupo I recebeu somente amostra positivada (“spike”), com a finalidade de servir como controle positivo, sendo usado como comparação das respostas dos demais grupos. O Grupo II recebeu uma administração de amostra não pirogênica e, 48 horas após, a amostra de soro contaminada. O Grupo III recebeu amostra negativa nas duas primeiras administrações, tendo recebido a amostra contaminada no dia 5. O Grupo IV recebeu nos dias 1, 3 e 5 amostras não pirogênicas e no dia 7, a amostra positivada.

No caso do SAB, outros grupos foram acrescentados ao estudo, a saber: Grupo V, onde os animais receberam SAB contaminado com 0,5ng/mL (dose não pirogênica) somente no dia 1; Grupo VI, no qual procedeu-se a administração de amostra contaminada com 0,5 ng/mL apenas no dia 5, recebendo anteriormente SAB negativo nos dias 1 e 3; Grupo VII, composto de animais que receberam amostra negativa no dia 1 e positivada com 1 ng/mL no dia 5.

Em todos os casos os animais receberam 1 mL/kg e os procedimentos foram conforme descrito no teste de pirogênio *in vivo*, exceto que não foram usados os critérios de teste duvidoso. Este experimento é parte do projeto aprovado pela CEUA/FIOCRUZ sob Licença nº 138/02.

3.5 – Ensaio complementares

3.5.1 - Teste de Endotoxinas

Foi utilizado o método do LAL Cromogênico End Point (CAMBREX – QCL-1000), um teste quantitativo, que utiliza um substrato cromóforo para detecção colorimétrica. O LAL foi realizado para atestar a potência da solução-estoque e, para confirmar as diluições utilizadas para contaminar as amostras, bem como para testar os soros anti-botrópico positivados.

3.5.1.1 – Preparo da curva padrão e procedimento de análise

Foi preparada uma solução de endotoxinas, contendo 1,0 UE/mL, a partir da solução estoque. Para tal, foi diluído 1/x, onde x é a potência de endotoxinas declarada. As diluições foram preparadas de acordo com o Quadro 3.

QUADRO 3 – Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão

Conc. Endotoxina(EU/mL)	Vol. de sol. estoque 1 EU/mL	Vol. de sol. padrão	Vol.de água apirogênica
1,0	0,1 mL	-	x-1/10mL
0,5	-	0,5 mL	0,5 mL
0,25	-	0,5 mL	1,5 mL
0,1	-	0,1 mL	0,9 mL

Após preparo dos pontos padrão e amostra foi seguido o esquema descrito no Quadro 4 com a microplaca pré-aquecida a 37°C, em aquecedor de blocos. Cada ponto foi ensaiado em duplicata e a leitura foi realizada em 405 ou 410 nm, utilizando leitor VersaMax, Molecular Device.

QUADRO 4 – Etapas do Procedimento de análise do LAL Cromogênico

	AMOSTRA		BRANCO
Amostra teste ou padrão (20 – 25°C)	50µL		-
Água apirogênica	-		50µL
LAL	50µL		50µL
Misturar e incubar 37°C ± 1,0 °C		10 minutos	
Substrato cromogênico (37°C ± 1,0°C)	100µL		100µL
Misturar e incubar 37°C ± 1,0°C		6 minutos	
Reagente de parada	50µL		50µL
Misturar imediatamente			

O cálculo da concentração de endotoxinas foi realizado subtraindo-se a média das absorbâncias do branco, da média das absorbâncias dos padrões e amostras para calcular a variação da absorbância média (Δ abs média). A concentração de endotoxina foi determinada através do cálculo de regressão linear. Todos os cálculos foram realizados através da programação pré-definida no equipamento (Software SoftMax® Pro5).

$$\text{Inclinação} = (S_y/S_x).r$$

$$Y \text{ intercepto} = \Sigma y/N - (\Sigma x/N \cdot \text{Inclinação})$$

$$r = \frac{N\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{N(N-1) \cdot S_x \cdot S_y}$$

$$\text{Concentração de Endotoxina} = \frac{\Delta D.O. - Y \text{ intercepto}}{\text{Inclinação}}$$

onde,

x = concentração de endotoxina em UE/mL

y = média da variação dos valores de absorbância

N = número de padrões usados

Σx = somatório das concentrações dos padrões usados, em UE/mL

Σy = somatório da média dos valores de absorvância

Σxy = somatório das concentrações dos padrões multiplicado pela média da variação dos valores de absorvância

$$S_x = \text{desvio padrão de } x = \sqrt{\frac{N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{desvio padrão de } y = \sqrt{\frac{N\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

3.5.2 – Teste do Sangue Total

3.5.2.1 – Doadores de sangue

O sangue foi coletado (10 mL/doador), através de punção venosa, usando tubos a vácuo com citrato de sódio (anticoagulante) de voluntários, sadios, de ambos os sexos. Todos os doadores (n=5) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O sangue foi criopreservado seguindo o procedimento descrito por Schindler *et al*, 2006. Os experimentos com sangue total foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, sob a licença nº 368/07.

3.5.2.2 – Procedimento do Teste de Sangue Total

O sangue foi descongelado por 15 minutos em estufa a 37°C, sendo em seguida posto em contato com as soluções-teste na seguinte proporção: 100 µL do estímulo (padrão ou teste) + 200 µL de sangue + 900 µL de RPMI 1640. Em seguida o sangue foi incubado a 37°C, em presença de 5% de CO₂ *overnight* (16 a 18 horas). Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 1 minuto. Após esse procedimento, os mediadores inflamatórios (IL-1β e IL-6) foram dosados usando kit comercial R&D Systems (Figura 14). Para cada experimento foi preparada uma curva dose-resposta que serviu de comparação para a quantificação dos efeitos obtidos nas amostras. O esquema do procedimento do teste de sangue total está descrito na Figura 7.

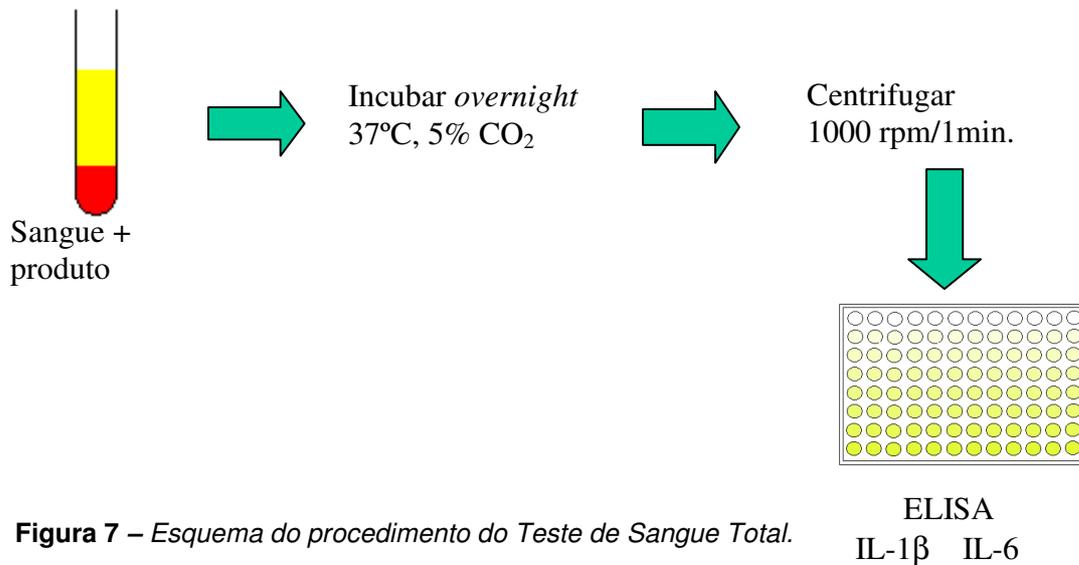


Figura 7 – Esquema do procedimento do Teste de Sangue Total.

3.5.2.3 – Dosagem de Citocinas (Interleucina-1 β , Interleucina-6)

As curvas-padrão de IL-1 β e IL-6 foram preparadas conforme apresentado nas Figuras 8 e 9.

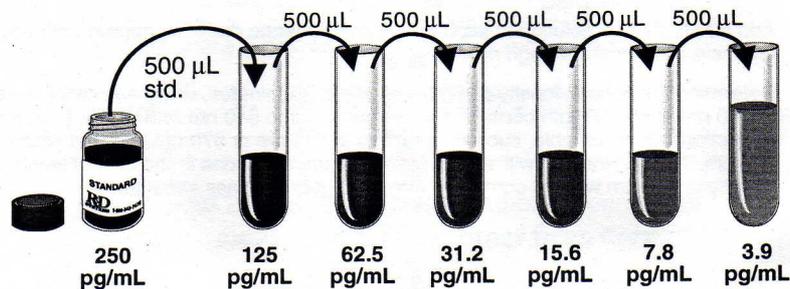


Figura 8 – Esquema de diluição da curva-padrão de IL-1 β (Extraído do folheto de instruções do kit R&D Systems).

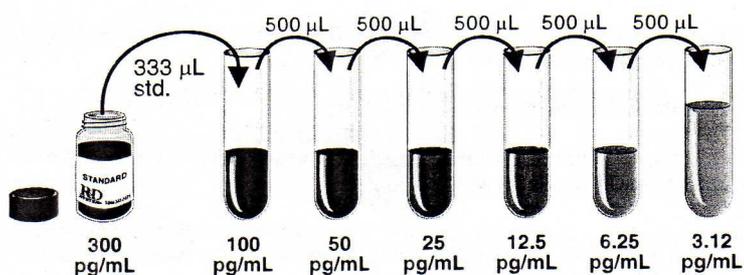


Figura 9 – Esquema de diluição da curva-padrão de IL-6 (Extraído do folheto de instruções do kit R&D Systems).

Após o preparo dos reagentes e diluições do padrão 50 µL do diluente apropriado (RD1C) foi colocado em cada poço. Após adicionar o volume de padrão ou amostra, a placa foi coberta com adesivo incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi desprezado e os poços lavados com 400 µL do Tampão de Lavagem. Após a lavagem, a placa foi invertida em lenço de papel para retirada do excesso e, em seguida foram adicionados 200 µL do conjugado em cada poço. Novamente a placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 horas seguindo-se novo procedimento de lavagem. Foram adicionados 200 µL do substrato em cada poço e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Só então foram adicionados 50 µL da solução de parada. A placa foi gentilmente agitada para homogeneizar a cor e proceder a leitura dentro de 30 minutos. Cada ponto (padrão e amostra) foi ensaiado em duplicata e a leitura foi realizada em 450 nm, utilizando leitor VersaMax, Molecular Device (Figuras 10 e 11).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO PARA IL-1 β

1. Preparo do reagente e padrões como na instrução



2. Para o Soro / Amostra de Plasma

Adicionar 50µL do diluente RD1C para cada poço



3. Adicionar 200µL do padrão ou da amostra para cada poço

Incubar por 2 hrs. Em temp. ambiente



4. Aspirar e lavar por 3 vezes



5. Adicionar 200µL do conjugado para cada poço
Incubar por 2 hrs em temp. ambiente
- 
6. Aspirar e lavar por 3 vezes
- 
7. Adicionar 200µL de solução de substrato para cada poço.
Incubar 20 min.a temp. ambiente. Proteger da luz
- 
8. Adicionar 50µL de solução de parada para cada poço.
Ler a 450nm dentro de 30 min
λ de correção 540 ou 570 nm

Figura 10 – Procedimento para dosagem de IL-1β (Extraído do folheto de instruções do kit R&D Systems).

PROCEDIMENTO DO ENSAIO PARA IL-6

1. Preparo do reagente e padrões como na instrução
- 
2. Adicionar 100µL de diluente RD1W para cada poço.
Incubar por 2hrs em temp.. ambiente
- 
3. Adicionar 100µL do padrão ou da amostra para cada poço
Incubar por 2 hrs. em temp. ambiente
- 
4. Aspirar e lavar por 3 vezes
- 

- 5. Adicionar 200 μ L do conjugado para cada poço
Incubar por 2 hrs em temp. ambiente**

- 6. Aspirar e lavar por 4 vezes**

- 7. Adicionar 200 μ L de solução de substrato para cada poço.
Incubar 20 min.a temp. ambiente. Proteger da luz**

- 8. Adicionar 50 μ L de solução de parada para cada poço.
Ler a 450nm dentro de 30 min
 λ de correção 540 ou 570 nm**

Figura 11 – *Procedimento para dosagem de IL-6 (Extraído do folheto de instruções do Kit R&D Systems).*

A concentração de citocinas liberada é calculada através da Regressão Linear, onde, pela equação da reta se determina o valor de y (quantidade de citocinas liberada) em relação à concentração x de LPS. Todos os cálculos foram realizados através da programação pré-definida no equipamento (Software SoftMax® Pro5).

Uma solução foi considerada pirogênica, sempre que a quantidade de citocinas liberada por esta era igual ou superior à quantidade liberada pela solução de referência contendo 1ng/mL. Caso contrário, foi considerada como sendo não pirogênica.

3.6 – Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de reutilização foram analisados pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se as respostas aos estímulos positivos apresentavam ou não, diferença estatisticamente significativa nos distintos dias de administração.

3.7 – Avaliação da Redução de Custo do Ensaio “*in vivo*”

A Vice-Diretoria de Planejamento e Estratégia – VDPE – Gestão Econômica – GECON, divulgou um relatório em outubro de 2005, realizado pela GEMOC (gestão de monitoriamento de custo) onde apresentava os resultados alcançados através de um estudo feito nos departamentos do INCQS levantando o custo das análises “*in vivo*” e “*in vitro*”. No Setor de Pirogênio fez o levantamento dos custos de Soros, Vacinas e Diluentes do Ensaio de Pirogênio “*in vivo*” e “LAL” (INCQS, 2005).

4 – RESULTADOS

Os resultados foram divididos em cinco etapas primeiramente apresentando (I) os dados relativos à curva dose-resposta utilizada para testar a sensibilidade dos animais na dose limite e depois (II) os resultados relativos ao teste de endotoxina usado para comprovar a potência da substância de referência e suas diluições assim como as amostras de soro anti-botrópico utilizadas no teste *in vivo*. Na terceira etapa (III) foram apresentados os dados referentes ao teste de liberação de citocinas para os soros hiperimunes antibotrópico e antirábico, puros e diluídos 1:10, contaminados ou não com a substância de referência e comparados ao controle em salina apirogênica pura e contaminada com a dose limite. Para definir as VITs como parâmetro para os estudos de reutilização foi realizado numa quarta etapa (IV) o teste de pirogênio *in vivo* com oito animais, injetados com soro antibotrópico contaminado na dose-limite de 1 ng/mL e na dose não pirogênica de 0,5 ng/mL. E por último (V) foram apresentados os resultados do teste de reutilização de animais com soros antibotrópico, anti-rábico e antitetânico seguindo desenho experimental já descrito anteriormente.

4.1 - 1ª Etapa - Curva Dose-Resposta

A curva dose-resposta foi realizada para testar a sensibilidade dos animais nas diferentes concentrações de LPS, avaliando a resposta do animal para doses não pirogênica, limite e pirogênica. Pode ser observado na Figura 12 que os coelhos apresentaram uma resposta com o perfil típico de uma curva monofásica e pico de febre ($VIT \geq 0,5^{\circ}C$) em 60 minutos. Os resultados mostram que não houve elevação de temperatura do grupo controle nem nos animais que receberam a dose não pirogênica de 0,5 ng/mL/kg. A resposta de febre foi observada a partir da concentração limite de 1 ng/mL/kg ($VIT = \text{média} \pm \text{erro padrão}$), demonstrando a sensibilidade esperada. Estes dados confirmam os apresentados na literatura que mostram que 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre no coelho e no homem (HOCHSTEIN, 1990). Os animais que receberam as doses pirogênicas de 2 e 4 ng/mL/kg apresentaram VIT de $1,05^{\circ}C$ e $1,25^{\circ}C$ respectivamente, demonstrando uma resposta dependente da dose.

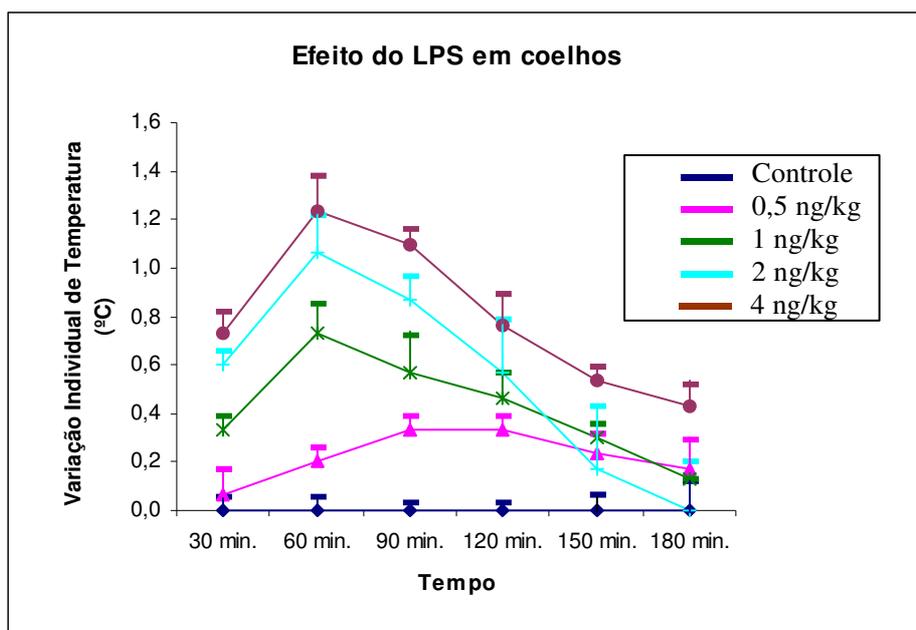


Figura 12 – Curva dose-resposta nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 ng/mL/kg de LPS de *E.coli* em coelhos . A resposta de febre (VIT >0,5°C) pode ser observada a partir da dose limite de 1ng/mL.

4.2 - 2ª Etapa - Teste de Endotoxina

O Teste de Endotoxina foi realizado para confirmar a potência das soluções injetadas nos animais e testar a capacidade do LAL em detectar o LPS presente nos soros contaminados. As amostras analisadas foram alíquotas das soluções utilizadas nos testes *in vivo* na concentração limite de 1ng/mL em solução salina e soro antibiótico.

Os resultados demonstraram que a concentração limite preparada em salina correspondeu a 5 UE/mL de *E.coli*. A comprovação desta relação é importante para avaliar a real potência da solução de referência utilizada para o ensaio *in vivo* frente ao padrão de referência de endotoxina certificado no kit. Com isso comprova-se que a resposta apresentada pelos animais é decorrente de solução com a concentração definida (1 ng/mL = 5 UE/mL).

Não foi possível detectar a presença de LPS nos soros contaminados com a dose limite, gerando resultados falso-negativos e ratificando os dados existentes na literatura em relação à limitação do teste para produtos biológicos devido à presença de interferentes, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados do LAL cromogênico end-point de endotoxinas de *E. coli* de referência e de soros hiperimunes

SOLUÇÕES TESTE	UE/mL
Controle -	0,038
Sal 1 ng/mL	4,90
SAB -	0,077
SAB +	0,108
SAR -	0,086
SAR +	0,051
SAT -	0,051
SAT +	0,048

4.3 – 3ª Etapa - Sangue Total

Os estudos que vêm sendo realizados com o uso do teste de sangue total têm mostrado que esta metodologia é promissora quanto à possibilidade de sua aplicação também para soros hiperimunes.

Os resultados preliminares dos ensaios utilizando sangue criopreservado mostram que estes produtos somente podem ser testados quando diluídos 1:10 (Figuras 13 e 14), pois, quando ensaiados não diluídos não mostram liberação de citocinas devido ao forte potencial citotóxico do seu conservante 2003.

O gráfico representado nas figuras 13 e 14 representa um único experimento utilizando um pool de sangue criopreservado.

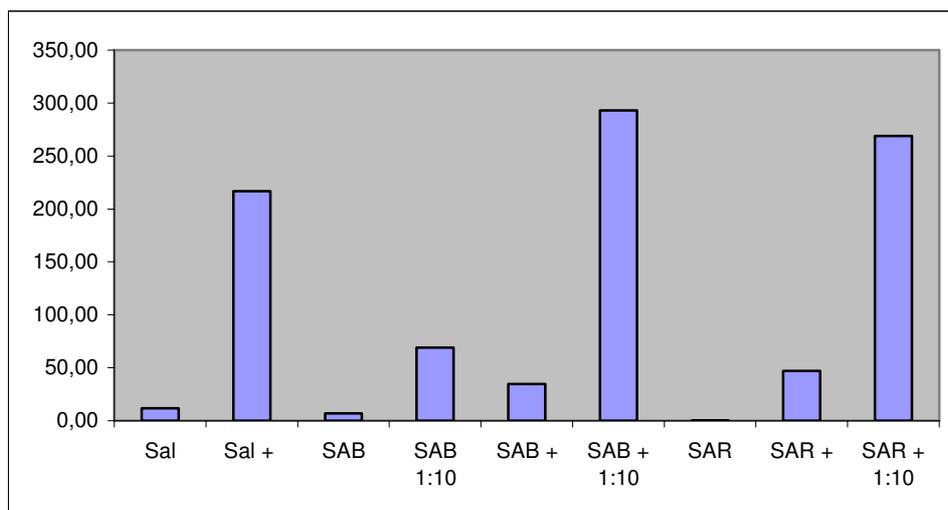


Figura 13 – Liberação de IL-1 β em sangue total humano criopreservado.

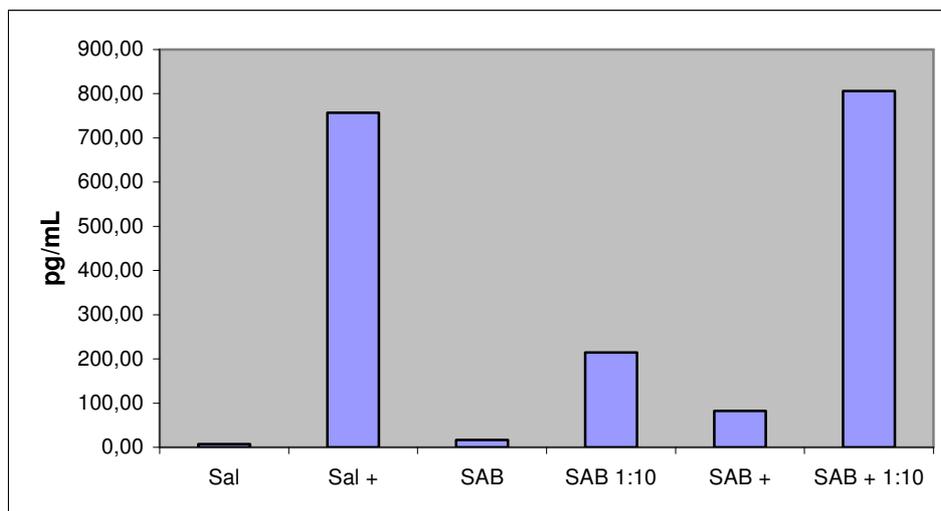


Figura 14 – Liberação de IL-6 em sangue total humano criopreservado.

4.4 – 4ª Etapa: Teste de pirogenicidade da dose-limite de LPS

Os resultados dos ensaios realizados para avaliação da contaminação das amostras (3.3.2) mostraram que o SAB, quando contaminado com 0,5 ng/mL apresentou resultado negativo para o teste de pirogênio. Somente 1 animal no primeiro teste apresentou elevação igual ou superior a 0,5 °C e o somatório dos 8 animais foi igual à 2,7 °C. O SAB contaminado com 1 ng/mL apresentou resultado positivo. Dois coelhos do primeiro teste e 4 do segundo apresentaram VIT igual ou superior a 0,5 °C, totalizando 6 animais em 8 e o somatório foi igual a 6,0 °C (Tabela 3). Este fato permitiu usarmos somente as VITs (variações individuais de temperaturas) como parâmetro para os estudos de reutilização.

Tabela 3: Conclusão dos testes de pirogênio “in vivo” realizado, em soro anti-botrópico (SAB) contaminado com 0,5 e 1 ng/mL.

Soluções	Conclusão do Pirogênio <i>in vivo</i>
SAB 0,5 ng/mL	negativo
SAB 1,0 ng/mL	positivo

4.5 – 5ª Etapa: Estudo sobre a reutilização de animais submetidos a administrações anteriores de soros hiperimunes

Diante dos resultados obtidos nos testes de pirogênio (item 4.4), optou-se por trabalhar neste estudo somente com as VITs pois a repetição com 5 animais exigiria coelhos virgens, uma vez que não tínhamos ainda a certeza da possibilidade de reutilização. Além disso, a aplicação do teste com 8 coelhos implicaria na utilização desnecessária de animais, já que a administração de 1 ng/kg produziu a resposta de febre em 6 animais testados.

4.5.1 – Soro Anti-botrópico

O primeiro experimento (n=3) apresentou uma elevação da resposta febril nos dia 3 e 5 ligeiramente superior ao primeiro dia de aplicação (Figura 15) em comparação ao grupo I.

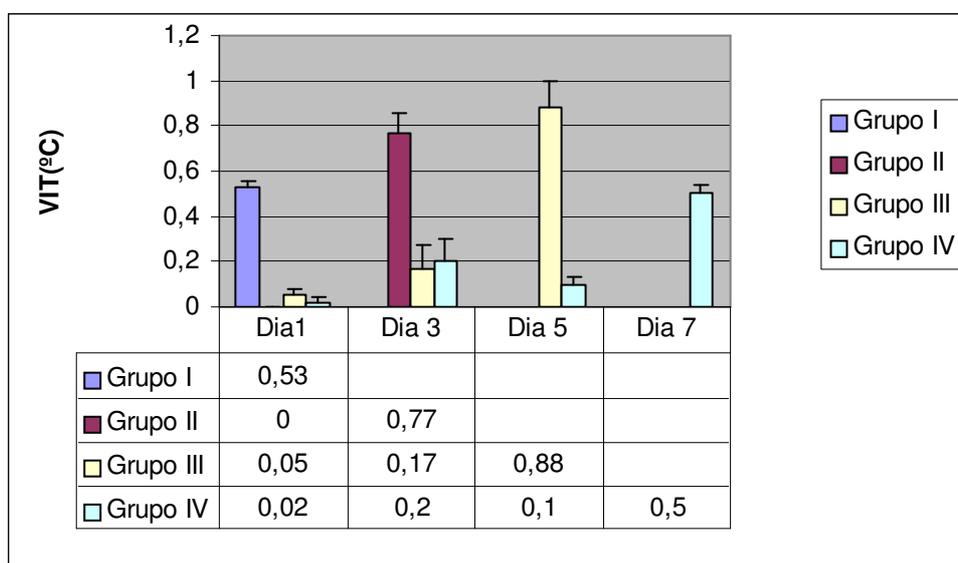


Figura 15 – Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo. Experimento 1 (n=3).

Uma vez que foi evidenciada uma tendência de elevação da resposta, fez-se mister avaliar se este aumento poderia implicar em transformar uma resposta negativa em positiva. Para isso, foram incluídos 2 grupos: Grupo V – recebendo somente SAB contaminado com 0,5 ng/kg (dose não pirogênica) e Grupo VI –

animais recebendo SAB negativo nos dias 1 e 3, sendo desafiados com SAB contaminado com 0,5 ng/kg no dia 5.

Os resultados mostraram que, embora ainda exista uma tendência de aumento da resposta no dia 5, a elevação encontrada não proporcionou resultado falso positivo, conforme demonstrado na Figura 16.

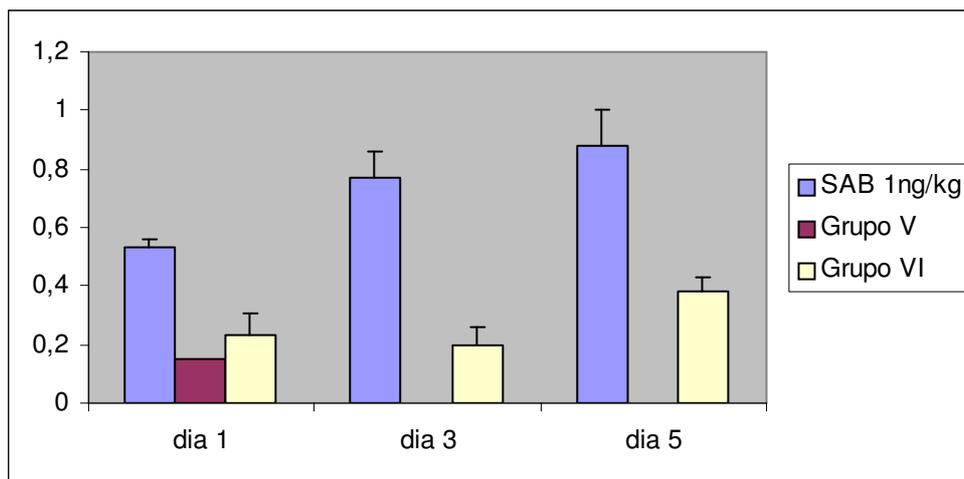


Figura 16 – Demonstração do efeito da administração repetida de Soro Antibotrópico negativo, seguida de SAB contaminado com 1 ng/mL.

Uma vez que o número de animais no experimento 1 era muito pequeno ($n=3$) para possibilitar uma análise estatística conclusiva, foi realizado um novo experimento com mais 3 animais (experimento 2) para avaliar se esse aumento poderia ser devido a um potencial efeito cumulativo do soro (Figura 17). Nesse experimento, uma discreta elevação da resposta ocorreu apenas nos dias 5 e 7, o que levou a outra repetição com um número maior de animais ($n=5$, 3º experimento).

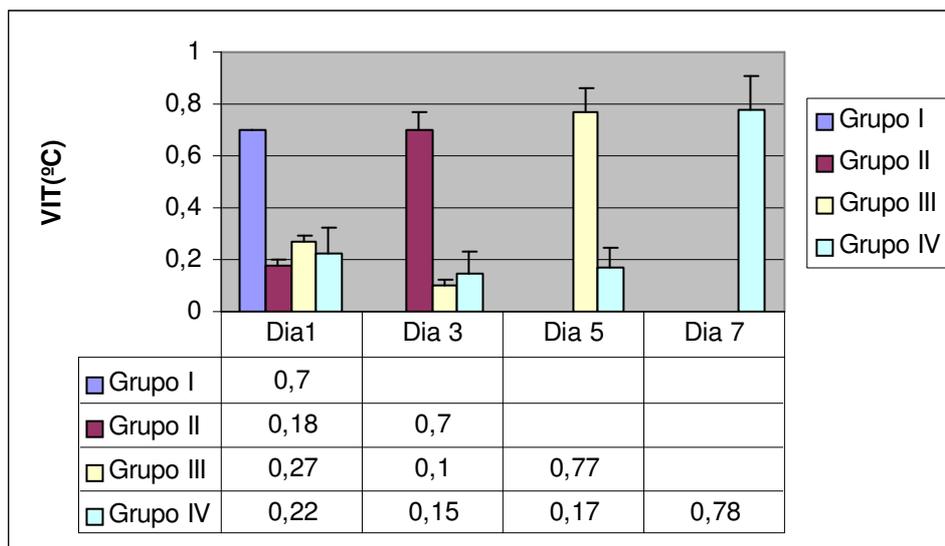


Figura 17 – Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo.
Experimento 2 (n=3)

Os dados deste terceiro experimento ratificaram o aumento encontrado no dia 3 do primeiro experimento em relação ao dia 1 e mostraram uma nova elevação do dia 7 em relação ao quinto dia de aplicação (Figura 18).

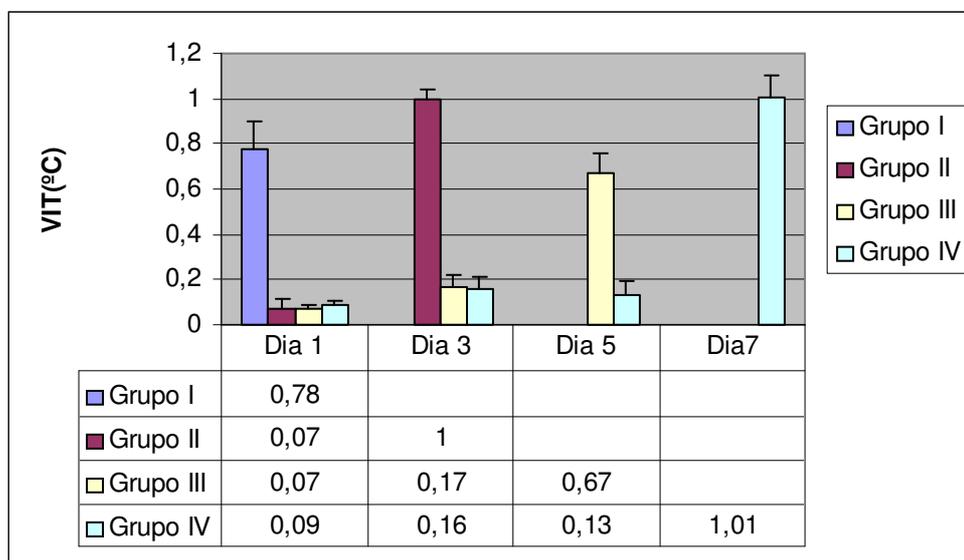


Figura 18 – Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo
Experimento 3 (n=5).

Quando se utiliza a média das VITs do total de animais (n=11) essa tendência permanece, mostrando uma discreta elevação de resposta nos dias 3 e 7 (Figura 19). Cabe ressaltar, que esse aumento não foi significativo.

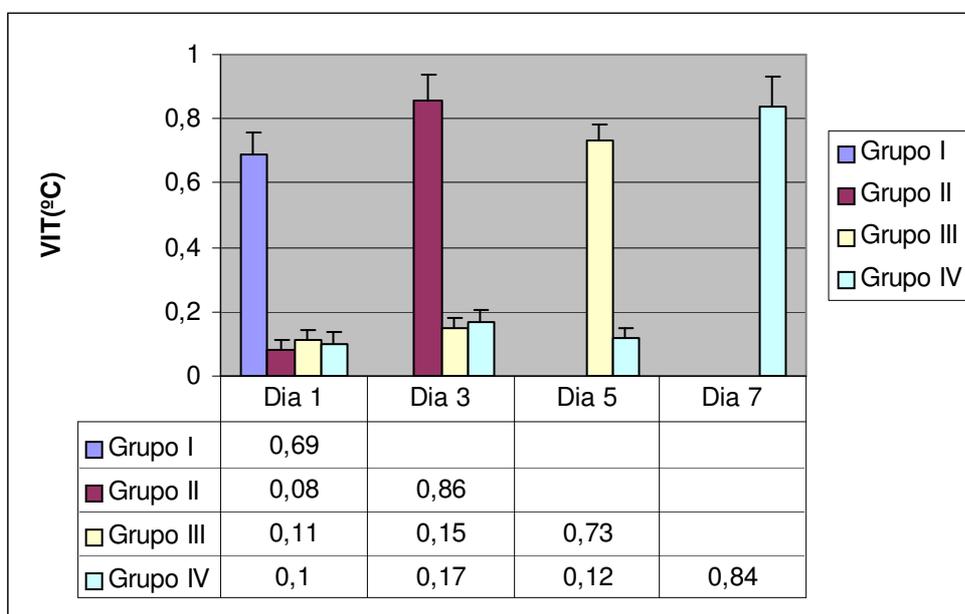


Figura 19 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAB negativo e positivo. Média dos 3 experimentos (n=11).

As respostas do SAB positivado com 1 ng/mL não foram estatisticamente significativas entre si, quando avaliadas pelo método de Kruskal-Walis. Este fato por si só já indica que não há efeito cumulativo do soro. No entanto, para verificar se essas discretas elevações dos VITs em intervalos de 48 horas estariam relacionadas com esse intervalo de tempo, um outro experimento foi realizado, onde os animais (n=2) receberam SAB negativo no dia 1 e SAB positivado com 1ng/ml no dia 5. O resultado mostrou que a resposta de febre dos animais foi bastante semelhante àquela obtida com os animais que receberam SAB positivo sem injeção prévia de SAB negativo, indicando que a elevação não está relacionada com a segunda injeção, mas, provavelmente foi um evento ao acaso, devido às variações intrínsecas do modelo animal (Figura 20).

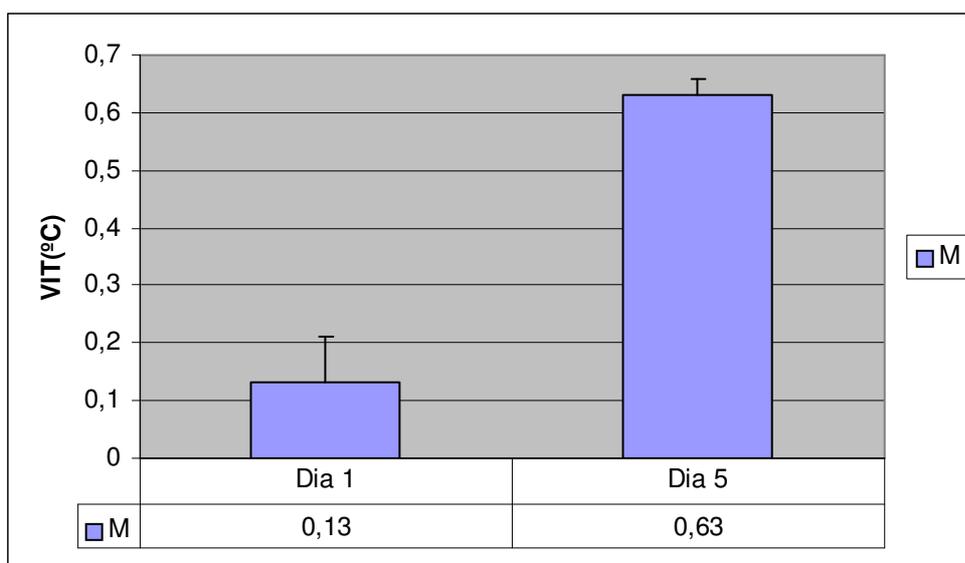


Figura 20 – Administração de SAB contaminado com 1 ng/mL demonstrando que não ocorre elevação de resposta quando da segunda aplicação de SAB (média de n=2).

Este resultado pode ser compreendido de forma mais clara, quando os valores das VITs são colocados juntos (Figura 21).

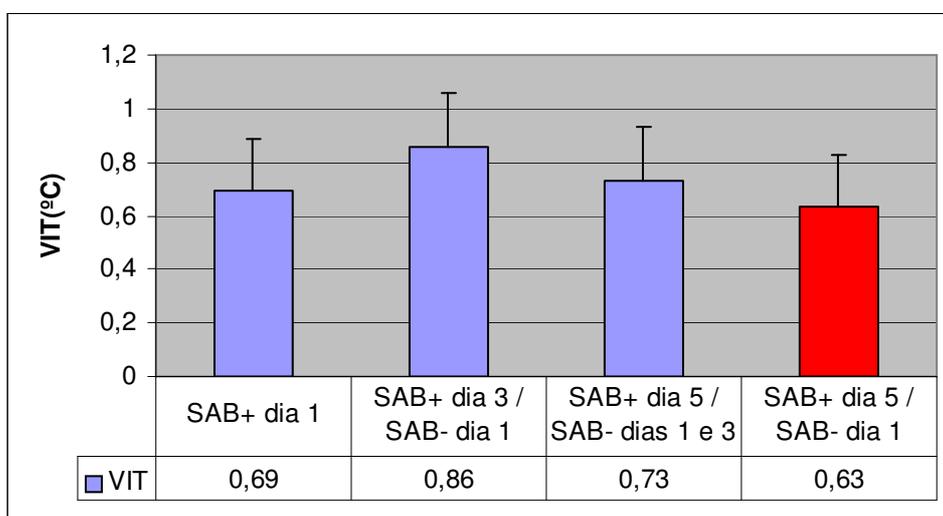


Figura 21 – Comparação das médias das variações individuais de temperatura, dos animais que receberam SAB positivado somente no dia 1, SAB positivado no dia 3 ou no dia 5, tendo recebido previamente SAB negativo e, SAB positivado no dia 5, tendo recebido SAB negativo somente no dia 1.

4.5.2 – Soro Anti-rábico

A partir dos resultados obtidos com o SAB, o mesmo esquema foi adotado para SAR, entretanto, um número menor de animais foi utilizado (n=6/grupo).

A administração de SAR positivado após administrações consecutivas do mesmo produto negativo, não apresentou diferença entre as respostas nos diferentes dias (Figura 22).

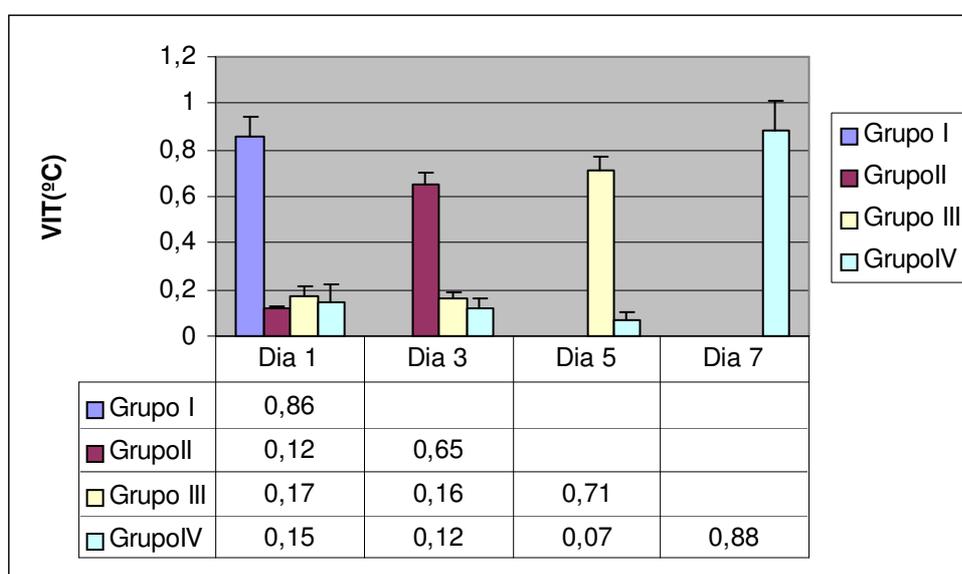


Figura 22 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAR negativo e positivo (n=6).

As respostas do SAR positivado com 1 ng/mL não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, quando testadas pelo método de Kruskal-Walis.

4.5.3 – Soro Anti-tetânico

A administração de SAT positivado após administrações consecutivas do mesmo produto negativo, não apresentou diferença entre as respostas nos diferentes dias (Figura 23).

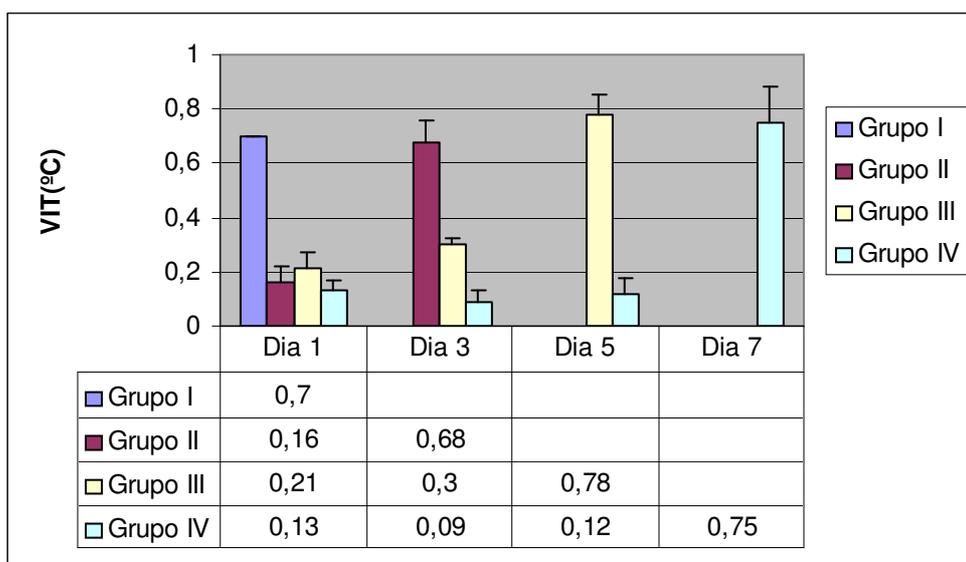


Figura 23 – Gráfico da reutilização de coelhos que receberam SAT negativo e positivo (n=6).

As respostas do SAT positivado com 1 ng/mL não foram estatisticamente significativas nas diferentes situações, quando avaliadas pelo método de Kruskal-Walis.

4.6 – Avaliação de Redução do Custo do Ensaio “in vivo”

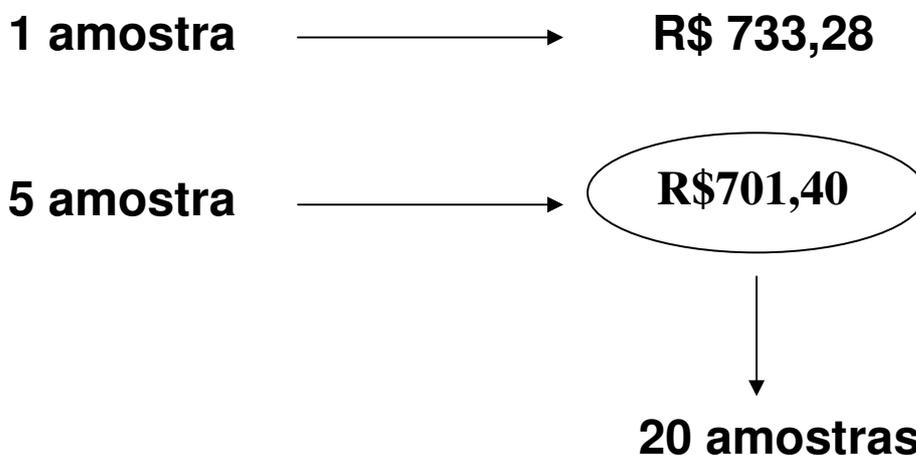
Segundo relatório realizado pela Gestão de Monitoramento de Custos para o INCQS, em outubro de 2005, um ensaio de pirogênio *in vivo* para Soros Hiperimunes custa por amostra R\$ 733,28. Cabe ressaltar, que o cálculo é uma estimativa, já que, o custo por amostra pode diminuir dependendo do número de amostras analisadas no dia e leva em consideração outras variáveis além do preço do animal. No caso de se realizar 5 amostras ao mesmo tempo, o custo fica em R\$ 701,40, uma vez que os gastos fixos (luz, hora-Homem etc) se mantêm constantes.(Tabela 4)

TABELA 4 – Custo de 1 amostra e de 5 amostras. (GEMOC)

IN VIVO	
1 AMOSTRA	R\$ 733,28
5 AMOSTRAS	R\$701,40

Com os resultados obtidos nos experimentos de reutilização dos coelhos para Soro antibotrópico, Soro antirábico e Soro antitetânico é possível reutilizar os mesmos até 4 vezes no período de 7 dias , desde que tenham apresentado resultado negativo .

Analisando por esse ângulo, diante da possibilidade de que com a redução os custos girarão em torno de 25% dos valores atuais, os dados encontrados indicam que 20 amostras realizadas ao mesmo tempo com animais reutilizados custarão os mesmos R\$ 701,40 atuais para 5 amostras.



Se analisarmos os custos somente em termos do valor individual dos animais (R\$ 53,50 para coelhos na faixa de 60 a 100 dias, pesando entre 1500 e 2400g), o teste de pirogênio de uma amostra com 3 animais custa R\$ 160,50. Com esse mesmo valor, com animais reutilizados, seria possível a realização de 4 amostras, significando um custo de R\$ 40,13 por amostra.

5 – Discussão

A curva dose-resposta demonstrou que existe um aumento de temperatura dependente da dose e que os dados encontrados corroboram os descritos na literatura. Hochstein e colaboradores (1990) publicaram os resultados referentes ao estudo colaborativo desenvolvido pela Farmacopéia Americana e o Centro para Avaliação e Pesquisas de Biológicos do FDA, do qual participaram doze laboratórios, e recomendaram, entre outros pontos, a não reutilização do coelho positivo para endotoxina num período de duas semanas e a redução do critério de 0,6°C para 0,5°C. Neste estudo também é ratificado a utilização deste novo critério por refletir o limite da dose pirogênica humana, mostrando que 1 ng/kg (5 UE/kg) é a menor dose que causa febre nos coelhos. A literatura mostra, desta forma, que esse limite é igual para coelhos e humanos (HOCHSTEIN, 1990).

Diante disso, esta dose foi escolhida como parâmetro para nossos estudos, pois, qualquer alteração de resposta nesse nível de dose inviabilizaria a reutilização de animais. Não adiantaria usar doses acentuadamente elevadas, uma vez que estas poderiam não sofrer interferências da reutilização, justamente por provocarem reações pirogênicas significativas. Isto significa dizer que, se não fosse possível identificar a contaminação da amostra com 1ng/kg, estaríamos diante de um quadro falso negativo, o que para um teste de segurança seria extremamente crítico.

A curva dose-resposta nos permitiu, também, identificar a dose de 0,5 ng/kg como não pirogênica, determinando que esta seria utilizada nos estudos em que foi necessário demonstrar que na reutilização de animais não havia exacerbação de respostas levando a uma resposta falso positiva.

Os testes de LAL cromogênico foram utilizados para atestar a potência das soluções-estoque, a partir das quais as diluições usadas para contaminar as amostras eram preparadas. Esporadicamente, estas diluições também eram testadas para garantir que as amostras estavam sendo positivadas corretamente, assegurando que a resposta dos animais não estava sendo afetada por uma dose inadequada.

Existem poucos trabalhos relacionando o LAL à detecção de endotoxinas em produtos biológicos. Alguns artifícios são descritos na literatura buscando minimizar os efeitos no teste dos interferentes ou inibidores presentes nestes produtos (PARK *et al*, 2005, HUSZÁR *et al*, 2002). Um dos principais problemas descritos reside na capacidade da endotoxina de se ligar a proteínas plasmáticas e não ser detectada no LAL já que este só quantifica endotoxina livre. Segundo Park e colaboradores (2005), no caso de vacinas como a Hepatite B além dos componentes protéicos, a interferência do hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) na conclusão do teste é clara. Neste estudo, foi comparado o LAL cromogênico e gelificação ao teste *in vivo* e após várias diluições da amostra e processos de filtração para a retirada do $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi possível detectar apenas a endotoxina pelo teste de gelificação, sugerindo apenas neste caso, o LAL como alternativa ao coelho (PARK *et al*, 2005).

A mesma situação pode ser estendida para os hemoderivados. Estudos com imunoglobulinas mostraram que o LAL de gelificação pode ser aplicado apenas quando utilizado com apropriado inibidor (HUSZÁR *et al*, 2002). No caso de soros hiperimunes não há trabalhos publicados neste sentido, ratificando a importância do teste *in vivo* para estes produtos.

Com a finalidade de demonstrar que o LAL sofre interferência dos soros hiperimunes, foi realizada a dosagem das mesmas amostras contaminadas e que foram injetadas nos coelhos. Os soros positivados administrados aos animais induziram resposta febril, enquanto que os resultados destas soluções quando testadas no LAL cromogênico mostraram resultado negativo. Este fato está em concordância com os dados de literatura, que mostram que o LAL sofre interferências de diversos tipos. Neste caso específico, uma explicação pode estar relacionada com o fato de que o LAL somente detecta endotoxina livre, quando esta se apresenta ligada às proteínas plasmáticas, como no caso dos soros hiperimunes, não ocorre a reação com o substrato, gerando, desta forma, um resultado falso-negativo, pelo menos nesta concentração limite (5UE/mL). No caso de concentrações mais altas de endotoxina, o resultado do LAL poderá até ser positivo, embora corresponda somente à reação com o LPS livre, podendo, no caso de altas contaminações ser insignificante o resultado da fração ligada às proteínas.

Os testes realizados com SAB contaminados com 0,5 e 1,0 ng/mL demonstraram que o teste de pirogênio completo, isto é, realizado seguindo todas as etapas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira, é capaz de diferenciar claramente entre concentrações não pirogênicas e pirogênicas.

Os estudos preliminares que estão em curso em nosso laboratório utilizando a metodologia de liberação de citocinas *in vitro* com o uso do sangue total humano criopreservado têm demonstrado que este método é promissor na determinação do potencial de pirogenicidade de soluções injetáveis. Como os soros hiperimunes não foram objeto da validação deste ensaio, estes produtos estão sendo, agora, foco de experimentação.

Os dados encontrados nestes experimentos mostraram que as mesmas soluções de SAB e SAR administradas aos coelhos do teste *in vivo*, quando diluídos 1:10, recuperaram a capacidade de liberação de citocinas em quantidade semelhante àquela liberada pela solução de cloreto de sódio contaminada com 5 UE/mL, usada como referência de positividade. Este fato vem ratificar achados anteriores usando sangue total humano fresco, de que soros hiperimunes necessitam ser diluídos para evitar a citotoxicidade causada pelo conservante (PRESGRAVE, 2003; PRESGRAVE, 2005).

Esses resultados mostram, ainda, que a resposta positiva do animal ao estímulo pirogênico é refletida na liberação de citocinas *in vitro*, quando comparada com a referência de positividade (solução de NaCl a 0,9% positivada com a concentração limite de 5 UE/mL de LPS de *E. coli*). Dentro do presente estudo, isso mostra uma certa correlação de resultados entre animais e o teste *in vitro*. Em termos gerais, esse fato corrobora a possibilidade do método de liberação de citocinas vir a ser um candidato à substituição dos coelhos no teste de pirogênio *in vivo* (PRESGRAVE, 2003; PRESGRAVE, 2005)

Os resultados da reutilização de animais que receberam SAB positivado sugerem a possibilidade de que os animais possam ser novamente utilizados, uma vez que não houve diferença entre as respostas nos diferentes dias. A ocorrência de elevação ligeiramente superior nos dias 3 e 7 para SAB positivado não alterou o perfil da dose não pirogênica, mostrando que não há risco de resposta falso-positiva.

Tanto SAR quanto SAT positivados apresentaram respostas semelhantes demonstrando que não houve influência das injeções prévias de amostras dos mesmos produtos negativos.

Os resultados apresentados neste estudo para soros hiperimunes corroboram os do estudo apresentado por Bourg (1997) para vacina de hepatite B, onde mostra a possibilidade de reutilizar animais, até um máximo de 4 vezes, no período de uma semana. Segundo estes achados, este fato contribui para reduzir em um terço o número de coelhos utilizados.

Estudos complementares devem ser conduzidos com a finalidade de testar todas as possibilidades de administração prévia de diferentes produtos biológicos. Da mesma forma, deverão ser testados outros soros hiperimunes (soro anticrotálico, soro antibotrópico-crotálico, antiescorpiônico etc) hemoderivados (albumina, fator VIII, fator IX etc) e vacinas (Hepatite B, meningocócica A e C e AC, pneumocócica, *Haemophilus influenza* etc). Ainda falta ser avaliado se é possível a reutilização dos mesmos animais para diferentes produtos e se existe a possibilidade de reutilização dos produtos biológicos, dentro dos 14 dias preconizados pela Farmacopéia Brasileira, no caso de um resultado positivo na primeira administração. No entanto, a importância maior do estudo de reutilização de animais está na avaliação de amostras negativas, uma vez que, historicamente o número de amostras insatisfatórias no teste de pirogênio é muito reduzida, não ultrapassando 2 % do total de amostras analisadas por ano no INCQS.

A possibilidade de reutilização dos animais no teste de pirogênio para os soros hiperimunes cumpre com o preceito de redução dos 3Rs, reduzindo em aproximadamente 70% o número de animais. Desta forma, podemos citar como exemplo o próprio setor de pirogênio onde são utilizados por semana um lote de animais composto por 24 coelhos, do qual, se todos os animais forem considerados aptos no treinamento corresponderiam a 8 produtos avaliados. Se este mesmo lote pode ser utilizado quatro vezes na mesma semana para a mesma classe de produtos, podem ser liberadas até 32 amostras com os mesmos animais, sem a necessidade de solicitar novos coelhos ao CECAL. Portanto, além da questão ética

relacionada a redução e às questões práticas em termos de agilidade de prazos e laudos, isto contribuiria de forma significativa para a redução do custo do ensaio.

Essa agilidade de prazos se refere ao fato de que, uma vez que os animais possam ser reutilizados, a solicitação dos mesmos ao CECAL será menos freqüente, já que os animais ficarão no próprio INCQS em experimentação por um tempo maior. Cabe ressaltar que a utilização repetida desses animais não fere nenhum princípio ético, uma vez que os mesmos não estão submetidos à estresse nem procedimentos doloroso.

A possibilidade de reutilização dos coelhos para soros hiperimunes pode refletir, também, na redução de custos da produção desses produtos significando a médio ou longo prazo uma economia aos cofres públicos relativos à compra dos mesmos para distribuição aos posto de saúde.

Considerando o disposto no parágrafo 2º, do Artigo 28, do Decreto nº 4.725/2003 que define como uma das competências do INCQS o “estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde”, diante dos resultados desse estudo, após a publicação do trabalho científico, será sugerida à Farmacopéia Brasileira a modificação para que se passe a permitir a reutilização de coelhos no teste de pirogênio de soros hiperimunes, pelo menos, dos que foram objeto deste trabalho, até que todas possibilidades estejam concluídas.

Um levantamento recente sobre o número de trabalhos científicos que procuram cumprir o preceito dos 3Rs mostrou que aproximadamente 60% desses trabalhos estão relacionados com a redução do uso de animais, cerca de 30% versam a respeito da substituição, enquanto que 10% tratam do refinamento (Figura 24) (REINHARDT, 2008). Estes números refletem de forma significativa à dificuldade que ainda temos, hoje em dia, de encontramos alternativas que substituam o uso de animais nas diversas áreas da experimentação. Desta forma, o presente estudo se encontra em consonância com esses números apresentados, ou seja, trata do “R” onde se tem maior abrangência de atuação e possibilidade de desenvolvimento ou adaptação metodológica.

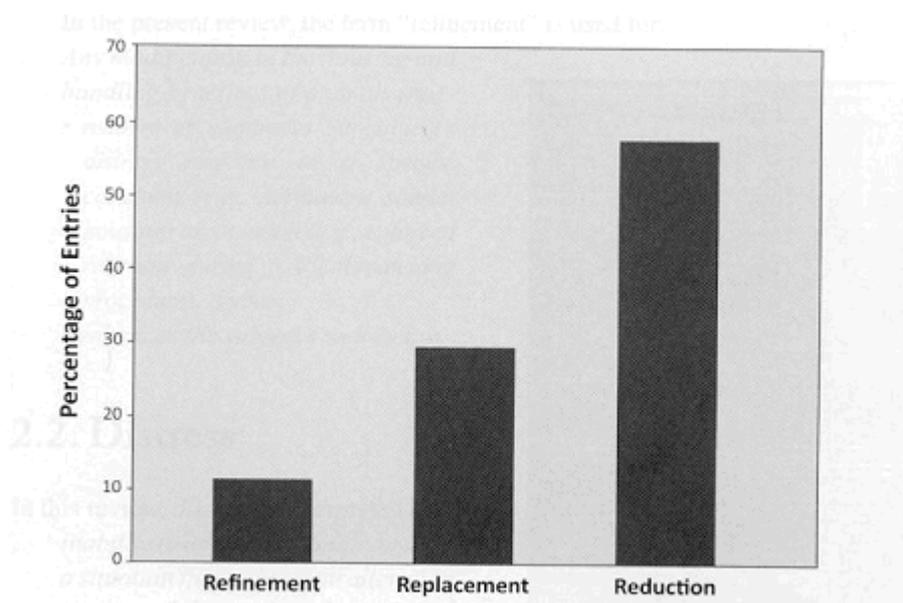


Figura 24 - Resultados de levantamento em base de dados Scirus, usando palavras-chave “Animal Testing Alternatives & Use of Laboratory Animals & Refinement/Replacement/Reduction” em 30/06/2007 (Reinhardt, 2008). Reproduzido com autorização do autor

Assim sendo, até que o uso do método *in vitro* do Sangue Total esteja validado para testar soros hiperimunes, a única forma de seguir os 3Rs é reduzindo o uso de animais no teste de pirogênio através da reutilização de coelhos já submetidos à administração prévia desses produtos que tenham apresentado resultados negativos quanto à pirogenicidade, assim como já é preconizado pelo Farmacopéia Brasileira para outras classes de produtos.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem as seguintes conclusões:

1- No teste de endotoxina (LAL cromogênico) não foi possível detectar a presença de LPS nas amostras de soros hiperimunes previamente contaminadas, comprovando a limitação deste teste para a avaliação de produtos imunobiológicos;

2 – O teste do sangue total criopreservado se mostrou um ensaio promissor para avaliação pirogênica de imunobiológicos, detectando amostras de Soro antibotrópico e Soro anti-rábico positivadas com LPS de *E.coli*;

3 – É possível reutilizar coelhos que tenham recebido Soro antibotrópico, Soro anti-rábico e Soro anti-tetânico até 4 vezes no período de 7 dias, respeitando os intervalos de 48 horas, desde que os mesmos tenham apresentado resultado negativo;

4 – A reutilização poderá ser realizada, mesmo nos casos de repetições com 5 animais (2º teste);

5 – A reutilização de animais permite uma diminuição em até 70% da quantidade de coelhos utilizados;

6 – Como conseqüência da redução de animais, os custos envolvendo a criação e a manutenção destes também sofrerá decréscimo;

7 – Os resultados encontrados permitem sugerir à Farmacopéia Brasileira a modificação da monografia de soros hiperimunes, quanto à recomendação de reutilização dos coelhos no teste de pirogênio.

7 – REFERÊNCIAS

BALLS, M.; GOLDBERG, A.M.; FENTEM, J.H.; BROADHEAD, C.L.; BURCH, R.L.; FESTING, M.F.; FRAZIER, J.M.; HENDRIKSEN, C.F.; JENNINGS, M.; VAN DER KAMP, M.D.; MORTON, D.B.; ROWAN, A.N.; RUSSEL, C.; RUSSELL, W.M.; SPIELMANN, H.; STEPHENS, M.L.; STOKES, W.S.; STRAUGHAN, D.W.; YAGER, J.D.; ZURLO, J.; VAN ZUTPHEN, B.F. The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11. **ATLA**. v. 25, n. 6, nov./dez. 1995.

BEUTLER, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 270, p. 100-120, 2002

BOCHNER, R. Animais peçonhentos. Disponível em <http://www.saude.rj.gov.br/animaispeconhentos/animaispeconhentos.html> [Acesso em 06 abril.2008].

BOURG, V.; ROSA, E., DE LA.; PÉRES J.; MARTELL F.; CORRALES J. Estudio sobre la reutilización de los conejos utilizados para probar productos biológicos en el ensayo de pirógenos. Una alternativa para la reducción de animales. **Anais do I Taller de Ensayos Biológicos**, BioCen, La Habana, Cuba, 1997.

BRASIL. Decreto nº 79.094, 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360 de 23 de janeiro de 1976, que submete ao Sistema de Vigilância Sanitária, os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial [da] [República Federativa do Brasil]**. Brasília, 05 de janeiro de 1977a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] [República Federativa do Brasil]**. Brasília, 24 de agosto de 1977b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 500, de 09 de outubro de 1997. Aprova o regulamento técnico de soluções

parenterais de grande volume – SPGV e seus anexos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 13 out. 1997. Seção 1, p. 22996-23027.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 46, de 18 de maio de 2000. Aprova o regulamento técnico para a produção e controle de qualidade de hemoderivados de uso humano. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 19 mai. 2000. Seção 1, p. 41-47.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, parte II, fascículo 5. 2003

CALDEIRA, C.; GIMENES, I. C.; FREITAS, J. C. B. R.; PRESGRAVE, O. A. F. The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products. **ALTEX**; 22(Special Issue):213, 2005

COCEANI, F.; AKARSUR, E. S. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**; 856:76-82, 1998.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rozenfeld S (org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000

DE RUIJTER, K.; VERHEIJDEN, J. H. M.; VAN LEENGOED, A. M. G.; BERENDS, J. Fever and changes in plasma zinc and iron concentrations in the sow. **J. Vet. Med.**; 35(4):247-251, 1988..

DINARELLO, C. A. Endogenous pyrogens. **Methods Enzymol.**; 163:495-510, 1988.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M. New concepts on the pathogenesis of fever. **Rev. Infectious Disease**; 10(1): 168-189, 1988.

DINARELLO, C. A. The endogenous pyrogens in host defense interactions. **Hosp. Pract. [off.]**; 24(11):111-111, 1989.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens some concepts have changed. **J Endotoxin Res.**;10(4):201-22, 2004.

ECVAM. European Centre for the Validation of Alternative Methods. 2006 [on line] Disponível em <http://www.ecvam.jic.it/>. [Acesso em 28 março.2008]

ENDRES, S.; VAN DER MEER, J. W. M.; DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 17, n. 6, p. 469-474, 1987.

ESTADOS UNIDOS 2007. United State Pharmacopoeia.30.ed Washington,

FREITAS, J. C. R. B. **A importância da realização periódica da curva dose-resposta de LPS como ferramenta para garantir a sensibilidade dos coelhos no Teste de Pirogêno.** 2005 Monografia (Especialização)- Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviço vinculados à Vigilância Sanitária. Fiocruz, Rio de Janeiro,2005.

HAAR, S.; MOGENSEN, S. Function of fever in infectious disease. **Biomedicine**; 28:305-307, 1978.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. **In Vitro Toxicol.**, v. 9, n. 4, p. 353-359, 1996.

HARTUNG, T.; AABERGE, I.; BERTHOLD, S.; CARLIN, G.; CHARTON, E.; COECKE, S.; FENNRICH, S.; FISCHER, M.; GOMMER, M.; HALDER, M.; HASLOV, K.; JAHNKE, M.; MONTAG-LESSING, T.; POOLE, S.; SCHECHTMAN, L.; WENDEL, A.; WERNER-FELMAYER, G. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLA**; 29:99-123, 2001.

HOCHSTEIN, H. D.; MUNSON, T. E.; OUTSCHOORN, A. S. Comparison of rabbit responses of two *E. coli* endotoxin preparations in the USP rabbit pyrogen test. **Pharmacopeial Fórum**, Mar-Apr: 346-351, 1990.

HOFFMANN, S.; LÜDERITZ-PÜCHEL, U.; MONTAG, T.; HARTUNG, T Optimization of testing in parenterals according to different pharmacopoeias by probabilistic modeling. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, n. 1, p. 25 – 31, 2005a.

HOFFMANN, S.; PETERBAUER, A.; SCHINDLER, S.; FENNRICH, S.; POOLE, S.; MISTRY, Y.; MONTAG-LESSING, T.; SPREITZER, I.; LÖSCHNER, B.; VAN AALDEREN, M.; BOS, R.; GOMMER, M.; NIBBELING, R.; WERNER-FELMAYER, G.; LOITZL, P.; JUNGI, T.; BRCIC, M.; BRÜGGER, P.; FREY, E.; BOWE, G.; CASADO, J.; COECKE, S.; DE LANGE, J.; MOGSTER, B.; NAESS, L. M.; AABERGE, I.S.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **J Immunol Methods**; 298(1-2):161-73, 2005b.

HUSZÁR, G.; JENEI, B.; SZABÓ, G.; MEDGYESI, G. A. Detection of Pyrogens in Intravenous IgG Preparations The International Association for Biologicals. Elsevier Science Ltd; **Biologicals**; 30,:77-83, 2002.

INGLATERRA 2004. **British Pharmacopoeia**. 4 Ed, 2004.

INSTITUTO BUTANTAN. Produção de soros, vacinas e biofármacos. [on line] Disponível em: <http://www.butantan.gov.br>. [Acesso em 06 abril.2008].

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil) **Atividades Institucionais** 2001/2004, Rio de Janeiro: 2004

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE.(Brasil). FREITAS, J. C. B. R. In: Ensaio de Pirogênio, **POP nº 65.3330.002**, Rev07, 2007.

LEWIS, G. P. **Mediators of inflammation**. Bristol: IOP Publishing Ltd, 1986

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. M. Circulating Cytokines as Mediators of Fever. **Clinical Infectious Diseases**. v. 31, supl. 178-84, 2000.

MOESBY, L.; HANSEN, Ew.; CHISTENSEN, Jd. Endotoxin testing of proteins for parenteral administration using the Mono Mac 6 assay. **J Clin Pharm Ther.**, v. 25, n. 4, p. 283-289, 2000

PARK C. Y., JUNG S.H., BAK J.P., LEE S.S. Comparison of the rabbit pyrogen test and *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. 2005 The International Association for Biologicals. **Biologicals** 33:145-151,2005

PEARSON, F. C. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and depyrogenation.** New York: Marcel Dekker, 272 p. , 1985.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE A, PINTO S C, DE OLIVEIRA R S (orgs). **Animais de laboratório – criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

PRESGRAVE, O. A. F. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle de qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003 Dissertação (Mestrado)- Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molécula. Fiocruz, Rio de Janeiro.

PRESGRAVE, O. A. F.; SABAGH, F. P.; FARIA, L. F.; CALDEIRA, C.; FREITAS, J. C. B. R.; GIMENES, I. C.; FARIA NETO, H. C. C.; BOZZA, P. T.; DIETERICH, I.; KINDINGER, I.; HARTUNG, T. The use of cytokine release (whole blood assay) for detecting pyrogens in anti-venom sera. **ALTEX**; 22(Special Issue):221, 2005.

POOLE, S.; THORPE, R.; MEAGER, A.; GEARING, A. J. H. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. **Dev. Biol. Stand.**; v.69, p. 121-123, 1988.

REINHARDT, V. **Taking better care of monkeys and apes** 1 Ed.Washington: Animal Welfare Institute, 2008

SAPER, C. B.; BREDER, C. D. The neurologic basis of fever. **New England J Med.**; 330(26): 1880-1886, 1994.

SCHINDLER, S.; SPREITZER, I.; LÖSCHNER, B.; HOFFMANN, S.; HENNES, K.; HALDER, M.; BRÜGGER, P.; FREY, E.; HARTUNG, T.; MONTAG, T. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **J. Immunol. Methods**; 316:42-51, 2006.

SINITOX. Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento, Brasil, 1997 – 2000. [on line] Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/> [Acesso em 06 abril.2008].

WILLIAMS, L. K. **Endotoxins. Pirogens, LAL Testing and Depyrogenation**. 2. Ed. New York : Marcel Dekker, 372 p., 2001.