

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

Izabela Gimenes Lopes

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA DETERMINAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA COM ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM PRODUTOS
INJETÁVEIS**

Rio de Janeiro

2014

Izabela Gimenes Lopes

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA DETERMINAÇÃO
DA CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA COM ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM
PRODUTOS INJETÁVEIS**

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

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Lopes, Izabela Gimenes

Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos na determinação da contaminação pirogênica com ácido lipoteicoico em produtos injetáveis. / Izabela Gimenes Lopes - Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2014.

78 f.,il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2014.

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Bôas

1. Teste de Ativação de monócitos. 2. Teste de pirogênio. 3. Métodos alternativos. 4. Ácido lipoteicoico. 5. Vigilância Sanitária.

Evaluation of Monocyte Activation Test in determining pyrogenic contamination with lipoteichoic acid in injectable products.

Izabela Gimenes Lopes

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS NA DETERMINAÇÃO
DA CONTAMINAÇÃO PIROGÊNICA COM ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM
PRODUTOS INJETÁVEIS**

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

Aprovado em 20/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Helena Pereira da Silva Zamith (INCQS/Fiocruz)

Prof. Dr. Fábio Coelho Amendoeira (INCQS/Fiocruz)

Prof.^a Dra. Cristina Ferreira e Teixeira (UERJ)

Dr.^a Maria Helena Simões Villas Bôas (INCQS/Fiocruz) - Orientadora

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

Sigmund Freud

AGRADECIMENTOS

A Deus toda a honra e glória. Agradeço por estar suprindo todas as minhas necessidades e por me presentear com toda sorte de bênçãos. Pelo dom da vida e possibilidade de completar mais uma etapa em minha carreira, entre elas a conclusão deste trabalho.

Ao meu amado esposo Leonardo Lopes pela compreensão, carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais Emanuel e Lucy pela educação e lição de vida: nunca desistir, sempre continuar e avançar, e irmãos Filipe e Davi pelo incentivo.

Ao Tio João Bittencourt pela revisão do Inglês.

A minha orientadora Maria Helena Simões Villas Bôas, e Octavio Augusto F. Presgrave e Cristiane Caldeira da Silva por colaborarem com a orientação, confiando a mim este tema.

Aos meus colegas de trabalho João Carlos Borges Rolim de Freitas (Profeta), Edmilson Souza, Adigerson Ferreira Pires da Costa pelo apoio na rotina do setor.

Aos colegas Ronald Santos Silva, por todos os momentos de apoio e força, Taline Conde, Clarice Canto, Renata Calil e Creuza Ribeiro pelo incentivo.

Aos bolsistas do laboratório Mayara Barreto pelo auxílio nos testes, José Mário (in memorian), Vanessa Lira, Drielli Braga e Douglas Emidio pelo apoio nesta jornada.

A amiga Vanessa Melandri pela inestimável amizade e apoio de todas e para todas as horas.

Giselaine La Rosa pelo apoio psicológico nos momentos necessários.

Aos colegas da biblioteca do INCQS em especial Alexandre Medeiros pela atenção e ajuda nas pesquisas e bibliografias.

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

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação do INCQS.

Ao ex-chefe de departamento Fernando Faria Fingola pela liberação para realizar este curso.

Ao Dr. Wlamir Correa de Moura pela colaboração na análise estatística.

Ao Dr. Fábio Coelho Amendoeira pela colaboração como revisor desta dissertação.

Aos participantes da banca examinadora.

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

RESUMO

O teste de detecção de pirogênio é preconizado nas farmacopeias como teste de segurança imprescindível para a avaliação da qualidade de produtos injetáveis. Os métodos alternativos ao teste de pirogênio em coelhos são o Teste de Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL) e o Teste de Ativação de Monócitos (MAT). Esses métodos ainda não podem substituir o teste em coelhos por completo, pois no caso do LAL os resultados podem não ser confiáveis quando a análise é realizada na presença de algumas substâncias interferentes com alto teor de lipídios e proteínas (encontrados nos medicamentos biológicos) e glucanas, além disso, o teste só detecta endotoxinas. Em relação ao MAT, já que o teste é sensível para todos os tipos de pirogênios e tem o mesmo mecanismo biológico responsável pela reação de febre em humanos, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) recomendou sua utilização desde que fique demonstrada a equivalência de seus resultados ao teste em coelhos, em conformidade com a regulamentação aplicável. Verifica-se assim, que a literatura carece de dados que envolvam a comparação entre a dose limite que causa febre em coelhos e a correspondência para o MAT relacionado ao ácido lipoteicóico (ALT), sendo assim, esse estudo tem como objetivo principal avaliar a utilização do MAT na detecção da contaminação de ALT de *S. aureus* em Cloreto de Sódio 0,9 % a pirogênico artificialmente contaminado, através do estabelecimento de curva dose-resposta de ALT em coelhos; curva concentração-resposta de ALT para o MAT e avaliação em paralelo dos resultados obtidos utilizando ALT no teste em coelhos, LAL cromogênico e MAT. A resposta de febre foi observada a partir de 75.000 ng de ALT/Kg nos coelhos e no MAT para sangue criopreservado/IL-1 β foi estabelecida em 50.000 ng/mL de ALT, ou 5,41 UEE/mL. O teste de LAL apresentou resultado falso-reativo a partir de 10.000 ng/mL de ALT. Os resultados apresentados neste estudo fornecem informações importantes sobre a comparação entre o teste de pirogênio em coelhos, MAT e LAL, contribuindo com dados para a validação do MAT, envolvendo outros pirogênios que não a endotoxina, e também para a aceitação deste teste pelos órgãos regulatórios no Brasil visando uma possível substituição do uso de animais, garantindo, assim, a segurança da saúde da população.

Palavras-chave: Teste de Ativação de monócitos. Teste de pirogênio. Métodos alternativos. Ácido lipoteicóico. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The pyrogenic test is preconized in the Pharmacopeias as a safety test indispensable for the quality of evaluation of injectable products. The alternative methods to the rabbit pyrogen test are the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test and the Monocyte Activation Test (MAT). These methods cannot replace the rabbit test completely yet, for in the case of LAL the results may not be reliable when the analysis is carried out in the presence of some interfering substances with high content of lipids and proteins (found in biological medicines) and glucans, moreover, the test only detects endotoxins. Concerning the MAT, since the test is sensitive to all types of pyrogens and has the same biological mechanism responsible for the fever reaction in humans, the *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos - ICCVAM) have recommended its utilization provided that the equivalence of its results from the rabbit test, in conformity with the applicable regulation. It can be verified, then, that the literature lacks the data which involves the comparison between the limit dose that causes fever in rabbits and the consequence for the MAT related to the lipoteichoic acid (LTA), that being so, the aim of this study is mainly the utilization of MAT in the detection of the contamination of LTA of *S. aureus* in apyrogenic 0.9 % Sodium Chloride artificially contaminated, through the establishment of the dose-response curve of LTA in rabbits; concentration-response curve of LTA for the MAT and parallel evaluation of the results obtained by utilizing LTA in the test in rabbits, chromogenic LAL and MAT. The fever response was observed from 75.000 ng of LTA/Kg in rabbits and in MAT and for cryopreserved blood/IL-1 β was established in 50.000 ng/mL of LTA, or 5,41 UEE/mL. The LAL test presented a false-positive result from 10.000 ng/mL of ALT. The results presented in this study provide important information on the comparison between the rabbit pyrogen test, MAT and LAL, contributing with data to the evaluation of MAT, involving pyrogens other than endotoxin, and also to the acceptance of this test by the regulatory organs in Brazil aiming at a possible animal substitution, and guaranteeing, then, the health security of the population.

Key-words: Monocyte Activation Test. Pyrogen test. Alternative methods. Lipoteichoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sequência de fotos do teste de pirogênio em coelhos	30
Figura 2	Extração do sangue do <i>Limulus polyphemus</i> (Caranguejo-Ferradura)	34
Figura 3	Representação esquemática do Teste de Ativação de Monócitos	37
Figura 4	Esquema de diluição da curva-padrão de IL-1 β	50
Figura 5	Curva dose-resposta de Ácido Lipoteicoico de <i>S. aureus</i> em coelhos	57
Figura 6	Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de diferentes concentrações de ALT de <i>S. aureus</i> por ELISA em sangue criopreservado	58
Figura 7	Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de diferentes concentrações de LPS de <i>E. coli</i> O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado	59
Figura 8	Equivalência das diferentes concentrações de ALT de <i>S. aureus</i> para as Unidades de Endotoxina (UEE/mL)	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resumo do procedimento do Teste de Ativação de Monócitos para sangue criopreservado	50
Quadro 2	Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão do Kit LAL Cromogênico <i>End Point</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etapas do procedimento do Teste de Endotoxina Bacteriana.	54
Tabela 2	Média da Variação Individual de Temperatura dos coelhos nas doses de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000; 500.000 ng de ALT/kg (<i>S. aureus</i>), com erro padrão.	57
Tabela 3	Leituras apresentadas pelas diferentes concentrações de ALT utilizadas no LAL Cromogênico <i>End Point</i> (controle negativo; ALT de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/mL).	62
Tabela 4	Resultados apresentados pelo Teste de pirogênio em coelhos, Teste de Ativação de Monócitos para sangue crio/IL-1 β e pelo LAL Cromogênico <i>End Point</i> para avaliação do Ácido Lipoteicóico de <i>S. aureus</i> .	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ALT	Ácido Lipoteicóico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BET	<i>Bacterial Endotoxin Test</i> (Teste de Endotoxina Bacteriana)
BRACVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Teste de Imunoabsorção Enzimática)
EUA	Estados Unidos da América
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)

Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
°C	Graus Celsius
Hb	Hemoglobina
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i> (Linhagem monocítica humana derivada de leucemia monocítica aguda)
HSA	<i>Human Serum Albumin</i> (Albumina Humana Sérica)
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> (Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos)
IFN- α	Interferon – alfa
IL-8	Interleucina – 8
IL-10	Interleucina -10
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL- 6	Interleucina-6
LPS	Lipopolissacarídeo
LP	Lipoproteína
LAL	Lisado de Amébócitos de <i>Limulus</i>
μ L	Microlitro
mL	Mililitro

MM6	Mono Mac-6 (Linhagem celular monocítica humana)
MAT	<i>Monocyte Activation Test</i> (Teste de Ativação de Monócitos)
ng	Nanograma
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (Instituto Nacional de Saúde)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Receptores de Reconhecimento Padrão)
PG	Peptideoglicano
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
pg	Picograma
PVC	Policloreto de Vinila
pH	Potencial Hidrogeniônico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
Kg	Quilograma
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	<i>Toll Like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
UE	Unidade de Endotoxina
UEE	Unidades Equivalentes de Endotoxinas
USP-NF	<i>United States Pharmacopeia – National Formulary</i> (Formulário Nacional da Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
VIT	Varição Individual de Temperatura
WB	<i>Whole Blood</i> (Sangue Total)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 PIROGÊNIOS.....	20
1.1.1 Endotoxinas	23
1.1.2 Ácido lipoteicóico.....	24
1.2 TESTE DE PIROGÊNIO EM COELHOS.....	27
1.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE PIROGÊNIO EM COELHOS.....	32
1.3.1 Teste de endotoxina bacteriana.....	33
1.3.2 Teste de ativação de monócitos.....	36
1.4 JUSTIFICATIVA.....	43
2 OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 METODOLOGIA	45
3.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ALT EM COELHOS.....	45
3.1.1 Animais.....	45
3.1.2 Preparo das soluções de ALT.....	46
3.1.3 Procedimento do ensaio	46
3.2 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS.....	47
3.2.1 Preparação das soluções de LPS	47
3.2.2 Preparação das soluções de ALT para o MAT.....	48

3.2.3 Obtenção do sangue dos doadores.....	48
3.2.4 Criopreservação do sangue total	49
3.2.5 Contato do sangue criopreservado com as concentrações de ALT ou LPS.....	49
3.2.6 Dosagem de citocinas (Interleucina-1 β).....	50
3.2.7 Cálculo das unidades equivalentes de endotoxinas (UEE).....	51
3.3 TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA	52
3.3.1 Preparo da curva-padrão	52
3.3.2 Procedimento do ensaio.....	53
3.3.3 Cálculo da concentração de endotoxina.....	54
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS	56
4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ALT EM COELHOS.....	56
4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DE ALT PARA MAT.....	58
4.3 TESTE DE LAL PARA O ALT.....	61
4.4 AVALIAÇÃO EM PARALELO DOS RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO ALT NOS TESTES DE PIROGÊNIO EM COELHOS, LAL CROMOGÊNICO E MAT.....	62
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Lei Orgânica da Saúde (Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990, Art. 6º. § 1º), compete ao Sistema Único de Saúde a execução de ações de vigilância sanitária definida por “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).

O artigo 28 do Decreto nº 4.725, de 9 de junho de 2003, que regulamenta o Estatuto da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) estabelece que “ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) compete planejar, coordenar, supervisionar e executar atividades de: I. Controle da qualidade de produtos para consumo humano, compreendendo alimentos, medicamentos, sangue e hemoderivados, imunobiológicos, cosméticos, saneantes, reativos para diagnósticos, equipamentos e artigos de saúde em geral; II. Estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde (SUS); III. Capacitação de profissionais em sua área de competência para o sistema de saúde e de ciência e tecnologia do país; IV. Promoção de ações regulatórias em parceria com o órgão de vigilância sanitária; e V. Assessoria técnica, como unidade de referência, à rede nacional de laboratórios de controle de qualidade em saúde” (BRASIL, 2003, INCQS, 2009).

Assim, para o cumprimento de seu papel no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), o INCQS realiza as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária somente para o poder público, principalmente por denúncias e por programas com instituições do SNVS. Entre as ações de vigilância sanitária está a realização de análises analítico-laboratoriais, que têm como objetivo principal fornecer subsídios aos órgãos competentes para elucidar dúvidas quanto a desvios dos padrões de qualidade dos produtos (INCQS, 2009).

Entre os produtos destinados ao consumo humano, os injetáveis são um dos que oferecem grande risco ao usuário, já que por definição esses produtos devem ser preparações estéreis e apirogênicas destinadas à administração parenteral (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

Em 1657, Christopher Wren foi o primeiro a injetar uma droga, processo utilizado rotineiramente mais tarde pelo médico inglês Johan Major em 1662. Nesta época, o fato foi referido como "cirurgia infusora". No início de 1800, Gaspard realizou experimentos com a injeção de extratos pútricos em cães. Stanislas Limousin inventou a ampola em 1886 e Charles Pravex de Lyon propôs a seringa hipodérmica em 1853 (WILLIAMS, 2007).

A via parenteral, também chamada de injetável, foi utilizada pela primeira vez, de maneira sistemática, em 1853, na terapêutica humana pelo médico Alexander Wood, quando administrou injeção de morfina em seus pacientes, dando origem a diversos acidentes infecciosos. Assim, surgem como exigências da via parenteral, a necessidade de utilização de medicamentos estéreis, e de soluções aquosas com pH e tonicidade compatíveis com os tecidos onde são aplicados (GUIA, 2014).

A Sociedade Médica e Cirúrgica de Londres aprovou a injeção hipodérmica de morfina em 1867, como o primeiro medicamento injetável oficialmente reconhecido, que apareceu pela primeira vez no adendo de 1874 da Farmacopeia Britânica de 1867, e em 1888, na primeira edição do Formulário Nacional dos Estados Unidos (WILLIAMS, 2007).

O início do progresso de terapia injetável foi desacelerado pela ocorrência de febre e outros sintomas associados com a forma ainda primária do processo de produção parenteral. Martindale e Wynn propuseram técnicas de fabricação para procedimentos assépticos de salvarsan (primeira substância projetada para combater micróbios na história), no mesmo ano em que Hort e Penfold estavam descrevendo o agente ativo na produção de febre (endotoxina bacteriana) (WILLIAMS, 2007).

O conceito de esterilidade foi introduzido no início da fabricação parenteral, na nona revisão da USP, em 1916. As únicas soluções parenterais incluídas nesse momento foram de água destilada, solução de hipófise e solução de cloreto de sódio. O primeiro compêndio oficial a preconizar o ensaio de esterilidade de drogas administradas pela via parenteral foi a Farmacopeia Britânica 32, em 1932. E na Farmacopeia Americana em 1936, (USP 11 – NF VI), com 26 monografias de drogas parenterais (WILLIAMS, 2007).

Com o desenvolvimento das soluções farmacêuticas parenterais, no início de 1900, surgiu um problema associado chamado "febre de injeção". Acreditavam que a

febre que acompanhou as primeiras injeções era devido à via de administração (pela resposta do organismo quando picado pela agulha), em vez de ser vista como um contaminante da droga e, portanto, foi designada por "febre de injeção". Em 1912 Hort e Penfold publicaram vários estudos conclusivos incluindo microrganismos e sua relação com a febre. Os autores estudaram o material tóxico originado somente de bactéria Gram-negativa, onde a contagem microbiana da atividade pirogênica em água destilada da bactéria morta foi tão pirogênica quanto da bactéria viva. Hort e Penfold foram os primeiros a desenhar e padronizar o teste de pirogênio em coelhos. Eles concluíram que uma substância bacteriana estável ao calor era a razão mais provável da "febre de injeção". O trabalho de Hort e Penfold foi, em grande parte, negligenciado até 1923, quando Florence Seibert explorou as causas da pirogenicidade em água destilada, e concluiu que a contaminação bacteriana foi de fato a causa da conhecida "febre de injeção". Outros estudos investigaram que a bactéria Gram-negativa possuía um complexo de alto peso molecular, chamado de "complexo de endotoxina" responsável pela toxicidade, pirogenicidade e resposta imunológica, além de elucidar vários fatores que afetam a severidade da resposta incluindo a dose, a espécie hospedeira infectada, a espécie da bactéria na qual a infecção foi derivada, e do modo de entrada. Rademaker confirmou as descobertas de Seibert e salientou a importância de se evitar a contaminação bacteriana em cada etapa da produção farmacêutica, ressaltando que a esterilidade não garante a apirogenicidade. Em 1942, foi introduzida na Farmacopeia Americana, o primeiro teste oficial de pirogênio em coelhos para garantir a apirogenicidade de soluções parenterais (WILLIAMS, 2007).

A eficácia da via parenteral de administração necessita de um nível de limpeza que se aproxima do absoluto, caso contrário, se o medicamento que foi projetado para trazer vida ao paciente for introduzido no corpo com contaminação, poderá ocasionar efeitos adversos, como, infecção, febre, choque ou morte, sendo considerado um grave problema de Saúde Pública (WILLIAMS, 2007, SCHINDLER et al, 2009).

Devido ao risco associado de contaminação, a produção dos medicamentos injetáveis deve atender a parâmetros descritos na legislação envolvendo entre outros a determinação de volume, da esterilidade, da ausência de pirogênio, além de

outras exigências previstas nas monografias individuais de cada produto (ANVISA, 2008).

1.1 PIROGÊNIOS

Os médicos gregos consideravam a febre como um agente terapêutico e não como uma patologia. Parmênides (500 a.C.) e Rhupos de Épheso (100 d.C.) compartilhavam do conceito de que, se a febre pudesse ser produzida artificialmente, certamente poderia curar grande parte das doenças. A ideia de que a febre tinha valor terapêutico perdurou por séculos e foi reforçada por dois eventos subsequentes. Primeiro pela indução do efeito de febres experimentais através da injeção intravenosa de material pútrido em animais, e em segundo lugar, pela preparação altamente pirogênica feita a partir das células mortas de *Salmonella typhosa*, utilizada como vacina tifóide (PEARSON, 1985).

Em 1862, Billbroth, foi provavelmente o primeiro pesquisador a usar o termo pirogênio (do grego *pyro* que significa “fogo” e *gênesis* que significa “criar ou resultar”) sendo, portanto, adequado para designar qualquer substância que tenha a capacidade de induzir reações febris (PEARSON, 1985, SCHINDLER et al, 2009). A partir de então, muitos autores usaram este termo em diversos trabalhos e este fenômeno foi muito estudado. Durante a última parte do século XIX, von Jauregg começou investigações abrangentes para determinar o valor da terapia de febre. E recebeu o prêmio Nobel de medicina em 1927 por seus estudos fundamentais com a febre (PEARSON, 1985).

A temperatura corporal normal, que pode variar ao longo do dia em até 0,5 °C em adultos é controlada pela região pré-óptica do hipotálamo anterior, considerado o maior centro termorregulador do Sistema Nervoso Central (SNC). No caso da infecção por microrganismos, pode ocorrer o desencadeamento de uma série de acontecimentos que, finalmente, aumentam o ponto de ajuste do corpo para produzir febre. Quando o centro termorregulador permite um aumento do limite máximo de temperatura corporal, o hipotálamo ativa o Sistema Nervoso Simpático para induzir vasoconstrição, aumento da atividade do músculo esquelético ou aumento

insensível do tônus muscular, como fracos tremores para aumentar o metabolismo das células (ZOMORRODI; ATTIA, 2008, OGOINA, 2011).

Os pirogênios podem ser classificados com base no seu local de produção em exógenos (produzidos fora do corpo e indutores de elevações térmicas quando injetados em humanos e animais) e endógenos (produzidos dentro do hospedeiro). Classes gerais de pirogênios exógenos compreendem bactérias, vírus e fungos, parte deles ou seus produtos, como as toxinas. E também não microbianos como alguns fármacos. Pirogênios endógenos são principalmente citocinas pirogênicas (classe de imunopeptídeos), incluindo as Interleucina 1 β (IL1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interferon- α (IFN- α) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) (HARTUNG et al, 2001, HOFFMANN et al, 2005a, OGOINA, 2011) . Em particular, a família de sinalização do sistema imune inato, conhecido como Toll Like receptors (*Toll Like receptors - TLR*) tem providenciado grandes avanços na determinação do mecanismo infeccioso. Os receptores tipo Toll funcionam como receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptor – PRR*) presentes nos macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns - PAMP*), os quais são expressos em um amplo espectro de agentes infecciosos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus e fungos (OGOINA, 2011).

Os TLRs juntos com os receptores de IL-1 são conhecidos como uma super família denominada “Receptor de Interleucina-1/Receptor Toll-Like”; e têm em comum um domínio chamado TIR (*Toll/IL-1 receptor*). Os receptores Toll-Like 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, de modo que eles contêm domínios intracelulares, devido à presença de proteínas adaptadoras do tipo TIR e extracelular (repetições ricas em leucina), enquanto que os receptores Toll-Like 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente, ou seja, nos endossomos e não possuem domínio extracelular. O domínio TIR é requerido para iniciar a geração dos sinais intracelulares, visto que a proteína MyD88 está presente em todos os receptores, exceto no TLR3. As proteínas adaptadoras do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) através de uma cascata de sinalização atuam então na transdução de sinal com ativação de proteinoquinases e consenquente ativação do fator de transcrição NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) o

qual é translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas e moléculas de adesão. Em outros casos, envolvem co-receptores como MD2 e CD14 onde a partir de uma cascata de sinalização ativam IRF3 o qual vai para o interior do núcleo e induz a produção de genes para a produção de Interferon α e β (MEDZHITOV et al., 1997, KOPP; MEDZHITOV, 2003).

Alguns receptores Toll-Like funcionam aos pares de modo que esta associação forma um receptor. O dímero TLR1-TLR2 reconhece os PAMPs de bactérias gram-positivas, incluindo lipoproteínas (LP), lipopeptídeos, peptideoglicanos (PG) e o ácido lipoteicoico (ALT). A associação TLR2-TLR6 é responsável pelo reconhecimento do ácido lipoteicoico da parede de bactérias gram-positivas. TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas e a proteína F de alguns vírus (DINARELLO, 2004).

As citocinas (pirogênos endógenos ou intrínsecos) a partir da via NF- κ B podem agir por ativação da via de ciclo-oxigenases levando à transformação do ácido aracádônico em prostaglandinas (PGE₂) nas membranas citoplasmáticas. A prostaglandina E₂ é uma pequena molécula que facilmente atravessa a barreira hematoencefálica ligando-se a receptores específicos (EP₃) ativando neurônios na área pré óptica do hipotálamo a elevar a temperatura corporal desencadeando mecanismos de produção e conservação de calor, resultando na febre (DINARELLO et al., 1988, OGOINA, 2011). 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 (COX) (DINARELLO, 2004).

A temperatura do corpo pode variar também sem a ação de microrganismos invasores na corrente sanguínea, como no caso da hipertermia. Suas causas estão relacionadas à exposição em ambientes com temperatura elevada, falha no mecanismo de regulação da temperatura corporal em dissipar o calor (transpiração e a vasodilatação), prática excessiva de atividade física, desidratação, consumo de medicamentos como barbitúricos e anfetaminas, etc. Os sintomas da hipertermia são suor intenso, confusão mental, câimbras, náuseas, vômitos e perda de coordenação.

Não são muitos os pacientes que sobreviveram mais do que alguns dias ou semanas, com temperaturas superiores a 41,7 °C. O tratamento deve ser realizado com técnicas de resfriamento corporal, incluindo cobertores de refrigeração, imersão

em água gelada, utilizar sacos de gelos entre as virilhas, axilas e pescoço, lavagem gástrica e intraperitoneal com fluidos frescos, etc. (ZOMORRODI; ATTIA, 2008).

1.1.1 Endotoxinas

As endotoxinas bacterianas são lipopolissacarídeos complexos de alta massa molecular ($\sim 10^6$ Da) que constituem a parede celular de bactérias Gram-negativas e constituem a principal fonte de pirogênio exógeno encontrada em produtos injetáveis de uso veterinário e humano para a indústria farmacêutica. Endotoxinas não purificadas podem conter lipídeos, carboidratos e proteínas. A denominação de lipopolissacarídeo é aplicada à forma química pura da endotoxina, para enfatizar a sua natureza química (PINTO, 2010). O LPS é formado pelo núcleo polissacarídico, ao qual se liga a cadeia O-antigênica e a unidade lipídica A, que é responsável pelas propriedades pirogênicas. É caracterizado como uma molécula anfifílica (hidrofílica e lipofílica), resistente ao calor e muito estável a variações de pH (SCHAUMBERGER et al, 2014). O LPS é bem estabelecido como o principal componente imunoestimulatório da resposta inflamatória desencadeada por microrganismos *in vivo* e *in vitro* desde 1950, sendo capaz de causar choque séptico letal (MORATH; GEYER; HARTUNG, 2001, DEININGER et al, 2008).

A sua forma purificada e biologicamente ativa foi demonstrada desde 1952 e seu principal ativo, o lipídio ancorado - lipídio A, foi comprovado quase 30 anos depois por síntese química em 1985. Mais de 45 mil artigos científicos listados no sistema *Medline* desde 1966 descrevem a atividade biológica do LPS (MORATH et al, 2002b).

Por meio de um processo de esterilização pode-se eliminar todos os microrganismos viáveis. Porém, em relação a um produto, como a obtenção da esterilidade de qualquer unidade isolada, vinculada a um lote produzido, não pode ser garantida e nem demonstrada, verifica-se a esterilidade de um lote em termos probabilísticos por meio de um processo de produção adequadamente validado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010c).

Devido à característica termoestável da endotoxina, esta não é inativada de forma eficaz pelos processos de esterilização amplamente utilizados, como exemplo o calor úmido a 121 °C/15 min. Assim, a endotoxina pode ser eliminada através de processos de despirogenização submetendo-se o produto ao calor seco em temperatura acima de 250 °C por 30 minutos (SCHINDLER et al, 2009, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b). Em produtos termossensíveis pode ser realizada a inativação da endotoxina por tratamentos químicos, como: hidrólise ácida, oxidação com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, periodato de sódio, permanganato de potássio diluído, alquilação com anidrido acético e succínico, ou mesmo óxido de etileno, a radiação ionizante e o tratamento com o antibiótico polimixina B. Outros processos levam a remoção da endotoxina, como a exclusão pelo tamanho físico através da ultrafiltração, remoção por troca iônica, ou agregação, seguido por filtração (WILLIAMS, 2007).

1.1.2 Ácido lipoteicóico

Mesmo depois de 50 anos, após a elucidação do LPS como principal estrutura de bactérias Gram-negativas que causa a ativação do sistema imune humano, o seu homólogo para as bactérias Gram-positivas ainda permanece em debate (ROCKEL; HARTUNG, 2012).

Entretanto, os sintomas provenientes da contaminação por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são semelhantes e não podem ser distinguidos clinicamente (MORATH et al, 2002a, DRAING et al, 2008, DEININGER et al, 2008). Recentemente, a importância de bactérias Gram-positivas na patogênese da sepse foi enfatizada e o ácido lipoteicóico, presente em quase todas as bactérias Gram-positivas, tem sido sugerido como o principal representante imunoestimulatório (MORATH; GEYER; HARTUNG, 2001, MORATH et al, 2002a, MORATH et al, 2002b, DRAING et al, 2008). Alguns autores o tem descrito como o equivalente não estrutural à endotoxina de Gram-negativas (MORATH, et al, 2002a, MORATH et al, 2002b).

Apesar dos avanços médicos no tratamento de infecções bacterianas, a frequência das infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* vem crescendo consideravelmente, sendo esse o microrganismo infectante mais comum em crianças nos EUA, com quadros graves de sepse, tornando ainda mais complicado o tratamento devido ao surgimento de espécies resistentes aos antibióticos (MORATH; GEYER; HARTUNG, 2001, THIEMERMANN, 2002, ROCKEL; HARTUNG; HERMANNA, 2011, MALONEY, 2013).

Porém, a natureza química do agente causador de febre em bactérias Gram-positivas ainda carece de maior compreensão, já que aproximadamente 90% da parede celular dessas bactérias é composta por peptidoglicano. O PG é um polímero, que fornece resistência e forma a parede da célula bacteriana (THIEMERMANN, 2002, CARVALHAL; ALTERTHUM, 2004).

Na parede celular de bactérias Gram-positivas são também encontrados ácidos teicóicos e proteínas que podem representar 50% da massa seca dessa parede. Esses ácidos incluem todos os polímeros formados por resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster, sendo encontrados tanto na parede celular, quanto na membrana plasmática da célula. Os ácidos teicóicos são divididos em dois tipos: os ligados ao peptidoglicano e ácidos lipoteicóicos, que apesar de serem encontrados ao longo da parede celular, apresentam-se intimamente ligados à fração lipídica da membrana plasmática (CARVALHAL; ALTERTHUM, 2004).

Morath, Geyer e Hartung (2001) verificaram através de um novo procedimento de isolamento do ALT de *S. aureus*, que os substituintes alaninas da molécula são essenciais para a atividade imunoestimulatória do ALT. Esses substituintes eram perdidos durante o procedimento padrão de isolamento utilizado anteriormente. Quando adequadamente purificado (>99% de pureza como indicado pela Ressonância Magnética Nuclear), o ALT foi capaz de induzir uma resposta de liberação de TNF- α no sangue total humano similar a do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (MORATH; GEYER; HARTUNG, 2001). Em 2002, Morath e cols. concluíram que a estrutura apresentada em 2001 representava, de fato, uma molécula imunoestimuladora. Esta descoberta indicou que o lipídio âncora do ALT na membrana, representa um componente-chave para sua atividade biológica. A molécula sintética exibiu uma atividade estimulatória semelhante à molécula isolada da bactéria quando em contato com sangue total

humano na liberação de TNF- α , demonstrando ter os requisitos estruturais essenciais para a ativação imune. Os autores sugerem que o lipídio âncora do ácido lipoteicóico seja nomeado como “lipídio B” em analogia ao nome “lipídio A” do LPS (MORATH et al, 2002b).

Diferentemente da endotoxina, para o ALT, até a década passada, não existiam muitos estudos abordando a resistência química e física dessa molécula, incluindo a resistência ao calor da atividade pirogênica de bactérias Gram-positivas, e esse fato estaria relacionado à inexistência de métodos quantitativos *in vitro* disponíveis que pudessem mensurar essa atividade. O teste de pirogênio em coelhos até então seria a única alternativa, porém devido aos custos elevados de execução, não seria amplamente utilizado na pesquisa (MOESBY et al, 2005).

Moesby e cols. (2005) publicaram um estudo abordando a esterilização por calor seco e úmido, envolvendo microrganismos Gram-positivos como *S. aureus* e *Bacillus subtilis* na liberação de IL-6 pela linhagem celular Mono Mac 6 (MM6). Foi demonstrado que no processo de esterilização por calor úmido, preconizado pela Farmacopeia Europeia (121 °C ou 134 °C/15 min), envolvendo *B. subtilis* ocorria redução da capacidade pirogênica da bactéria, enquanto que para *S. aureus* houve aumento da atividade nessas condições, mesmo quando foi empregado um tempo maior de exposição (60 min) (MOESBY et al, 2005). Segundo Moesby e cols. (2008) os procedimentos de esterilização por calor úmido convencional (121 °C/15 min e 134 °C/3min) não seriam capazes de inativar a atividade pirogênica de ALT e de PG de *S. aureus*. No entanto, depois de 160 min a atividade pirogênica do ALT foi removida tanto em 121 °C quanto em 134 °C. Porém, o mesmo resultado não foi observado para PG. Os autores relataram que estudos complementares devem ser realizados para compreender o efeito sinérgico com outros pirogênios (MOESBY et al, 2008).

Há evidências de que a sinergia entre o ALT e o PG pode causar choque e falência múltipla dos órgãos em roedores e porcos. É interessante apontar que a insuficiência circulatória causada pela administração concomitante de ALT e PG também é significativamente maior do que a causada pela administração dos mesmos separadamente, na liberação de TNF- α , IL-6 e IL-10 no sangue total humano (THIEMERMANN, 2002). Rockel, Hartung e Hermann (2011) demonstraram que o PG altamente purificado, a partir de três cepas de *S. aureus*, em contraste

com ALT, apresentou uma atividade muito baixa na liberação de citocinas TNF- α , IL-8 e IL-10 no sangue total humano.

Rockel e Hartung (2012) realizaram um estudo de revisão sistemática para a existência de evidências sobre a real natureza estrutural do pirogênio das bactérias Gram-positivas. A avaliação foi baseada no critério de Koch–Dale para mediador de efeito. Para os três principais componentes da parede celular (ALT, PG e LP bacteriana), supostamente envolvidos com essa atividade, foram encontrados 380 artigos para PG, 391 para LP e 285 para ALT, sendo que apenas 12, 8 e 24, respectivamente, conseguiram preencher todos os critérios de inclusão. Baseado nas melhores evidências disponíveis atualmente e reunidas pelos autores, ALT é a única substância que preenche todos os critérios de inclusão, pois já foi isolado de várias bactérias, resultando na liberação de citocinas, e essa indução também foi verificada pelo uso de ALT sintético. Contudo, os autores não excluem a possibilidade que outros componentes estimulatórios possam complementar ou mesmo substituir o ALT (ROCKEL; HARTUNG, 2012). Porém, os problemas centrais referentes a pirogênios não-endotoxinas seriam: o grau de pureza das preparações de ALT testadas; a dúvida se as contaminações menores com os outros componentes da parede celular são de fato responsáveis pela ativação imune; a ausência da ampla disponibilidade em forma pura (comercial) e a ausência de materiais de referência (HASIWA et al, 2013).

1.2 TESTE DE PIROGÊNIO EM COELHOS

Em meados de 1920, Seibert completou uma série de estudos clássicos, concluindo que a “febre de injeção”, terminologia da época que estava associada à via de administração intravenosa, era resultado de um produto bacteriano filtrado, estável ao calor, comumente referido como pirogênio (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007). Para detectar a presença ou ausência de reações febris causadas pelas suas soluções teste, Seibert selecionou o coelho como sendo o modelo animal a ser testado, uma escolha que foi posteriormente provada como sendo acidental. Desde então, várias outras espécies foram testadas para a resposta febril quando se

injetava pirogênio bacteriano. Macacos, cavalos, cães e gatos, assim como os coelhos reproduziram uma resposta de febre similar a do homem. Em outros animais como ratos, cobaias, camundongos, hamsters e galinhas a resposta ao pirogênio foi irregular, imprevisível e inadequada para investigação da febre. Por razão de conveniência e economia, a seleção final do animal modelo para pirogênio ficou com o cão e o coelho (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007).

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 testar a 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 (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007).

No início de 1930, soluções de dextrose e salina (parenterais de grande volume) foram avaliadas pela primeira vez 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, 2007).

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 Farmacopeia Americana (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007). Então, em 1941, o Comitê de Revisão da Farmacopeia Americana (*The United States Pharmacopeia – 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, em colaboração com a Divisão de Bacteriologia da agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration – FDA*) e o Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health - NIH*) em 14 produtores farmacêuticos. Os resultados destes estudos, publicados em 1943, levaram a incorporação do primeiro método oficial para detecção de pirogênio na 12ª edição da Farmacopeia Americana em 1942 (PEARSON, 1985, WILLIAMS, 2007).

O teste de pirogênio em coelhos se baseia na reação fisiológica do animal. O produto a ser testado é injetado na veia marginal da orelha dos animais (**Figura 1**). O parâmetro do ensaio que determina a contaminação é a resposta por elevação da temperatura no animal (febre), a qual possui as mesmas características da febre humana (WILLIAMS, 2007, HOCHSTEIN; MUNSON; OUTSCHOORN, 1990, PINTO, 2010).

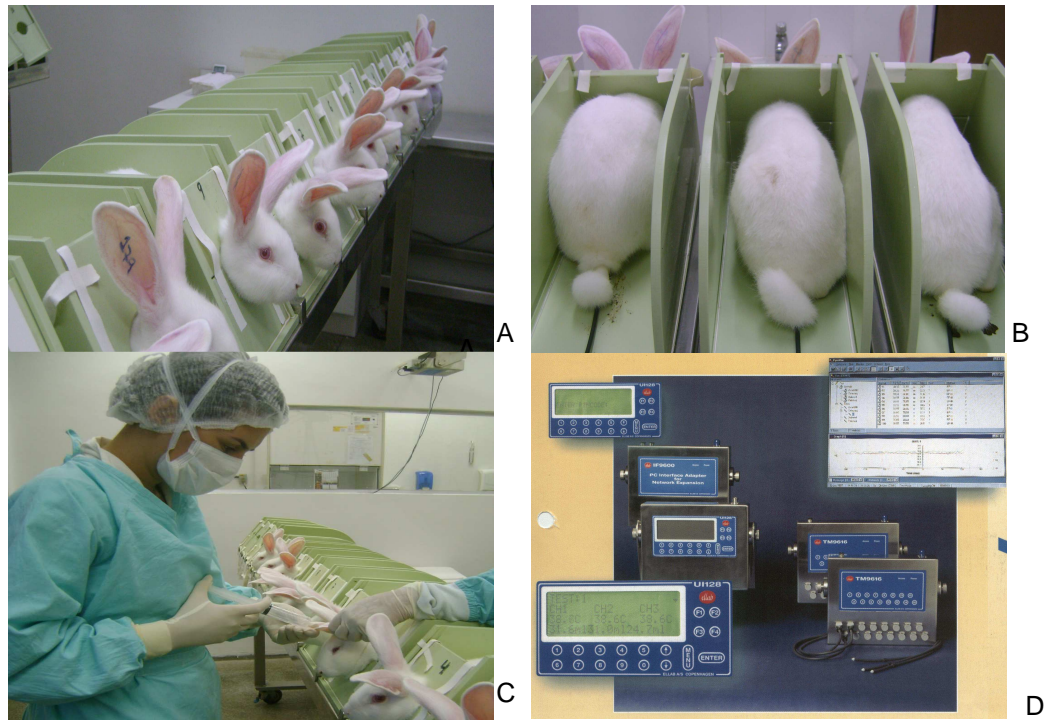
Em 1971, o teste de pirogênio foi publicado na segunda edição da Farmacopeia Europeia (FE). A metodologia da Farmacopeia Europeia não sofreu alterações até o momento (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1971, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2011).

Em 1976, o teste de pirogênio em coelhos foi publicado pela primeira vez na Farmacopeia Brasileira, 3ª edição.

Em 1990 a Convenção dos Estados Unidos da América (EUA) publicou um estudo colaborativo com 12 laboratórios com objetivo de comparar a resposta do teste de pirogênio em coelhos frente a dois padrões de referência de endotoxinas de *Escherichia coli*. Esse estudo demonstrou que para refletir o limiar humano da dose pirogênica de 5,0 UE/kg ou 1,0 ng de *E. coli* (O55:B5)/Kg seria necessária a mudança do critério de alteração da temperatura corporal dos coelhos de 0,6 °C para 0,5 °C, alterando o intervalo de detecção da temperatura do teste de 1 hora para 30 minutos durante o período de 3 horas (HOCHSTEIN; MUNSON; OUTSCHOORN, 1990). Este limiar foi confirmado em um estudo realizado no Instituto Paul-Ehrlich, que incluiu 171 coelhos (HOFFMANN et al, 2005b). Apesar de algumas modificações, o fundamento do método permanece o mesmo desde sua oficialização.

Apenas em 2001, a Farmacopeia Americana (USP 24/NF19 - *United States Pharmacopeia – National Formulary*) modificou os critérios de avaliação 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, alterando o intervalo de detecção da temperatura do teste para 30 min durante o período de 3 horas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2001).

Figura 1: Sequência de fotos do teste de pirogênio em coelhos. No INCQS, os animais são colocados em gaiolas de contenção (A), os eletrodos são colocados no reto do animal (B) e o produto é injetado na veia marginal da orelha (C). O registro das temperaturas é realizado pelo equipamento *Pyromon*® ELLAB, durante o período de três horas (D).



Em 2003, a Farmacopeia Brasileira incorporou as mesmas mudanças de critérios da Farmacopeia Americana, no fascículo 5 da 4ª edição (2003), seguindo desta mesma forma até os dias de hoje (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1976, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b).

Desta forma, a obrigatoriedade do uso do teste de pirogênio em coelhos principalmente para produtos biológicos, ainda consome um grande número de animais, e a reutilização dos mesmos é definida por diferentes farmacopeias por um período de segurança definido (SPREITZER et al, 2002). A Farmacopeia Brasileira 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, como os não biológicos (parenterais de grande volume, onde não há restrição quanto à reutilização). Entretanto, quando os coelhos receberem um

produto biológico, só é permitida uma única administração (FREITAS, 2008, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b). Porém já existem alguns estudos sobre a reutilização de animais quando usados produtos biológicos apresentando bons resultados (FREITAS, 2008, NOGUEIRA, 2009, FREITAS et al, 2011).

É interessante também abordar, que as farmacopeias diferem no número máximo de animais utilizados por ensaio, número de etapas do teste, assim como no critério de aceitação do produto. De acordo com Lopes (2011) as diferenças metodológicas podem gerar incertezas nas avaliações dos protocolos de acordo com o país em que o produto foi fabricado e interferem na interpretação dos resultados (LOPES, 2011). A necessidade de harmonização entre os métodos das farmacopeias é evidente, permitindo a otimização do projeto experimental, com a finalidade de promover a proteção animal (TSCHUMI, 2003, HOFFMANN et al, 2005b, LOPES, 2011).

O teste “clássico” em coelhos é caro, pois envolve toda a estrutura e manutenção de um biotério, demanda tempo para execução da análise e envolve a variabilidade fisiológica dos animais utilizados. Também é ressaltada principalmente a questão ética, quanto ao uso de animais, pois é uma questão atual em debate e envolve a pressão de grupos protecionistas quanto a não utilização de animais na ciência; além da necessidade da extrapolação interespecie a partir dos coelhos para os seres humanos. No entanto o método é capaz de detectar todos os tipos de pirogênio endotoxinas e não-endotoxinas (ICCVAM, 2008).

Porém, o futuro para o teste de substâncias injetáveis livres de pirogênio direciona para métodos alternativos ao uso de animais, já disponíveis em farmacopeias, até que estes possam substituir por completo o teste *in vivo* (ICCVAM, 2008).

1.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE PIROGÊNIO EM COELHOS

Nos últimos anos, o movimento liderado por grupos protecionistas contrários ao uso de animais em pesquisa tem crescido largamente, assim como as campanhas contra a utilização de animais de laboratório têm obtido espaço na mídia, motivando a busca por métodos de análise alternativos. Porém esta questão é muito antiga. No século XIX, Jeremy Bentham, já demonstrava preocupação em proteger os animais com a frase “a questão não é se os animais raciocinam ou se eles podem falar, mas, se eles sofrem”. Em 1842, surge a primeira sociedade protetora dos animais, a *British Society for the Prevention of Cruelty to Animals*, mais tarde denominada *Royal Society for the Preventions of Cruelty to Animals* – Sociedade Real para Prevenções contra Crueldade em Animais (PRESGRAVE, 2002, PRESGRAVE; BOZZA; CASTRO FARIA NETO, 2003, PRESGRAVE, 2009).

A publicação do livro *The principles of humane experimental technique* pelos cientistas Russel e Burch (1959) contribuiu para o início das pesquisas em alternativas ao uso de animais, e implementou no meio científico os princípios éticos da experimentação animal, o princípio dos 3Rs – *reduction, refinement and replacement* - que significa a **redução** do número de animais em experimentos, aprimoramento ou **refinamento** de técnicas para minimizar o sofrimento, mantendo o bem-estar animal e o uso de alternativas para a **substituição** de métodos *in vivo* por *in vitro* (BALLS, 2009).

Esse conceito evoluiu como uma tendência mundial quanto a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no árduo trabalho de validação de métodos alternativos na área de toxicologia (PRESGRAVE, 2009).

De acordo com o Decreto n°. 6.889, de 15 de julho de 2009, que regulamenta a Lei de n°. 11.794 de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), a qual estabelece procedimentos para o uso científico de animais, também conhecida como “Lei Arouca”, métodos alternativos são definidos como: “procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que:

a) não utilizem animais;

- b) usem espécies de ordens inferiores;
- c) empreguem menor número de animais;
- d) utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou
- e) diminuam ou eliminem o desconforto”.

Os métodos alternativos farmacopeicos ao teste de pirogênio em coelhos são: o Teste de Endotoxina Bacteriana (*Bacterial Endotoxin Test – BET*) e o Teste de Ativação de Monócitos (*Monocyte Activation Test - MAT*). Porém estes métodos ainda não podem substituir o teste em coelhos por completo, pois o Teste de Endotoxina Bacteriana possui limitações referentes ao tipo de produto analisado, já que apresenta interferência na presença de glucanas e de produtos com alto teor de lipídios e proteínas, como os biológicos, além disso, é ineficaz na detecção de pirogênios que não sejam endotoxinas. Em relação ao MAT, apesar do teste detectar todos os tipos de pirogênios, apresenta a necessidade de validação dos produtos que não foram contemplados nos estudos de validação para endotoxinas desde que fique comprovada a equivalência ao teste em coelhos. Além disso, existe uma ausência de dados que comprovem a capacidade do MAT detectar pirogênios não-endotoxinas (ICCVAM, 2008).

1.3.1 Teste de endotoxina bacteriana

O Teste de Endotoxina Bacteriana refere-se a uma série de testes que detectam endotoxina de bactéria Gram-negativa, baseados na reação da endotoxina com o lisado das células sanguíneas (amebócitos) do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus* ou do variante japonês *Tachypleus tridentatus*.

Também é conhecido como teste do Lisado do Amebócito de *Limulus* (LAL). Esse animal pertence ao Filo Arthropoda (Subfilo Chelicerata, Classe Merostomata, Subclasse Xiphosura) (STORER; USINGER, 1979), mantendo características de aracnídeo e de crustáceo, sendo considerado um fóssil vivo, pois possui mais de 440 milhões de anos. É uma espécie importante, tanto para o seu lugar central no ecossistema e para a sua utilização em aplicações biomédicas (CHARLES RIVER LABORATORIES, 2013).

Os animais são retirados da natureza (costa do Oceano Atlântico dos Estados Unidos até o Golfo do México) ou de cativeiros. Para preparação do lisado os caranguejos são contidos para a sangria (retirada da hemolinfa), introduzindo-se uma agulha através do músculo entre as regiões céfalo-torácica e abdominal. Após este procedimento são retornados ao mar (**Figura 2**). Nos Estados Unidos, este procedimento causa morte de cerca de 30.000 *Limulus* por ano, o que aumenta as ameaças da população de caranguejos, tais como isca para pesca, perda de habitat e poluição (HOFFMANN et al, 2005a, SCHINDLER et al, 2009, BACHINSKI et al, 2010).

Figura 2: Extração do sangue do *Limulus polyphemus* (Caranguejo-Ferradura).



Fonte: <http://historiasnaturais.wordpress.com/2012/01/31/sangue-real/>. Acesso em 24/06/2012.

O teste passou a integrar a Farmacopeia Americana em 1980. No Brasil, foi incluído na 4^a. edição da Farmacopeia em 1996 (MELANDRI et al, 2010). Diversos métodos de LAL foram desenvolvidos ao longo do tempo, entretanto, os mais utilizados na rotina de laboratórios oficiais e indústrias são os de gelificação (*gel-clot*) e colorimétrico (cinético e *end-point*) (PEARSON, 1985).

Na realidade o teste de LAL não é considerado como um substituto total do teste em coelhos, pois, somente detecta endotoxina, e contaminações por outros pirogênicos que poderiam causar sinais clínicos graves em pacientes não são detectáveis por este teste (MARTIS et al, 2005, HUANG et al, 2009). Também

possui limitações bem documentadas, incluindo a suscetibilidade às interferências com certos tipos de materiais com alto teor de lipídios, proteínas e glucanas (ICCVAM, 2008). Nos produtos biológicos, tais como soros hiperimunes, vacinas e hemoderivados, a endotoxina se liga às proteínas plasmáticas do produto, não sendo detectada no teste, que só quantifica endotoxina livre (SPREITZER et al, 2002, SCHINDLER, et al, 2003, SCHINDLER, 2009). Alguns produtos podem provocar a reação de gelificação da endotoxina pela indução de uma cascata de várias enzimas, pois estas substâncias podem também conter alto peso molecular relativo, visto que são constituídas de várias unidades repetidas de moléculas de baixo peso molecular, muitas são também polissacarídeos (PEARSON, 1985).

No caso das glucanas, sabe-se que (1,3)- β -D-glucana entra na via de formação do coágulo ativando o Fator G, em vez de ativar o Fator C como as endotoxinas. Os amebócitos do *Limulus* em contato com endotoxinas bacterianas degranulam e liberaram zimogênios envolvidos na via de formação do coágulo. Esses zimogênios tornam serinaproteases ativas de duas maneiras: por endotoxinas (lipopolissacáridos) de bactérias Gram-negativas que ativam o Factor C, ou por (1,3)- β -D-glucanas que ativam o Factor G. Ambos os eventos de ativação resultam na formação de coágulos, ou seja, *coagulogen* é clivada para *coagulin* pela enzima de coagulação. Baseado neste conhecimento, as principais empresas produtoras de kits comerciais para endotoxina desenvolveram kits para (1,3)- β -D-glucana. A Associação da *Cape Code* – ACC desenvolveu o *GLUCATELL® Kit* e a Charles River, o *Endosafe®-PTS™ Glucan Assay* baseados na alteração da via do LAL. A inclusão de um substrato cromogênico peptídeo no reagente permite a quantificação espectrofotométrica do *proclotting* da enzima ativada. O reagente não reage com outros polissacáridos, incluindo beta-glucanas com diferentes ligações glicosídicas (ASSOCIATES OF CAPE COD, 2014, CHARLES RIVER LABORATORIES, 2014).

Portanto, para os produtos biológicos, ainda deve ser realizado o teste em coelhos (SPREITZER et al, 2002). Dessa forma, quando o teste foi oficializado pela Farmacopeia Americana, recebeu o nome de Ensaio de Endotoxina, refletindo melhor a sua finalidade (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

Entretanto, para produtos em que não se pode utilizar o teste em coelhos, como radiofarmacêuticos e hipnóticos (drogas que promovem sono), deve ser aplicado o Teste de Endotoxina Bacteriana (PEARSON, 1985).

Existem três técnicas para este teste: gelificação - técnica que se baseia na formação de gel; turbidimétrico – baseado no desenvolvimento de turbidez após a clivagem de um substrato endógeno; cromogênico Cinético e *End Point* - baseado no desenvolvimento de cor após o tempo de reação da clivagem de um complexo peptídeo-cromógeno (UNITED STATES PHARMACOPOEIA., 2009).

O teste do LAL pelo método cromogênico *End Point* utiliza a parte inicial da reação endotoxina/LAL para ativar uma enzima, que por sua vez, libera p-nitroanilina (pNA) de um substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA produzindo uma coloração amarela:

1- Pró-enzima + endotoxina → Enzima

2- Substrato + água + enzima → Peptídeo + pNA

A endotoxina da bactéria Gram negativa catalisa a ativação de uma pró-enzima no LAL. A via de ativação inicial é desta forma, determinada pela concentração de endotoxina ali presente. A enzima ativada catalisa a formação da p-nitroanilina (pNA) a partir da descoloração do substrato Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. A pNA transformada é medida fotométricamente no comprimento de onda de 405 nm (nanômetros) durante o período de incubação. A concentração de endotoxina em uma amostra é calculada a partir do seu tempo de reação em comparação ao tempo de reação de uma solução padrão contendo uma quantidade conhecida de endotoxina (LONZA, 2011).

1.3.2 Teste de ativação de monócitos

A busca por métodos alternativos ao uso de animais levou ao estudo de metodologias baseadas no princípio da febre, que pudessem substituir o teste clássico em coelhos. O MAT é utilizado para detectar ou quantificar possíveis contaminantes presentes na amostra, que quando em contato com monócitos do sangue humano, induzem a liberação de citocinas (principalmente IL-1 β , IL-6 e TNF-alfa), que têm um papel na patogênese da febre. Esse processo de liberação pode ocorrer a partir de monócitos de diferentes origens como do sangue humano fresco ou criopreservado, de células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral blood*

mononuclear cell - PBMC) ou de cultura de linhagens celulares monocíticas (MM-6). As citocinas liberadas são medidas por kits comerciais através de um ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) (**Figura 3**) (HARTUNG et al, 2001, CALDEIRA et al, 2005, PRESGRAVE; BOZZA; CASTRO FARIA NETO, 2003, SCHINDLER et al, 2009, EUROPEAN FARMACOPOEIA, 2010).

Figura 3: Representação esquemática do Teste de Ativação de Monócitos.



Fonte: Adaptado de: <http://www.pharmaceuticalint.com/article/pyrodetect-system.html>. Acesso em 24/06/2012.

A liberação de citocinas pró-inflamatórias pode ser iniciada no sangue total humano depois de 2-3 horas (atingindo um *plateau* por volta de 8 horas), porém por razões práticas, é utilizado o tempo de incubação médio de 16-24 horas (HOFFMANN et al, 2005a, MONTAG et al, 2007).

Poole e cols. (1988) descreveram a primeira demonstração da aplicação da liberação de citocinas *in vitro* através do “teste do monócito”, em comparação com os ensaios em coelho e do LAL. Nesse método, monócitos em cultivo (MM-6) foram submetidos à presença de endotoxinas de diversas origens, sendo que as citocinas

liberadas (IL-1 β e TNF) foram dosadas mostrando uma boa relação concentração-resposta (MELANDRI et al, 2010). A partir da publicação do “teste de monócito” nessa pesquisa, outros trabalhos foram desenvolvidos no sentido de melhor estudar a liberação de citocinas em diferentes cultivos de monócitos e sua relação com os ensaios em coelhos e LAL (POOLE, et al, 1988, PRESGRAVE; BOZZA; CASTRO FARIA NETO, 2003, MELANDRI et al, 2010).

A utilização de células PBMC foi demonstrada em 1990 por Hansen e Christensen, como um indicador sensível de contaminação por endotoxina. Resultados promissores indicaram que, além de sensível, o método com PBMC para IL-1 β , era capaz de detectar endotoxinas e bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) sendo considerado como um modelo substitutivo quando comparado ao LAL e o teste em coelhos (MELANDRI et al, 2010).

Taktak e colaboradores (1991) também demonstraram o desenvolvimento de um método de pirogênio *in vitro* com base na liberação de IL-6 a partir de células MM6. Três lotes de Albumina Humana Sérica (HSA) que causaram febre em humanos foram positivos no método MM6/IL-6, enquanto que as mesmas substâncias foram negativas no LAL e no teste de pirogênio em coelhos. Os autores sugerem que o método MM6/IL-6 representa uma alternativa importante e pode ser um teste de produto final mais adequado para testar a detecção de agentes pirogênicos em produtos parenterais, tais como HSA, que não podem ser detectadas no LAL e no teste em coelhos nas condições experimentais avaliadas (ICVAM, 2008, MELANDRI et al, 2010).

Entre 1996 e 1997, Eperon e cols. desenvolveram um sistema de teste *in vitro* para medir substâncias pirogênicas utilizando dois clones derivados da linhagem celular MM6 (MM6-2H8 e MM6-4B5) e um da linhagem celular THP-1 (THP-1G3). Estes clones são referidos como sendo fenotipicamente mais estáveis ao longo do tempo no que diz respeito à sua capacidade de resposta superior à endotoxina do que as linhagens de origem. A resposta de endotoxina foi medida através da liberação de TNF- α utilizando imunoensaio. Os autores sugerem que estes métodos de ensaio à base de clones de linhagens celulares monocíticas são válidos em alternativas *in vitro* para a detecção de endotoxina em preparações comerciais, e produzem resultados comparáveis ao teste em coelhos e ao LAL (ICCVAM, 2008, MELANDRI et al, 2010).

Em 1998, Poole e cols. descreveram um estudo utilizando sangue total para a detecção de pirogênicos em produtos sanguíneos a partir da liberação de IL-6, em resposta a endotoxina de *E. coli* e também a células íntegras de *E. coli* e *Bacillus subtilis* (Gram-positiva). Houve uma variação considerável na liberação de IL-6 entre os doadores após a exposição à endotoxina, mas cada resposta manteve o mesmo perfil. Os produtos foram avaliados pelo método de sangue total em comparação com o LAL e com o teste em coelhos, encontrando boas correlações. Os autores concluíram que o ensaio de sangue total foi capaz de detectar tanto a bactéria Gram-negativa quanto bactéria Gram-positiva e apresentou uma maior sensibilidade a endotoxina do que o teste em coelhos (ICCVAM, 2008).

Segundo ICCVAM, em 1994, Bleeker e cols. verificaram a liberação de IL-6 a partir de células PBMC como um indicador de pirogenicidade em testes *in vitro* de soluções de hemoglobina (Hb). Os autores demonstraram que a hemoglobina polimerizada pura, produzida sob condições assépticas, não induz ou inibe a produção de IL-6, enquanto que a produzida sob condições não assépticas levou a liberação de IL-6, o produto também foi testado pelo LAL. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a liberação de IL-6, a partir de PBMC, forneceu um indicador sensível de contaminação de endotoxinas em soluções de Hb. Os autores sugerem que este método poderá ser mais sensível à presença de endotoxina do que o teste em coelhos (ICCVAM, 2008).

Em 2001, Hartung e cols. apresentaram um relatório resumido de um *workshop* patrocinado pelo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) para revisar a situação atual dos testes de pirogenicidade, analisar a capacidade dos novos testes de pirogênio *in vitro*, e para fornecer recomendações para o seu desenvolvimento continuado. A necessidade de métodos alternativos para o teste de pirogênio em coelhos e o LAL foi discutida, e as suas respectivas limitações foram destacadas. O *workshop* comparou a utilidade dos vários métodos (*in vitro*, LAL e o teste em coelhos) para testar uma variedade de pirogênios. As conclusões do *workshop* indicaram a necessidade de métodos alternativos para resolver as limitações do LAL e do teste em coelhos mas destacou a necessidade de validação apropriada de qualquer novo método (ICCVAM, 2008, MELANDRI et al, 2010).

Em 2002, Nakagawa e cols. descreveram um sistema baseado na liberação de citocinas a partir de um subclone de células MM6 (MM6-CA8) e compararam essa resposta ao sangue total e ao teste em coelhos. Os autores sugeriram que as células MM6-CA8 são capazes de detectar uma variedade de pirogênios usando IL-6 como marcador, e que essas respostas são altamente relevantes para a previsão das reações em humanos (MELANDRI et al, 2010).

Em 2003, Andrade e cols. avaliaram a utilização de PBMC humanas e Sangue total humano (*Whole Blood* - WB) diluído comparados as respostas obtidas no LAL e no teste de pirogênio em coelhos para produtos farmacêuticos de uso parenteral e produtos biológicos. Os autores concluíram que ambos os métodos PBMC e WB foram comparáveis ao LAL e ao teste em coelhos na capacidade de detectar e quantificar a presença de endotoxinas. Além disso, o método de teste WB foi capaz de detectar a liberação de IL-6 em resposta a exposição de WB para pirogênios não-endotoxinas, como *Candida albicans* e *S. aureus* (ICCVAM, 2008).

Estudos também já demonstraram que é possível determinar a contaminação pirogênica em soros hiperimunues pelo método do sangue total, desde que estes sejam diluídos 1:10 (PRESGRAVE; BOZZA; CASTRO FARIA NETO, 2003, PRESGRAVE et al, 2005).

Um dos problemas que poderiam ser gerados com o uso do teste de sangue total seria a necessidade de se buscar doadores cada vez que se necessitasse realizar o ensaio. Entretanto, o ensaio foi otimizado com o desenvolvimento do procedimento de criopreservação apresentado por Schindler e cols. (2004) no qual o sangue poderia ser utilizado imediatamente após o descongelamento, sem etapas de lavagem. A criopreservação tornou o ensaio mais seguro em relação às questões de biossegurança, já que possibilita em tempo hábil testar possíveis contaminações de agentes infecciosos consequentemente aumentando a confiabilidade da resposta dos monócitos, além de facilitar o transporte e o armazenamento das amostras (SCHINDLER et al, 2004, MELANDRI et al, 2010).

Hoffmann e cols. (2005a) publicaram um estudo de validação usando 13 drogas (parenterais de grande volume e alguns medicamentos, principalmente antibióticos) e seis testes *in vitro* realizados em dez laboratórios. Os testes validados foram: PBMC/IL-6; WB/IL-1 β , WB/IL-6, MM6 IL-6, THP-Neo/TNF α e THP/TNF α . Comparado com o teste em coelhos, os novos testes são mais sensíveis, bem como

de menor custo e prazo. Em contraste com o LAL, todos os testes foram capazes de detectar pirogênios de origem Gram-positiva. Os dois sistemas de ensaio, baseados no uso de células THP-1, apresentaram problemas no desempenho e foram retirados do estudo. No entanto, os dados obtidos para os outros quatro sistemas de teste sugerem claramente que estes se encontravam numa fase de desenvolvimento que os tornariam adequados para utilização em testes de pirogênio como substitutos ao teste em coelhos (HOFFMANN et al, 2005a, MELANDRI et al, 2010).

Após o processo de validação do sangue fresco em 2005, o uso do teste para o sangue criopreservado foi validado internacionalmente (validação por captura), em 2006, por meio de um método simples de congelamento do sangue humano para a dosagem de IL-1 β . Na validação do sangue criopreservado foram utilizados os mesmos produtos da validação do sangue fresco (SCHINDLER et al, 2006, ICCVAM, 2008, MELANDRI et al, 2010).

O ECVAM apresentou ao Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM*) um documento para revisão do status de validação dos cinco métodos: Sangue total humano (*Whole Blood - WB*) / IL-1 β ; Sangue total humano WB/IL-1 β com aplicação do sangue criopreservado, Sangue total humano WB/IL-6, Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)/IL-6 e a linhagem celular Mono Mac 6 (MM6)/IL-6 com a intenção de combinar um sistema de ensaio *in vitro* que reunisse a sensibilidade do LAL com a ampla gama de pirogênios detectáveis pelo teste em coelhos, com o objetivo de substituir o teste *in vivo*. Contudo, apenas a endotoxina foi incluída no estudo de validação, pois foi considerada: sua capacidade em responder as células monocíticas; por ser utilizada na realização do LAL e pelo fato de sua resposta ser bem documentada para o teste em coelhos. Devido a razões éticas e legais o teste em coelhos não foi realizado em paralelo com as substâncias testadas dos estudos de validação, foram utilizados apenas informações dos dados históricos (ICCVAM, 2008).

Em 2008 o ICCVAM publicou um documento sobre o estado de validação desses cinco métodos propostos para avaliação de potencial de pirogenicidade dos produtos farmacêuticos e outros produtos, recomendando que, embora nenhum desses cinco métodos possa ser considerado como um substituto completo para o teste *in vivo*, podem ser utilizados para detectar endotoxinas. Além disso,

recomendou o uso para cada produto específico de uso parenteral, desde que fique demonstrada a equivalência ao teste *in vivo* em conformidade com a regulamentação aplicável, apontando para a necessidade de novos esforços de validação para os produtos que ainda não foram validados (ICCVAM, 2008; SCHINDLER et al, 2009, MELANDRI et al, 2010, ROCKEL; HARTUNG, 2012). Todas as agências federais aplicáveis, incluindo o FDA, aceitaram ou aprovaram as mesmas recomendações (FDA, 2009, ICCVAM, 2009, STOKES; WIND, 2010).

Estes métodos foram também adotados pela Comissão da Farmacopeia Europeia em março de 2009 (STOKES; WIND, 2010). Em 2010, os cinco ensaios de liberação de citocinas foram aceitos pela Farmacopeia Europeia com o nome de “Teste de Ativação de Monócitos” (Monografia 2.6.30) (EUROPEAN FARMACOPOEIA, 2010). A Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency* - EMEA) incentiva a substituição do teste em coelhos por testes alternativos, como LAL ou MAT em produtos médicos derivados do plasma (EMEA, 2009). O MAT também encontrou reconhecimento em países como o Japão, Brasil e Cuba (HASIWA et al, 2013).

O guia mais recente, FDA 2012, reconhece que para medicamentos de uso humano e animal, algumas monografias da USP ainda exigem o teste de pirogênio em coelhos. Entretanto, este mesmo documento aceita que, mesmo quando há a exigência do teste *in vivo*, este poderá ser substituído por um método alternativo desde que seja submetido à validação apropriada, mostrando atingir resultados equivalentes ou melhores em comparação com o método padrão (coelhos). O FDA deverá considerar o MAT, tomando por base caso-a-caso (FDA, 2012).

As avaliações são dificultadas devido a não existência de consenso sobre a natureza estrutural de outros pirogênios de bactérias Gram-positivas, de fungos e de vírus pirogênicos. Também não existem materiais de referência para tais. Não existem trabalhos sobre pirogênios não-endotoxinas relacionando a indução de febre em coelhos e humanos. Os testes de segurança de produtos são de extrema importância, sendo essa a maior preocupação das agências reguladoras e dos fabricantes. Por isso, muitas leis, regulamentos e documentos de orientação, nacionais e internacionais, estão sendo publicados para garantir que apenas os produtos que foram submetidos a testes de segurança adequados alcancem o mercado e o consumidor (HASIWA et al, 2013).

1.4 JUSTIFICATIVA

De acordo com o relatório do ICCVAM, o MAT foi recomendado para avaliação da endotoxina em produtos validados. Para os produtos sem o estudo de validação, deverá ser realizado um estudo caso a caso. É mencionado também que o potencial do método em detectar endotoxina em produtos biológicos e dispositivos médicos ainda não foi avaliado. Desta forma, nenhum dos cinco métodos *in vitro* discutidos anteriormente foi considerado como um substituto completo do coelho ou do LAL para detecção de endotoxina (ICCVAM, 2008). Por isso, o uso de animais ainda é necessário para a maioria dos produtos avaliados.

Além disso, os estudos de validação possuem informações limitadas para outros pirogênios, faltando dados na literatura de estudos que envolvam a indução de febre em coelhos e humanos, por pirogênios não-endotoxinas, como o ALT. Não existem estudos que abordem a correspondência entre o teste *in vivo* e o MAT, empregando o ALT. Para que o MAT possa substituir o teste *in vivo*, os estudos com ALT devem ser submetidos à validação apropriada, ou seja, deverá ser realizada uma avaliação em paralelo desses resultados frente ao método padrão (coelhos).

Assim os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir com a elucidação de pontos importantes para a aplicabilidade do MAT para o ALT. Esse estudo deve ser considerado como um piloto, que tem o objetivo maior, através do estabelecimento de estudos colaborativos, fornecer dados para os órgãos reguladores brasileiros (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos - BRACVAM), e possibilitar definitivamente num futuro próximo a substituição do uso de animais de laboratório.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização do Teste da Ativação de Monócitos na detecção da contaminação de ácido lipoteicóico em produtos injetáveis.

2.2 Objetivos específicos

- a) estabelecer curva dose-resposta de ALT em coelhos;
- b) estabelecer curva concentração-resposta de ALT pelo método do MAT;
- c) verificar a resposta do LAL cromogênico para ALT;
- d) avaliar em paralelo os resultados obtidos utilizando ALT no teste em coelhos, no LAL cromogênico e no MAT.

3 METODOLOGIA

3.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ALT EM COELHOS

3.1.1 Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Foram utilizados 65 coelhos adultos albinos, da raça Nova Zelândia, sadios e de peso corpóreo mínimo de 1,5 kg, mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, sendo fornecido feno como enriquecimento ambiental.

No ambiente onde foi realizado o ensaio, a temperatura foi mantida constante a 20 °C (± 2 °C) e livre de distúrbios que poderiam incomodar os animais. Antes do ensaio, depois que os animais chegaram ao Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do INCQS, os animais foram submetidos a um pré-teste, até 72 horas anteriores ao ensaio, nas mesmas condições, apenas sem a inoculação do produto. Os animais que apresentaram variação individual de temperatura igual ou menor que 0,3 °C foram considerados aptos para o ensaio.

Durante todo o período do ensaio, os animais permaneceram nas gaiolas de contenção, imobilizados pela região cervical de modo que assumiram uma posição sentada e confortável.

Para a realização do ensaio foram utilizados apenas animais com temperatura igual ou inferior a 39,8 °C e que não apresentaram variação superior de 1,0 °C de um para o outro.

Após o término do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico (Tiopental, 100 mg/kg intravenosa). O teste de pirogênio em coelhos está licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (L-010/05).

3.1.2 Preparação das soluções de ALT

Para a realização das diluições de ALT foram utilizadas soluções injetáveis de Cloreto de Sódio 0,9% livres de pirogênio (Sanobiol, lote: 13050857).

Foi utilizado o ALT de *S. aureus* (Sigma, referência N° L2515, N° cas 56411-57-5), com grau de pureza $\leq 3,0$ % de proteína e $\leq 5,0$ % de água. As soluções preparadas são estáveis por dois meses se estocadas em alíquotas de uso único, em freezer a -20 °C, ou 48 hs em geladeira ($2-8$ °C). O preparo da curva dose-resposta de ALT em coelhos foi realizado em diluições seriadas da alíquota estoque de 5 mg/mL de ALT.

3.1.3 Procedimento do ensaio

Para realização do estudo, a curva dose-resposta foi determinada em coelhos segundo a metodologia de Hochstein, Munson e Outschoorn (1990). De acordo com os dados dos estudos *in vitro* de Pharmaceutical International (2010) foi realizado um estudo piloto com 3 animais por grupo nas doses de 100; 1.000; 10.000 ng de ALT/Kg do coelho. As doses de 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000; 500.000 ng de ALT/Kg foram determinadas envolvendo 8 animais. Paralelamente foi utilizado um grupo de oito animais como controle negativo que receberam uma solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% apirogênica. As diferentes doses foram administradas em um volume final de 1mL/Kg em cada um dos animais por via intravenosa.

Para a determinação da Variação Individual de Temperatura (VIT), foi calculada a diferença entre a maior variação em relação à temperatura inicial (imediatamente antes da administração, temperatura tomada automaticamente pelo equipamento) registrada durante o período de três horas do ensaio.

Os animais foram retirados de suas gaiolas e postos em gaiolas de contenção de Policloreto de Vinila (PVC), sendo introduzido eletrodo no reto (6-7 cm) para tomada de temperatura. Os animais permaneceram em repouso por pelo menos 30 minutos antes da administração das soluções de ALT.

Após o período de repouso, as soluções foram administradas pela veia marginal da orelha. Após a administração, os animais foram mantidos por três horas, com registro contínuo da temperatura em intervalos de 30 minutos, utilizando-se o equipamento PyroMon™ (ELLAB, modelo APT 96, versão 2.9.5), para monitoramento de temperatura.

Foi considerada como febre a variação individual igual ou superior a 0,5 °C. O resultado foi expresso através da média das VITs (HOCHSTEIN; MUNSON; OOUTSCHOORN, 1990, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A partir do resultado da curva dose-resposta, foi escolhida a concentração limite para utilização nos estudos *in vitro*.

3.2 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS

3.2.1 Preparação das soluções de LPS

Foi utilizado LPS de *E. coli* sorotipo O55:B5 (Sigma, referência N° L2880, lote n° 032M4082V). O LPS possui grau de pureza < 3,0 % de proteína. Para o preparo da curva concentração-resposta para o MAT foram realizadas diluições seriadas da alíquota estoque de 1mg/mL de LPS nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 UE/mL e o controle negativo com a solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% apirogênica.

Para o MAT, a curva concentração-resposta de LPS foi realizada em paralelo com a curva de ALT, para cada ensaio. Foram realizados quatro experimentos independentes, em duplicata.

De acordo com o trabalho de Hochstein, Munson e Outschoorn (1990) que compara a dose que corresponde a febre em humanos e coelhos, foi estabelecido um limiar da dose pirogênica determinada em 5 UE/kg que equivale a 1,0 ng de LPS/Kg (LPS de *E. coli*; O55:B5) (HOCHSTEIN; MUNSON; OOUTSCHOORN, 1990). Assim, o modelo de predição para o método testado foi estabelecido com base neste limite de detecção, isto é, uma substância é considerada pirogênica, se o

valor é significativamente superior ou igual a 5 UE/mL, comparado ao padrão de endotoxina.

3.2.2 Preparação das soluções de ALT

Para o MAT, as concentrações de ALT de *S.aureus* utilizadas foram 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000; 500.000 ng de ALT/mL e o controle negativo com solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%.

3.2.3 Obtenção do sangue dos doadores

Foram coletados 10 mL de sangue em material estéril, por punção venosa da veia (mediana, basílica, cefálica) do braço direito ou esquerdo, em tubos para coleta de sangue, heparinizados (Labor IMPORT), de no mínimo 4 doadores individuais saudáveis, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preenchimento dos questionários para afastar possíveis fatores de exclusão.

Após a coleta, o tubo foi invertido cinco vezes para garantir a mistura do sangue com a heparina. Os voluntários foram funcionários do INCQS, homens ou mulheres acima de 18 anos, que se auto declararam saudáveis no momento da assinatura do TCLE. Foram excluídos como doadores os declarantes de portadores de doenças infectocontagiosas, usuários de analgésicos e/ou anti-inflamatórios dentro de um período de uma semana. Esse projeto encontra-se licenciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz, sob o número 368/07.

3.2.4 Criopreservação do sangue total

O procedimento foi realizado após a coleta do sangue, que permaneceu à temperatura ambiente, no máximo por quatro horas. As etapas seguiram o protocolo de Schindler e cols. (2006), onde uma parte do sangue total fresco é misturado a uma parte da solução Dimetilsulfóxido (DMSO) (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany)/Tampão Sörensen (Acila AG, Mörfelden Walldorf, Germany), pH 6,8 (1:5). Após este procedimento o sangue foi distribuído em criotubos, colocado a -80 °C e utilizado no máximo dentro de um período de 4 meses.

3.2.5 Contato do sangue criopreservado com as concentrações de ALT ou LPS

Foi retirada a quantidade de sangue necessária para a realização do teste, de acordo com o volume das concentrações a serem avaliadas e controles. Foi utilizado *pool* de sangue dos doadores, de acordo com a metodologia da Farmacopeia Europeia (2010). O *pool* de sangue foi descongelado em estufa (37 °C) por 15 minutos. Para a realização do ensaio, foram colocados 200 µL do sangue criopreservado em contato com 900 µL de NaCl 0,9 % e 100 µL das concentrações de ALT ou LPS avaliadas ou do padrão em microtubos tipo Eppendorf estéril e apirogênico (1,5 – 2 mL) (**Quadro 1**). Os tubos foram colocados abertos em estante apropriada, cobertos com papel alumínio e incubados na estufa (37 °C, 5 % CO₂), por uma noite.

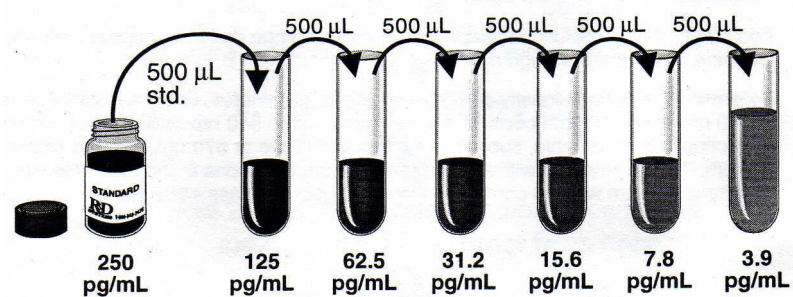
Após o período de incubação, o material foi retirado da estufa. Os microtubos foram fechados e misturados vigorosamente por inversão, analisados ou congelados até o momento da análise.

Quadro 1: Resumo do Procedimento do Teste de Ativação de Monócitos para sangue criopreservado.

Sangue Criopreservado	
Sangue	200 μ L
Concentração de ALT ou LPS avaliada	100 μ L
NaCl 0,9 %	900 μ L
Estufa (37°C, 5% CO ₂) por uma noite	
Dosagem das Interleucinas (IL-1 β e/ou IL-6)	

3.2.6 Dosagem de citocinas (Interleucina-1 β)

Para a determinação da liberação de IL-1 β foi utilizado o kit comercial da R&D Systems. A curva-padrão de IL-1 β foi preparada conforme apresentado na **Figura 4**.

Figura 4: Esquema de diluição da curva-padrão de IL-1 β 

Fonte: Manual do kit R&D Systems.

Após reconstituir o padrão de interleucina IL-1 β com 5 mL do Calibrador diluente RD6C, esta solução produziu uma solução estoque de 250 pg/mL. Foram

pipetados 500 μL do calibrador diluente em cada tubo, e realizada uma diluição seriada com a solução estoque de 250 pg/mL (**Figura 4**). Para dosagem, 50 μL do diluente apropriado (RD1-83) foram colocados em cada poço. Após adicionar o volume de 200 μL de padrão IL-1 β ou do produto da reação de ALT ou LPS com sangue criopreservado. A placa foi coberta com adesivo, incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi desprezado e os poços foram aspirados e lavados por 3 vezes 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 à temperatura ambiente por 2 horas, seguindo-se de um novo procedimento de lavagem. Foram adicionados 200 μL do substrato em cada poço e a placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Só então foram adicionados 50 μL da solução de parada. A placa foi suavemente agitada para homogeneizar a cor e foi realizada a leitura dentro de 30 minutos. Cada ponto (padrão e produto da reação) foi realizado em duplicata e a leitura feita a 450 nm, utilizando leitor VersaMax (Molecular Device, software SoftMax® Pro5).

3.2.7 Cálculo das unidades equivalentes de endotoxinas (UEE)

A contaminação pirogênica das preparações testadas foi estimada quantitativamente através da construção de uma curva concentração-resposta do padrão de LPS (0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 UE/mL) versus o valor da Densidade Óptica (OD) da liberação de IL-1 β por ELISA das diferentes concentrações do ALT. Desta forma os resultados de ALT foram expressos em Unidade Equivalente de Endotoxina por mL – UEE/mL (MONTAG et al, 2007, ICCVAM, 2008).

Assim, um produto de uma reação de ALT foi considerado pirogênico, sempre que a quantidade de citocinas liberada por esse for igual ou superior à quantidade liberada de IL-1 β em resposta à endotoxina de referência (5UE/mL = 1ng/mL).

3.3 TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Foi utilizado o método do LAL Cromogênico *End Point* (LONZA), um teste quantitativo, que utiliza um substrato cromóforo para detecção colorimétrica. O LAL foi realizado para atestar a potência do LPS na concentração de 0,5 UE/mL enquanto o ALT foi testado nas concentrações de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000; 500.000 ng/mL para verificar sua possível resposta neste modelo.

O nível de interferência nas diluições foi assegurado utilizando uma solução *spike*¹ nas concentrações de 100, 1.000 e 125.000 ng/mL de ALT.

Todas as soluções foram preparadas conforme descrito no manual que acompanha o kit (QCL-1000, BioWhittaker).

3.3.1 Preparo da curva-padrão

Foi preparada uma solução de endotoxinas, contendo 1,0 UE/mL, a partir da solução estoque do padrão. Para tal, foi diluído 1/x, onde x é a potência de endotoxinas declarada pelo fabricante a partir do lote do kit. As diluições foram preparadas de acordo com o **Quadro 2**.

¹*Spike*: Solução positivada propositalmente com 0,5 UE/mL do padrão de endotoxina do KIT.

Quadro 2: Preparo das concentrações de endotoxinas da curva padrão do Kit LAL Cromogênico *End Point*.

Conc. Endotoxina (UE/mL)	Volume solução estoque de 1 UE/mL	Volume solução padrão de 1 UE/mL	Volume de água apirrogênica
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

3.3.2 Procedimento do ensaio

Após preparo dos pontos da curva padrão e das concentrações avaliadas foi seguido o procedimento da **Tabela 1** com a microplaca pré-aquecida a 37 °C, em aquecedor de blocos.

Para a realização do ensaio foram colocados 50 µL da curva padrão do kit (item 3.3.1) e 50 µL das diluições de LPS ou ALT, em duplicata, nos poços da microplaca. A água apirrogênica foi utilizada como branco. No tempo 0 (t=0), 50 µL do lisado (LAL) foram adicionados e a placa foi agitada suavemente, através de leves batidas na lateral. Em seguida a placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C. No tempo 10 min (t=10), foram adicionados 100 µL do substrato cromogênico agitando suavemente posteriormente. A placa foi incubada por mais 6 minutos a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 50 µL da solução de parada agitando suavemente. A leitura foi realizada em densidade ótica de 405-410 nm em no máximo 30 minutos utilizando leitor VersaMax (Molecular Device, software SoftMax® Pro5).

Tabela 1

Etapas do procedimento do Teste de Endotoxina Bacteriana.

	Amostra	Branco
Diluições avaliadas ou padrão	50 µL	
Água apirogênica		50 µL
Lisado (LAL)	50 µL	50 µL
Misturar e incubar a 37 °C		10 min
Substrato cromogênico	100 µL	100 µL
Misturar e incubar a 37 °C		6 min
Solução de parada	50 µL	50 µL

3.3.3 Cálculo da concentração de endotoxina

O cálculo da concentração de endotoxina foi realizado subtraindo-se a média das absorvâncias do branco, da média das absorvâncias dos padrões e das diluições avaliadas para calcular a variação da absorvância 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 de leitor de ELISA VersaMax, Molecular Devices, software SoftMax® Pro5.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise da curva dose-resposta do ácido lipoteicóico em coelhos e da curva concentração-resposta de ácido lipoteicóico no MAT foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism® v.5. Este programa utilizou o Teste F de Fisher e o valor de p para avaliar uma possível diferença estatisticamente significativa entre os pontos da curva dose-resposta separados em intervalos não pirogênicos (controle negativo até a dose de 50.000 ng/Kg) e pirogênicos (75.000 ng/Kg até 500.000 ng/Kg). O coeficiente de determinação (r^2) foi utilizado para avaliar estatisticamente a linearidade da curva, inclinações de cada intervalo em relação a zero (curva teórica, onde não há inclinação). Assim, $p > 0,05$ significou que a inclinação não foi estatisticamente diferente de zero e $p < 0,05$, considerou-se que houve a diferença. Para a comparação destes coeficientes foi utilizado o Test T de Fisher, descrito por KENNY (1986), onde os valores r foram transformados para Z para uma normalização dos dados (Log_{10}). Neste caso, $p < 0,05$ foi utilizado para demonstrar a diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes.

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE ALT EM COELHOS

Os resultados demonstraram que houve resposta dose-dependente a partir da concentração de 10.000 ng/Kg. A resposta de febre foi observada a partir da dose de 75.000 ng/Kg. (**Figura 5 e Tabela 2**).

Figura 5: Curva dose-resposta de Ácido Lipoteicoico de *S. aureus* em coelhos. Os resultados são expressos através da média da maior VIT por concentração/animal, com erro padrão. Os animais receberam as doses de 100; 1.000 e 10.000 (n=3); 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/Kg, além do grupo controle (n=8), na veia marginal da orelha. A linha vermelha representa o corte na temperatura de 0,5°C, que corresponde à febre.

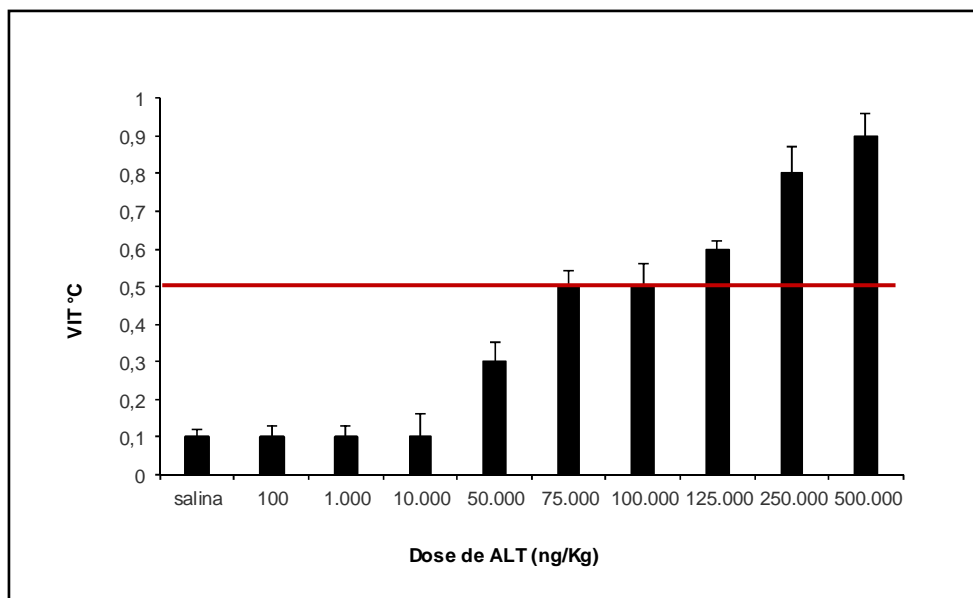


Tabela 2

Média da Variação Individual de Temperatura dos coelhos nas doses de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000; 500.000 ng de ALT/kg (*S. aureus*), com erro padrão.

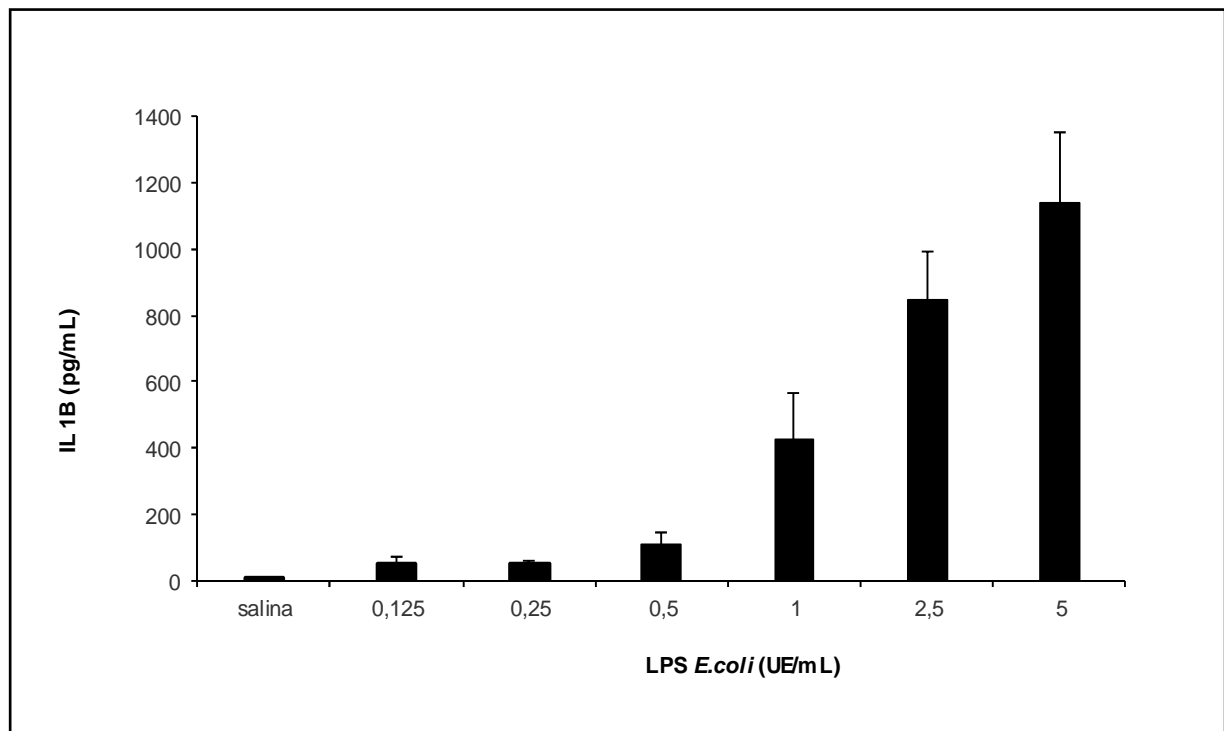
N°. coelhos	Salina	100	1.000	10.000	50.000	75.000	100.000	125.000	250.000	500.000
1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,7	0,7	0,8
2	0,2	0,0	0,1	0,0	0,5	0,3	0,5	0,6	1,0	0,8
3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	1,1
4	0,1	---	---	---	0,4	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7
5	0,1	---	---	---	0,1	0,3	0,6	0,5	0,7	0,8
6	0,0	---	---	---	0,4	0,4	0,4	0,6	0,9	1,0
7	0,0	---	---	---	0,2	0,6	0,4	0,7	0,8	0,9
8	0,1	---	---	---	0,4	0,4	0,3	0,7	0,8	0,9
Média	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	0,5	0,6	0,8	0,9
Erro Pad.	0,02	0,03	0,03	0,06	0,05	0,04	0,06	0,02	0,07	0,06

Na comparação entre as respostas, para o intervalo das doses não pirogênicas (controle negativo até a dose de 50.000 ng/Kg), o valor de F calculado foi 2,917 e $p = 0,1862$ demonstrando que a inclinação não foi significativamente diferente de zero. No intervalo das doses pirogênicas (75.000 ng/Kg até 500.000 ng/Kg), o valor de F foi 63,98 e $p = 0,0041$ demonstrando que a inclinação foi significativamente diferente de zero. Na comparação dos coeficientes de correlação pelo teste t de Fischer, o resultado obtido foi $Z = 5,06$ com $p < 0,0001$ ($p < 0,05$) demonstrando que existe diferença estatisticamente significativa entre os dois coeficientes de correlação. Desta forma, podemos comprovar que a resposta de 50.000 ng/Kg (apirogênica) é estatisticamente diferente da resposta de 75.000 ng/Kg (pirogênica), já que os pontos estão respectivamente abaixo e acima do limite de febre .

4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DE ALT NO MAT

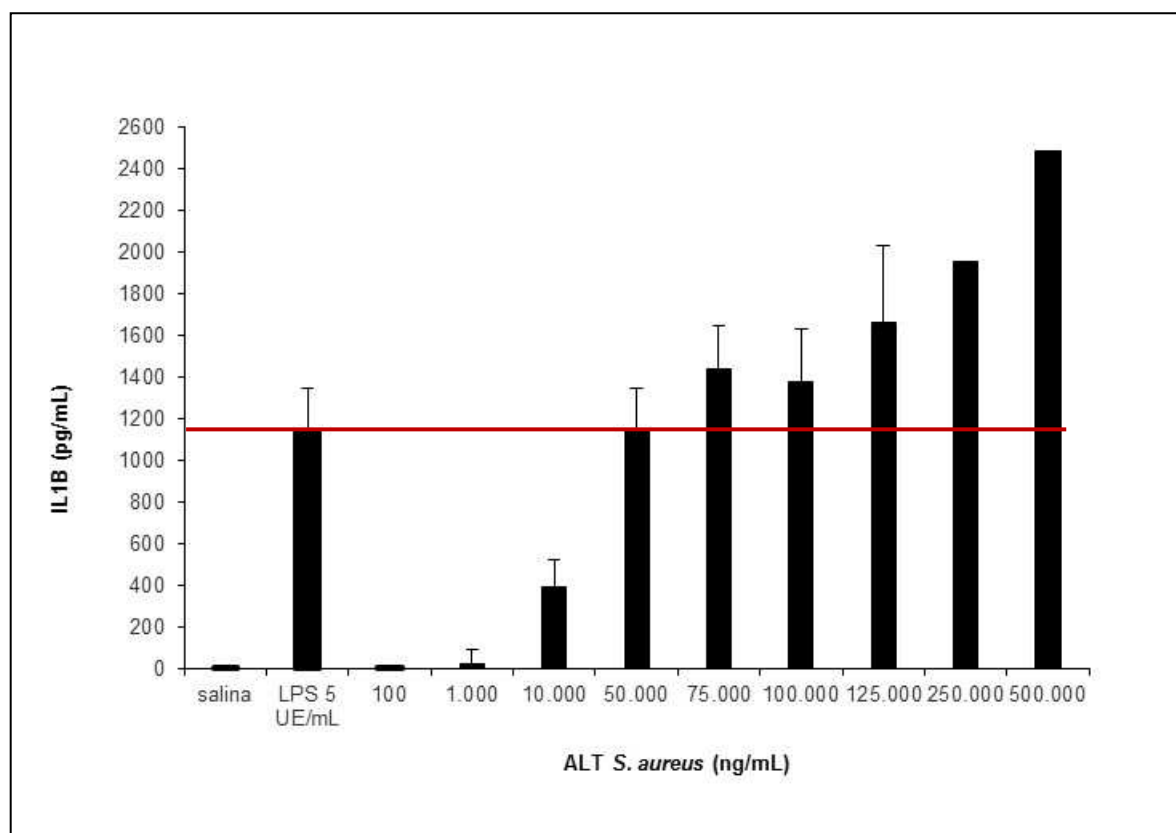
Para cada experimento foi realizada em paralelo uma curva padrão de LPS de *E.coli* nas concentrações de 0,125; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 UE/mL e o controle negativo. Os resultados demonstraram que foi possível verificar uma diferença na liberação de IL-1 β dependente da concentração de LPS (**Figura 6**). Esta diferença na liberação foi comprovada estatisticamente pelo coeficiente de determinação $r^2 = 0,9360$, onde $F = 73,18$ ($p < 0,001$) demonstrando que a inclinação apresenta diferença de zero estatisticamente significativa. Foi também evidenciado estatisticamente uma relação linear entre as concentrações e as respostas ($p = 0,3333$).

Figura 6: Resposta da liberação de IL1- β para o estímulo de diferentes concentrações de LPS de *E. coli* O55:B5 por ELISA em sangue criopreservado. Foi utilizado o *pool* do sangue criopreservado de 4-5 doadores. Média de 4 experimentos independentes, em duplicata e erro padrão. Observou-se uma diferença na liberação de IL1- β dependente da concentração de LPS.



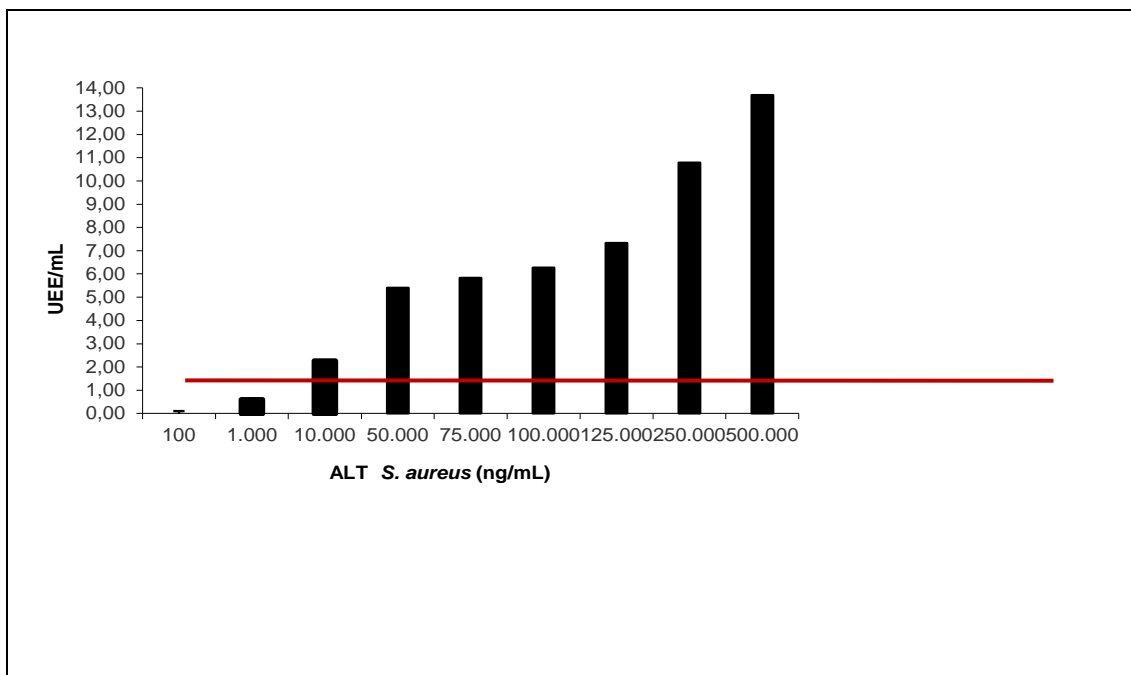
As concentrações de ALT utilizadas no MAT foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos animais. Sendo assim, foram empregadas as concentrações de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/mL de ALT, além da utilização do controle negativo. Todas as concentrações de ALT testadas no sangue demonstraram uma resposta dependente da concentração avaliada (**Figura 7**). A linearidade das respostas foi comprovada estatisticamente pelo coeficiente de determinação $r^2 = 0,9284$, onde $F = 103,7$ ($p < 0,0001$) demonstrando que a inclinação apresentou diferença de zero estatisticamente significativa. Foi também evidenciado uma relação linear estatisticamente significativa ($p = 0,1905$) entre as concentrações e as respostas.

Figura 7: Resposta da liberação de IL-1 β para o estímulo de diferentes concentrações de ALT de *S. aureus* por ELISA em sangue criopreservado. Foi utilizado o *pool* do sangue criopreservado de 4-5 doadores. Média de 4 experimentos independentes, em duplicata e erro padrão. A linha vermelha representa o corte na concentração de 5 UE/mL de LPS de *E. coli* O55:B5, dose limite que corresponde a febre em humanos e coelhos.



Foi realizado o cálculo das Unidades Equivalentes de Endotoxina, onde os resultados mostraram que as concentrações de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/mL de ALT de *S. aureus*, equivaleram respectivamente a 0,0; 0,6; 2,26; 5,41; 5,84; 6,27; 7,33; 10,79; 13,69 UEE/mL de *E. coli* (**Figura 8**).

Figura 8: Equivalência das diferentes concentrações de ALT de *S. aureus* para as Unidades de Endotoxina (UEE/mL) com base na curva concentração-resposta de LPS versus o valor da Densidade Óptica do ALT na liberação de IL-1 β por ELISA. A linha vermelha representa o corte na concentração de 5 UE/mL de LPS de *E. coli* O55:B5.



4.3 TESTE DE LAL PARA O ALT

O LPS (Sigma) de 0,5 UE/mL utilizado nos estudos, apresentou no teste de LAL uma leitura média de 0,523 UE/mL, correspondendo com a potência esperada. As soluções de Cloreto de Sódio a 0,9% apirogênica e as de 100 e 1.000 ng/mL de ALT não foram reativas (< 0,1 UE/mL), mostrando ausência da contaminação por endotoxina. A concentração de 10.000 ng/mL de ALT apresentou uma leitura de 0,179 UE/mL, porém tendo em vista que o LAL não detecta ALT, este resultado foi considerado um falso-reativo mas não significativo, tendo em vista que se administrássemos uma solução dez vezes mais concentrada não atingiria a concentração que causa febre. As diluições de 50.000 a 500.000 ng/mL de ALT apresentaram resultados acima da faixa de leitura do método (>1,0 UE/mL) (**Tabela 3**).

As soluções de 100 e 1.000 ng/mL quando positivadas (*spike*) com 0,5 UE/mL da endotoxina do kit apresentaram reação referente a própria endotoxina (0,528 e 0,521 UE/mL, respectivamente). Esses resultados demonstraram que as concentrações não apresentaram inibição nem contaminação por endotoxina (**Tabela 3**).

Tabela 3

Leituras apresentadas pelas diferentes concentrações de ALT utilizadas no LAL Cromogênico *End Point* (controle negativo; ALT de 100; 1.000; 10.000; 50.000; 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/mL). Para o ALT n = 1, em duplicata e para o LPS de 0,5 UE/mL n = 2 experimentos, em duplicata. Valores referentes às médias.

Amostras	Concentração de Endotoxina (UE/mL)	Spike (0,5 UE/mL)
Controle negativo	< 0,1*	---
ALT 100 ng/mL	< 0,1*	0,528
ALT 1.000 ng/mL	< 0,1*	0,521
ALT 10.000 ng/mL	0,179	---
ALT 50.000 ng/mL	>1,0*	---
ALT 75.000 ng/mL	>1,0*	---
ALT 100.000 ng/mL	>1,0*	---
ALT 125.000 ng/mL	>1,0*	>1,0*
ALT 250.000 ng/mL	>1,0*	---
ALT 500.000 ng/mL	>1,0*	---
LPS 0,5 UE/mL	0,523	---

*Resultados fora da faixa de detecção do método

4.4 AVALIAÇÃO EM PARALELO DOS RESULTADOS OBTIDOS UTILIZANDO ALT NOS TESTES DE PIROGÊNIO EM COELHOS, LAL CROMOGÊNICO E MAT

As concentrações de 100 e 1.000 ng/mL de ALT foram não pirogênicas com base nos testes em coelhos e no MAT. A dose de 10.000 ng/Kg de ALT foi não pirogênica tanto no teste *in vivo* quanto no MAT, porém no LAL apresentou uma leitura de 0,179 UE/mL, resultado considerado falso-reativo. A dose de 50.000 ng/Kg de ALT foi não pirogênica no teste em coelhos e pirogênica no MAT. As doses de 75.000; 100.000; 125.000; 250.000 e 500.000 ng/Kg foram pirogênicas tanto no teste em coelhos como no MAT (**Tabela 4**).

Tabela 4

Resultados apresentados pelo Teste de pirogênio em coelhos, Teste de Ativação de Monócitos para sangue crio/IL-1 β e pelo LAL Cromogênico *End Point* para avaliação do Ácido Lipoteicóico de *S. aureus*.

ALT (ng/mL/Kg)	Teste em coelhos (média ΔT) (°C) *	MAT (IL-1 β) UEE/mL	LAL (UE/mL)
100	0,1 \pm 0,03 ^{NP}	0,0 ^{NP}	< 0,1 ^{NR}
1.000	0,1 \pm 0,03 ^{NP}	0,6 ^{NP}	< 0,1 ^{NR}
10.000	0,1 \pm 0,06 ^{NP}	2,26 ^{NP}	0,179 ^{NP}
50.000	0,3 \pm 0,05 ^{NP}	5,41 ^P	>1,0 ^{RI}
75.000	0,5 \pm 0,04 ^P	5,84 ^P	>1,0 ^{RI}
100.000	0,5 \pm 0,06 ^P	6,27 ^P	>1,0 ^{RI}
125.000	0,6 \pm 0,02 ^P	7,33 ^P	>1,0 ^{RI}
250.000	0,8 \pm 0,07 ^P	10,79 ^P	>1,0 ^{RI}
500.000	0,9 \pm 0,06 ^P	13,69 ^P	>1,0 ^{RI}

NP = Não Pirogênico, NR = Não Reativo. RI = Reação Indeterminada (falso-reativo). P = Pirogênio, *valores referentes à média \pm erro padrão.

5 DISCUSSÃO

O teste de pirogênio em coelhos se baseia na reação fisiológica do animal. Porém é um teste caro, já que envolve toda a estrutura e manutenção de um biotério, demanda tempo para execução da análise e envolve a variabilidade fisiológica dos animais utilizados. Também a questão ética não deve ser esquecida, já que existe uma tendência mundial no caminho da redução da utilização do uso de animais de laboratório. No entanto o método é capaz de detectar todos os tipos de pirogênio (endotoxinas e não-endotoxinas) (WILLIAMS, 2007; ICCVAM, 2008).

O futuro para o teste de detecção de pirogênios em produtos injetáveis direciona para métodos alternativos ao uso de animais, alguns já disponíveis em farmacopeias, até que estes possam substituir o teste *in vivo* por completo (ICCVAM, 2008).

Baseado na necessidade de prover estudos sobre a aplicação do Teste de Ativação de Monócitos para pirogênios não-endotoxinas, foi realizado um estudo, visando determinar a possível equivalência de resultados obtidos a partir desse método com aqueles obtidos no teste em coelhos utilizando-se uma solução de Cloreto de Sódio a 0,9 % apirogênica, artificialmente contaminada com diferentes concentrações de Ácido Lipoteicóico. Na obtenção da curva dose-resposta de ALT em coelhos não foi observada resposta de febre até a dose de 50.000 ng de ALT/Kg dos coelhos. Essa resposta somente foi observada a partir da dose de 75.000 ng de ALT/Kg. As doses de 125.000; 250.00 e 500.000 ng de ALT/Kg apresentaram respostas dependentes da dose. A Farmacopeia Brasileira (2010) apresenta 2 (dois) critérios para avaliação de uma amostra: o número de animais apresentando VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ e o somatório dos 8 (oito) animais, que não deve exceder $3,3^{\circ}\text{C}$. No caso do primeiro teste com 3 animais, se um animal possuir VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ é suficiente para o resultado ser encaminhado para um segundo teste com mais 5 animais e, portanto não se considera a existência de um somatório nesta etapa que determine a reprovação direta do produto. Na realização do segundo ensaio considera-se não só o somatório acumulado (8 animais) como também o número de animais com VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ que não deve ser superior a três coelhos.

Se os resultados obtidos estivessem sendo analisados segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a dose de 50.000 ng de ALT/Kg no coelho apresentaria como resultado a repetição do primeiro teste. Porém após a realização do segundo teste e de acordo com os resultados obtidos, o “produto” seria considerado aprovado. Já a dose de 75.000 ng de ALT/Kg de coelho também apresentaria resultado que levaria a repetição no primeiro teste, mas seria pirogênica no segundo (**Tabela 2**). Sendo assim, a dose de 50.000 ng de ALT/Kg no coelho utilizada nesse trabalho poderia ser considerada um indício de possível contaminação. As diferenças de resultados entre essas doses podem ser possivelmente relacionadas à variabilidade de resposta dos animais que são influenciadas por fatores intrínsecos ao animal ou fatores ambientais (WILLIAMS, 2007).

Porém no estabelecimento da curva concentração-resposta de ALT para o MAT, a concentração de 50.000 ng/mL de ALT foi pirogênica, correspondendo a 5,41 UEE/mL, sendo considerada a concentração limite no teste *in vitro*, de acordo com o limite de detecção de febre no homem e no coelho (HOCHSTEIN; MUNSON; OUTSCHOORN, 1990). Pela análise desses resultados, podemos inferir que o MAT seja mais sensível que o teste em coelhos. Essa diferença possivelmente acontece devido às condições de execução do MAT, onde não é observada a interferência de inúmeros fatores fisiológicos presentes em um sistema *in vivo*.

Além da sensibilidade do MAT que possibilitaria a detecção precoce da resposta pirogênica, esse teste possui outras vantagens como, por exemplo, utilizar sangue total humano, já que as células circulantes do sistema imune podem interagir com os componentes do soro em sua composição natural. Esse método também não necessita de procedimentos de isolamento de células, reduzindo possíveis fontes de contaminação (DANESHIAN; AULOCK; HARTUNG, 2009). Outro ponto importante, é que o MAT apresenta o mesmo mecanismo biológico responsável pela reação de febre induzida por ALT em humanos, sem precisar fazer a extrapolação entre as espécies (ICCVAM, 2008). Tal fato é importante quando relacionamos medidas de segurança na avaliação de um produto injetável sujeito a vigilância sanitária.

Na literatura existem poucos artigos que tenham como objetivo relacionar a resposta de febre em coelhos frente a diferentes concentrações de ALT. Isso se

deve possivelmente a limitações impostas pelas autoridades regulatórias de diversos países desenvolvidos, que restringem o uso de animais na experimentação laboratorial, seja para a pesquisa ou para ensaios analíticos de determinados produtos.

Em um estudo realizado por Schindler e cols. (2003), foi verificada a comparação entre a resposta *in vitro* do sangue total humano e sangue de coelhos para liberação de IL-1 β e IL-8 por ELISA, utilizando-se bactérias Gram-negativas (LPS de *E.coli* O113: H10 e O111: B4, *Serratia marcescens*, *Salmonella abortus equi*) e Gram-positivas (ALT de *B. subtilis* e *S. aureus*). As respostas das duas espécies para o LPS de *E. coli* O111: B4 foram comparáveis, enquanto que para o ALT essa reatividade foi consideravelmente diferente. O sangue humano foi mais sensível para IL-1 β (5 $\mu\text{g/mL}$ = 5.000 ng/mL) do que o sangue de coelho (>100 $\mu\text{g/mL}$ = 100.000 ng/mL). Os autores sugerem que o teste de pirogênio *in vitro* deva prever melhor a reação humana à contaminação que o teste de pirogênio em coelhos.

Células da linhagem MM6 foram testadas quanto a secreção de IL-6 por ELISA após exposição a diferentes pirogênios (*B. subtilis*, endósporos, e componentes da parede celular). Todas as substâncias foram pirogênicas pelo teste *in vivo*. *B. subtilis*, endósporos e ALT induziram a liberação de IL-6 de maneira dependente ao estímulo. Porém apesar do LPS estimular a liberação desta citocina, as curvas de LPS e ALT apresentaram perfis completamente diferentes. As doses pirogênicas da bactéria vegetativa e dos endósporos no coelho estavam na mesma faixa de grandeza, enquanto a dose pirogênica de ALT foi 10 vezes menor. Segundo os autores os limites de detecção das células MM6 estavam muito abaixo das doses pirogênicas, o que pode demonstrar que esse ensaio seja uma boa alternativa ao teste de pirogênio em coelhos (MOESBY et al, 2003).

Outro método utilizado para detecção de endotoxina presente na Farmacopeia Brasileira é o LAL. Diversos métodos de LAL foram desenvolvidos ao longo do tempo, entretanto, os mais utilizados na rotina de laboratórios oficiais e indústrias são os de gelificação (*gel-clot*) e colorimétrico (cinético e *end-point*) (PEARSON, 1985).

Para efeito de comparação entre os métodos, o teste de LAL foi realizado nas soluções de ALT as quais apresentaram resultado positivo a partir da concentração

de 10.000 ng/mL (10 µg/mL). A ausência de interferência nas diluições mais baixas de ALT (100 e 1.000 ng/mL) foi demonstrada através solução *spike*, as quais apresentaram resposta no LAL. O ensaio de LAL apesar de detectar somente endotoxinas pode apresentar resultados falso-reativos ou falso-negativos em decorrência de interferentes que possam aumentar ou inibir a reação (PEARSON, 1985). No caso do ALT, os estudos de Pearson e Weary (1980) atribuem a questão dos resultados falso-reativos ao fato do teste de LAL interpretar a união das cadeias de monossacarídeos do ALT (30 a 40 unidades repetidas) como um polissacarídeo, mascarando a reação. Williams (2007) afirma que tanto o PG como o ALT são estruturalmente semelhante à endotoxina, podendo induzir a produção de citocinas, nos monócitos, e alguns podem até mesmo reagir com o LAL.

Morath e cols. (2002) avaliaram tanto preparações comerciais de ALT de *S. aureus* e *B. subtilis* como preparações altamente purificadas (extração com butanol) nos testes de LAL e Sangue Total Humano/ IL-1 β , IL-6 e IL-10. No teste de LAL foi encontrada leitura entre 10–100 ng de LPS/mg de ALT nas preparações comerciais, enquanto que o ALT altamente purificado, de *S. aureus* e *B. subtilis*, foi negativo no teste de LAL (< 30 pg de LPS/mg de ALT). Quando o sangue total humano foi estimulado com 10µg/mL (10.000 ng/mL) de ALT de *S. aureus* purificado, através de extração com butanol, foram obtidos os seguintes resultados: 2,2 \pm 0,82 ng/mL de IL-1 β (2.200 pg/mL), 4,3 \pm 2,1 ng/mL de IL-6 e 0,2 \pm 0,1 ng/mL de IL-10 (MORATH et al., 2002a). Porém o valor descrito para IL-1 β (2.200 pg/mL) foi acima do valor encontrado em nosso estudo (395 pg/mL de IL-1 β). Os autores concluíram que, preparações comerciais sem boas práticas de fabricação para o ALT podem contribuir para relativa contaminação por endotoxina e conseqüentemente dificultar a caracterização da ativação de células imunes pelo ALT.

O ICCVAM (2008) recomenda que “otimamente, um estudo que inclua um teste paralelo com testes *in vitro* sendo comparados com coelhos e LAL devem ser conduzidos para permitir uma avaliação compreensiva da relevância e da performance comparativa dos cinco métodos compreendidos pelo MAT. Esses estudos devem ser conduzidos com dados históricos dos coelhos fornecidos para as mesmas substâncias, isto é, o mesmo lote e que sejam testados em cada método. Baseado no racional científico e ético, qualquer teste *in vivo* deve ser conduzido, limitado somente aos estudos que irão preencher as falhas existentes”.

Embora a área científica tenha dado um passo significativo no desenvolvimento de métodos alternativos em substituição ao uso de animais, os testes com os mesmos ainda são necessários para a avaliação de segurança e eficácia de produtos que ainda não foram testados para os pirogênios não-endotoxinas, assim como para os produtos que não foram contemplados nos estudos de validação para endotoxina. Os resultados deste trabalho contribuem de uma forma direta nos estudos de comparação dos métodos alternativos ao teste de pirogênio em coelhos, pois existe uma ausência de dados na literatura quanto a esses estudos, contribuindo com resultados para a validação e aceitação dos órgãos regulatórios do MAT no Brasil, promovendo o princípio dos 3Rs, e garantindo a segurança da saúde da população.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que pelos resultados do teste de pirogênio em coelhos, a dose limite que causa febre nos animais foi estabelecida em 75.000 ng de ALT/Kg. Em relação ao LPS, no Teste de Ativação de Monócitos, utilizando sangue criopreservado, foi observada liberação de IL-1 β dependente da concentração.

A concentração limite para ALT de *S. aureus*, baseado no MAT, foi estabelecida em 50.000 ng/mL ou 5,41 UEE/mL tomando-se por base o valor da Densidade Ótica da resposta de liberação de citocinas pelo ALT versus as diferentes concentrações de LPS.

O LAL Cromogênico *End Point* não foi reativo para as concentrações de 100 e 1.000 ng/mL de ALT testadas e apresentou resultados falso-reativos a partir de 10.000 ng/mL.

Estudos complementares comparando os três métodos devem ser realizados para outros pirogênios, assim como a demonstração da aplicabilidade para outros produtos injetáveis contaminados com ALT de *S. aureus* tomando como base a curva demonstrada neste estudo.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Consulta Pública nº 50, de 4 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 05 set. 2008. Seção 1. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B23764-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 25 out. 2012.

ASSOCIATES OF CAPE COD INC. **GlucateLL Kit**. East Falmouth, 2007. Disponível em: <<http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/pisheets/GlucateLL%20Insert%20English.pdf>>. Acesso em: 21 jan 2014.

BACHINSKI, R. et al. Criticism of the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test as a replacement method of the rabbit pyrogen test (RPT) and environmental health implications. **ALTEX**, Linz, v. 27, supl. 2/10, p. 15, 2010.

BALLS, M. **The three Rs and the humanity criterion**: an abridged version of The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S. Russel and R.L. Burch. FRAME. Nottingham, 2009.

BRASIL. **Decreto Nº 4.725, DE 9 de Junho de 2003**. Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 09 jun. 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4725.htm>. Acesso em: 03 jan. 2014.

_____. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 19 set. 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm>. Acesso em: 10 jan. 2014.

_____. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 09 out. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 02 jul 2012.

CALDEIRA, C. et al. The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products. **ALTEX**, v. 22, Special Issue, p. 213, 2005.

CARVALHAL, M. L; ALTERTHUM, F. Morfologia e Estrutura da Célula Bacteriana. In: TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 7-19.

CHARLES RIVER LABORATORIES. (nov de 2013). *Charles River Laboratories*. Disponível em: http://www.criver.com/lal_horseshoe .Acesso em: 15 nov 2013.

CHARLES RIVER LABORATORIES. Endotoxin Rapid Testing Systems: Endosafe®-PTS™ Glucan Assay. 2014. Disponível em: <<http://www.criver.com/products-services/rapid-micro/endotoxin-rapid-testing-systems/endosafe-pts-glucan-assay>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

DANESHIAN, M; AULOCK, S. V; HARTUNG, T. Development, purpose and importance of in vitro pyrogenicity tests. Abstract of the 7 th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life. Sciences; Aug 30-Sep 03; Rome, Italy. **ALTEX**, Special Issue v. 26, p. 22, 2009.

DEININGER, S. et al. Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity. **Immunobiology**, v. 213, p. 510-529, 2008.

DINARELLO C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of Endotoxin Research**. v.10, n.4, p.201-22, 2004.

DRAING, C. et al. Cytokine induction by Gram-positive bacteria. **Immunobiology**. v. 213, p. 285-296, 2008.

EMA. **Guideline on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived products**. London, 2009. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003599.pdf>. Acesso em: 21 jan 2014.

EPERON, S.; JUNGI, T. W. The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. **J Immunol Methods**, v. 194, n. 2, p. 121-129, 1996.

EPERON, S. et. al. Human monocytoïd cell lines as indicator of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus* amoebocyte lysate assay. **J Immunol Methods**, v. 207, n. 2, p. 135-145, 1997.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Monocyte-Activation Test. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 th Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2010. v.1, p.192-197.

_____. Test for pyrogens. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. Maisonneuve S.A: Sainte-Ruffine, France,1971. v. 2, p.58 - 60.

_____. Pyrogens. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. th Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2007. v.1, p. 164-165.

_____. Pyrogens. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 7. th Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2011. v.1, p. 161-162.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Pirogênios. In: FARMACOPÉIA Brasileira. 3 ed. São Paulo: Organização Andrei Editoras S.A, 1976. p. 993-994.

_____. Definições. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010a. v.1, p. 45.

_____. Pirogênios. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010b. v.1, p. 229-230.

_____. Preparações de produtos estéreis. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010c. v.1, p. 321-322.

FDA. [**Letter from Norris E. Alderson, PhD, FDA Associate Commissioner for Science, to RADM William S. Stokes, Director NICEATM**]. 2009. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/pyrogen/transmitNov08/FDA-Response.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

FDA. **Guidance for industry Pyrogen and Endotoxins Testing: questions and answers**. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM310098.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com produtos biológicos sujeitos à vigilância sanitária**. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FREITAS, J.C.B.R. et al. The re-use of rabbits in pyrogen testing (RPT) of hyperimmune sera and vaccines contributes to the reduction of animal use. **ALTEX**, Linz, v. 28, Special issue, p. 23, 2011.

GUIA de Preparações de administração de medicamentos por via parentérica. Disponível em: <<http://www.injectaveis.com/introducao.html>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

HARTUNG, T. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLA**, v.29, p.99-123, 2001.

HASIWA, N. et al. T4 Report: Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. **ALTEX**. v. 30. 2/13, pp. 169-208, 2013.

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 Forum**, Mar-Apr, p. 346-351, 1990.

HOFFMANN, S. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. **J Immunol Methods**. v. 298, n.1-2, p.161-73, 2005a.

_____. Optimization of testing in parenterals according to different pharmacopoeias by probabilistic modeling. **Journal of Endotoxin Research**, v.11, p.25-31, 2005 b.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **ICCVAM test method evaluation report**: Validation status of five *in vitro* test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. 2008. (NIH publication, n. 08-6392). Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/pyrogen/TMER/PyroTMER2008.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2012.

_____. **In Vitro Pyrogen test Methods**. 2009. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=82013354-9C2E-17F9-9F75FE7717C6BEBB>. Acesso em: 10 jan. 2014.

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. **Atividades institucionais 2005-2008**. Rio de Janeiro, 2009. 107p.

KENNY, D. A. **Statistics for the social and behavioral sciences**. Boston: Litte, 1986.

KOPP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**. v.15, n.4, p.396-401, 2003.

LONZA. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000™. Catalog number: 50-647U, 50-648U, U.S. License No. 1775, 2011.

LOPES, I. G. **Comparação dos métodos de pirogênio *in vivo* descritos nas farmacopeias brasileira e europeia: interferência na interpretação dos resuALTdos**. 2011. 45p. Monografia (Especialização)– Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

MALONEY, P. J. Sepsis and Septic Shock. **Emerg Med Clin N Am**, v. 31, p. 583–600. 2013.

MEDZHITOV R., PRESTON-HURLBURT P., JANEWAY C. A. A human homologue of the rosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**; v. 388 (6640), p. 394-397,1997.

MELANDRI, V. et al. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à Vigilância Sanitária. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília. v. 8, n. 2, p. 69-95, jul./dez, 2010.

MOESBY, L. et al. Endospores of *B subtilis* are pyrogenic and activate Mono Mac 6 cells: importance of the CD14 receptor. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n.4, p. 245-251, 2003.

_____. Dry and moist heat sterilization cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26. p. 318-323, 2005.

_____. Effect of moist heat sterilisation on the pyrogenicity of cell wall components from *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35. p. 442-446, 2008.

MONTAG, T. et al. Safety Testing of Cell-based Medicinal Products: Opportunities for the Monocyte Activation Test for Pyrogens. **ALTEX**, v. 24, p. 81-89, 2007.

MORATH, S; STADELMAIER, A; GEYER, A ; SCHMIDT, R.R ; HARTUNG, T. Synthetic Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* Is a potent Stimulus of Cytokine Release. **J. Exp. Med**, v. 195, n. 12, p. 1635-1640, 2002b.

MORATH, S; GEYER, A; HARTUNG, T. Structure-Function relationship of cytokine induction by Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus*. **J. Exp. Med.** v. 193. n.3. p. 393-397, 2001.

MORATH, S; GEYER, A; SPREITZER, I; HERMANN, C; HARTUNG, T. Structural Decomposition and Heterogeneity of Commercial Lipoteichoic Acid Preparations. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 938–944, 2002a.

NOGUEIRA, S. T.B. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio no controle da qualidade de produtos biológicos com enfoque na vacina antimeningocócica AC.** 2009. 30 f. Monografia (Especialização) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

OGOINA, D. Fever: fever patterns and diseases called "fever" a review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 3, p. 108-124, 2011.

PEARSON, F. C. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation.** New York: Marcel Dekk, 1985. p. 3-73; 159-199.

PEARSON, F. C; WEARY, M. The Significance of Limulus Amebocyte Lysate Test specificity on the pyrogen evaluation of parenteral drugs. **Journal Parenteral Drug Association**, v. 34, p.103-108, 1980.

PHARMACEUTICAL INTERNATIONAL. The monocyte-Activation Test (MAT) for Pyrogens. 2010. Disponível em: <<http://www.pharmaceutical-int.com/article/the-monocyte-activation-test-mat-for-pyrogens.html>>. Acesso em 15 fev 2014.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. Pirogênio e endotoxinas Bacteriana. In: **CONTROLE biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 497-542

POOLE, S. et al. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. **Dev. Biol. Stand**, v. 69, p. 121-123,1988.

PRESGRAVE, O. A. F. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** 2003. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003.

_____. Métodos Alternativos. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G.M; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo. Atheneu, 2009.p. 619-634.

PRESGRAVE, O. A. F; BOZZA, P. T; CASTRO FARIA NETO, H. C. Teste do Sangue Total: uma alternativa ao uso do teste de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis. In: BIENAL DE PESQUISA DA FIOCRUZ, 3., 2002. Rio de Janeiro. **Anais da III Bienal de Pesquisa da FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2002. p. 102-103.

PRESGRAVE, O. A. F. et al. Detection of pyrogenic contamination of anti-venom sera using "in vitro" cytokine release assay (human whole blood assay). In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife. **Resumos**. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 18. p.104-104, 2005.

ROCKEL, C; HARTUNG, T. Systematic review of membrane components of Gram-positive bacteria responsible as pyrogens for inducing human monocyte/macrophage cytokine release. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 1-18, 2012.

ROCKEL, C.; HARTUNG, T.; HERMANN, C. Different *Staphylococcus aureus* whole bacteria mutated in putative pro-inflammatory membrane components have similar cytokine inducing activity. **Immunobiology**, v. 216, p. 316-321, 2011.

SCHAUMBERGER, S. et al. Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the Limulus-Amebocyte lysate test: an in vitro study. **AMB Express**. v. 4, n.1, p. 1-9, 2014.

SCHINDLER, S.; SPREITZER, I.; LOESCHNER, B. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **J.Immunol. Methods**, v. 316, p. 42-51, 2006.

SCHINDLER, S. et. al. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity test. **J Immunol Methods**, v. 294, p.89-100, 2004.

_____. Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli. **ALTEX**, v. 20, n. 2, p. 59-63, 2003

_____. Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. **ALTEX**, v. 26, p. 4-9, 2009.

SPREITZER, I. et al. Comparative Study of Rabbit Pyrogen Test and Human whole Blood Assay on Human Serum Albumin. **ALTEX**, v.21, n.2, p. 73-75, 2002.

STORER, T; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1979.

STOKES, W.S; WIND, M. Recent Progress and Future Directions at NICEATM-ICCVAM: Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Test Methods that

Reduce, Refine, and Replace Animal Use. **ALTEX**, v. 27, Special Issue, p.1-13, 2010.

TAKTAK, Y. S. et al. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 43, p. 578-582, 1991.

THIEMERMANN, C. Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: a structural and functional analysis. **Microb Infec.** v. 4, p. 927-935, 2002.

TSCHUMI, J. Comparison of temperature rise interpretations between European and United States Pharmacopeias Pyrogen Tests. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. v. 57, n. 3, p. 218-227, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Pyrogen test. In: **USP 24/NF19**: Maryland, 2001.

_____. Pyrogen test. In: **USP 32/NF 27**: Rockville, 2009. p.124-125.

WILLIAMS, L. K. **Endotoxins. Pirogens: LAL Testing and Depyrogeneration**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2007.

ZOMORRODI, A.; ATTIA, M. W. Fever: parental concerns. **Clinical Pediatric Emergengy Medicine**, v. 9, n. 4, p. 238-243, 2008.