

**SAULO DE TASSO BORGES NOGUEIRA**

**A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE  
PIROGÊNIO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS  
BIOLÓGICOS COM ENFOQUE NA VACINA  
ANTIMENINGOCÓCICA AC**

**ESPECIALIZAÇÃO**

**PPGVS/INCQS**

**FIOCRUZ**

**2009**

**A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE  
PIROGÊNIO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS  
BIOLÓGICOS COM ENFOQUE NA VACINA  
ANTIMENINGOCÓCICA AC**

**SAULO DE TASSO BORGES NOGUEIRA**

ESPECIALIZAÇÃO

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos,  
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: João Carlos Borges Rolim de Freitas  
Cristiane Caldeira da Silva

Rio de Janeiro  
2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

# **A REUTILIZAÇÃO DE COELHOS SUBMETIDOS AO TESTE DE PIROGÊNIO NO CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS COM ENFOQUE NA VACINA ANTIMENINGOCÓCICA AC**

Saulo de Tasso Borges Nogueira

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras Instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialização.

Aprovado

Prof<sup>a</sup>.

Prof<sup>a</sup>.

Prof<sup>a</sup>.

Orientadora: Cristiane Caldeira da Silva

João Carlos Borges Rolim de Freitas

Rio de Janeiro

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Nogueira, Saulo de Tasso Borges

**A reutilização de coelhos submetidos ao Teste de Pirogênio no controle da qualidade de produtos biológicos com enfoque na Vacina Antimeningocócica AC/ Saulo de Tasso Borges Nogueira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.**

xv, 30 p., il., tab.

Trabalho de conclusão do Curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: João Carlos Borges Rolim de Freitas

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

The re-use of rabbits subjected to the Pyrogen Test in the quality control of biological products with a focus on Meningococcal AC Vaccine.

**“Todas as substâncias são venenos. Não existe  
nada que não seja veneno.  
Somente a dose certa diferencia o veneno do remédio”.**  
**Paracelsus (1493 a 1541).**

*A minha esposa Ana Maria, e  
aos meus filhos, Samantha e Saulo II.*

*Homenagem especial*  
*Aos irmãos NélioBorges Nogueira e Nilmaracir Ibirajó Borges Nogueira*  
*in memoriam.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

A minha esposa Ana Maria, e aos meus filhos Samantha e Saulo II pelo apoio, incentivo e paciência nos momentos de nervosismo.

As minhas irmãs e irmãos.

Aos meus irmãos Nélio e Nilmaracir (Bira), com muitas saudades, mas creio que devem estar muito contentes onde estiverem.

Ao Sr. Fernando Faria Fíngola, Chefe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia.

Ao Sr. Octavio Augusto França Presgrave, que me iniciou no Pirogênio e a quem devo os meus conhecimentos.

Ao Sr. João Carlos Borges Rolim de Freitas, meu orientador, pelo incentivo e apoio nesta monografia.

A Sra. Cristiane Caldeira da Silva, minha orientadora pelo o incentivo e apoio nesta monografia.

Aos Coordenadores e Professores do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – PPGVS/INCQS-FIOCRUZ.

Aos participantes da banca examinadora.



Ao companheiro Eduardo Gomes de Souza que ao meu lado começamos os primeiros Ensaio de Pirogênio.

Ao colega Adigerson Ferreira Pires por ter participado ativamente para concretização deste trabalho.

Ao meu amigo Joel Felisbino de Souza, por ter sempre acreditado em mim e pela grande força, apoio e ajuda na elaboração dessa monografia.

Aos colegas do INCQS/FIOCRUZ pela atenção, ajuda e apoio moral quando precisei.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta monografia.

## Resumo

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser livres de pirogênio. Existem dois métodos oficiais na Farmacopéia Brasileira para a detecção da contaminação pirogênica: o Teste de pirogênio *in vivo* usando coelhos e o Teste do Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL). Recentemente foi incorporado na Farmacopéia Européia um terceiro teste denominado Teste de Ativação dos Monócitos (Monocyte Activation Test- MAT). Entretanto, devido a algumas limitações, o LAL e o MAT são modelos de substituição que no momento ainda não podem ser aplicados para produtos biológicos e neste contexto, a redução (3 Rs) é uma alternativa estratégica ao uso de animais. Pela Farmacopéia Brasileira, coelhos que tenham recebido produtos biológicos no teste de pirogênio *in vivo* não podem ser reutilizados para estes mesmos produtos, implicando na utilização de um grande número de animais para estas análises. O objetivo deste estudo foi avaliar a redução do número de coelhos através da sua reutilização para Vacina Antimeningocócica AC, verificando se estes animais continuam apresentando febre, quando administrados com amostras contaminadas com endotoxina (5UE/Kg). Este trabalho foi elaborado utilizando um desenho experimental onde os animais foram divididos em 4 grupos que receberam desde uma única injeção de vacina contaminada até o grupo que recebeu 3 injeções da vacina negativa, em intervalos de 48 horas, os quais foram desafiados no dia 7 com a vacina contaminada. Os resultados mostraram que a resposta ao estímulo positivo após as administrações da vacina negativa não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação à resposta ao estímulo positivo de uma única administração, independente do número de amostras negativas recebidas. Desta forma, pode-se concluir que, é possível reutilizar os coelhos até 4 vezes no período de uma semana para a Vacina Antimeningocócica AC desde que com resultado negativo, reduzindo custos e tempo de análise. Estes resultados permitem sugerir à Farmacopéia Brasileira a modificação da monografia do Teste de Pirogênio quanto à recomendação da reutilização.

## Abstract

Every injectable product intended for human administration must be tested free from any kind of pyrogenic contamination. There are two official methods in the Brazilian Pharmacopoeia for detection of pyrogens: the *in vivo* Rabbit Test and the Limulus Amoebocyte Lysate Test (LAL). It has also been recently incorporated into the European Pharmacopoeia a third assay called Monocytes Activation Test (MAT). Even though both LAL and MAT are very promising substitutes for the Rabbit test, they still cannot be applied to biological products due to some limitations. In this context, the reductions (three R`s) is a strategic alternative for the animal usage. The Brazilian Pharmacopoeia states that rabbits which have been previously injected with biological products on the pyrogenic *in vivo* test cannot be used again for the same means, what leads to a high number of animals used in that kind of analysis. The aim of this study was to evaluate the reduction in the number of rabbits by re-using of those animals for the meningococcal AC vaccine, checking if they keep presenting fever when samples spiked with endotoxin (5UE/kg) are administrated. This study was elaborated using an experimental design where animals were divided into four groups, which received from one to three injections of negative vaccine in a 48 hours interval which were challenged on day seven with spiked vaccine. Results attested that the answer to the positive shot after the negative vaccine administrations did not create statistically relevant difference from the one spiked administration, despite the increasingly number of negative injections taken per 48 hours interval. Therefore, it`s mandatory to assert the possibility of reutilization of rabbits for meningococcal AC vaccine, as soon as negative result, up to four times in a seven day period reducing costs and analysis time. These results allow us to suggest to the Brazilian Pharmacopoeia the modification about the recommendation of reutilization in the rabbits pyrogen test.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CGPNI	Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações
COX	Ciclo-oxigenase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
d.C.	depois de Cristo
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
ECVAM	European Center for Validation of Alternative Methods
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GEMOC	Gestão de Monitoramento de Custos
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LAL	Lisado do Amebócito do Limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde

PG	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGV	Parenterais de Grande Volume
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PNI	Programa Nacional de Imunização
PVC	Policloreto de Vinila
SUS	Sistema Único de Saúde
TAM	Teste de Ativação de Monócitos
Tc	Temperatura controle
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> )
UE	Unidades de Endotoxina
USP	Farmacopéia dos Estados Unidos ( <i>United States Pharmacopoeia</i> )
VDPE	Vice Diretoria de Planejamento e Estratégia
VISA	Vigilância Sanitária
VIT	Varição Individual de Temperatura

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Representação esquemática da alteração do set point hipotalâmico.	03
<b>FIGURA 2</b> - Patogenia da febre.	04
<b>FIGURA 3</b> - (A) Caranguejo–Ferradura ( <i>Limulus polyphemus</i> ) e (B) Extração da Hemolinfa do caranguejo.	08
<b>FIGURA 4</b> - Gráfico do total de Vacinas analisadas pelo setor de Pirogênio do INCQS no período de 2006 a 2009.	10
<b>FIGURA 5</b> - Sequência de fotos do Teste de Pirogênio <i>in vivo</i> .	16
<b>FIGURA 6</b> - Curva dose-resposta nas concentrações de 0,5; 1; 2 e 4 ng/mL/kg de LPS de <i>E. coli</i> em coelhos.	19
<b>FIGURA 7</b> - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 1 (n=12).	20
<b>FIGURA 8</b> - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 2 (n=12).	21
<b>FIGURA 9</b> - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 1 e 2 (n=24).	22

## **LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1** - Esquema das administrações nos coelhos das amostras contaminadas com 1 ng/mL de LPS *Escherichia coli* (A+) e não contaminadas (A) nos grupos experimentais para vacina antimeningocócica AC. 17

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 - Mecanismo da Febre	2
1.2 - O Controle da Qualidade de Vacinas	5
1.2.1 - O Teste de Pirogênio <i>in vivo</i>	6
1.2.2 - Métodos Alternativos ao Teste de Pirogênio <i>in vivo</i>	7
1.3 - Vacina Antimeningocócica AC	9
1.4 - Mecanismos Básicos Envolvidos no Processo de Imunização	11
<b>2 - JUSTIFICATIVA</b>	12
<b>3 - OBJETIVOS</b>	13
3.1 - Objetivo Geral	13
3.2 - Objetivos Específicos	13
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	14
4.1 - Animais	14
4.2 - Teste de Pitogênio <i>in vivo</i>	14
4.3 - Curva Dose-Resposta	15
4.4 - Desenho Experimental do Estudo de Reutilização	16
4.4.1 - Vacina Antimeningocócica AC	16
4.4.2 - Esquema de Administração da Vacina	17
4.5 - Análise Estatística	17
4.6 - Avaliação da Redução de Custo do Ensaio <i>in vivo</i>	18
<b>5 - RESULTADOS</b>	18
5.1 - Curva Dose-Resposta	18
5.2 - Reutilização de Animais para a Vacina Antimeningocócica AC	19
5.3 - Estimativa da Redução do Custo do Ensaio <i>in vivo</i>	22
<b>6 - DISCUSSÃO</b>	23
<b>7 - CONCLUSÕES</b>	26
<b>8 - REFERÊNCIAS</b>	27



## 1 – INTRODUÇÃO

Qualquer substância que tem a capacidade de induzir febre recebe o nome de pirogênio, do grego **pyro** que significa “fogo” e **genesis** que significa “criar ou resultar”. A maior parte das informações científicas sobre estes contaminantes surgiu nos últimos cinquenta anos, enquanto que o estudo da febre e seus sintomas são tão antigos quanto à própria medicina com relatos de até dois mil anos (PEARSON, 1985).

Na Grécia antiga a febre já era considerada por médicos como um agente terapêutico e não como uma patologia. Parmênides (500 a.C.) e Rhupos de Épheso (100 d.C.) compartilhavam deste conceito e acreditavam que, se a febre pudesse ser produzida artificialmente, certamente poderia curar grande parte das doenças (PEARSON, 1985).

Em 1862, Billbroth, foi provavelmente o primeiro pesquisador a usar o termo pirogênio para designar as substâncias capazes de induzir reações febris. Foi Burdon-Sanderson o que mais escreveu sobre os mecanismos da febre, quando, em 1876, lançou a discussão indagando se a origem da resposta febril estava nos agentes exógenos ou em agentes endógenos liberados por células do hospedeiro. Estas idéias estavam muito próximas do que atualmente entendemos sobre esse mecanismo (PEARSON, 1985).

Em 1930, Seibert, completa uma série de estudos clássicos, que comprovaram que a “febre de injeção”, terminologia da época, estava associada à administração intravenosa de produto bacteriano filtrado, comumente referido como pirogênio. Macacos, cavalos, cães e gatos, assim como os coelhos reproduziram uma resposta similar à do homem. Por razão de conveniência e economia, a seleção final do animal modelo para pirogênio ficou com o cão e o coelho. Posteriormente, Co Tui, pesquisador com grande experiência com cães e coelhos, relatou as vantagens e desvantagens de ambas as espécies e, o coelho tornou-se o animal modelo para o ensaio de pirogênio (WILLIAMS, 2007).

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

A grande vantagem anunciada para estes produtos era a exigência no rótulo da ausência de pirogênio, tendo por base o teste em coelhos desenvolvido por Seibert e seus colaboradores.

Com a II Guerra Mundial surgiu uma grande demanda na terapia de parenterais de grande volume o que atraiu a necessidade de garantir um ensaio para ausência de pirogênio em preparação intravenosa no compêndio oficial da Farmacopéia Americana (WILLIAMS, 2007).

O Comitê de Revisão da Farmacopéia Americana autorizou em 1941 o Subcomitê 3 em Ensaio Biológicos a iniciar o primeiro estudo colaborativo para o Ensaio de Pirogênio sob a direção de Henry Welch. Os resultados destes estudos foram publicados em 1943. Ainda durante o desenvolvimento deste estudo, o primeiro método oficial para detecção de pirogênio foi incorporado à décima segunda edição da Farmacopéia Americana no ano de 1942 sendo utilizado na sua forma original até recentemente (WILLIAMS, 2007; KIKKERT *et al*, 2008).

Apenas em 2001, a Farmacopéia dos Estados Unidos (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000), modificou os critérios de avaliação do teste, tornando-os mais rigorosos, considerando como febre a variação individual de temperatura (VIT) igual ou superior a 0,5°C, substituindo o critério anterior de igual ou superior a 0,6°C. Em 2003, a Farmacopéia Brasileira mudou Também o seu critério no fascículo 5º da 4ª edição (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

### **1.1- Mecanismo da Febre**

Os pirogênios são divididos em dois grupos: exógenos: que têm sua origem fora do organismo e endógenos que são produzidos pelo hospedeiro infectado. Pirogênios exógenos podem se originar de diversas fontes como bactérias, vírus, fungos, materiais antigênicos e alguns medicamentos. Dentre eles, a endotoxina, também designada como lipopolissacarídeo (LPS) proveniente de bactérias Gram-negativas, e é a responsável pela maior parte das contaminações importantes, e, devido à sua natureza termoestável nem sempre é possível ser eliminada através dos processos normais de esterilização (WILLIAMS, 2007).

Os pirogênios endógenos são produzidos pelo organismo e permitem uma das principais respostas à infecção pirogênica: a elevação da temperatura corporal.

Estas substâncias são secretadas por fagócitos mononucleares e pertencem a uma classe de imunopeptídeos chamadas citocinas sendo a interleucina (IL-1 $\beta$ , IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) as principais envolvidas no processo inflamatório (BEUTLER, 2002).

Pirogênios exógenos quando entram na corrente sangüínea ativam células de defesa, principalmente monócitos, que liberam as citocinas (mediadores inflamatórios) que, através da via de ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) levam à transformação do ácido aracdônico em prostaglandinas (PGs). Dos prostanóides resultantes desta transformação, a prostaglandina E2 (PGE2) é a que altera o termostato hipotalâmico resultando na febre (FIGURA 1). Todo esse mecanismo, associado ao aumento de cobre e redução de ferro, gera um sistema de produção e manutenção de calor (tremores e pilo-ereção) deflagrado com a finalidade de manter a temperatura nesse novo patamar (FIGURA 2). A temperatura do corpo é mantida nestes níveis altos até que os efeitos dos pirógenos cessem (BEUTLER, 2002; BLATTEIS, 2007).

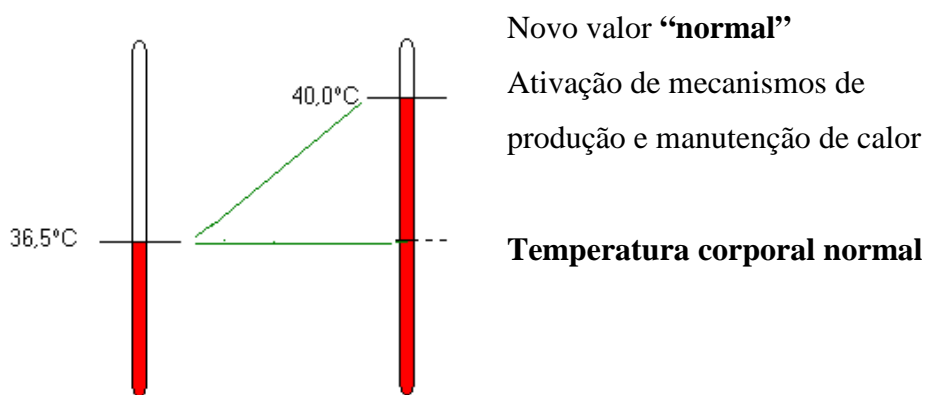


FIGURA 1 - Representação esquemática da alteração do set point hipotalâmico. A temperatura normal de referência, de 36,5°C é alterada para 40,0°C que passa a ser, então, a nova temperatura “normal” do corpo. Neste momento, surgem eventos para a produção e manutenção de calor (adaptado de PRESGRAVE, 2003).

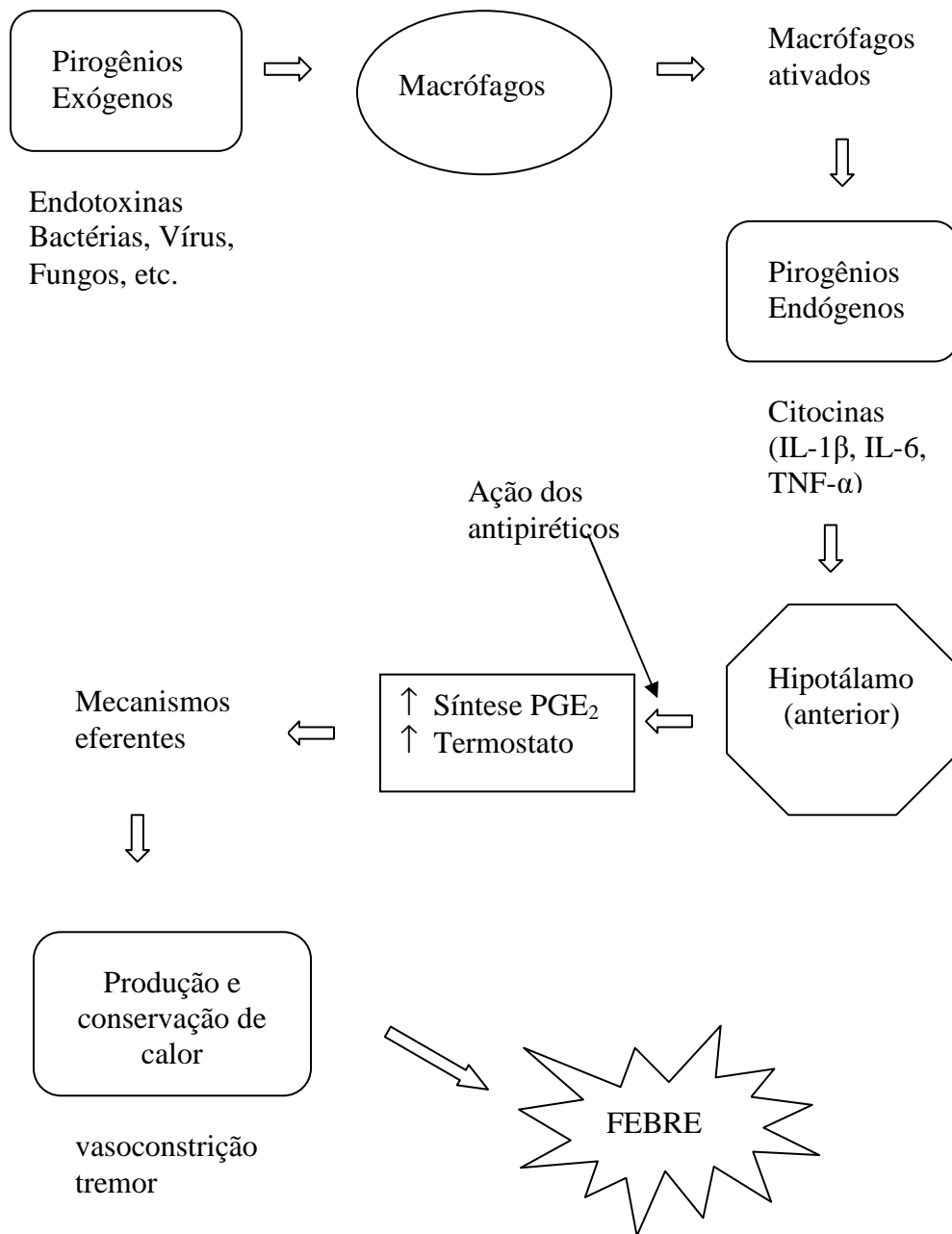


FIGURA 2 - Patogênese da febre. Pirógenos exógenos atuando sobre macrófagos induzem a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas). Esses mediadores atuam no hipotálamo alterando o *set-point* e desencadeando mecanismos de produção e conservação de calor, resultando na febre (Adaptado de PRESGRAVE, 2003).

## 1.2 - Controle da Qualidade de Vacinas

O Instituto nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) é um órgão público federal, de caráter técnico-pericial que assume atividades exclusivas de Estado. Atua em todo território nacional, atendendo ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e interagindo com organizações internacionais, vinculadas à qualidade de produtos ofertados à população. O Decreto nº 4.725, de 9 de junho de 2003 no seu artigo 28, parágrafo 2º define como uma das competências do INCQS o “estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde”. Além disso, tem como missão: “contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária” (PRESGRAVE, 2003; FREITAS,2008).

Todos os produtos injetáveis de uso humano, sujeitos à Vigilância Sanitária, que se encontram no mercado, devem ser livres de pirogênio (PRESGRAVE, 2003). Estes produtos incluem todos os dispositivos médicos que servirão como instrumento de administração de fluídos ou soluções. Além disso, medicamentos e hemoderivados também chegam para análise nos Laboratórios Oficiais através de denúncias ou de programas estabelecidos com Secretarias Municipais ou Estaduais de Saúde. Os imunobiológicos são analisados no INCQS como parte do Programa Nacional de Imunização, requisito básico para a efetivação da compra dos mesmos pela SNVS.

Laboratórios nacionais e estrangeiros fornecem as vacinas para uso no Brasil. Embora a maioria dos agentes imunizantes seja produzida a partir de cepas ou linhagens de bactérias ou vírus em instituições de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem particularidades no processo de produção de cada laboratório que contribuem, eventualmente, para que as vacinas apresentem diferenças em seu aspecto ou coloração (BRASIL, 2001).

O controle de qualidade das vacinas é realizado pelo laboratório produtor e deve obedecer a critérios padronizados, estabelecidos pela OMS. Após aprovação em testes de controle do laboratório produtor, cada lote de vacina é submetido à análise no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) órgão vinculado ao Ministério da Saúde (MS). Só depois a vacina é liberada para uso, garantida sua segurança, potência e estabilidade (BRASIL, 2001).

Existem três testes de segurança toxicológicos descritos nas farmacopéias para a detecção de pirogênios em produtos injetáveis: o Teste de Pirogênio *in vivo* em coelhos, o Teste de Endotoxina Bacteriana Também conhecido como Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL), e o Teste de Ativação de Monócitos, sendo apenas os dois primeiros reconhecidos pela Farmacopéia Brasileira. No caso das análises dos soros hiperimunes e algumas vacinas apenas o teste *in vivo* é recomendado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009).

### **1.2.1 - O Teste de Pirogênio *in vivo***

O Teste de Pirogênio *in vivo* fundamenta-se na observação da resposta febril em coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, onde se verifica a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; WILLIAMS, 2007).

É um ensaio que pode aprovar ou rejeitar uma amostra sendo utilizado para produtos que podem ser tolerados por coelhos em doses que não excedam 10 mL/kg de peso corporal, quando administrado dentro do período não superior a 10 minutos. Para produtos que necessitem preparação preliminar ou diluições apropriadas, estas condições são estabelecidas nas monografias das farmacopéias (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

A resposta pirogênica em coelhos tem uma característica bem marcante, pois se inicia cerca de 45 minutos após a injeção intravenosa, atingindo o seu pico na faixa de 60 a 90 minutos, iniciando uma descida ao nível basal (perfil monofásico) (WILLIAMS, 2007). Cabe ressaltar que os coelhos respondem à mesma concentração limite que o homem, ou seja, 1ng/kg, o que equivale a 5 UE/kg (HOESCHSTEIN *et al.*, 1990).

No que tange a reutilização de animais, as principais farmacopéias internacionais preconizam que, quando o ensaio é considerado negativo, os animais podem ser reutilizados, respeitando interstício de 48 horas.

No caso de teste positivo, deve-se obedecer a um intervalo de 14 dias para que os mesmos possam ser usados para qualquer produto (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001). A Farmacopéia Brasileira não recomenda a reutilização de coelhos para produtos biológicos, porém mantém as condições de reutilização de animais para os demais produtos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

A categoria de produto biológico é mencionada na Lei nº 6.360/76, sendo descritos como soros, vacinas, bacteriófagos, hormônios e vitaminas naturais ou sintéticas, fermentos e outros, conforme preconiza o Decreto 79.094/77 regulamentador da referida Lei. A Resolução - RDC nº 315/05, que versa sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alterações Pós-Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados, E acrescenta àquela lista os seguintes produtos: Hemoderivados; Biomedicamentos (obtidos de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal, e de procedimentos biotecnológicos); anticorpos monoclonais; probióticos e alérgenos (BRASIL, 1976; FREITAS, 2008).

### **1.2.2 - Métodos Alternativos ao Teste de Pirogênio *in vivo***

A partir de 1959, com a publicação do livro “The principles of humane experimental technique”, por Russel e Burch, foi introduzido o conceito dos “3 Rs” (Reduction, Refinement and Replacement) no meio científico que consiste na redução do número de animais, refinamento das técnicas experimentais minimizando o sofrimento do animal e preservando o seu bem estar e quando possível à substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro*. Este conceito evoluiu como uma tendência mundial, iniciando uma forte pressão com implicações éticas quanto a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no árduo trabalho da validação de métodos alternativos na área de toxicologia (BALLS *et al*, 1995).

O Teste do Lisado do Amebócito do Limulus (LAL), um ensaio *in vitro* muito sensível para a detecção de endotoxinas, foi implementado para um grande número de produtos, entretanto com a limitação de não revelar a presença de outras substâncias pirogênicas (HARTUNG *et al*, 2001; MOESBY *et al*, 2000).

Apesar de desenvolvido ainda na década de 1970, o LAL só foi considerado como método farmacopéico em 1985, em alguns casos onde o teste em animal não poderia ser utilizado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000; HARTUNG *et al*, 2001) (FIGURA 3).

Entretanto, este teste não é preconizado para a maior parte das vacinas, em função das interferências provocadas por esses produtos na reação de gelificação (HARTUNG *et al*, 2001, PRESGRAVE, 2003).



FIGURA 3 - (A) Caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) e (B) processo de extração da hemolinfa (Fotos extraídas de PRESGRAVE, 2003).

Seguindo a tendência mundial na busca por métodos alternativos ao uso de animais, o teste de liberação de citocinas utilizando linhagens celulares ou sangue humano foi desenvolvido no final da década de 1980 e início dos anos 1990, tomando por base o princípio do mecanismo da febre. Este método quantifica mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) envolvidos neste processo, levando à febre (POOLE *et al*, 1988; HARTUNG e WENDEL, 1996; NETEA *et al*, 2000; HARTUNG *et al*, 2001; CALDEIRA *et al*, 2005; PRESGRAVE *et al*, 2005).

As perspectivas de uso do método de liberação de citocinas *in vitro* incluem a sua utilização tanto por órgãos reguladores quanto pelas indústrias, uma vez que abrange todos os pirogênicos, além de não representar gastos com a manutenção de animais. Este método foi validado através de um estudo colaborativo medicamentos, entretanto, não foram contemplados produtos biológicos de importância nacional como os imunobiológicos, (HOFFMANN *et al*, 2005; SCHINDLER *et al*, 2006; ECVAM, 2006). Assim, o coelho permanece como a única alternativa para avaliação da contaminação pirogênica destes produtos (FREITAS, 2008).



Recentemente, este método foi incorporado à Farmacopéia Européia sob a denominação de Teste de Ativação de Monócitos, porém, como um terceiro teste, sem substituir o teste *in vivo* ou o LAL uma vez que os dados na literatura não foram considerados conclusivos e deixando clara a necessidade de novos estudos na área. (ICCVAM, 2008; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009; SCHINDLER *et al*, 2009;).

Em alguns casos onde a substituição ainda não é possível, a concepção da redução (3 Rs) é uma alternativa estratégica ao uso de animais. Este conceito pode ser aplicado ao teste de pirogênio, já que o Ensaio de Endotoxinas e Teste de Ativação de Monócitos são modelos de substituição que no momento ainda não podem ser aplicados para produtos biológicos. Apesar da carência de dados na literatura, foi apresentado um estudo durante a “Primeira Oficina de Ensaio Biológicos” em Cuba onde foi comprovada a possibilidade de reutilização dos animais nos testes de pirogênio para a vacina anti-hepatite B até três ou quatro vezes em um período de uma semana, reduzindo em até um terço o número de animais (BOURG *et al*, 1997). Outro trabalho realizado no INCQS utilizando soros hiperimunes corroborou estes achados encontrando resultados semelhantes para esta classe de produtos (FREITAS, 2008).

### **1.3 - Vacina Antimeningocócica AC**

A vacina é o imunobiológico que contém um ou mais agentes imunizantes (vacina isolada ou combinada) sob diversas formas: bactérias ou vírus vivos atenuados, vírus inativados, bactérias mortas e componentes de agentes infecciosos purificados e/ou modificados quimicamente ou geneticamente. O produto em que a vacina é apresentada contém, além do agente imunizante, o líquido de suspensão, conservantes, antibióticos e estabilizadores (BRASIL, 2001; SANTOS *et al*, 2008).

A *Neisseria meningitidis* (o meningococo) é o líder causador da meningite e septicemia fulminante e um problema significativo de saúde pública na maioria dos países. A composição antigênica da cápsula polissacarídica permite a classificação do meningococo em 13 diferentes sorogrupos: A, B, C, D, H, I, K, L, W135, X, Y, Z e 29E.

Os sorogrupos A, B, C, Y e W135, são responsáveis por praticamente todos os casos de doença, infectando apenas humanos (SORIANO-GABARRÓ *et al*, 2002, SÁFADI *et al*, 2006). No Brasil, o número de casos notificados de meningite por meningococo foi de 2.264 em 2007 e 2.555 em 2008, segundo o Ministério da Saúde (MS).

Mas o número real pode ser mais que o dobro dos números divulgados, uma vez que 50% dos casos de meningite bacteriana acabam não sendo comunicados às autoridades de saúde (SÁFADI *et al* 2006; SANTOS *et al*, 2008).

Estes dados refletem a demanda encontrada no INCQS, uma vez que, a vacina antimeningocócica, possui análises realizadas lote a lote, como parte do Programa Nacional de Imunização (PNI) e requisito básico para efetivação da compra das mesmas pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunização (CGPNI). Entre o período de 2006 a 2009 o Setor de Pirogênio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) analisou 75 vacinas, sendo que deste total 52% foram representadas pela vacina antimeningocócica AC (FIGURA 4).

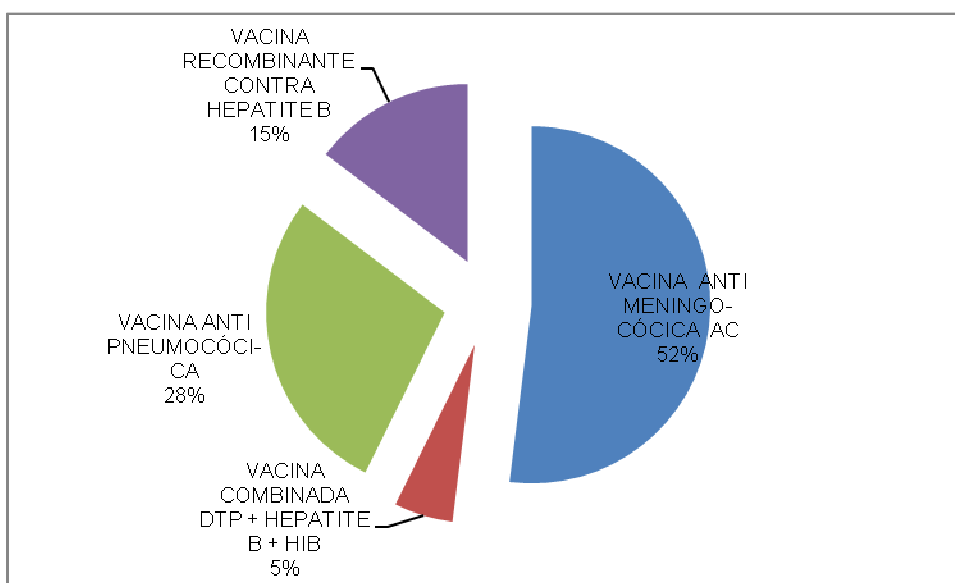


FIGURA 4 – Gráfico do total de vacinas analisadas pelo Setor de Pirogênio no período de 2006 a 2009.

#### 1.4 - Mecanismos Básicos Envolvidos no Processo de Imunização

O processo imunológico pelo qual se desenvolve a proteção conferida pelas vacinas é semelhante àquele utilizado pelo organismo para lutar contra as infecções virais ou bacterianas (BRASIL, 2001).

O antígeno encontra-se no agente ou na substância reconhecida como estranha pelo organismo, podendo ser componente de bactérias, vírus e etc. Depois de sua penetração, através da pele e/ou de mucosas, atinge a circulação sanguínea e linfática e alcança os órgãos linfóides secundários (gânglios linfático, baço e nódulos linfóides). O antígeno sofre processamento inicial e, após esse processamento, o mesmo, agora fragmentado, é apresentado aos linfócitos envolvidos na fase efetora da resposta imune. Os linfócitos, originários das células primordiais da medula óssea, sofrem processos de diferenciação celular, de que resulta o aparecimento dos linfócitos T e B, cujas atividades são distintas e complementares. Da interação dos antígenos com os receptores dos linfócitos T e B resulta o estímulo dessas células e subsequente ativação (ABBAS *et al*, 2000).

Dependendo das características e propriedade de cada vacina, os processos imunológicos podem envolver diferentes mecanismos. A imunidade após a infecção meningocócica é sorogrupo-específica, e, portanto, as vacinas comercializadas atualmente são combinações de polissacarídeos capsulares purificados grupo específicos (bivalentes AC, monovalente A ou C) ou em um conjugado entre o polissacarídeo específico e uma proteína carreadora, grupo C (antimeningocócica conjugada tetravalente A, C, Y, e W135, com toxina diftérica não tóxica mutante - CRM 197 ou toxoíde tetânico) (SAFADI *et al*, 2006). As vacinas produzidas a partir dos polissacarídeos purificados conferem ao organismo a proteção necessária por meio da imunidade humoral que é essencial na resistência à doença meningocócica e não depende da participação da imunidade celular, tímica, sendo por isso denominada T-independente. (SORIANO-GABARRÓ *et al*, 2002).

Os antígenos polissacarídeos são capazes apenas de estimular linfócitos B, sem a participação de linfócitos T-auxiliares, induzindo imunidade de mais curta duração. Neste tipo de resposta, que se segue ao primeiro contato com o antígeno, há um período de latência de alguns dias ou algumas semanas entre o estímulo e o aparecimento de anticorpos séricos: IgM, IgA e IgG (ABBAS *et al*, 2000).

A participação da imunidade celular na doença meningocócica é pouco definida. As vacinas polissacarídeas conjugadas com as proteínas carreadoras modificam a resposta celular independente de linfócitos T para dependente (SORIANO-GABARRÓ *et al*, 2002). Como resultado da ativação de linfócitos T, dá-se o aparecimento de diversas subpopulações dessas células: linfócitos T-auxiliares, linfócitos T-supressores, linfócitos T-citotóxicos, linfócitos T responsáveis pelas reações de hipersensibilidade tardia e linfócitos T-memória (ABBAS *et al*, 2000).

## **2 – JUSTIFICATIVA**

O Setor de Pirogênio do INCQS, seguindo consultores da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) desde a sua criação, adotou como procedimento não reutilizar os coelhos para produtos biológicos como questão de segurança, devido à possibilidade do desenvolvimento de resposta cruzada ao pirogênio em coelhos administrados sucessivamente para este tipo de produto. A partir dos promissores resultados obtidos em estudos anteriores no INCQS e em Cuba, da limitação dos métodos alternativos hoje existentes e a competência do INCQS para o estabelecimento de normas, surgiu à necessidade de se verificar a possibilidade de reutilização dos animais, através de um modelo consistente de redução para testar vacinas.

A possibilidade de reutilização dos coelhos reduz o custo dos ensaios e o tempo de análise, além de estar em consonância com a tendência mundial do preceito dos 3 Rs. O presente trabalho pretende contribuir significativamente como alternativa à atual situação, uma vez que a importância de novos estudos na literatura sobre a possibilidade de reutilização dos coelhos no teste de pirogênio para produtos antigênicos gera a necessidade de estudos mais rigorosos e que incorporem um maior número de produtos de uma forma segura e confiável.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Avaliar a redução do número de coelhos utilizados no teste de pirogênio, através da reutilização para vacina antimeningocócica AC, verificando se animais que receberam amostras não contaminadas, ainda apresentam a capacidade de responder ao estímulo febril, quando administrados com amostras contaminadas na dose limite de endotoxina (5UE/Kg).

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Testar a sensibilidade dos animais na dose limite utilizando uma curva dose-resposta;
- avaliar a reutilização de animais em diferentes intervalos de tempo;
- avaliar a redução de custo do ensaio *in vivo* em função da possibilidade de reutilização.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Animais**

Foram utilizados 49 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, machos ou fêmeas, pesando acima de 1.500 gramas. Sendo que 25 animais foram utilizados para a curva dose-resposta e 24 para o estudo de reutilização. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em temperatura ambiente de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade de 50% a 70%, com água filtrada e ração apropriada *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Foi fornecido feno autoclavado como enriquecimento ambiental. Os coelhos foram provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Após os experimentos, todos os animais foram submetidos à eutanásia por administração intravenosa de tiopental na concentração de 100 mg/kg. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), através da Licença nº 137/02.

### **4.2 - Teste de Pirogênio *in vivo***

Os animais foram treinados 24 horas antes do início do teste, simulando o mesmo procedimento do ensaio, sem haver, entretanto, a administração de qualquer produto. Aqueles que apresentaram variação individual de temperatura (VIT) igual ou menor que  $0,3^{\circ}\text{C}$  foram considerados aptos a entrarem em teste. No dia do ensaio os animais foram pesados para o cálculo do volume a ser administrado, e depois, colocados em gaiolas de contenção de policloreto de vinila (PVC), para a colocação do eletrodo no reto do animal (6-7 cm) e registro da temperatura individual. Foi feita a tricotomia da orelha, antes da injeção, para facilitar a visualização da veia marginal e a introdução da agulha. Os animais foram mantidos em repouso por pelo menos 30 minutos antes da administração das amostras e após este período, a temperatura controle (Tc) foi registrada pelo equipamento. Foram utilizados os animais com temperatura igual ou inferior a  $39,8^{\circ}\text{C}$  no momento do ensaio e que não apresentaram variação superior a  $1,0^{\circ}\text{C}$  no mesmo grupo. As soluções-teste foram administradas pela veia marginal da orelha de cada animal (FIGURA 5).

Após a administração, os animais foram mantidos por três horas, com registro contínuo da temperatura em intervalos de 30 minutos. A medida de temperatura e o cálculo da VIT foram realizados utilizando o sistema de monitoramento de pirogênio PyroMon® da Ellab. A avaliação foi realizada automaticamente pelo equipamento subtraindo-se a temperatura controle da maior temperatura individual registrando-se a VIT (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

Segundo o critério para a aprovação de produtos descritos pela Farmacopéia Européia, no primeiro ensaio são utilizados 3 (três) animais por dose, considerando-se o produto satisfatório quando nenhum animal apresentar a VIT igual ou superior a 0,5°C. No caso do produto ser considerado duvidoso, ou seja, se pelo menos 1 (um) dos 3 (três) animais alcançar esta variação, o ensaio deverá ser repetido com 5 (cinco) animais. O produto será considerado satisfatório se no máximo 3 (três) dos 8 (oito) animais apresentarem VIT igual ou superior a 0,5°C e se o somatório das variações individuais de temperatura dos 8 (oito) animais não for superior a 3,3°C. Caso contrário, a amostra é considerada pirogênica (INCQS, 2007; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; HOCHSTEIN *et al*, 1990).

Cabe ressaltar, que todos os procedimentos relacionados à administração dos animais para obtenção dos dados relativos a curva dose-resposta e à reutilização, seguiram como descrito no teste de pirogênio (item 4.2). Entretanto, não foi utilizado o critério de aprovação de produtos como descrito na Farmacopéia, sendo considerando apenas a VIT de cada animal como resposta febril. Desta forma, os ensaios não foram repetidos com 5 novos animais como um teste duvidoso, já que, a administração de 1 ng/kg produziu a resposta de febre e a aplicação do teste com 8 coelhos implicaria na utilização desnecessária de animais.

### **4.3 - Curva Dose-Resposta**

A curva dose-resposta foi realizada para testar a sensibilidade dos animais nas diferentes concentrações de LPS, nas seguintes doses: 0,5; 1; 2; e 4 ng/kg de LPS de *Escherichia coli* (SIGMA-Sorotipo 055B5), além de um grupo com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl). Foram utilizados 5 (cinco) coelhos para cada ponto da curva, que receberam 1 mL/kg de solução pela veia marginal da orelha.



FIGURA 5 – Etapas do teste *in vivo*. Os animais são colocados em gaiolas de contenção (A), os eletrodos são colocados no reto dos animais (B) e o produto é injetado na veia marginal da orelha após 30 minutos de repouso (C). O registro das temperaturas é feito pelo equipamento Pyromon® ELLAB, durante um período de três horas (D).

#### 4.4 - Desenho Experimental do Estudo de Reutilização

##### 4.4.1 - Vacina Antimeningocócica AC

As amostras utilizadas neste estudo foram selecionadas com base na representatividade dos produtos biológicos analisados nos últimos anos pelo Setor de Pirogênio. Entre as vacinas, selecionou-se a vacina antimeningocócica AC por ter maior demanda nos últimos anos. Todas as amostras utilizadas foram provenientes da rotina de análise, do mesmo produtor e os lotes foram previamente testados, apresentando resultado satisfatório. Além disso, foram utilizados os mesmos lotes de cada produto nos experimentos. As amostras contaminadas foram obtidas através da adição de 1 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (SIGMA-Sorotipo 055B5). Esta concentração foi selecionada por refletir o limite da dose pirogênica humana e ser a menor dose que causa febre nos coelhos (HOCHSTEIN *et al*, 1990).



#### 4.4.2 - Esquema de Administração da Vacina

Foram realizados experimentos independentes cada um com 12 animais (N=24) utilizando a vacina antimeningocócica AC. O esquema geral da reutilização é apresentado no Quadro 1. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo cada grupo experimental formado por 3 coelhos, e as administrações seguiram intervalos de 48 horas durante 7 dias.

**QUADRO 1** - Esquema das administrações, nos coelhos, das amostras contaminadas com 1 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (A+) e não contaminadas (A) nos grupos experimentais para vacina antimeningocócica AC.

	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
Grupo I	A+			
Grupo II	A	A+		
Grupo III	A	A	A+	
Grupo IV	A	A	A	A+

Em todos os casos os animais receberam 1 mL/kg. O Grupo I recebeu somente amostra contaminada (*spike*), com a finalidade de servir como controle positivo, sendo usado como comparação das respostas dos demais grupos. O Grupo II recebeu uma administração de amostra não pirogênica e, 48 horas após, a amostra de vacina contaminada. O Grupo III recebeu amostra negativa nas duas primeiras administrações, tendo recebido a amostra contaminada no dia 5. O Grupo IV recebeu nos dias 1, 3 e 5 amostras não pirogênicas e no dia 7, a amostra contaminada.

#### 4.5 - Análise Estatística

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

#### **4.6 - Estimativa da Redução de Custo do Ensaio *in vivo***

A análise de custo foi estimada apenas em termos do valor individual dos animais utilizados na etapa de reutilização (R\$ 57,90 para coelhos na faixa de 60 a 100 dias, pesando entre 1500 e 2400 gramas).

### **5 - RESULTADOS**

#### **5.1 - Curva Dose-Resposta**

A curva dose-resposta foi realizada para testar a sensibilidade dos animais nas diferentes concentrações de LPS, avaliando a resposta do animal nas doses não pirogênica, limite e pirogênica.

Pode ser observado que as variações de temperatura dos coelhos apresentaram uma resposta com o perfil típico de uma curva monofásica e pico de febre ( $VIT \geq 0,5^{\circ}C$ ) em 60 minutos (FIGURA 6). Estes resultados mostram que não houve elevação de temperatura do grupo controle nem nos animais que receberam a dose não pirogênica. A resposta de febre foi observada a partir da concentração limite de 1 ng/mL/kg ( $VIT = \text{média} \pm \text{erro padrão}$ ), demonstrando a sensibilidade esperada. Estes dados confirmam os apresentados na literatura que mostram que 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre no coelho e no homem (HOCHSTEIN *et al*, 1990). Os animais que receberam as doses pirogênicas de 2 e 4 ng/mL/kg apresentaram VIT de 1,05°C e 1,25°C respectivamente, demonstrando uma resposta dependente da dose.

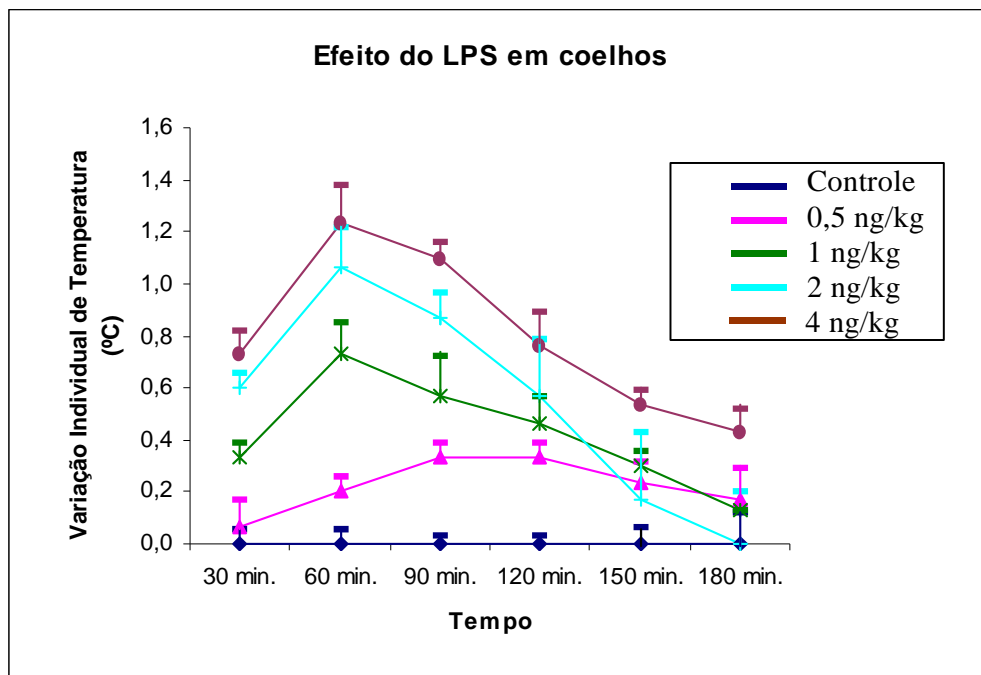


FIGURA 6 - Curva dose-resposta nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4 ng/mL/kg de LPS de *E.coli* em coelhos. A resposta de febre (VIT  $\geq$  0,5°C) pode ser observada a partir da dose limite de 1ng/mL/kg.

## 5.2 - Reutilização de Animais para a Vacina Antimeningocócica AC

Foram realizados experimentos seguindo o esquema descrito no item 4.4.2. Para fins de análise foram considerados os resultados (VIT= média  $\pm$  erro padrão) dos 24 animais que participaram dos ensaios e receberam a dose de 1 ng/mg. Do total destes animais, três coelhos não apresentaram febre. Este número foi considerado aceitável levando-se em conta a variabilidade biológica do modelo animal, por se tratar de uma dose limite, e, portanto, considerados importantes para a compreensão dos resultados.

No primeiro experimento todos os grupos (n=12) que receberam a vacina contaminada apresentaram VIT  $\geq 0,5$  °C (VIT= média  $\pm$  erro padrão) independente do número de vacinas negativas recebidas anteriormente. Também pode ser observada, principalmente no grupo II, uma elevação da resposta febril 48 horas após a primeira administração em comparação ao grupo I considerado como controle positivo (FIGURA 7).

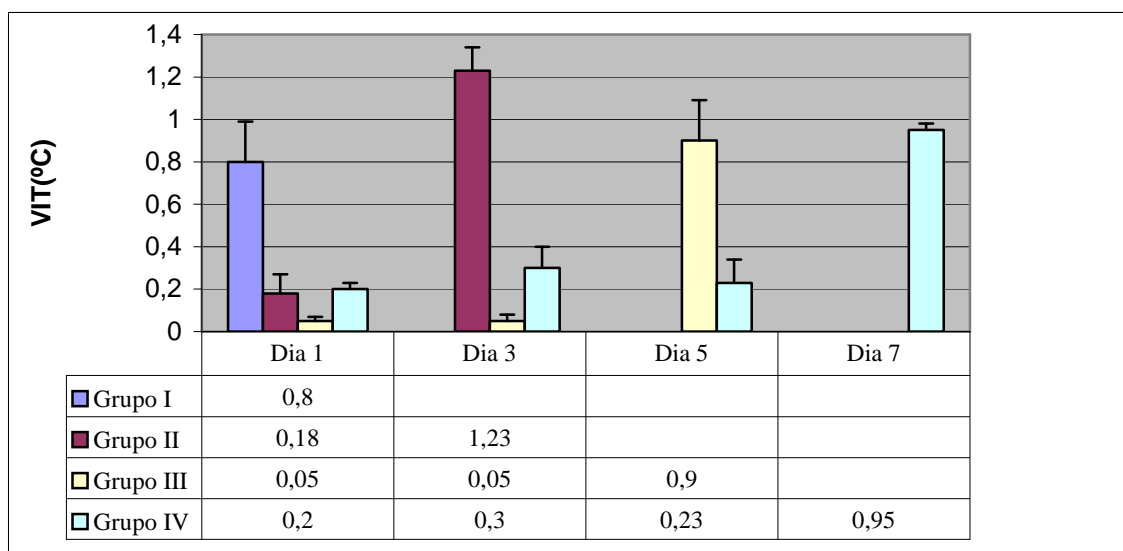


FIGURA 7 - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 1 (n=12, média  $\pm$  EP).

Os dados do segundo experimento ratificaram os encontrados anteriormente, onde, todos os grupos (n=12) que receberam a vacina contaminada apresentaram febre (VIT= média ± erro padrão). Também pode ser observado um aumento da resposta no grupo II (dia 3) em relação ao grupo I. Além disso, o grupo IV Também apresentou um aumento da resposta febril (dia 7) 48 horas após a última administração (dia 5), em relação ao grupo I não observado anteriormente (FIGURA 8).

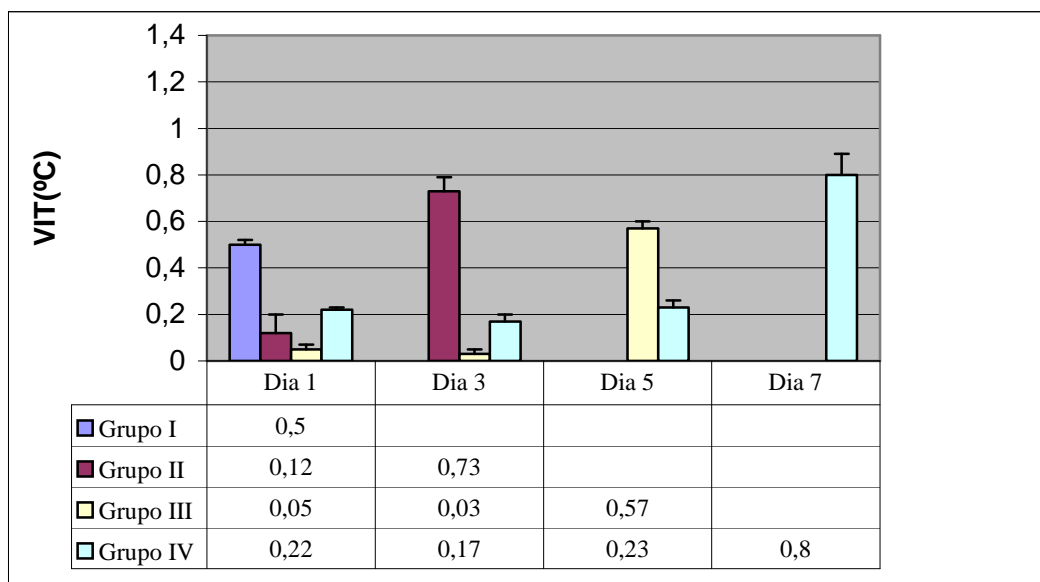


FIGURA 8 - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 2 (n=12 , média ± EP).

Quando se utilizam os resultados dos 24 animais (VIT= média ± erro padrão) essa tendência em relação ao grupo II permanece, mostrando uma discreta elevação de resposta no dia 3 em relação ao grupo I, após 48 horas da última administração da vacina negativa (FIGURA 9).

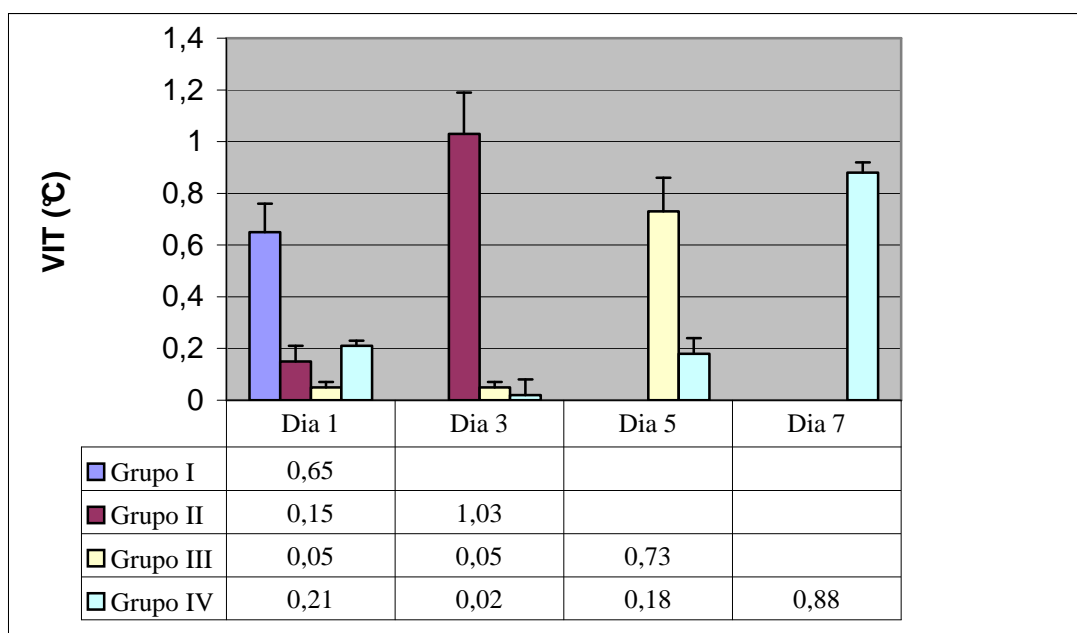


FIGURA 9 - Gráfico da Reutilização de coelhos que receberam vacina antimeningocócica AC não contaminada e contaminada com 1 ng/mL. Experimento 1 e 2 (n=24, , média ± EP).

A resposta da vacina com 1 ng/mL não foi estatisticamente significativa entre si, quando avaliadas pelo método de Kruskal-Wallis. Este fato indica que não há efeito cumulativo do produto e, sugere, que a elevação não está relacionada com a segunda injeção, mas, provavelmente foi um evento ao acaso, devido às variações intrínsecas do modelo animal.

### 5.3 - Avaliação de Redução do Custo do Ensaio *in vivo*

O custo foi estimado somente em termos do valor individual dos animais (R\$ 57,90 para coelhos na faixa de 60 a 100 dias, pesando entre 1500 e 2400 gramas). Levando-se em consideração a possibilidade de reutilização dos animais em até 4 vezes em 7 dias, e que, a execução do teste para uma amostra é realizada com 3 animais haveria um custo atual de R\$ 173,70 por amostra. Desta forma reutilizando animais, por este mesmo valor, seriam analisadas 4 amostras pelo valor de uma significando um custo de R\$ 43,42 por amostra.

## 6 - DISCUSSÃO

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

Diante disso, esta dose foi utilizada como parâmetro para este estudo, pois, qualquer alteração de resposta nesse nível de dose inviabilizaria a reutilização de animais. Além disso, doses acentuadamente elevadas poderiam não sofrer interferências da reutilização, justamente por provocarem reações pirogênicas significativas.

Os resultados sugerem que os animais podem ser novamente utilizados, uma vez que não houve diferença entre as respostas nos diferentes dias. O aumento de resposta observada no grupo II (dia 3) não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo I (controle positivo) e desta forma atribuído a uma variabilidade biológica do modelo animal.

Neste estudo, os achados em relação à vacina antimeningocócica AC corroboram os do estudo apresentado por Bourg para vacina anti-hepatite B e por Freitas para soros hiperimunes onde mostram a possibilidade de reutilizar animais, até um máximo de 4 vezes, no período de uma semana. Segundo estes achados, este fato contribui para reduzir em um terço o número de coelhos utilizados (BOURG *et al*, 1997; FREITAS, 2008).

Estudos complementares devem ser conduzidos com a finalidade de testar todas as possibilidades de administração prévia de diferentes produtos biológicos.

Ainda falta ser avaliado se é possível a reutilização dos mesmos animais para diferentes produtos simultaneamente e se existe a possibilidade de reutilização dos animais para outros produtos biológicos, dentro dos 14 dias preconizados pela Farmacopéia Brasileira, no caso de um resultado positivo na primeira administração. No entanto, a importância maior do estudo de reutilização de animais está na avaliação de amostras negativas, uma vez que historicamente, o número de amostras insatisfatórias no teste de pirogênio é muito reduzido, não ultrapassando 2% do total de amostras analisadas por ano no INCQS. Além da questão ética relacionada à redução, a reutilização contribui de forma significativa para a redução do custo do ensaio por amostra, ou seja, de R\$ 173,70 para R\$ 43,42. Citando como exemplo o próprio setor de pirogênio onde são utilizados por semana, um lote de animais de 24 coelhos, do qual, se todos os animais forem considerados aptos no treinamento corresponderiam a 8 produtos avaliados. Se este mesmo lote de animais for utilizado quatro vezes na mesma semana para a mesma classe de produtos, podem ser liberadas até 32 amostras com os mesmos animais, sem a necessidade de solicitar novos coelhos ao CECAL.

Esta redução significativa do custo ratifica o resultado encontrado por Freitas (2008), onde segundo o autor, um relatório realizado em 2005 pela Gestão de Monitoramento de Custos (GEMOC) para o INCQS, apresentou que um ensaio de pirogênio *in vivo* custava por amostra R\$ 733,28. Cabe ressaltar, que o cálculo foi uma estimativa, já que, o custo por amostra pode diminuir dependendo do número de amostras analisadas no dia, além do preço do animal. Além disso, na realização de 5 amostras simultâneas, o custo ficaria em R\$ 701,40, uma vez que os gastos fixos (luz, hora-homem e etc) se mantêm constantes. Ainda segundo o mesmo autor, quando reutilizados os mesmos animais até 4 vezes no período de 7 dias, a redução dos custos giraria em torno de 25% dos valores atuais. Além disso, os dados encontrados indicaram que 20 amostras realizadas de forma simultânea com animais reutilizados custariam os mesmos R\$ 701,40 para 5 amostras (FREITAS, 2008).

Outro ponto fundamental que deve ser ressaltado quanto à reutilização são as questões práticas em termos de agilidade de prazos e laudos. Essa agilidade de prazos se refere ao fato de que, uma vez que os animais possam ser reutilizados, a solicitação dos mesmos ao CECAL será menos freqüente, já que os animais ficarão no próprio INCQS em experimentação por um tempo maior. Cabe ressaltar que a utilização repetida desses animais não fere nenhum princípio ético, uma vez que os mesmos não estão submetidos a estresse e nem a procedimentos dolorosos.



A possibilidade de reutilização dos coelhos para vacina antimeningocócica AC pode refletir, Também, na redução de custos da produção desses produtos significando a médio ou longo prazo uma economia aos cofres públicos relativos à compra dos mesmos para distribuição aos postos de saúde.

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

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

Assim sendo, até que o uso do método *in vitro* do Teste de Ativação de Monócitos esteja validado e reconhecido pelos órgãos regulatórios para testar vacinas, a única forma de seguir o preceito dos 3Rs, é reduzindo o uso de animais no teste de pirogênio através da reutilização de coelhos já submetidos à administração prévia desses produtos que tenham apresentado resultados negativos quanto a pirogenicidade, assim como já é preconizado pela Farmacopéia Brasileira para outras classes de produtos.

## **7 - CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados permitem as seguintes conclusões:

1 - É possível reutilizar coelhos que tenham recebido vacina antimeningocócica AC até 4 vezes no período de 7 dias, respeitando os intervalos de 48 horas, desde que os mesmos tenham apresentado resultado negativo;

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

3 - Como consequência da redução de animais, os custos envolvendo a criação e a manutenção destes, Também sofrerá decréscimo;

4 - Os resultados encontrados permitem sugerir à Farmacopéia Brasileira a modificação da monografia da vacina antimeningocócica AC, quanto à recomendação de reutilização dos coelhos no teste de pirogênio.

## 8 - REFERÊNCIAS

ABBAS K., LICHTMAN A H, POBER J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2000.

### **ANVISA, 2009.**

Ref.<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuário&usersecoes=36&usearssu nto=143>. Acessado em 20/12/2009.

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

BEUTLER, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. **Currents Topics in Microbiology and Immunology**, v. 270, p. 100-120, 2002.

BLATTEIS C.M. The onset of fever: new insights into its mechanism. **Progress in Brain Research**; n.162, p.3-14, 2007.

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

BRASIL, LEI n ° 6360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências.

BRASIL, FUNASA. **Manual de normas de vacinação**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: <[http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/manu\\_normas\\_vac.pdf](http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/manu_normas_vac.pdf)> Acesso em: 10/12/2009.

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

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

ECVAM. European Centre for the Validation of Alternative Methods. 2006 [on line] Disponível em <http://www.ecvam.jic.it/>. [Acesso em 28 novembro.2009].

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

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test, 2.6.8 Pyrogens. Strasbourg: Council of Europe, 2001

EUROPEAN PHARMACOPEIA. Monocyte Activation Test. General Method 2.6.30. 6<sup>th</sup> Edition, Suppl. 6.7.; 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4<sup>a</sup> ed. Parte II. São Paulo: Editora Atheneu , 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4<sup>a</sup> ed. Parte II. Fascículo. 5. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FREITAS, J. C. B. R. **A importância da realização periódica da curva dose-resposta de LPS como ferramenta para garantir a sensibilidade dos coelhos no Teste de Pirogênio.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 28 p. Monografia (Especialização) – Fundação Oswaldo Cruz, Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviço vinculados à Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao Teste de Pirogênio com soros hiperimunes sujeitos a Vigilância Sanitária.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. 60 p. Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

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

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

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

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

ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. ICCVAM test method evaluation report. NIH publication number 08-6392; 2008.

INSTITUTO BUTANTAN. Produção de soros, vacinas e biofármacos. [on line] Disponível em: <http://www.butantan.gov.br>. [Acesso em 06 dezembro 2009].

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

KIKKERT R., DE GROOT ER, ARDEN L.A. Cytokine induction by pyrogens: comparison of whole blood, mononuclear cells, and TLR-transfectants. **Journal of Immunological Methods**. v.20; n.336(1), p.45-55 Jul., 2008.

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

MOESBY, L.; HANSEN, E W.; CHISTENSEN, JD. Endotoxin testing of proteins for parenteral administration using the Mono Mac 6 assay. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**., v. 25, n. 4, p. 283-289, 2000.

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

POOLE, S.; THORPE, R.; MEAGER, A.; GEARING, A. J. H. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release from monocytes. **Developments in Biological Standardization**.; 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 de qualidade de produtos injetáveis**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. 83p. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro.

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

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

SÁFADI MA, BARROS AP. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. **Jornal de Pediatria** (Rio J).; n.82, Suppl 3, p.35-44, Jul 2006.

SANTOS, H.; PINTO, E.; VALENTE, I. A Survey of Meningococcal Vaccination Coverage in a Primary Health Centre. **Saúde Infantil**, n.30; v.2, p.62-64, 2008.

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

SCHINDLER, S; VON- AULOCK; S.; DANESHIAN, M. AND HARTUNG, T. Development, validation and applications of the Monocyte Activation Test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, 26, p. 265:277, 2009.

SORIANO-GABARRÓ M., STUART J.M., ROSENSTEIN N.E. Vaccines for the prevention of meningococcal disease in children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. Jul; n. 3, v. 3, p.182-9, 2002.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). I. Biological Test- Pyrogen test. 24, Rochville, MD, 2000.

WILLIAMS, L. K. **Endotoxins. Pirogens, LAL Testing and Depyrogeneration**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 372 p; 2007.