

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

Thais de Andrade Oliveira Colares

**USO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
PIROGÊNICA DE PRODUTOS BIOLÓGICOS: UMA REVISÃO DE ESCOPO**

Rio de Janeiro

2022

Thais de Andrade Oliveira Colares

USO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
PIROGÊNICA DE PRODUTOS BIOLÓGICOS: UMA REVISÃO DE ESCOPO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do 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 de título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Maria Helena S. V.
Bôas

Cristiane Caldeira da
Silva

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Colares, Thais de Andrade Oliveira

Uso dos métodos alternativos na avaliação da contaminação pirogênica de produtos biológicos: uma revisão de escopo. / Thais de Andrade Oliveira Colares. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

161 f.: fig.; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientadora: Maria Helena Simões Villas Bôas.

Co-orientadora: Cristiane Caldeira da Silva.

1. Métodos Alternativos. 2. Pirogênios. 3. Produtos Biológicos. 4. Revisão de Escopo. I. Título.

Use of alternative methods in the assessment of pyrogenic contamination of biological products: a scope review.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Thais de Andrade Oliveira Colares

**USO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
PIROGÊNICA DE PRODUTOS BIOLÓGICOS: UMA REVISÃO DE ESCOPO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do 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 de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)

Fundação Oswaldo Cruz

Gutemberg Gomes Alves (Doutor)

Universidade Federal Fluminense

Octavio Augusto França Presgrave (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

ORIENTADORAS

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Cristiane Caldeira da Silva (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão primeiramente a Deus, meu Pai, por ter me permitido viver esta conquista tão preciosa pra mim. Ele esteve comigo em todo tempo e pude ver sua mão me guiando desde o início até aqui onde pela sua graça, esta etapa pôde ser concluída. Obrigada, meu Senhor, por cuidar de mim e obrigada Jesus, meu melhor amigo pela força e amor que me conduziram a prosseguir.

Minha gratidão a minha família, meu tesouro (marido) e meus amigos que estiveram do meu lado e me ajudaram, seja em oração, seja no abraço amigo. Obrigada pela torcida, por todo apoio e por cada oração feita por mim! Amo muito cada um de vocês!

Tânia minha amiga a você meu agradecimento especial. Você foi a pessoa que acreditou em mim e que me impulsionou a sonhar que esse mestrado se tornaria realidade. Nunca vou esquecer! Obrigada por estar comigo em cada momento.

Obrigada ao IVB, na figura de minha chefia, por me permitir estudar. Serei eternamente grata!

Agradeço aos membros da banca pela amabilidade de cada um e por cada conhecimento transmitido e, em especial à professora Dra. Helena Zamith pela gentileza de aceitar o convite em presidir a banca examinadora. Foi um prazer tê-la na banca pela profissional e pessoa que é. Muito obrigada professora!

O meu muito obrigado às minhas orientadoras Cristiane e Maria Helena. Agradeço muito por terem abraçado minha ideia e me acolhido tão bem desde o início. Agradeço a vocês duas por tudo, principalmente pela compreensão e paciência para comigo. Muito, mas muito obrigada! Agradeço mesmo de coração.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o uso dos métodos alternativos validados na detecção de pirogênios em produtos biológicos mapeando e analisando a literatura científica da área. **Introdução:** A contaminação por pirogênios impacta em transtornos à saúde pública sendo assim, um requisito mandatório que todos os produtos injetáveis para humanos estejam apirogênicos. O RPT (*Rabbit Pyrogen Test* - Teste de Pirogênio em Coelhos) é o método ouro para detecção de pirogênios e ainda é amplamente utilizado para a avaliação destes contaminantes, principalmente em produtos biológicos injetáveis. Os métodos alternativos conquistam espaço a cada dia, contudo há uma lacuna na literatura de como integrá-los em uma estratégia de uso em produtos biológicos para uma substituição segura do modelo animal. **Método:** Foi realizada uma revisão de escopo seguindo as recomendações do Manual do Instituto Joanna Briggs (JBI) para Revisões de Escopo e o *checklist Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Extension for Scoping Review* (PRISMA-ScR). A questão norteadora foi elaborada a partir da estratégia Problema, Conceito e Contexto (PCC) e a busca dos artigos foi realizada na base de dados PubMed nos idiomas português, inglês e espanhol no período de 01 de janeiro e 30 de março de 2021. **Resultados:** Foi encontrado um total de 493 artigos e, após a remoção dos duplicados, leitura do título e resumo e, avaliação quanto à elegibilidade dos estudos, restaram 16 artigos considerados elegíveis para a síntese. Os artigos foram avaliados por assunto e analisados criticamente quanto às vantagens, desvantagens, limitações do método utilizado e, atendimento aos princípios de substituição, redução e refinamento (3Rs). **Conclusões:** De modo geral todos os métodos alternativos farmacopeicos para avaliação da pirogenicidade identificados são passíveis de uso quando adaptados para superar as intercorrências que os afetam de acordo com as particularidades de cada produto biológico. Todavia, todos enfrentam desafios quanto a sua aplicabilidade plena para a completa substituição do RPT sendo necessário, que cada método assim como cada uma das possibilidades de seus respectivos formatos, sejam avaliados individualmente para uma verificação específica por produto.

Palavras-chave: Métodos Alternativos. Pirogênios. Produtos Biológicos. Revisão de Escopo

ABSTRACT

Objective: To evaluate the use of validated alternative methods in the detection of pyrogens in biological products, mapping and analyzing the scientific literature in the area. **Introduction:** The contamination by pyrogens impacts on public health disorders, therefore, a mandatory requirement that all injectable products for humans are apyrogenic. The Rabbit Pyrogen Test (RPT) is the gold method for detecting pyrogens and is still widely used for the evaluation of these contaminants, mainly in injectable biological products. Alternative methods are gaining space every day, however there is a gap in the literature on how to integrate them into a strategy for using biological products for a safe replacement of the animal model. **Method:** A scope review was carried out following the recommendations of the Joanna Briggs Institute (JBI) Manual for Scope Reviews and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Review (PRISMA-ScR) checklist. The guiding question was elaborated from the **Problem, Concept and Context (PCC)** strategy and the search for articles was carried out in the PubMed database in Portuguese, English and Spanish in the period from January 1st to March 30th, 2021. **Results:** A total of 493 articles were found and, after removing the duplicates, reading the title and abstract, and evaluating the eligibility of the studies, 16 articles were considered eligible for the synthesis. The articles were evaluated by subject and critically analyzed in terms of advantages, disadvantages, limitations of the method used, and compliance with the principles of the 3Rs. **Conclusions:** In general, all alternative pharmacopeial methods for pyrogenicity assessment identified can be used when adapted to overcome the complications that affect them, according to the particularities of each biological product. However, all face challenges regarding its full applicability for the complete replacement of the RPT, being necessary that each method, as well as each of the possibilities of their respective formats, be individually evaluated for a specific verification by product.

Key-words: Alternative Methods. Pyrogens. Biological Products. Scope Review

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.....	17
Figura 2:	Vacinas disponibilizadas às diferentes faixas etárias da população pelo PNI segundo calendário nacional de vacinação.....	24
Figura 3:	Anticorpo IgG com sítio de ligação com antígeno e seus fragmentos obtidos pela digestão com pepsina e papaína.....	25
Figura 4:	Principais fases de produção de soros hiperimunes.....	26
Figura 5:	Esquema do mecanismo da febre.....	32
Figura 6:	Classificação dos pirogênios conforme origem endógena ou exógena.....	34
Figura 7:	Teste de pirogênio em coelhos: contenção dos animais e inoculação da amostra teste.....	35
Figura 8:	Extração da hemolinfa do caranguejo-ferradura <i>Limulus polyphemus</i>	37
Figura 9:	Cascata de reação em lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (LAL) e ensaio de fator C recombinante (rFC).....	41
Figura 10:	Princípio do teste de ativação de monócitos.....	43
Figura 11:	Fluxograma Prisma-ScR referente a seleção das fontes de evidências.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Testes <i>in vitro</i> validados segundo ICCVAM propostos para suceder o teste de pirogênio em coelhos (ICCVAM, 2008).....	45
Quadro 2:	Tipos de revisão de literatura e suas características.....	50
Quadro 3:	Elaboração da pergunta norteadora a partir do acrônimo PCC.....	56
Quadro 4:	Termos de buscas por assuntos utilizados para a recuperação de artigos na base de dados PubMed.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Tipos de soros hiperimunes do PNI	27
Tabela 2:	Descrição dos artigos selecionados para síntese segundo número de identificação, autores, título, ano de publicação, país e produto biológico pesquisado: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021.....	64
Tabela 3:	Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênios: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021.....	68
Tabela 4:	Análise crítica, segundo os autores, dos métodos alternativos ao teste de pirogênio <i>in vivo</i> utilizados nos estudos selecionados.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	<i>Sensitivity of the assay</i> (Sensibilidade do ensaio)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BET	<i>Bacterial Endotoxins Test</i> (Teste de Endotoxinas Bacterianas)
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
CRIES	Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT	<i>Diphtheria/Tetanus Vaccine</i> (Vacina para difteria e tétano)
DTaP	<i>Diphtheria/Tetanus/Pertussis Acellular Vaccine</i> (Vacina acelular para difteria, tétano e pertussis)
DTP	<i>Diphtheria/Tetanus/Pertussis Vaccine</i> (Vacina para difteria, tétano e pertussis)
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos)
EEU	<i>Endotoxin equivalents units</i> (Unidades equivalentes de endotoxinas)
EGYVAC	<i>Egyptian Company for Sera, Vaccines and Drugs</i> (Companhia Egípcia de Produção de Vacinas, Soros e Medicamentos)
EL	<i>Endotoxin Limit</i> (Limite de Endotoxina)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Teste imunoenzimático)
ENP	<i>Endotoxin-neutralizing protein</i> (Proteína neutralizante de endotoxina)
FB	Farmacopéia Brasileira
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência Norte Americana de Alimentos e Drogas)
FE	Farmacopeia Europeia
FRAME	<i>Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments</i> (Fundo para a substituição de animais em experiências médicas)
FUNED	Fundação Ezequiel Dias

GMMA	<i>Generalized Modules of Membrane Antigens</i> (Módulos Generalizados de Antígenos de Membrana)
GT-PB	Grupo Técnico – Produtos Biológicos
IB	Instituto Butantan
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> (Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> (Conferência Internacional de Harmonização)
IF	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IGIV-G	Imunoglobulina G Humana Intravenosa
IGHAHB	Imunoglobulina Humana Anti-Hepatite B
IGHAR	Imunoglobulina Humana Anti-Rábica
IGHAT	Imunoglobulina Humana Anti-Tetânica
IGHVAZ	Imunoglobulina Humana Anti-Varicela Zoster
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVB	Instituto Vital Brazil
JaCVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos)
JP	<i>Japanese Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Japonesa)
Kg	Quilograma
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (Lisado de Amébócitos de <i>Limulus</i>)
LOD	<i>Limit of the detection</i> (Limite de detecção)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> (Ácido lipoteicóico)
MAT	<i>Monocyte Activation Test</i> (Teste de Ativação de Monócitos)
MeSH	<i>Medical Subject Heading</i> (Título de assunto médico)
MM6	Mono Mac 6
MS	Ministério da Saúde

MVD	<i>Maximum valid dilution</i> (Máxima diluição válida)
Ng	Nanograma
NP	Não Pirogênico
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
OMVs	<i>Outer membrane vesicles</i> (Vesículas de membrana externa)
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P	Pirogênico
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PGE2	Prostaglandina E2
pNA	p-nitroanilina
PNE	Pirogênio Não Endotoxina
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRISMA-ScR	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews</i> (Itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises extensão para revisões de escopo)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rCR	<i>Recombinant Cascade Reagent</i> (Reagente em Cascata Recombinante)
rFC	Fator C Recombinante
RPT	<i>Rabbit Pyrogen Test</i> (Teste de Pirogênio em Coelhos)
RPU	<i>Relative Pyrogen Units</i> (Unidades Pirogênicas Relativas)
SER	<i>Reference Standard Endotoxin</i> (Endotoxina Padrão de Referência)
SAA	Soro Antiaracnídico
SAB	Soro Antibotrópico
SABC	Soro Antibotrópico-Crotálico
SABL	Soro Antibotrópico-Laquétrico
SAC	Soro Anticrotálico
SAD	Soro Antidiftérico
SAE	Soro Antiescorpiônico
SAEL	Soro Antielaídico

SALON	Soro Antilonômico
SAR	Soro Antirrábico
SAT	Soro Antitetânico
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TAL	<i>Tachypleus Amebocyte Lysate</i> (Lisado de Amebócitos de <i>Tachypleus</i>)
TB	Temperatura Basal
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis vírus</i> (Vírus da encefalite transmitida por carrapatos)
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores <i>Toll-like</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
U.S.	<i>United States</i> (Estados Unidos da América)
EU	União Européia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
Visa	Vigilância Sanitária
VIT	Varição Individual de Temperatura
WB	<i>Whole Blood</i> (Sangue Total)
ZEBET	<i>Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments</i> (Centro de Documentação e Avaliação de Métodos Alternativos para Experimentos com Animais)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Importância da vigilância sanitária na avaliação dos produtos biológicos.....	16
1.1.1 Controle da qualidade dos produtos biológicos.....	18
1.2 Caracterização dos produtos biológicos.....	20
1.2.1 Vacinas.....	20
1.2.2 Soros hiperimunes.....	24
1.2.3 Imunoglobulinas homólogas.....	28
1.2.4 Outros produtos biológicos.....	29
1.3 Mecanismo da febre: contaminação pirogênica.....	31
1.4 Métodos para avaliação da contaminação pirogênica.....	33
1.4.1 Teste de pirogênio <i>in vivo</i> (RPT).....	33
1.4.2 Métodos alternativos <i>in vitro</i> : princípio dos 3 Rs.....	35
1.4.2.1 <i>Teste de endotoxina bacteriana (LAL)</i>	36
1.4.2.2 <i>Ensaio do fator C recombinante (rFC)</i>	40
1.4.2.3 <i>Teste de ativação de monócitos (MAT)</i>	42
1.4.2.4 <i>Legislação sobre métodos alternativos</i>	47
1.5 Importância das revisões de literatura – revisão de escopo.....	48
1.6 Justificativa.....	54
2 OBJETIVO.....	55
2.1 Objetivo geral.....	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
3 METODOLOGIA.....	56
3.1 Definição da questão norteadora: hipótese.....	56
3.2 Identificação e seleção dos estudos relevantes.....	56
3.3 Estratégia de busca.....	57
3.4 Identificação e seleção das fontes de evidências.....	60
3.5 Mapeamento e itens dos dados.....	60
3.6 Síntese dos resultados.....	61
3.7 Análise crítica dos resultados.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Identificação e seleção dos estudos relevantes.....	62

4.2 Descrição dos estudos selecionados.....	63
4.3 Síntese dos resultados.....	67
4.3.1 Métodos alternativos utilizados para detecção de pirogênios.....	67
4.3.1.1 <i>Teste de endotoxina bacteriana (LAL)</i>	67
4.3.1.2 <i>Teste de ativação de monócitos (MAT)</i>	79
4.3.1.3 <i>Ensaio do fator C recombinante (rFC)</i>	80
4.3.1.4 <i>Configuração dos métodos alternativos utilizados</i>	82
4.3.1.5 <i>Métodos alternativos não farmacopeicos em desenvolvimento para detecção de pirogênios</i>	88
4.3.2 Produtos biológicos avaliados pelos métodos alternativos.....	91
4.3.2.1 <i>Vacinas</i>	92
4.3.2.2 <i>Soros hiperimunes</i>	96
4.3.2.3 <i>Outros produtos biológicos: albumina, eritropoietina, insulina e somatropina</i>	99
4.3.3 Aplicabilidade do método alternativo nos produtos biológicos.....	103
4.3.3.1 <i>Aplicabilidade dos testes de endotoxina bacteriana (LAL) e de ativação ativação de monócitos (MAT)</i>	103
4.3.3.2 <i>Aplicabilidade do ensaio do fator C recombinante (rFC)</i>	118
4.4 Análise crítica dos resultados.....	119
4.4.1 <i>Teste de endotoxina bacteriana (LAL)</i>	120
4.4.2 <i>Teste de ativação de monócitos (MAT)</i>	128
4.4.3 <i>Ensaio do fator C recombinante (rFC)</i>	129
5 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXO A - PROTOCOLO PRISMA-SCR PARA REVISÃO DE ESCOPO.....	156
APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE MAPEAMENTO DE DADOS NO MICROSOFT OFFICE EXCEL.....	158

1 INTRODUÇÃO

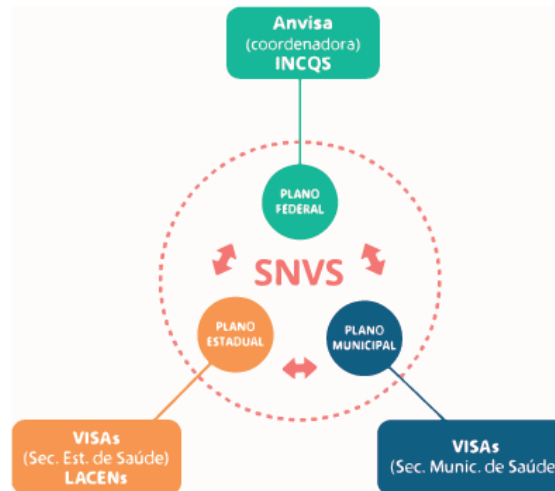
1.1 Importância da vigilância sanitária na avaliação dos produtos biológicos

As ações da vigilância sanitária (Visa) visam promover e proteger a saúde da população, assim como, eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990). Portanto, atua no âmbito dos produtos, medicamentos, alimentos, meio ambiente e serviços voltados à população, desenvolvendo, regulando, monitorando e fiscalizando. A estes produtos e serviços são garantidas segurança e qualidade fundamentada por esta área da saúde (LEAL, 2017).

A Visa é estruturada por meio de uma rede governamental intitulada Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) ligada ao Sistema Único de Saúde (SUS). Fazem parte do SNVS a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS) e as Vigilâncias Sanitárias estaduais e municipais que atuam de forma integrada e descentralizada em todo o território nacional no que se refere às atividades de Visa no país (Figura 1) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2015).

Medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos estão sujeitos às ações de controle e fiscalização de Visa e precisam atender a critérios necessários na legislação que comprovem que o produto é seguro, eficaz e de qualidade para que possa ser registrado (BRASIL, 1976). Neste contexto, se enquadram também os produtos biológicos que segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 55, de 16 de dezembro de 2010 podem ser vacinas, soros hiperimunes, hemoderivados, biomedicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal ou por procedimentos biotecnológicos, medicamentos contendo microrganismos vivos, atenuados ou mortos e anticorpos monoclonais (BRASIL, 2010).

Figura 1: Estrutura do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.



Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; SNVS: Sistema Nacional de Vigilância Sanitária; VISA's: Vigilâncias Sanitárias; LACEN's: Laboratórios Centrais de Saúde Pública.

Fonte: (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2015).

Os imunobiológicos em especial se destacam por serem a principal garantia para a prevenção das doenças imunopreveníveis e para o tratamento eficaz contra moléstias causadas por animais peçonhentos ou toxinas de micro-organismos. Ademais, no Brasil o setor de imunobiológicos possui importância estratégica para a saúde pública onde são concedidos à população de forma gratuita e exclusivamente na rede pública de saúde (SUS) em todo o território nacional (SILVA JUNIOR, 2013).

Importado ou de produção nacional, esta classe de medicamento tem sua segurança, qualidade e eficácia asseguradas pelas autoridades sanitárias nacionais. Para se garantir que o fabricante de imunobiológicos cumpra com as normas nacionais ou internacionais para esses produtos e que cada lote produzido esteja de acordo com os requerimentos estabelecidos no processo de registro aprovado, as autoridades sanitárias atuam adotando uma série de medidas técnico-administrativas e laboratoriais. São atividades prioritárias para as autoridades sanitárias do país as ações de VISA na garantia do padrão de qualidade destes medicamentos (soros hiperimunes, vacinas e imunoglobulinas) disponibilizados em grande escala à população que fazem parte do Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MIRANDA; HENRIQUES, 2005).

O PNI foi criado em 1973 e possui hoje um importante papel de interventor na saúde pública sendo considerado como um programa de referência mundial na eliminação ou controle de doenças preveníveis por meio da vacinação tendendo

expandir sua abrangência conforme o aparecimento de novas doenças como o novo coronavírus. São disponibilizados 45 produtos sendo 28 vacinas, 13 soros hiperimunes e quatro imunoglobulinas. Desde então, doenças como varíola, poliomielite e rubéola receberam *status* de eliminadas no país enquanto outras doenças sofreram redução em sua morbimortalidade como tétano, difteria, coqueluche, hepatite B, meningites, caxumba e febre amarela. Em 2016, o Brasil chegou a receber o certificado de erradicação do sarampo, contudo esta condição foi perdida em 2018 pelos surtos da doença ocorridos na região norte do país. Assim, o PNI possui a responsabilidade de não permitir que a cobertura vacinal de doenças imunopreveníveis decline em nível de expor à população ao risco de retorno de algumas dessas moléstias, como o caso do sarampo além, da difteria e da poliomielite, que ameaçam voltar devido ao aumento de ocorrência de casos em outros países da América Latina como Argentina, Chile e Venezuela (MINISTERIO DA SAUDE, 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2019; MEDEIROS, 2020).

Devido ao tamanho do impacto sanitário que qualquer um destes produtos pode repercutir, não só individualmente como também na sociedade, considera-se assim que não sejam uma mera mercadoria. Além do mais, estes estão incluídos na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde corroborando assim a relevância da atuação da Visa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Diante deste quadro, desde 1983 o INCQS, por ser o instituto de controle de qualidade oficial da Anvisa, realiza análises dos imunobiológicos baseadas em Normas Oficiais Nacionais ou Internacionais, assim como, realiza análise dos protocolos de produção. Além disso, executa ensaios laboratoriais em cada lote nacional ou importado de imunobiológicos adquiridos pelo Ministério da Saúde e utilizados no PNI, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde. Portanto, no Brasil, é o INCQS (por meio do Grupo Técnico de Produtos Biológicos/GT-PB) que tem a responsabilidade oficial exclusiva sobre a fiscalização e o controle de qualidade dos imunobiológicos. Praticamente todas as demandas do GT-PB vêm ou do PNI ou da Anvisa. No caso dos soros e das vacinas, quem faz os pedidos de análise é o PNI (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2019). O laudo final do produto, portanto, é emitido e tal responsabilidade é delegada ao INCQS pela RDC da Anvisa nº 73, de 21 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008a).

1.1.1 Controle da qualidade dos produtos biológicos

A qualidade, segurança, eficácia e credibilidade dos medicamentos são asseguradas através da realização do controle da qualidade nas indústrias farmacêuticas. Entende-se como controle da qualidade o conjunto de operações (programação, coordenação e execução) que tem por objetivo verificar e assegurar que os produtos estejam em conformidade com os padrões de qualidade exigidos, sempre através de algum tipo de análise e medição. Todo esse processo é de extrema importância na detecção de qualquer falha durante o processo de desenvolvimento de um medicamento com potencial de acarretar sérios danos à saúde da população assim como grande impacto negativo à indústria fabricante frente ao mercado consumidor (ROCHA; GALENDE, 2014).

Numa indústria farmacêutica cada etapa do processo produtivo sofre rigoroso monitoramento até liberação do produto final por meio da aplicação de normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e controle da qualidade. Com base nas BPF, a Garantia da Qualidade assegura que o produto fabricado está nos padrões de qualidades exigidos pela consistência nas etapas de produção e controle e, que atende o uso pretendido requerido para comercialização. Atualmente está em vigor a RDC da Anvisa nº 301, de 21 de agosto de 2019 que estabelece os requisitos mínimos de BPF a serem cumpridos em todas as operações envolvidas na fabricação de medicamentos (BRASIL, 2019d). É de grande importância o controle de cada etapa do processo de produção assim como os resultados obtidos que devem ser confiáveis, pois com base nessa avaliação fundamentada nas especificações pré-estabelecidas, pode-se avançar passo-a-passo na produção, até chegar ao produto final (HOKAMA, 2005).

Um processo de fabricação robusto é crucial e, os controles em processo assumem uma importância particular na fabricação de medicamentos biológicos (BRASIL, 2019a). Desta forma, é irrefutável a importância de um controle de qualidade solidificado com métodos de análises confiáveis e eficazes durante todo o processo de produção visto que dados analíticos imprecisos ou não fidedignos podem conduzir a decisões desastrosas, grande prejuízo financeiro a indústria, além de gerar um produto que será comercializado com potencial danoso aos consumidores (LA ROCA *et al.*, 2007).

Em virtude da natureza dos produtos e dos processos de produção, os medicamentos biológicos possuem considerações especiais quanto ao seu controle de qualidade, pois envolve processos e materiais de origem biológica diferentemente, da fabricação de medicamentos convencionais nos quais são aplicadas técnicas químicas e físicas já consolidadas na sua fabricação (BRASIL, 2019a). No caso dos imunobiológicos em particular disponibilizados pelo PNI, eles sofrem rigoroso controle de qualidade lote a lote seguindo requisitos da Farmacopeia Brasileira (FB) que estabelece os parâmetros mínimos de qualidade necessários que estes medicamentos devem obedecer (NETTO *et al.*, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

O Teste de Pirogênio é um dos testes de segurança toxicológica realizado no controle da qualidade. Seu uso é imprescindível em produtos injetáveis visto que, todos os medicamentos desta classe sujeitos a ação da Visa devem ser livres de pirogênios. Conceitualmente, pirogênio pode ser qualquer substância capaz de causar febre podendo levar o paciente a um quadro de choque e morte. Desta forma, para evitar efeitos adversos à saúde humana, a mensuração destes contaminantes em produtos farmacêuticos de uso parenteral é uma importante precaução de segurança (KIKKERT *et al.*, 2007).

A consciência por parte das indústrias farmacêuticas da necessidade de um processo produtivo acurado é fundamental. Princípios básicos devem ser seguidos rigorosamente como trabalhar em condições adequadas de higiene no que se refere a operadores e ambientes, utilizar matérias primas de boa qualidade com baixas cargas microbianas, além da certificação de processos validados e profissionais qualificados. Quando aplicados todos os conceitos de BPF, o produto terá *status* apirogênico no primeiro processamento, eliminando preocupações quanto à reprocessos ou tratamentos adicionais. Assim sendo, todo o controle faz-se necessário para que os níveis de contaminantes pirogênicos estejam nos limites toleráveis para liberação de medicamentos parenterais, incluindo de igual forma os medicamentos biológicos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

1.2 Caracterização dos produtos biológicos

1.2.1 Vacinas

Vacinas são produtos que contêm micro-organismos atenuados, inativados, ou apenas pequenas partes deles atuando de forma similar à infecção, mas com menor potencial reatogênico em relação à infecção natural (BRASIL, 2019c). Sua participação no cenário sanitário, já com mais de 200 anos, juntamente com o saneamento básico tem contribuído na prevenção de doenças infecciosas e pode ser considerado o maior benefício à saúde pública do século XX (PINTO; MATTA; CRUZ, 2011).

Promover ao indivíduo vacinado por meio da administração de um imunobiológico a imunidade contra determinada doença define o objetivo da vacinação que é a imunização. Assim, vacinação consiste no ato de vacinar e imunização é a aquisição de proteção imunológica contra uma doença, geralmente infecciosa. É importante compreender que a imunização pode ser ativa e passiva. Quando o próprio sistema imune do indivíduo produz anticorpos e células imunes (linfócitos T) em resposta ao contato com uma substância estranha ao organismo (antígeno), a imunização é ativa. Esse tipo de imunidade é adquirido ao se contrair uma doença infecciosa ou por meio da vacinação e tem por característica longa durabilidade, conferindo proteção por vários anos ou às vezes por toda vida, diferentemente da imunização passiva que é passageira, pois é conferida pela administração de anticorpos prontos contra uma infecção específica (BRASIL, 2019c).

No processo vacinal, a resposta imune primária ocorre quando há o primeiro contato dos linfócitos com o antígeno responsável por determinada doença. Após o período de sete a dez dias, anticorpos específicos produzidos por linfócitos B, predominantemente da classe IgM, são detectados na circulação configurando a imunidade humoral. Um percentual das células competentes se transforma em linfócitos de memória posteriormente a resposta inicial, e estes serão responsáveis por produzir uma maior quantidade de anticorpos num prazo curto (dois a quatro dias) no caso de um segundo contato com o mesmo antígeno, caracterizando a resposta secundária, na qual a IgG é a imunoglobulina predominante (CARVALHO; NUDELMAN; CARNEIRO-SAMPAIO, 1998).

Relatos apontam que a imunização ativa começou na China ou na Índia nos séculos XVI e XVII com a prática da variação, em que o próprio vírus da varíola, administrado artificialmente, impedia as pessoas de desenvolver cicatrizes de varíola naturalmente, embora inevitavelmente alguns indivíduos morressem com a própria

inoculação. Contudo, o amanhecer da vacinologia veio com as observações do médico inglês Edward Jenner em 1776. Em seu experimento Jenner inoculou fluido obtido de lesões de uma ordenhadeira infectada pelo vírus da varíola bovina em um menino e após dois meses inoculou o vírus da varíola humana, não desenvolvendo nenhum sinal da doença. Mais de 80 anos depois, o químico francês Louis Pasteur foi o responsável por lançar as bases metodológicas de vacinas, o qual estabeleceu o princípio da atenuação para o desenvolvimento de vacinas a partir de experimentos com a bactéria causadora da cólera aviária e dos experimentos de cultivo e passagem do vírus da raiva em cérebro de coelho (PLOTKIN, 2011; PINTO; MATTA; CRUZ, 2011).

No contexto nacional, a introdução das vacinas possui um histórico de traumas e comoções. No século XX, as primeiras experiências tinham como cenário um estado do Rio de Janeiro assolado por uma epidemia de varíola, febre amarela e peste bubônica. Com plena convicção que a vacina seria a solução para o caos implantado pela varíola, Oswaldo Cruz impôs a vacinação obrigatória e as brigadas sanitárias entravam nas casas e vacinavam as pessoas à força. Inevitavelmente, a indignação popular tomou forma e ficou conhecida como “Revolta da Vacina” em 1904 (PORTO, 2003). Ao longo das décadas, até a criação do PNI em 1973, as atividades relacionadas à vacinação da população eram operacionalizadas de forma dividida, sendo algumas de competência dos programas verticais do Ministério da Saúde como varíola, tuberculose e febre amarela e, outras executadas através das Secretarias Estaduais de Saúde como poliomielite, sarampo e vacina tríplice bacteriana (TEMPORÃO, 2003).

A partir da implantação do PNI as ações desenvolvidas foram planejadas e sistematizadas. A aplicação de estratégias diversas como bloqueios além da rotina de campanhas e varreduras contribuiu para o controle da coqueluche, do sarampo, da tuberculose em suas formas graves, da difteria, do tétano acidental e neonatal, assim como para a erradicação da febre amarela urbana em 1942, da varíola em 1973 e da poliomielite em 1989. A modernização continuada da infraestrutura e operacionalização do programa são consequências de um perfil gerencial descentralizado, com integração entre os três níveis municipal, estadual e federal, que se comunicam na discussão de normas, definições, metas e resultados (DOMINGUES *et al.*, 2015).

A aquisição de maior parte dos imunobiológicos pelo Ministério da Saúde é de produtores nacionais, sobretudo as vacinas tradicionais e mais recentemente, as vacinas novas que são produzidas no país como resultados de acordos de transferência de tecnologia fortalecidos pela legislação nacional para a promoção de inovação tecnológica e autossuficiência nacional da produção de imunobiológicos. O Fundo Rotatório da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) permite a aquisição das vacinas não produzidas no país, importante parceria do Brasil com organismos internacionais para sanar a carência de vacinas a um custo menor e maior eficiência por parte de todos os países da região das Américas (MOURA, 2016).

O anseio de alcançar 100% de coberturas vacinais de forma homogênea em todos os municípios e em todos os bairros é o principal objetivo do PNI, disponibilizando mais de 300 milhões de doses de vacinas por ano. Atualmente, o Brasil é um dos países que oferece o maior número de vacinas de forma gratuita, incluindo 19 vacinas que são disponibilizadas pelo SUS que protegem contra cerca de 20 doenças, com um calendário definido para todas as faixas etárias, visando à imunização de crianças, de adolescentes, de adultos e de idosos, além de gestantes (Figura 2). Há também, um calendário diferente para a população indígena e para grupos de pessoas com condições especiais, onde as vacinas são ofertadas nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIEs) (BRASIL, 2014c). O CRIE foi implantado em 1993 e tem por objetivo atender pessoas que possuem quadros clínicos especiais, sendo assim os imunobiológicos fornecidos são de alta tecnologia e elevado custo a fim de proporcionar melhor qualidade de vida a pessoas que necessitam de um tratamento diferenciado (SILVA JUNIOR, 2010).

É de extrema relevância um controle sanitário eficiente de vacinas, capaz de verificar os diversos pontos da cadeia, desde as condições de produção até a notificação de eventos adversos. Além disso, a integração entre os sistemas de Visa e vigilância epidemiológica agrega um elevado grau de confiabilidade na segurança e na eficácia destes produtos fornecidos à população brasileira (MIRANDA; HENRIQUES, 2005). O êxito do programa de vacinação no Brasil envolve diferentes aspectos como um PNI bem estabelecido e gerenciado, qualidade do produto ofertado à população e, ainda, o foco pela inclusão social com redução das desigualdades regionais e sociais por meio de ações que viabilizam a vacinação para os brasileiros na maioria das localidades do país (LIMA, 2019).

Figura 2: Vacinas disponibilizadas às diferentes faixas etárias da população pelo PNI segundo o calendário nacional de vacinação.

Vacinas disponíveis no Programa Nacional de Imunizações	
CRIANÇAS	ADOLESCENTE E ADULTOS
BCG	Hepatite B
Hepatite B (dose ao nascer)	dT (Dupla adulto) – tétano e difteria
Penta (DTP/Hib/HepB)	Febre amarela
VIP (Vacina inativada poliomielite)*	Tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola)
VOP (Vacina oral poliomielite)*	dTpa (Gestante e profissionais de saúde)
VORH (Vacina oral rotavírus humano)	Influenza (Grupos prioritários)
Pneumocócica 10 valente	
Febre amarela	IDOSOS
Tríplice viral (Sarampo, caxumba e rubéola)	Hepatite B
DTP (Tríplice bacteriana) – difteria, tétano e coqueluche	dT (Dupla adulto) –tétano e difteria
Meningocócica C (conjugada)	Febre amarela
Influenza (campanha anual) 6 meses a < 5 anos	Influenza (campanha anual)
Tetraviral (Sarampo, caxumba, rubéola e varicela)	
Hepatite A	
Papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – HPV	

* Vacinas poliomielite esquema sequencial (VIP e VOP). 1ª e 2ª doses (VIP), 3ª dose e reforço s(VOP) Fonte: Ministério da Saúde

PNI: Programa Nacional de Imunizações; BCG: Bacillus Calmette-Guérin (vacina contra tuberculose); DTP: Vacina contra difteria, tétano e pertussis; Hib: Vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b; HepB: Vacina contra hepatite B; VIP: Vacina inativada contra poliomielite; VOP: Vacina oral contra poliomielite; VORH: Vacina oral contra rotavírus humano; HPV: Vacina contra papilomavírus humano; dT: Vacina dupla bacteriana do tipo adulto contra difteria e tétano; dTpa: Vacina acelular contra difteria, tétano e pertussis.

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

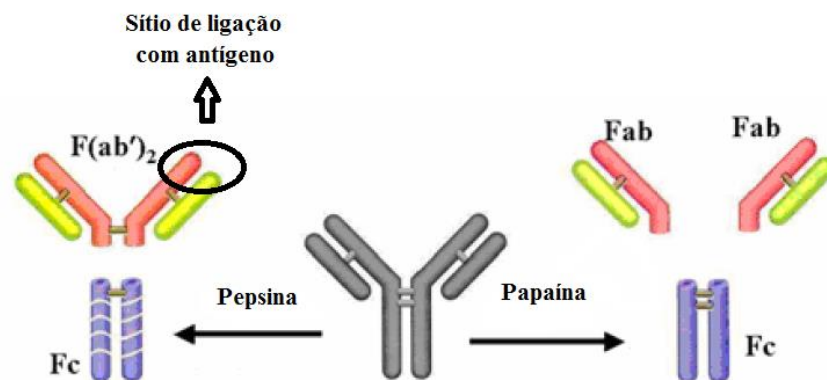
1.2.2 Soros hiperimunes

Os soros hiperimunes são classificados como medicamentos biológicos e são compostos de imunoglobulinas heterólogas advindas do plasma de equídeos hiperimunizados com antígenos específicos para cada tipo de soro. A soroterapia, que consiste na aplicação no paciente de um soro contendo um concentrado de anticorpos, é um tratamento eficiente utilizado em acidentes com animais peçonhentos, bem como à exposição de toxinas e vírus rábico. Desta forma, o paciente combate de forma rápida e eficiente o agente agressor por meio dos anticorpos recebidos (FREITAS, 2008).

Este importante medicamento com mais de 120 anos de existência teve seu desenvolvimento em 1894 e, desde então o conceito soroterapia antiveneno permanece, na sua essência, até os dias de hoje. Na época, os franceses Albert Calmette, Césaire Phisalix e Gabriel Bertrand inspirados na descoberta da soroterapia do tétano e da difteria por Emil Adolf Von Behring e Kitasato Shibasaburo em 1890, buscaram em suas pesquisas outros processos semelhantes para várias doenças e para o envenenamento ofídico. Ambos defendiam que o soro proposto decorrente das suas pesquisas, seria efetivo para qualquer tipo de envenenamento por serpentes, teoria que seria abortada pelo médico Vital Brazil em 1896 com a comprovação que a especificidade dos soros antiofídicos está relacionada ao gênero das serpentes. A descoberta do cientista brasileiro norteou daí em diante, a produção de soros antivenenos mundialmente (CUNHA, 2017).

As imunoglobulinas (anticorpos) são moléculas que medeiam os efeitos protetores da imunidade humoral. São produzidas nos vertebrados em resposta à exposição aos antígenos. São simétricas, possuem um formato que lembra a letra Y e são compostas por, no mínimo, quatro subunidades: duas cadeias leves e duas pesadas. A IgG é o principal anticorpo de interesse na produção de soros hiperimunes e pode estar sob sua forma íntegra ou em fragmentos, $F(ab')_2$ ou Fab, obtidos por tratamento enzimático com pepsina ou papaína, respectivamente (Figura 3) (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Figura 3: Anticorpo IgG com sítio de ligação com antígeno e seus fragmentos obtidos pela digestão com pepsina e papaína.



$F(ab')_2$: Fragmento ligante de antígeno de imunoglobulina após digestão com pepsina; Fab: Fragmento ligante de antígeno de imunoglobulina após digestão com papaína; Fc: região do fragmento cristalizável de imunoglobulina.

Fonte: (ZOLFAGHARIAN; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, 2013).

Os fragmentos F(ab')₂ são a porção ativa da imunoglobulina, responsáveis pela ligação com o epítipo do antígeno, conferindo a imunização passiva ao doente. A título de eficácia, estudos comprovam não haver diferença significativa dos soros compostos por IgG íntegras ou por fragmentos F(ab')₂, embora este último seja preconizado devido a ocorrência da produção de anafilatoxina C5 do Sistema Complemento somente em soros ricos em IgG, levando a episódios de reações adversas (SQUAIELLA-BAPTISTÃO *et al.*, 2014; KUNIYOSH, 2017).

Conceitualmente, o processo de produção dos soros hiperimunes consiste em submeter o plasma obtido da sangria dos animais hiperimunizados, a etapas de separação e purificação com o objetivo de minimizar os efeitos adversos causados pela administração de proteínas heterólogas presentes no soro no organismo do paciente, as quais podem causar manifestações clínicas importantes. O processo produtivo é composto pelas fases: obtenção do antígeno, preparo da solução do antígeno, obtenção do plasma hiperimune, transformação do plasma em soro e embalagem do produto (envase) (Figura 4) (JESUS SILVA, 2012).

Figura 4: Principais fases de produção de soros hiperimunes.



Fonte: (JESUS SILVA, 2012).

No Brasil, todos os soros produzidos possuem a temperatura de conservação de 2 a 8°C e têm apresentação na forma líquida. O período de validade, considerando as condições de estocagem adequadas, é de dois a três anos a partir da data de fabricação (INSTITUTO BUTANTAN, 2018).

O Brasil é autossuficiente na produção de soros heterólogos e apresenta uma situação mais bem estruturada que outros países da América Latina como Peru, Colômbia, Uruguai e Bolívia. Os laboratórios produtores são o Instituto Vital Brazil (IVB) no Rio de Janeiro, Instituto Butantan (IB) em São Paulo, Fundação Ezequiel

Dias (FUNED) em Minas Gerais e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) no Paraná. O soro brasileiro é considerado de ótima qualidade e possui um sistema de planejamento, produção e distribuição eficiente, totalmente coordenado pelo SUS, diferente de muitos outros países da América do Sul onde a produção é insipiente e não há uma articulação do Estado para garantir a toda a população o direito ao tratamento adequado (SANTOS, 2005; DOMINGUES *et al.*, 2017). Os soros hiperimunes do PNI são utilizados no tratamento de enfermidades de causas diversificadas: pela ação do veneno de diferentes espécies de animais peçonhentos como serpentes, escorpiões, aranhas e lagartas; por toxinas de agentes infecciosos, como os causadores da difteria, botulismo e tétano; e ainda, na profilaxia pós-exposição ao vírus da raiva (INSTITUTO BUTANTAN, 2018). Os treze tipos de soros hiperimunes disponíveis estão dispostos na Tabela 1 com suas respectivas indicações.

Tabela 1: Tipos de soros hiperimunes do PNI.

Tipo de soro	Nome	Indicação
Antiveneno	Antibotrópico pentavalente	para acidentes com serpentes do gênero <i>Bothrops</i> , popularmente conhecidas como jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, cotiara
	Anticrotálico	para acidentes com serpentes do gênero <i>Crotalus</i> , popularmente conhecida como cascavel
	Antielaipídico bivalente	para acidentes com serpentes do gênero <i>Micrurus</i> , conhecidas popularmente como coral verdadeira
	Antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico	para acidentes com serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e do gênero <i>Crotalus</i>
	Antibotrópico (pentavalente) e antilaquético	para acidentes com serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e do gênero <i>Lachesis</i> , conhecidas como surucucu pico-de-jaca
	Antiaracnídico (<i>Loxosceles</i> , <i>Phoneutria</i> e <i>Tityus</i>)	para acidentes com aranhas dos gêneros <i>Phoneutria</i> (armadeira), <i>Loxosceles</i> (aranha-marrom) e escorpiões do gênero <i>Tityus</i>
	Antiescorpiônico	para acidentes com escorpiões do gênero <i>Tityus</i>
	Antilonômico	para acidentes com lagartas do gênero <i>Lonomia</i>
Antitóxico	Antitetânico	para o tratamento de tétano
	Antidiftérico	para o tratamento da difteria
	Antibotulínico Tipo AB	para o tratamento do botulismo do tipo A e B
	Antibotulínico Tipo E	para o tratamento do botulismo do tipo E
Antiviral	Antirábico	para a profilaxia pós-exposição ao vírus da raiva

Fonte: (INSTITUTO BUTANTAN, 2018).

1.2.3 Imunoglobulinas homólogas

Outra forma de adquirir imunidade passiva artificial, além dos soros hiperimunes, é por meio dos soros homólogos, chamados também de imunoglobulinas humanas, provenientes da doação de sangue de pessoas selecionadas, previamente vacinadas ou na convalescência da doença, que apresentam alto título sérico de anticorpos contra a doença específica que se deseja prevenir. Promovem a imunização temporária, contudo possuem uma meia vida mais prolongada comparada aos soros hiperimunes, proporcionando proteção ao paciente por cerca de quatro semanas. O menor potencial reatogênico das imunoglobulinas humanas é mais um benefício de seu uso, diminuindo as chances de ocorrência de reações de hipersensibilidade (BALDY, 1981).

O PNI disponibiliza quatro tipos de imunoglobulinas humanas à população nos CRIEs: imunoglobulina humana antitetânica (IGHAT), imunoglobulina humana anti-hepatite B (IGHAHB), imunoglobulina humana antivaricela-zoster (IGHVAZ) e, imunoglobulina humana antirrábica (IGHAR) (SILVA JUNIOR, 2010).

A IGHAT possui imunoglobulinas da classe IgG específicas que agem neutralizando a toxina produzida por *Clostridium tetani*, causador do tétano. É indicada em casos de hipersensibilidade ao uso do soro antitetânico (SAT), em indivíduos imunodeprimidos e em recém-nascidos em situações de risco em contrair tétano como lesões, independente da história vacinal da mãe, ou tétano neonatal (BRASIL, 2019c).

A IGHAHB possui anticorpos específicos (anti-AgHB) advindos do plasma de doadores responsivos com altos títulos à imunização ativa contra hepatite B. Seu uso é indicado na prevenção da infecção perinatal pelo vírus da hepatite B, em acidentes com material biológico contaminado pelo vírus ou suspeito, em comunicantes sexuais de casos agudos de hepatite B ou vítimas de violência sexual e, em pessoas imunodeprimidas após exposição de risco, mesmo com vacinação prévia (BRASIL, 2019c).

A IGHVAZ é obtida do plasma de doadores humanos que produzem altos títulos de anticorpos IgG contra o vírus da varicela, sendo recomendado seu uso até 96 horas após contato de risco relevante. Seu uso é preconizado em pessoas imunocompetentes e imunodeprimidas sem história de vacinação anterior, em

pessoas com contato direto com doente seja em ambiente domiciliar ou hospitalar e, em recém-nascidos prematuros com menos de 28 semanas (BRASIL, 2019c).

A IG HAR é utilizada em situação de pós-exposição ao vírus da raiva atuando na neutralização do vírus com a finalidade de impedir sua penetração nas terminações nervosas do local da lesão. Tal inativação local do vírus é de grande importância na profilaxia pós-exposição. Porém, apesar deste imunobiológico ser um medicamento de grande valor no tratamento e profilaxia de uma doença letal como a raiva, sua produção é restrita, não estando acessível a todo o país nem mesmo nas áreas onde o risco de exposição ao vírus é grande. Esta imunoglobulina é recomendada em casos de hipersensibilidade por utilização do soro antirrábico (SAR), para pessoas em contato frequente com animais, principalmente equinos, em indivíduos imunocomprometidos ou submetidos a pós-exposição de risco e, em casos de ataques por morcegos (BRASIL, 2019c).

1.2.4 Outros produtos biológicos

Os hemoderivados são produtos biológicos obtidos em escala industrial oriundos do sangue total ou do plasma de um doador, por meio de processamento físico-químico ou biotecnológico. Sua importância na saúde pública destaca-se por serem considerados essenciais e insubstituíveis no tratamento de doenças metabólicas, hereditárias ou infecciosas. Seu uso é pautado na hemoterapia moderna, a qual parte do preceito racional de transfundir ao paciente somente o componente necessário do sangue após avaliação clínica e laboratorial ao invés do sangue total, onde proteínas como albuminas, fatores de coagulação, complexo protrombínico e imunoglobulinas são utilizados no tratamento de doenças como hemofilia, doença de Von Willebrand, coagulopatias raras e imunodeficiências primárias (BRASIL, 2014d; HEMOCENTRO CAMPINAS, 2018). O Brasil ainda é deficiente na produção de medicamentos hemoderivados, sendo adquiridos pelo Ministério da Saúde por importação. O controle da Garantia da Qualidade destes medicamentos é realizado pelo INCQS, em parceria com a Anvisa, onde só são liberados para uso no país após aprovação por análise lote a lote (EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES, 2018; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2021).

Conforme o avanço progressivo da participação da biotecnologia na indústria farmacêutica, a produção de biomedicamentos, outra classe de produto biológico, foi ganhando espaço cada vez maior e se consolidando como tendência mundial. A fabricação destes medicamentos envolve a utilização de micro-organismos vivos atenuados ou inativados, podendo estar sob a forma de subunidades ou inteiros, geneticamente modificados ou não, para a produção em escala industrial de biofármacos ou vacinas. O processo de fabricação dos biomedicamentos é um desafio, pois requer tecnologia de ponta que envolve processos sofisticados e custosos economicamente como de cultivo celular, sistemas de purificação de alto desempenho, técnicas altamente sensíveis no controle de qualidade, dentre outras plataformas complexas (SILVA; CAULLIRAUX, 2016). São exemplos de biomedicamentos a insulina humana recombinante, eritropoetina humana recombinante, anticorpos monoclonais, interferon humano recombinante e somatropina humana recombinante (ANDRADE, 2007).

Ainda sobre a influência revolucionária da biotecnologia na área da saúde, o desenvolvimento de medicamentos contendo micro-organismos vivos, atenuados ou mortos bem como os anticorpos monoclonais possuem importância imensurável para a saúde pública por serem medicamentos inovadores que atuam nos tratamentos das doenças de forma precisa e seletiva (OLIVEIRA; SILVA, 2018). Em especial, contribuindo de forma revolucionária no diagnóstico e terapêutica de certas doenças, os anticorpos monoclonais permitiram uma nova perspectiva no uso de imunoglobulinas, com diversas aplicações em transplantes, na composição de conjuntos de reativos para diagnóstico, em grande variedade de doenças autoimunes e, principalmente, na terapia do câncer. O inconveniente, contudo, consiste em uma produção que demanda maior tempo, dinheiro e técnicas mais refinadas. Diferentemente dos anticorpos policlonais convencionais onde um mamífero (por exemplo, cavalo, coelho, camundongos) ao ser imunizado origina grande variedade de anticorpos contra diferentes porções do antígeno apresentado advindos de diferentes linfócitos B, os anticorpos monoclonais são produzidos em laboratório a partir de uma população de células derivadas de um único linfócito B, fazendo com que todos os anticorpos gerados apresentem uma única especificidade. Em suma, os anticorpos monoclonais reagem apenas contra uma porção do antígeno, ou seja, um único epítopo conferindo-lhes desta forma, a capacidade de reconhecer e se ligar a diversos antígenos, sejam eles proteicos,

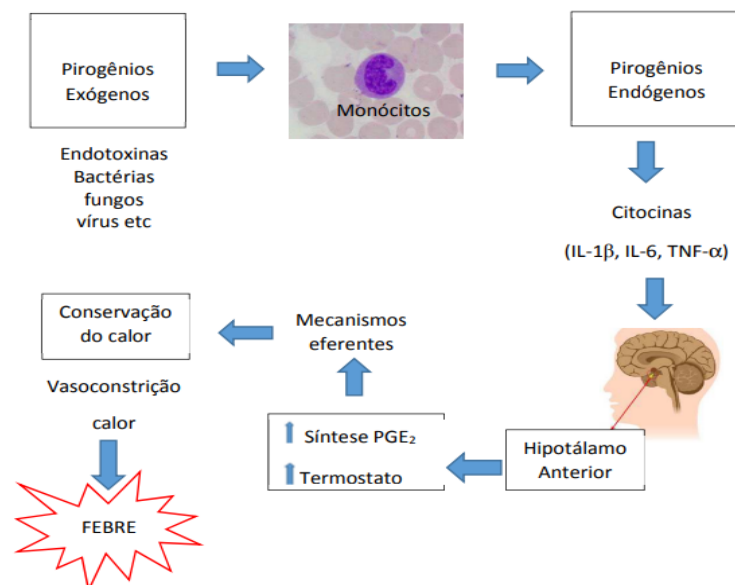
glicoproteicos, lipoproteicos ou ainda carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios (MARQUES, 2005; VANCONCELOS, 2010). Com mais de cinquenta anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados e em comercialização no país, a maioria antineoplásicos e imunossupressores, este produto biológico se destaca como uma importante ferramenta para uma terapia específica e segura (CONCEIÇÃO, 2021).

1.3 Mecanismo da febre: contaminação pirogênica

Na antiguidade, médicos acreditavam que a febre devia ser estimulada como um meio de combate à doença, tanto que Hipócrates acreditava que a febre servia para cozinhar “humores” em excesso (a causa pretendida de doença naquele dia) e, portanto, removê-los do corpo. Os primeiros estudos relacionavam a febre em homens e animais ao contato com materiais orgânicos em putrefação. No período compreendido entre 1809 e 1823, pesquisas desenvolvidas por Gaspard e François Magendie associaram a febre à presença de matéria orgânica putrefata, sendo inclusive demonstrada pelo último, a condição de absorção dos materiais pútridos através das veias. Os termos “pirogênio” e “pirogênico” foram utilizados pela primeira vez em meados do século XIX na publicação de Theodor Billroth “*Observations on Fever Caused by Wounds and Accidental Wound Diseases*” que explanava o estudo de ferimentos ou infecções sépticas. Billroth isolou uma bactéria que chamou de *Coccobacteria septica* e afirmou ser o agente causador da infecção no ferimento. Concomitantemente, estudos em animais desenvolvidos pelos franceses Pelletier e Caventue permitiram conhecer os efeitos de pirexia e antitérmicos através do isolamento do antipirético quinina. A compreensão do mecanismo da febre e o papel da bactéria em sua causa foram auxiliados pelo nascimento da teoria microbiológica moderna e seus métodos, e prosseguiu junto de muitas linhas de sobreposições de inquéritos, incluindo: higiene médica geral, infecção por feridas (ou sépticas), toxinas bacterianas, febre por injeção, terapia da febre, purificação química e elucidação estrutural da endotoxina e caracterização molecular moderna do lipopolissacarídeo (LPS). Contudo cabe destacar que, a ideia mais próxima do que entendemos atualmente sobre o mecanismo de febre foi levantada por Burdon-Sanderson quando, em 1876, foi lançada a discussão indagando se a origem da resposta febril estava nos agentes exógenos ou em agentes endógenos liberados por células do hospedeiro (WILLIAMS, 2007).

A febre é um sinal clínico que tem o intuito de preservar a integridade do organismo em face de uma aparente ameaça onde a temperatura corporal aumenta acima dos valores normais, por aumento do ponto de ajuste térmico hipotalâmico. Nesse processo, pirogênios exógenos estimulam a produção de pirogênios endógenos que, através do sangue, ultrapassam a barreira hematoencefálica e atingem células endoteliais especializadas dos órgãos vasculares hipotalâmicos, onde promovem a transformação de ácido araquidônico em prostaglandina E2 (PGE2). A PGE2 é detectada pelos seus receptores nos neurônios pré-óticos do hipotálamo e induz o aumento do ponto de ajuste térmico hipotalâmico induzindo respostas vasoconstritoras e de contração muscular que conduzem à produção endógena de calor, por forma a se atingir a nova temperatura corporal ajustada pelo hipotálamo (Figura 5). É importante destacar, que a febre difere da hipertermia, onde ocorre elevação da temperatura para valores acima de 38°C, contudo sem alteração do ponto de ajuste hipotalâmico e sem a atuação de agentes indutores de um estado febril. Deve-se a uma deficiência nos mecanismos de termorregulação ou a condições ambientais que ultrapassam o controle termorregulador, resultando na produção excessiva ou na diminuição da dissipação de calor (COCEANI *et al.*, 1986; OGOINA, 2011; SPENCER, 2015).

Figura 5: Esquema do mecanismo da febre.



IL-1 β : Interleucina 1 beta; IL-6: Interleucina 6; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; PGE₂: Prostaglandina E2.

Fonte: (Adaptado de PRESGRAVE, 2003).

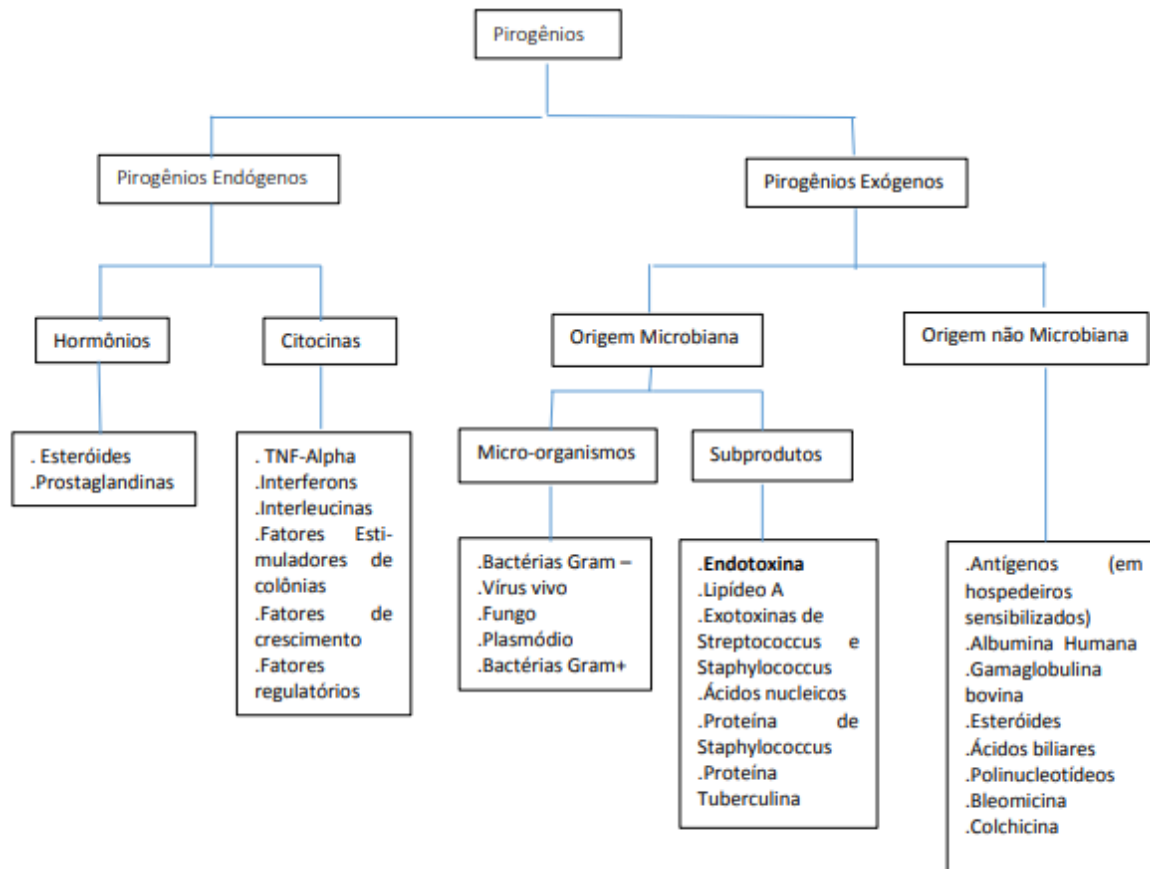
Pirogênios exógenos são aqueles com origem externa ao corpo podendo ser de diversas fontes como bactérias, fungos e vírus e/ou suas frações, como também pirogênios não microbianos, por exemplo, alguns fármacos, esteroides, frações do plasma e o adjuvante sintético muramil dipeptídeo. A endotoxina ou LPS é um dos pirogênios mais conhecidos relacionados à contaminação pirogênica. Pode ser definida como um componente estrutural de paredes celulares de bactérias Gram-negativas sendo um composto termoestável que resiste aos ciclos normais de esterilização (FREITAS, 2008). Já os pirogênios endógenos, entretanto, são produzidos internamente pelo hospedeiro em resposta ao estímulo dos pirogênios exógenos. São secretados por fagócitos mononucleares (neutrófilos, monócitos e macrófagos) e pertencem a uma classe de imunopeptídeo chamada citocina, responsáveis pela inflamação, coagulação e mecanismo da febre. Atualmente, está bem estabelecido que o pirogênio endógeno consiste em um dos mecanismos centrais da febre. Os pirogênios endógenos estão representados pela interleucina 1- α (IL-1 α), interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interferon α (IF- α), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o fator de necrose tumoral β (TNF- β). É fundamental a participação de tais citocinas no aumento e manutenção da alteração no ponto de ajuste hipotalâmico. Em resposta a estes estímulos, o sistema nervoso central define novos valores da temperatura corporal com a subida da temperatura (Figura 6) (SPENCER, 2015; GUIMARÃES, 2017).

1.4 Métodos para avaliação da contaminação pirogênica

1.4.1 Teste de pirogênio *in vivo* (RPT)

Com o surgimento das soluções parenterais de grande volume nos anos 1930 somado a sua grande demanda de consumo na II Guerra Mundial, tornou-se necessário o estabelecimento de um teste oficial para detecção de pirogênios. Surgiu então o teste de pirogênio em coelhos (RPT, sigla no inglês *Rabbit Pyrogen Test*) a partir de um estudo colaborativo autorizado pelo Comitê de Revisão da Farmacopeia Americana (USP, sigla no inglês *United States Pharmacopeia*) culminando na obrigatoriedade do método como condição para liberação de cada lote de produtos parenterais na USP (1942), Farmacopeia Europeia (FE) (1971) e FB (1976) (NAVEGA *et al.*, 2015).

Figura 6: Classificação dos pirogênicos conforme origem endógena ou exógena.



TNF: Fator de necrose tumoral; *Streptococcus*; *Staphylococcus*.
Fonte: (FINGOLA, 2018).

No RPT, a resposta febril é observada após inoculação, por via intravenosa, da solução através da medição da temperatura retal de coelhos por um período de três horas (Figura 7). A febre é dada pela variação individual da temperatura (VIT) entre a temperatura basal (TB) do coelho com a temperatura mais alta durante o período de 3 horas. Esse teste inicial é realizado com três animais, e, caso um destes coelhos apresente uma VIT maior ou igual a 0,5°C, a análise deve ser repetida com mais cinco animais a fim de se obter o resultado final da amostra em pirogênica (P) ou não pirogênica (NP). Na repetição, são usados mais cinco coelhos novos e, se, no máximo três dos oito coelhos mostrarem aumentos individuais de temperatura de 0,5°C, ou se, a soma das VIT dos oito animais não excederem 3,3°C, o produto atende aos requisitos para ausência de pirogênio (WILLIAMS, 2007).

Figura 7: Teste de pirogênio em coelhos: contenção dos animais e inoculação da amostra teste.



Fonte: (DA AUTORA, 2022).

O RPT ainda é utilizado como prova biológica em cada etapa do processo produtivo devido ao seu longo histórico de confiabilidade, sua capacidade de detectar diferentes tipos de pirogênios e da equivalência de resposta à dos humanos, onde tanto no coelho como no homem a concentração limite para resposta pirogênica é de 1 ngkg^{-1} de LPS, proporcional a 5 UEkg^{-1} de LPS de *Escherichia coli* (WILLIAMS, 2007). Os produtos biológicos representam uma parcela significativa dos medicamentos descritos na FB que utilizam tão somente o RPT, como o único teste oficial na avaliação de pirogenicidade (SILVA *et al.*, 2015; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Entretanto, há desvantagens no RPT a serem ressaltadas como: a questão ética do envolvimento de animais nos experimentos, além do estresse a que estes são submetidos e, também desvantagens metodológicas como menor sensibilidade quando comparado a métodos *in vitro*, ausência de quantificação e a extrapolação entre espécies. Além disso, a prática desta metodologia custa à utilização de grande quantidade de animais, tanto pelos produtores como pelo órgão de análise, fazendo uso de muitos coelhos por ano (SILVA, 2017).

1.4.2 Métodos alternativos *in vitro*: princípio dos 3Rs

A ideia do uso de métodos alternativos advém do interesse em proteger os animais que possui origens remotas do século XIX. Jeremy Bentham disse “a

questão não é se os animais raciocinam ou se eles podem falar, mas se eles sofrem” e, Marshall Hall propôs o primeiro código de ética na experimentação animal, que sugeria a substituição de grandes animais por animais inferiores na escala zoológica, a redução de repetições desnecessárias de ensaios com animais e a preocupação com a diminuição da dor imposta aos animais. Nos dias de hoje, a conscientização deve ser reforçada, tornando uma realidade urgente a busca por métodos validados como alternativas à utilização de animais tanto na pesquisa quanto no ensino (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MELANDRI *et al.*, 2010).

A introdução do conceito dos 3Rs (redução, refinamento e substituição; no inglês *reduction, refinement and replacement*) em 1959, com a publicação do livro “*The principles of humane experimental technique*” foi um marco no meio científico. A partir de então se busca a redução do número de animais, refinamento das técnicas experimentais, minimizando o sofrimento do animal e preservando o seu bem-estar e, quando possível, a substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro* (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Este princípio proposto é amplamente aceito como a melhor abordagem para maximizar a ciência de alta qualidade garantindo ao mesmo tempo o mais alto padrão de consideração ética regulamentar ao uso de animais em procedimentos científicos (KIRK, 2018).

O teste de endotoxina bacteriana (BET, sigla no inglês *Bacterial Endotoxin Test*, também conhecido como teste do lisado do amebócito de *Limulus* - LAL), e o teste de ativação de monócitos (MAT, sigla no inglês *Monocyte Activation Test*) são os métodos farmacopeicos alternativos ao teste de pirogênio em coelhos. O ensaio fator C recombinante (rFC) é o método farmacopeico alternativo ao teste do LAL.

1.4.2.1 Teste de endotoxina bacteriana (LAL)

O ensaio LAL foi descoberto na década de 1950 por Frederik Bang quando este observou a morte do caranguejo-ferradura americano *Limulus polyphemus* por coagulação sanguínea induzida pela presença de endotoxinas. Uma série de reações em cadeia ocorre de forma similar ao processo de coagulação do sangue em mamíferos e esse fenômeno está no cerne do ensaio do LAL, pois a formação de um coágulo mostra a presença de endotoxina devido aos amebócitos presentes no sangue do caranguejo-ferradura serem capazes de imobilizar e adsorver uma endotoxina (Figura 8). Em suma, os amebócitos mudam de forma aderindo-se às

laterais dos canais vasculares resultando um coágulo de gel quando expostos à endotoxina (WALLS; BERKSON; SMITH, 2002).

Figura 8: Extração da hemolinfa do sangue do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus*.



Fonte: (O valioso “sangue azul” do caranguejo-ferradura. Disponível em: <https://www.mdig.com.br/?itemid=20818>. Acesso em: 02/03/2021).

Este teste é altamente sensível para detectar quantidades mínimas de endotoxinas como um milionésimo de um bilionésimo de um grama de endotoxina em menos de 1 hora e está disponível em três variações básicas: o método de gelificação (*gel clot*) e, os métodos turbidimétrico e cromogênico, que podem estar nas versões de ponto final ou cinético, sendo ambos os métodos fotométricos que necessitam de calibração através de uma curva padrão de endotoxina e sua respectiva leitura espectrofotométrica. Com base na reação de coagulação do teste do LAL frente a endotoxinas ocorre opacificação, gelificação e coloração amarelada juntamente com cromógenos específicos e assim, a determinação e posterior mensuração de endotoxinas na amostra tornam-se possível de acordo com os métodos turbidimétrico, gelificação e cromogênico, respectivamente (BRUM, 2009).

O método de coagulação em gel é o mais clássico e elementar das opções do LAL em função de possuir a essência do princípio do teste, reproduzindo no tubo de ensaio a mesma reação frente a endotoxinas que ocorre *in vivo* na hemolinfa do caranguejo-ferradura. É uma técnica econômica por requerer equipamentos menos

sofisticados e também é menos suscetível a fatores interferentes inibitórios. O resultado é qualitativo sendo apresentado como positivo ou negativo para detecção de endotoxinas conforme a formação, ou não, de um gel insolúvel ou coágulo. A permanência de um gel firme após a inversão do tubo a um ângulo de 180° indica que a amostra é positiva e, negativa, para qualquer outra condição. O coágulo formado tem forte correlação com a concentração de endotoxina sendo proporcional à taxa máxima de coágulo formado e, inversamente proporcional ao tempo de coagulação. O método do LAL de coagulação em gel é considerado o mais preciso para determinar o conteúdo de endotoxinas sendo indicado para laboratórios que utilizem produtos contendo baixo volume ou para produtos altamente viscosos ou extremamente coloridos. A baixa precisão na avaliação da concentração de endotoxina entre duas diluições consecutivas, o longo processo de preparação com vários testes acrescidos de várias diluições na determinação da concentração de endotoxina e, a subjetividade no reconhecimento do coágulo levando a erro humano por depender de interpretação, são algumas das fragilidades deste método (JOINER; KRAUS; KUPIEC, 2002; MORALES, 2004; ONG *et al.*, 2006).

O método do LAL turbidimétrico é uma técnica fundamentada na reação de quebra de uma proteína de coagulação, também identificada como um composto endógeno, por uma enzima de coagulação que foi ativada na presença de endotoxinas. Com a ação de interações iônicas que ocorrem após esta quebra, os produtos dessa reação sofrem agregação e assim, a solução se torna turva. A medida da turbidez para determinar o conteúdo de endotoxina pode ser realizada de duas maneiras, ambas utilizando uma curva padrão, diferindo somente, no ponto final para medição. No formato do tipo limite se considera a leitura de turbidez em relação à concentração do substrato e no tipo cinético, a leitura de turbidez da amostra é baseada no tempo de reação para a solução obter uma absorbância pré-estabelecida. Recomenda-se realizar a medida da turbidez logo após o fim do período de incubação a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. É tido como um método sofisticado e conseqüentemente de custo elevado, necessitando de equipamentos complexos embora seja de fácil execução. Materiais em suspensão ou turvos podem resultar em falsos-positivos sendo necessário assim, o tratamento adequado da amostra para avaliação pelo método. Compostos como plasma, albumina, soro e outros materiais derivados do sangue também são passíveis de causar interferência (JOINER; KRAUS; KUPIEC, 2002; GUIMARÃES, 2017; OLIVEIRA, 2019).

O método LAL cromogênico possui o mesmo princípio que o método turbidimétrico, só que ao invés da turbidez, é realizada a medição do desenvolvimento da cor por um cromóforo. Tal substância possibilita estimar a concentração de endotoxinas de forma mais quantitativa e confiável, uma vez que o substrato cromogênico utilizado é específico para este método. O substrato nada mais é que um peptídeo ligado a uma molécula do cromóforo p-nitroanilina (pNA) que quando exposto a uma clivagem proteolítica em decorrência de uma cascata de etapas de ativação enzimática do LAL, libera a molécula de cor amarela pNA. Assim, a concentração de endotoxinas é mensurada com uma absorvância de 405 nm, após incubação da mistura de reação a 37°C, proporcionalmente ao desenvolvimento da coloração amarela. Bem como no método turbidimétrico, o método cromogênico está disponível em duas versões, o método cinético e o de ponto final e, como já dito, se faz necessária uma curva-padrão na análise de ambas as variantes do método LAL cromogênico assim como no turbidimétrico. É um método fácil com resultados rápidos quando automatizado, de elevada sensibilidade, quantitativo, e, no uso da leitura instrumental a variabilidade humana nas avaliações é excluída. Resultados falso-positivos podem ocorrer por substâncias interferentes iguais ao observado no método turbidimétrico e da mesma maneira, uma amostra com excesso de turbidez pode interferir, a não ser que a amostra passe por um tratamento prévio para remoção da turbidez ou que se faça a diferença entre esta e o padrão branco do ensaio (VANHAECKE; PIJCK; VUYE, 1987; JOINER; KRAUS; KUPIEC, 2002; MORALES, 2004).

O LAL é amplamente utilizado como um método *in vitro* simples e altamente sensível, porém não é capaz de substituir completamente o RPT por limitações inerentes. Ele somente detecta as endotoxinas oriundas de bactérias Gram-negativas, não sendo detectáveis outras fontes de pirogênio não endotoxinas; além da suscetibilidade às interferências com certos tipos de materiais com alto teor de lipídios, proteínas e glucanas. Assim, em alguns produtos biológicos, a endotoxina se liga às proteínas plasmáticas do produto, não sendo detectada no teste, que só quantifica endotoxina livre, embora estudos recentes tenham demonstrado a validade do ensaio do LAL na determinação da concentração de endotoxina bacteriana em amostras de soros hiperimunes (HARTUNG *et al.*, 2001; SCHINDLER *et al.*, 2009; LOPES, 2014; FINGOLA, 2018).

A capacidade de eliminar os interferentes do teste por meio da descoberta da menor diluição do produto a ser utilizada, compara a aplicabilidade dos diferentes métodos do LAL, correlacionando-os. Quando o reagente LAL é produzido pelo mesmo fabricante, ou ainda melhor, pelo mesmo lote, a correlação entre os métodos é considerada moderada. Contudo, em ocasião de fabricantes distintos, os resultados para o mesmo método podem ser diferentes. Assim, a validação do ensaio é um dos aspectos críticos e indispensável para garantir que uma determinada diluição do produto não sofra interferências, independentemente do método ou lote, e desta forma, o resultado da quantificação de endotoxinas na amostra testada seja confiável (MORALES, 2004).

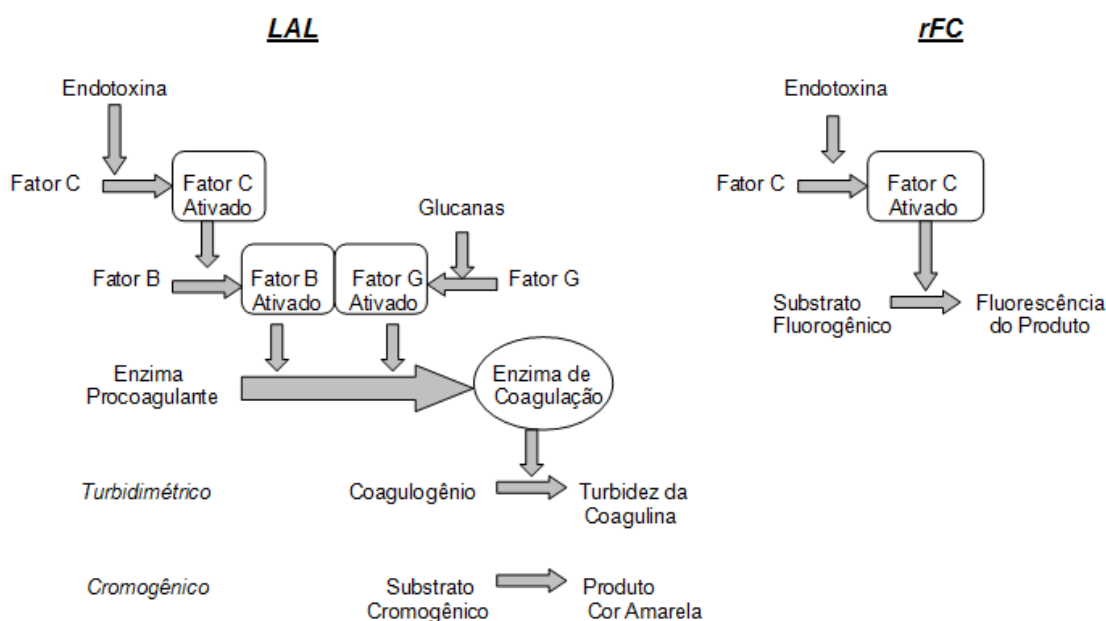
1.4.2.2 *Ensaio do fator C recombinante (rFC)*

O ensaio rFC é uma metodologia candidata a substituir o teste do LAL por ser conveniente, econômico e uma fonte padronizada de LAL recombinante pela sua ativação, via enzimática, por endotoxinas bacterianas. Neste método, o DNA da molécula do fator C do caranguejo-ferradura é clonado e sintetizado em rFC, que quando ativado por endotoxinas, libera um composto fluorogênico (Figura 9). A medição da fluorescência ocorre no tempo zero e após a introdução da endotoxina essa diferença proporcional a concentração de endotoxinas é utilizada para o cálculo final dos níveis de endotoxina na amostra. Por fazer o uso da detecção de fluorescência para determinar a concentração de endotoxinas, o rFC possui uma sensibilidade maior comparada ao LAL podendo alcançar 0,001 EU/mL, sendo esta técnica um dos testes analíticos mais sensíveis e com uma especificidade cerca de 1.000 vezes maior do que as técnicas de absorvância usadas para os ensaios LAL (MALONEY; PHELAN; SIMMONS, 2018; BIOMERIEUX, 2021).

Além da urgência de haver um método alternativo ao ensaio LAL, outros fatores colaboraram para a pesquisa e desenvolvimento do rFC, já com o intuito de superar algumas limitações do LAL como, a falta de especificidade pela reação com materiais interferentes como o β -D-glucana, sensibilidade do lisado comercial disponível variando de lote a lote e, diminuição a cada dia da população de caranguejos-ferradura que são a fonte do LAL. Assim, este ensaio possui o atributo de ser um teste de diagnóstico para pirogênios tipo endotoxinas simples, rápido, específico e sensível com base no rFC, sendo desenvolvido para que esta molécula

ative-se mediante contato com endotoxina, sendo promovida a hidrólise de um substrato com obtenção de um produto que será quantificado permitindo avaliar com extrema sensibilidade e especificidade o nível de endotoxina (DING; HO, 2001).

Figura 9: Cascata de reação em lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) e ensaio de fator C recombinante (rFC).



LAL: *Limulus Amebocyte Lysate* (Lisado de Amebócitos de *Limulus*); rFC: Fator C Recombinante.
 Fonte: (Adaptado de: O ensaio de fator C recombinante. Disponível em: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/BR/en/recombinant-factor-c-assay. Acesso em: 21/12/2021).

Em 2012 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) e o Ministério da Saúde Europeu reconheceram o ensaio rFC como uma alternativa aceita desde que fossem realizados testes de validação e, em 2016, o teste foi adicionado à FE. O rFC está em processo de adoção pela USP embora no ano de 2020 este compêndio decidiu cancelar a proposta de incluir tecnologia recombinante para o teste de endotoxina no capítulo de endotoxinas bacterianas e iniciar o desenvolvimento de um capítulo separado que se expande sobre o uso, validação e comparabilidade de testes de endotoxinas baseados em reagentes derivados de tecnologia recombinante. Desta forma, nos EUA, o FDA permite que o fabricante utilize o ensaio baseado em fator C recombinante, contudo, a validação do método deve estar de acordo com os requisitos do Capítulo USP, Teste de Endotoxinas Bacterianas, conforme descrito na seção de Técnicas Quantitativas

Fotométricas e Capítulo USP, Validação de Procedimentos Compendiais (FDA, 2012; MALONEY; PHELAN; SIMMONS, 2018).

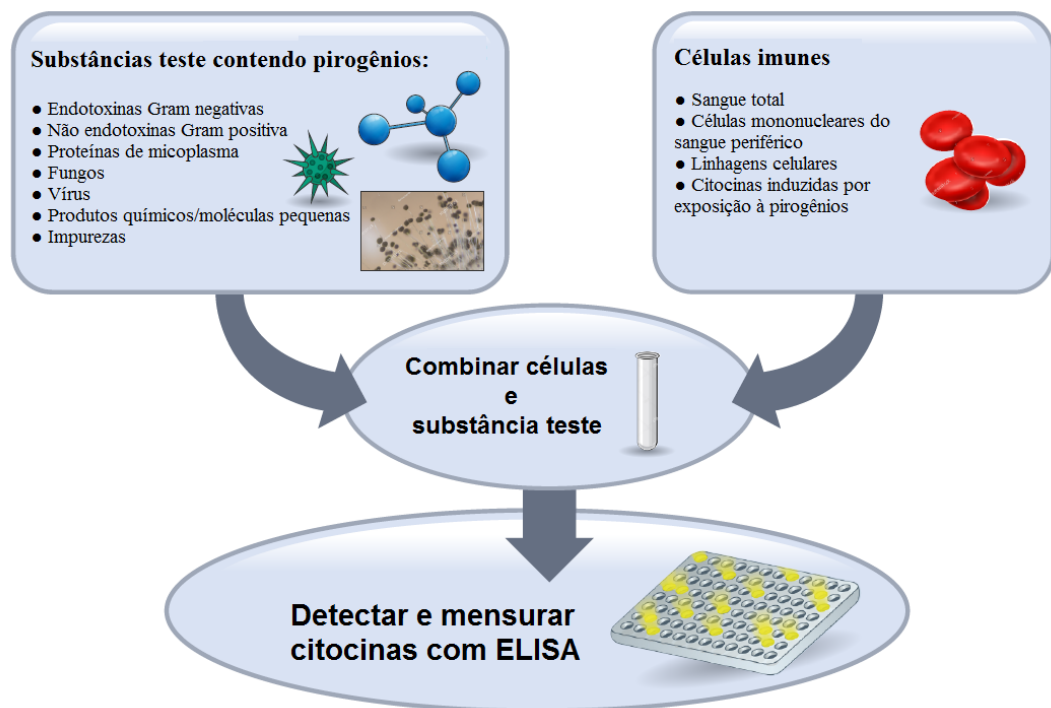
1.4.2.3 Teste de ativação de monócitos (MAT)

O MAT foi desenvolvido com a proposta de unir em um teste a elevada sensibilidade e robustez *in vitro* apresentada pelo LAL somado ao farto repertório de pirogênios detectáveis pelo RPT, transpondo suas limitações. Tem por base o mecanismo da febre em humanos, detectando e quantificando possíveis contaminantes presentes em amostra que quando em contato com os receptores de superfície e intracelulares presentes nos monócitos induzem a liberação de citocinas (principalmente IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que são medidas. Em síntese, esta plataforma de teste foi desenvolvida para refletir os processos moleculares que ocorrem no corpo humano quando em contato com substâncias pirogênicas a partir da compreensão do mecanismo da febre unido ao progresso da tecnologia de ensaio imunoenzimático (ELISA, sigla no inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) na mensuração desta resposta (Figura 10) (DINARELLO, 1984; POOLE *et al.*, 1988; HARTUNG *et al.*, 2001; DINARELLO, 2004). A liberação de citocinas pode ocorrer a partir de monócitos de diferentes origens como do sangue humano fresco ou criopreservado, de células mononucleares de sangue periférico (PBMC, sigla no inglês *Peripheral blood mononuclear cell*) ou de cultura de linhagens celulares monocíticas (Mono Mac 6, MM6) (HOFFMANN *et al.*, 2005; LOPES, 2014). É considerado um teste aspirante à substituição do teste *in vivo* devido sua alta sensibilidade em detectar vários tipos de pirogênios, ser inovador, por usar como meio reativo o próprio sangue humano não havendo necessidade de extrapolação entre espécies, além de sobrepor as limitações do BET (NAVEGA *et al.*, 2015).

O primeiro estudo a demonstrar a ideia de se investigar a presença de contaminantes indutores da febre por intermédio de um teste alternativo *in vitro* capaz de detectar a liberação de pirogênios endógenos produzidos por monócitos ativados no sangue foi em 1988, quando um grupo de pesquisadores do Reino Unido realizou o “teste de monócitos” onde observaram boa correlação na curva dose-resposta na detecção de IL-1 β e TNF- α liberados por monócitos em cultivos celulares depois de estimulados por cepas de diferentes origens (POOLE *et al.*, 1988). A partir de então, estudos foram realizados em fontes diversas de monócitos

e citocinas pirogênicas, buscando-se ampliar o conhecimento e as possibilidades do novo método frente aos testes tradicionais, RPT e o LAL. Em 1990, Hansen e Christensen demonstraram a liberação de IL-1 a partir de PBMC expostas ao LPS e *Staphylococcus aureus*, indicando assim, que o teste de monócito seria sensível tanto para bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (HANSEN; CHRISTENSEN, 1990). No ano seguinte, a contaminação pirogênica foi avaliada, com elevada sensibilidade, por meio de um teste ELISA desenvolvido, no qual, IL-6 foi detectada advinda da linhagem celular Mono Mac 6 (TAKTAK *et al.*, 1991). Hartung e Wendel em 1995 utilizaram o sangue total humano como fonte de monócitos e verificaram que pirogênios endógenos (IL-1, IL-6 e TNF) são facilmente quantificados e sua liberação é proporcional à concentração do estímulo pirogênico como endotoxinas, bactérias Gram-positivas ou seus subprodutos (HARTUNG; WENDEL, 1995).

Figura 10: Princípio do teste de ativação de monócitos.



ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Teste imunoenzimático)
 Fonte: (Adaptado de ALLEN *et al.*, 2019).

Diante do avanço científico, o *European Center for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) promoveu um *workshop* em janeiro de 2000, na Alemanha, com pauta no novo teste de pirogênio baseado na reação de febre humana. O relatório

deste evento forneceu um panorama de todos os testes de pirogenicidade com suas características analíticas, vantagens e desvantagens concluindo ao final, na necessidade de desenvolvimento do novo teste de pirogênio *in vitro* em consequência das limitações do RPT e do LAL, atrelada à condição de que cada novo método seja validado adequadamente (HARTUNG *et al.*, 2001).

O processo de validação internacional do novo teste de pirogênio com base em células de monócitos humanos começou com um estudo colaborativo envolvendo dez laboratórios, no ano de 2005. Nesse estudo, nove medicamentos e seis testes *in vitro* utilizando sangue total humano fresco foram validados (PBMC/IL-6; WB/IL-1 β ; WB/IL-6; MM6/IL-6; TPH-Neo/TNF α e THP/TNF α). Os resultados obtidos revelaram que não é possível utilizar sistemas baseados em células THP-1 (linhagem celular monocítica humana) devido a sua incompatibilidade aos critérios de validação. Contudo, quanto aos quatro testes aprovados, estes são mais sensíveis, menos custosos e mais rápidos comparados ao teste *in vivo* e, capazes de detectar pirogênios de origem Gram-positiva, diferente do LAL (HOFFMANN *et al.*, 2005). Em face à dificuldade de disponibilidade de sangue recém coletado, preocupação de segurança frente a possíveis doenças e diferenças interindividuais de doadores, o método de criopreservação do sangue total se mostrou uma opção na otimização do teste de liberação de citocinas. Assim, em 2006, o teste de pirogênio com base em células sanguíneas humanas criopreservadas foi validado internacionalmente por meio de um método simples de congelamento do sangue humano onde uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão de Sorensen são misturados ao sangue fresco e levado a uma temperatura de congelamento de -80°C para dosagem de IL-1 β (SCHINDLER *et al.*, 2006). A criopreservação do sangue torna o método analítico mais fácil indo ao encontro do motivo considerado mais limitante na aplicabilidade do MAT: o acesso aos monócitos humanos sem a necessidade de doadores de sangue a cada análise (KORYAKINA; FREY; BRUEGGER, 2014).

Em 2008, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternatives Methods* (ICCVAM) emitiu um relatório com recomendações para os cinco métodos de teste *in vitro* propostos para avaliar o potencial pirogênico de produtos farmacêuticos e outros produtos com base em uma avaliação abrangente do *status* de validação desses métodos, sendo pautado nos documentos de revisão, referente a estudos de validação sobre o assunto, enviados pela ECVAM. Os cinco

métodos de teste *in vitro* avaliados, propostos como substitutos ao teste de pirogênio em coelho, foram: Sangue total humano (WB)/Interleucina 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 (Quadro 1). O ICCVAM em suas considerações destacou que os testes avaliados podem ser considerados para o uso na detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas em drogas parenterais humanas caso a caso, após validação para cada produto específico mostrando equivalência com o RPT; que produtos biológicos e dispositivos médicos não foram contemplados nos estudos de validação, ficando restrito quanto ao número e a variedade de produtos farmacêuticos; e que os dados apresentados não davam suporte para o uso destes métodos em detectar um amplo espectro de pirogênios porém reconhecendo como perspectivas futuras, que estes métodos podem ser aplicáveis à detecção de uma gama de pirogênios não só endotoxina, desde que sejam adequadamente validados para tais usos (ICCVAM, 2008). A agência federal FDA do Departamento de Saúde dos Estados Unidos atuante na saúde pública do país consensuou com as recomendações do ICCVAM (FDA, 2009).

Quadro 1: Testes *in vitro* validados segundo ICCVAM propostos para suceder o teste de pirogênio em coelhos (ICCVAM, 2008).

TESTE	SISTEMA	DESFECHO
WB/IL 1 β	<i>Whole Blood</i> (WB) - Sangue total humano	Dosagem de Interleucina 1 β
Cryo WB/IL-1 β	<i>Cryopreserved Whole Blood</i> (Cryo/WB) - Sangue total humano criopreservado	Dosagem de Interleucina 1 β
WB/IL-6	WB Sangue total humano	Dosagem de Interleucina 6
PBMC/IL-6	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (PBMC) - Células Mononucleares do sangue periférico	Dosagem de Interleucina 6
MM6/IL-6	Linhagem celular monocítica Mono Mac 6	Dosagem de Interleucina 6

Fonte: (CALDEIRA, 2015).

Desde 2010, o MAT é reconhecido pela FE como um método substitutivo do RPT após uma validação específica por produto. A análise do conteúdo pirogênico de uma substância é determinada por meio dos métodos de análise do MAT

descritos na FE, podendo ser de forma quantitativa pelo método A, onde o resultado é expresso em unidade de endotoxina equivalente por mililitro devendo a concentração de pirogênio encontrada na amostra ser menor que o limite da concentração especificada na curva dose-resposta padrão para que o produto seja aprovado; semiquantitativa pelo método B, cujo resultado da amostra é positivo ou negativo pela comparação com um controle positivo de endotoxina; ou ainda, quando da inaplicabilidade dos métodos anteriores, pelo método C, onde a amostra é comparada com um lote do produto validado como referência (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010; CALDEIRA, 2015; SILVA, 2017).

Em 2016, devido ao aumento da produção de produtos mais complexos, o capítulo geral de Teste de Endotoxina na FE introduziu a necessidade de uma avaliação do produto, ou processo de produção e matérias-primas com relação ao risco de pirogênios não endoxinas (PNE). Este fato levou a revisão do capítulo geral do MAT na FE em 2017 com o objetivo de levar a uma redução ainda maior no uso de animais de laboratório. Esta revisão incluiu o MAT como um método substitutivo ao RPT para PNE (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2017).

A nível regulatório, o MAT é validado internacionalmente e reconhecido pela FE, sendo sua pesquisa incentivada por instituições internacionais, como o ICCVAM, que salienta ser necessária a realização de estudos de validação da técnica em produtos de origem biológica. A aplicabilidade deste teste baseado na reação da febre humana está sendo considerado um sucesso, inclusive já impactando de forma significativa, na redução do uso de animais devendo seu uso ser estimulado principalmente em países fora da Europa (HARTUNG, 2021).

No âmbito nacional, um passo importante foi o reconhecimento do MAT como método alternativo para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis pela Resolução Normativa nº 45, de 22 de outubro de 2019 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esta norma jurídica fornece subsídios para o avanço da implementação desta técnica como método oficial, pois reconhece que o método se encontra formalmente validado por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), e possui aceitação regulatória internacional. Entretanto, a RN nº 45/2019 não deixa claro quais são as aplicações específicas do método para cada tipo de produto, bem como, ao que se destina (substituição total, à substituição parcial ou à redução). O uso da FE, onde os métodos do MAT foram

descritos, disponibiliza três métodos de escolha (A, B e C), assim como, diferentes matrizes como fonte de obtenção dos monócitos de acordo com a legislação do Conselho da Europa (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2017; BRASIL, 2019b).

A validação do MAT específica por produto, principalmente em medicamentos biológicos, deve ser criteriosa em virtude da complexidade e alto valor agregado sendo, portanto, necessários dados técnico-científicos para que este método alternativo seja implementado a nível industrial poupando o uso de dezenas de animais (NAVEGA, 2015). Diante da importância dos produtos biológicos no contexto epidemiológico sanitário brasileiro, principalmente em relação aos medicamentos biológicos, somado à tendência atual de consolidação do MAT como método alternativo ao teste de pirogênio em coelhos, defende-se a prioridade desta classe de medicamentos a ser testada para demonstrar aplicabilidade do método (SILVA *et al.*, 2015).

1.4.2.4 Legislação sobre métodos alternativos

Alguns países reconhecendo a necessidade e percebendo a complexidade do desenvolvimento/validação de métodos alternativos ao uso de animais, se organizaram e criaram centros de pesquisa e fomento tendo os seguintes objetivos: desenvolvimento de novos métodos alternativos em consonância com o princípio dos 3Rs; estabelecimento da base de dados sobre métodos alternativos ao uso de animais; fomento de projetos de pesquisa relacionados aos métodos alternativos e as cooperações com outras agências de fomento nacionais e internacionais e centros de validação; promoção de fóruns de discussão sobre métodos alternativos ao uso de animais. Logo, em atendimento a essa perspectiva, foram criados o ECVAM em Ispra na Itália, o ICCVAM nos EUA, o *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) no Japão, o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) na Inglaterra e o *Center for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments* (ZEBET) na Alemanha, entre outros (ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008).

No Brasil a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, sancionou a criação do CONCEA, sendo sua competência regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, em monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino ou pesquisa científica (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2009). Desta forma, a legislação brasileira passou a olhar com mais

atenção para o assunto, legitimando e tornando obrigatório o uso de métodos alternativos validados em substituição ao uso de animais, buscando por métodos que reduzam a variabilidade biológica, aumentem a sensibilidade e que mantenham uma correlação de respostas com os ensaios a que se destina substituir (BRASIL, 2014a, 2014b, 2016; FINGOLA, 2018).

A parceria entre INCQS/Fundação Oswaldo Cruz e a Anvisa viabilizou a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) em 2012, importante organização no tema por ser o primeiro centro da América Latina a validar e coordenar estudos de validação de métodos de substituição, redução ou refinamento no emprego de animais em testes de laboratório. Outro marco fundamental no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais no Brasil foi a instituição da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) em nível do Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação pela Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012, permitindo recursos especializados e infraestrutura laboratorial para implantação de métodos alternativos ao uso de animais e validação de novos métodos no Brasil (BRASIL, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

O reconhecimento do uso de métodos alternativos ganhou ênfase com as publicações das resoluções normativas do CONCEA. A Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, em seu escopo reconhece o uso no país de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Lançada no mesmo ano, a Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014, reconhece 17 metodologias alternativas e estabelece também um limite de cinco anos para que as metodologias se tornem obrigatórias pelas instituições de pesquisa, e a Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016, reconhece outros sete métodos alternativos seguindo os mesmos parâmetros. Os 24 métodos alternativos mencionados pelas RN nº 18 e nº 31 são validados por vários países e possuem aceitação regulatória. De igual forma, a RN nº 45, de 22 de outubro de 2019, reconhece o método alternativo MAT para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis no Brasil com prazo de até cinco anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo (BRASIL, 2014a, 2014b, 2016, 2019b).

1.5 Importância das revisões de literatura – revisão de escopo

As revisões de literatura são ferramentas importantes na síntese periódica de conhecimento nas diversas áreas da pesquisa científica, pois fornecem informações atualizadas por meio da sumarização e síntese de dados disponíveis na literatura científica a respeito de determinado tema na área em estudo. Independentemente do tipo, as revisões de literatura devem ser conduzidas com o rigor metodológico que requerem para que se alcance o objetivo de subsidiar novas respostas para lacunas pendentes nos meios técnicos e científicos com resultados não enviesados e interpretações confiáveis, além de propor novos questionamentos a serem trabalhados (CARVALHO, 2019).

É importante destacar que não existe um único "tipo ideal" de revisão de literatura, mas sim que todos os métodos de revisão de literatura oferecem um conjunto de ferramentas que os pesquisadores precisam usar de forma adequada. Contudo, no atual panorama acadêmico, não há um consenso internacional de tipos de revisão caracterizados, coerentes e mutuamente exclusivos e assim, as especificidades e as modestas diferenças no grau de processo e rigor inerentes a cada tipo de revisão são por vezes negligenciadas. Desta forma, o pesquisador deve estar atento a tais variações entre os tipos de revisão que os distingue, sendo identificadas com mais clareza ao se analisar a estrutura e a metodologia por meio de quatro processos principais envolvidos no desenvolvimento de uma revisão que são: pesquisa (procura e seleção dos estudos), avaliação, síntese e análise (GRANT; BOOTHT, 2009).

Quatorze tipos diferentes de revisão de literatura são relatados com base nas publicações de Grant e Bootht (2009) e Bootht (2016), abrangendo desde uma revisão crítica a uma revisão sistemática (Quadro 2) (SOUSA *et al.*, 2018).

Quadro 2: Tipos de revisão de literatura e suas características (continua).

Tipo de Revisão	Descrição	Pesquisa	Avaliação	Síntese	Análise
Revisão crítica	Tem o objetivo de demonstrar investigação extensiva e avaliação crítica de qualidade. Permite incluir o grau de análise e inovação conceitual. Habitualmente resulta em hipótese ou modelo.	Procura identificar os itens mais significativos no campo.	Não. Avalia apenas através de contribuição.	Narrativa. Conceptual. Cronológica.	Procura identificar a contribuição conceitual para incorporar teoria existente ou obter teoria nova.
Revisão integrativa	Utiliza o tipo mais amplo de métodos de revisão de investigação, permitindo a inclusão de investigações experimentais e não experimentais, a fim de compreender mais amplamente um fenômeno. As revisões integrativas podem combinar dados da literatura teórica e empírica.	Pesquisa abrangente para identificar o número máximo de fontes primárias elegíveis, utilizando duas ou mais estratégias.	Relatórios codificados de acordo com a qualidade, mas podem não ser excluídos.	Tabulares (matrizes, gráficos, gráficos ou redes). Narrativa	Criatividade, análise crítica de dados e apresentação de dados são a chave para comparação e identificação de padrões e temas importantes.
Revisão de literatura	Consiste na análise da literatura recente ou atual. Pode abranger uma ampla gama de assuntos em vários níveis de abrangência. Pode incluir os resultados da pesquisa.	Possivelmente compreensiva/ extensa.	Possível.	Narrativa.	Cronológico, conceptual, temático, entre outros.
Revisão de mapeamento/mapa sistemático	Mapeia e categoriza a literatura existente a partir de revisões e/ou pesquisas primárias, identificando lacunas na literatura de pesquisa.	A pesquisa é feita de acordo com o tempo disponível.	Não.	Gráfico. Tabular.	Caracteriza a quantidade e a qualidade da literatura. Pode identificar a necessidade de pesquisa primária/secundária.

Quadro 2: Tipos de revisão de literatura e suas características (continuação).

Meta-análise	Combina estatisticamente os resultados de estudos quantitativos para fornecer um efeito preciso dos resultados.	Exaustiva e abrangente. Poderá utilizar gráfico de funil ou floresta.	Sim. O que permite determinar inclusão/exclusão e/ou análises de sensibilidade.	Gráfico. Tabular. Narrativa.	Análise numérica.
Revisão de estudos mistos	Combina métodos que incluem componentes de revisão (habitualmente sistemáticos). Combina estudos quantitativos com qualitativos ou então resultado com estudos de processo.	Pesquisa sensível ou estratégias quantitativas e qualitativas separadas.	Sim. São utilizados instrumentos de avaliação genérica.	Narrativa. Tabular. Gráfico (para integrar estudos quantitativos e qualitativos).	Pode procurar correlações entre características e usar análise de <i>gap</i> para identificar aspectos ausentes na literatura.
Visão geral	Tenta pesquisar literatura e descrever suas características.	Depende de quão sistemáticos são os seus métodos.	Depende de quão sistemáticos são os seus métodos.	Depende de quão sistemáticos são os seus métodos.	Cronológico, conceitual, temático, entre outros.
Revisão sistemática qualitativa/síntese de evidências qualitativas	Integra ou compara descobertas de estudos qualitativos. Procura "temas" ou "constructos" em ou através de estudos individuais.	Seletiva ou intencional.	Habitualmente para tomar a decisão de incluir/excluir.	Síntese qualitativa, narrativa.	Temática e pode incluir modelos conceituais.
Revisão rápida	Avalia o que já se sabe sobre política ou prática, utiliza métodos de revisão sistemática para pesquisar e avaliar criticamente pesquisas existentes.	A pesquisa é feita de acordo com o tempo disponível.	A avaliação é feita de acordo com o tempo disponível.	Narrativa. Tabular.	Quantidade e qualidade geral da literatura/direção do efeito da literatura.

Quadro 2: Tipos de revisão de literatura e suas características (conclusão).

Revisão de escopo	Avaliação preliminar do potencial âmbito e abrangência da literatura disponível. Visa identificar a natureza e a extensão das evidências dos estudos (geralmente incluindo investigação em curso).	Como permite o tempo. Pode incluir estudos que estão em curso.	Não.	Narrativa. Tabular.	Quantidade e qualidade da literatura (desenho do estudo e outras características). Tentativa de especificar uma revisão viável.
Revisão do estado da arte	Aborda assuntos atuais. Pode oferecer nova perspectiva sobre a questão ou indicar área para investigações futuras.	Compreensiva (literatura corrente).	Não.	Narrativa. Tabular.	Estados atuais de conhecimento, prioridades para futuras investigações e suas limitações.
Revisão sistemática e pesquisa	Combina os pontos fortes da revisão crítica com o processo de pesquisa abrangente. Aborda questões amplas para produzir "melhor síntese de evidências".	Exaustiva e compreensiva.	Possível.	Narrativa. Tabular.	Permite encontrar o que se sabe e fazer recomendações para a prática.
Revisão sistematizada	Tentativa de incluir elementos do processo de revisão sistemática na revisão sistemática abreviada. Normalmente é feito no trabalho de estudante de pós-graduação.	Pode ou não incluir uma pesquisa abrangente.	Pode ou não fazer a avaliação da qualidade metodológica.	Habitualmente narrativa com recurso a tabular.	O que é conhecido? Identifica incertezas em torno de descobertas; limitações das metodologias.
Revisão guarda-chuva ou de cobertura	Refere-se à revisão de recolha de evidência de várias revisões num documento acessível e utilizável. O foco é numa condição ampla ou problema para o qual há intervenções concorrentes e destaca os comentários que abordam essas intervenções e os seus resultados.	Identificação de outras revisões. Não utiliza estudos primários.	Avaliação da qualidade das revisões incluídas.	Gráfica. Tabular e comentários narrativos.	O que é conhecido? Recomendações para a prática. O que permanece desconhecido? Recomendações para futuras investigações.

Fonte: (SOUSA *et al.*, 2018).

A revisão de escopo ou *scoping review* é um método de levantamento da literatura que consiste em uma síntese de conhecimento pautada no mapeamento da literatura a respeito do assunto de interesse. A partir da incorporação de vários tipos de estudos, tal metodologia permite de forma ampla, resumir e sintetizar os dados observados na literatura para subsidiar campos de pesquisas não realizados nas lacunas levantadas e, fornece informação a programas, práticas e políticas. As revisões de escopo possuem como característica identificar rapidamente as principais fontes e evidências disponíveis de conceitos-chave de uma área de pesquisa sendo aplicável na avaliação de evidências emergentes quando ainda não estão claras quais outras questões mais específicas podem ser apresentadas e abordadas de forma valiosa (ARKSEY; O'MALLEY, 2005; PETERS *et al.*, 2020).

O uso deste tipo de revisão é relevante tanto em campos de pesquisa já estabelecidos ou em evolução. Em áreas de evidências emergentes, devido à grande diversidade de metodologias de estudo além da trajetória de artigos publicados referente a algumas áreas de conteúdo, a revisão de escopo facilita a compreensão da extensão do assunto explorado. Já em campos de pesquisa estabelecidos, por haver uma abundância de dados científicos, as análises de escopo fornecem uma compreensão geral do tema de pesquisa. Assim, como um método de síntese do conhecimento, as revisões de escopo têm potencial no avanço relativo à prática, à política e à pesquisa de cuidados de saúde (COLQUHOUN *et al.*, 2014).

Assim como a revisão do tipo sistemática, a revisão de escopo compartilha de algumas características metodológicas como ser metódica, transparente e replicável, contudo, particularidades pontuais a respeito de ambas as revisões devem ser salientadas. Primeiramente, uma revisão sistemática pode normalmente se concentrar em uma questão bem definida onde projetos de estudo apropriados podem ser identificados com antecedência, enquanto um estudo de escopo tende a abordar tópicos mais amplos, onde diversos desenhos de estudo distintos podem ser aplicáveis. Em segundo lugar, a revisão sistemática visa fornecer respostas a perguntas de uma gama relativamente estreita de estudos avaliados quanto à qualidade, enquanto um estudo de escopo tem menos probabilidade de procurar abordar questões de pesquisa muito específicas e nem, conseqüentemente, avaliar a qualidade dos estudos incluídos. Outra diferença é que na revisão de escopo os revisores exploram o campo de interesse na pesquisa primária em um espaço de

tempo relativamente curto, comparado a uma revisão sistemática completa, onde é possível identificar lacunas na base de evidências, bem como resumir e divulgar os resultados das pesquisas. Assim, mesmo com tempo hábil mais restrito, as lacunas na base de evidências são identificadas e os resultados da pesquisa são sintetizados e expostos, permitindo ao público leitor avaliar os dados em um formato acessível e resumido (ARKSEY; O'MALLEY, 2005).

1.6 Justificativa

A contaminação pirogênica em produtos injetáveis pode ser considerada um grave problema de saúde pública causando desde alterações vasculares até a morte do paciente, sendo um teste de segurança toxicológico de extrema importância no contexto sanitário. Atualmente, o RPT ainda é amplamente utilizado para a avaliação destes contaminantes, principalmente em produtos biológicos injetáveis, onde mais de 90% destes são exclusivamente analisados pelo teste em animal (CALDEIRA, 2015). Apesar do LAL e do MAT (i) serem métodos farmacopeicos, (ii) reconhecidos pelas RN do CONCEA, e, (iii) terem sido estudados e implantados para produtos biológicos (PESGRAVE, 2003; CALDEIRA, 2015; FINGOLA, 2018), ainda não estão sendo utilizados como métodos substitutivos. A cada dia estes métodos alternativos conquistam reconhecimento normativo e científico que possibilitam sua aplicabilidade, contudo, há uma lacuna na literatura de como definir a estratégia de uso dos métodos alternativos para que se tenha segurança na substituição do modelo animal. Esta revisão de escopo portanto, poderá servir de base para a implantação desta estratégia de substituição do teste de pirogênio para produtos biológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a substituição do teste de pirogênio *in vivo* por métodos alternativos validados por meio de uma análise crítica dos estudos na área de produtos biológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e selecionar os estudos relevantes e as evidências que viabilizem a amplitude e abrangência dos propósitos da revisão;
- Analisar o estado atual de conhecimento sobre o uso de métodos alternativos em substituição ao teste de pirogênio em coelhos no Brasil;
- Identificar os principais tipos de produtos biológicos avaliados por métodos alternativos para a pesquisa de pirogênios;
- Fazer uma análise comparativa e crítica dos resultados, ressaltando aspectos, vantagens, desvantagens e limitações de cada um deles.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão de escopo, seguindo as etapas: i) definição da hipótese; ii) estratégia de busca conforme os critérios predefinidos; iii) identificação e seleção de estudos relevantes que viabilizassem a amplitude e abrangência dos propósitos da revisão; iv) mapeamento e itens dos dados; v) síntese dos resultados; vi) análise crítica dos resultados.

O relato da pesquisa foi norteado pelo Manual do Instituto Joanna Briggs (JBI) para Síntese de Evidências (PETERS *et al.*, 2020), bem como pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Extension for Scoping Reviews* (PRISMA-ScR) *Checklist* (TRICCO *et al.*, 2018), que consiste em um roteiro para guiar a redação da dissertação de revisão de escopo (ANEXO A).

3.1 Definição da questão norteadora: hipótese

Para elaboração dessa hipótese, foi utilizada a estratégia PCC, onde o P = problema, o C = conceito e o C = contexto. A formulação da pergunta norteadora da revisão está presente no Quadro 3.

Quadro 3: Elaboração da pergunta norteadora a partir do acrônimo PCC.

Acrônimo	Conceito	Descrição no estudo
P	Problema	Estudos que utilizaram métodos alternativos para avaliar contaminação pirogênica
C	Conceito	Substituição do teste <i>in vivo</i>
C	Contexto	Produtos biológicos no Brasil

PCC: **P**roblema, **C**onceito e **C**ontexto.

Fonte: (ELABORADO PELA AUTORA, 2022).

A hipótese deste estudo, portanto, foi definida como: **“O que se tem de conhecimento científico sobre o uso de métodos alternativos para pirogênios que possam substituir o teste *in vivo* na avaliação de produtos biológicos no Brasil?”**.

3.2 Identificação e seleção dos estudos relevantes

Os critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão) foram estabelecidos a partir da questão norteadora e orientados a partir do acrônimo PCC. Os critérios de inclusão considerados foram: (i) artigos relacionados com a contaminação pirogênica em produtos biológicos; (ii) métodos alternativos relacionados a substituição, redução e refinamento ao uso de animais na pesquisa; (iii) artigos que utilizam métodos validados; (iv) artigos em português, inglês e espanhol para melhor compreensão; (v) textos disponíveis na íntegra para análise de extração de dados; e (vi) artigos publicados a partir da Lei n° 9.605, de 12 de fevereiro de 1998.

Os critérios de exclusão foram os seguintes: (i) artigos com assuntos não relacionados a esta pesquisa (por exemplo, dados epidemiológicos, ambientais, genéticos e da área de química); (ii) outros produtos não biológicos; (iii) artigos repetidos entre os cruzamentos dos termos de busca; (iv) artigos que não possuam textos disponíveis na íntegra; e (v) artigos de revisão.

3.3 Estratégia de busca

Foi realizada uma busca no período entre 01 de janeiro e 30 de março de 2021, no banco de dados do PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando as terminologias cadastradas como Descritores *Medical Subject Headings* (MeSH) da *U.S. National Library of Medicine* e termos de busca relacionados ao assunto de interesse.

Os levantamentos na base de dados foram conduzidos utilizando-se frases construídas a partir da combinação do conjunto de palavras-chaves (unitermos) com os operadores booleanos OR, AND e NOT, para unir e relacionar os termos da pesquisa. Utilizou-se ainda “aspas” para a integração de termos compostos e como frase exata contida no título, resumo ou palavra-chave. Os termos da pesquisa selecionados, que são os descritores do PubMed, foram baseados em assuntos (tipos de métodos, métodos farmacopeicos validados, classes de produtos imunobiológicos e, temas não relacionados à pesquisa), os quais estão descritos a seguir de acordo com as classes estabelecidas para a busca:

- (i) *pyrogens*
- (ii) *monocyte activation test*
- (iii) MAT

- (iv) *endotoxin*
- (v) *BET*
- (vi) *LPS*
- (vii) *limulus ameobocyte lysate*
- (viii) *LAL*
- (ix) *recombinant Factor C (rFC)*
- (x) *in vitro testing*
- (xi) *animal testing*
- (xii) *pyrogen test*
- (xiii) *use alternatives*
- (xiv) *3Rs*
- (xv) *reduction*
- (xvi) *refinement*
- (xvii) *replacement*
- (xviii) *beta glucan*
- (xix) *biological*
- (xx) *hyperimmune sera*
- (xxi) *serum*
- (xxii) *biological products*
- (xxiii) *vaccine*
- (xxiv) *hemoderivatives*
- (xxv) *blood productcs*
- (xxvi) *immunoglobulin*
- (xxvii) *medical devices*
- (xxviii) *air*
- (xxix) *environment*
- (xxx) *chemistry*
- (xxxi) *water*
- (xxxii) *hemodialysis*
- (xxxiii) *root canal*

Os termos de buscas de acordo com o assunto, utilizados na elaboração da estratégia de busca, estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4: Termos de buscas por assunto utilizados para a recuperação de artigos na base de dados PubMed.

Assunto	Termos de busca
Tipos de métodos	(i) <i>in vitro testing</i> OR <i>animal testing</i> OR <i>use alternatives</i> OR 3Rs OR <i>reduction</i> OR <i>refinement</i> OR <i>replacement</i> AND <i>pyrogens</i>
Métodos farmacopeicos validados	(i) <i>monocyte activation test</i> OR MAT OR BET OR <i>limulus ameocyte lysate</i> OR LAL OR <i>recombinant Factor C (rFC)</i> OR <i>pyrogen test</i> AND <i>pyrogens</i>
Classes de produtos imunobiológicos	(i) <i>endotoxin</i> OR LPS OR <i>beta glucan</i> OR <i>biological</i> AND <i>pyrogens</i> (ii) <i>hyperimmune sera</i> OR <i>serum</i> OR <i>biological products</i> OR <i>vaccine</i> OR <i>hemoderivates</i> OR <i>blood products</i> OR <i>immunoglobulin</i> AND <i>pyrogens</i>
Temas não relacionados à pesquisa	(i) <i>medical devices</i> AND <i>air</i> AND <i>environment</i> AND <i>chemistry</i> AND <i>water</i> AND <i>hemodialysis</i> AND <i>root canal</i>

3Rs: princípios de substituição, redução e refinamento; MAT: *Monocyte Activation Test* (Teste de Ativação de Monócitos); BET: *Bacterial Endotoxins Test* (Teste de Endotoxinas Bacterianas); LAL: *Limulus Ameocyte Lysate* (Lisado de Amebócitos de *Limulus*); rFC: Fator C Recombinante; LPS: Lipopolissacarídeo.

Fonte: (ELABORADO PELA AUTORA, 2022).

A partir da classificação dos termos de busca por assunto, a estratégia de busca foi definida como: "***in vitro testing***" AND "***monocyte activation test***" OR "***limulus ameocyte lysate***" OR "***pyrogen***" NOT "***medical devices***" NOT "***air***" NOT "***environment***" NOT "***chemistry***" NOT "***water***" NOT "***hemodialysis***" NOT "***root canal***".

Os arquivos originados dos resultados da pesquisa na base de dados mencionada foram exportados para o *software* gerenciador de bibliografia Zotero, sendo excluídas as duplicatas e organizados os resumos para elegibilidade.

Para complementar as buscas foram consultadas as referências bibliográficas dos estudos incluídos (referência cruzada), e que podiam conter citações de artigos

que atendessem aos critérios de inclusão propostos por este trabalho e que eventualmente não tivessem sido localizados na base de dados.

3.4 Identificação e seleção das fontes de evidências

A pesquisa foi realizada por dois revisores e os artigos em duplicata foram desconsiderados. Os títulos e os resumos das publicações potencialmente relevantes encontradas na base de dados foram lidos e selecionados conforme os critérios de inclusão. O próximo passo foi confirmar a elegibilidade dos artigos pela dupla de revisores por meio de sua leitura completa. As divergências sobre a seleção dos estudos e extração de dados foram resolvidas por consenso e discussão entre os revisores.

3.5 Mapeamento e itens dos dados

Um “Formulário de Mapeamento de Dados” foi elaborado no Microsoft Office Excel a fim de se extrair as informações relevantes das fontes de evidência incluídas e organizar a transcrição de tais dados (APÊNDICE A). O mapeamento dos dados pelo preenchimento do formulário ocorreu de forma iterativa e independente pelos dois revisores, sendo discutidas as discordâncias encontradas para um consenso entre as partes. O registro de informações importantes para mapear os estudos como autor, ano da publicação, país e objetivo/propósito seguiu o recomendado pelo Manual para Síntese de Evidência do JBI (PETERS *et al.*, 2020).

O restante do formulário foi adaptado com as questões relativas à necessidade do estudo. Definiu-se assim, além das informações padronizadas pelo referido documento orientativo, algumas variáveis para as quais os dados foram procurados nos estudos elegíveis. As categorias de dados do formulário foram preenchidas constando-se:

- a) Número de identificação do artigo
- b) Autor
- c) Título
- d) Ano de publicação

- e) Tipo de publicação (artigo original, tese, dissertação, capítulo de livro)
- f) País
- g) Periódico/Instituição
- h) *Link* do estudo no PubMed
- i) Objetivo / propósito do estudo
- j) Produto(s) biológico(s) utilizado(s) na pesquisa
- k) Método(s) utilizado(s) para detecção de pirogênios
- l) Resultados
- m) Aplicabilidade do(s) método(s)
- n) Principais conclusões que se relacionam com a questão da revisão do escopo.

3.6 Síntese dos resultados

Os resultados encontrados foram avaliados qualitativamente e interpretados pelos revisores. As evidências foram sistematizadas e apresentadas em formato de quadro e narrativa complementar.

Os artigos selecionados foram avaliados por assunto: (i) identificação dos métodos alternativos validados e seus formatos utilizados para detecção de pirogênios; (ii) produtos biológicos avaliados pelos métodos alternativos; e (iii) aplicabilidade do método alternativo nos produtos biológicos.

3.7 Análise crítica dos resultados

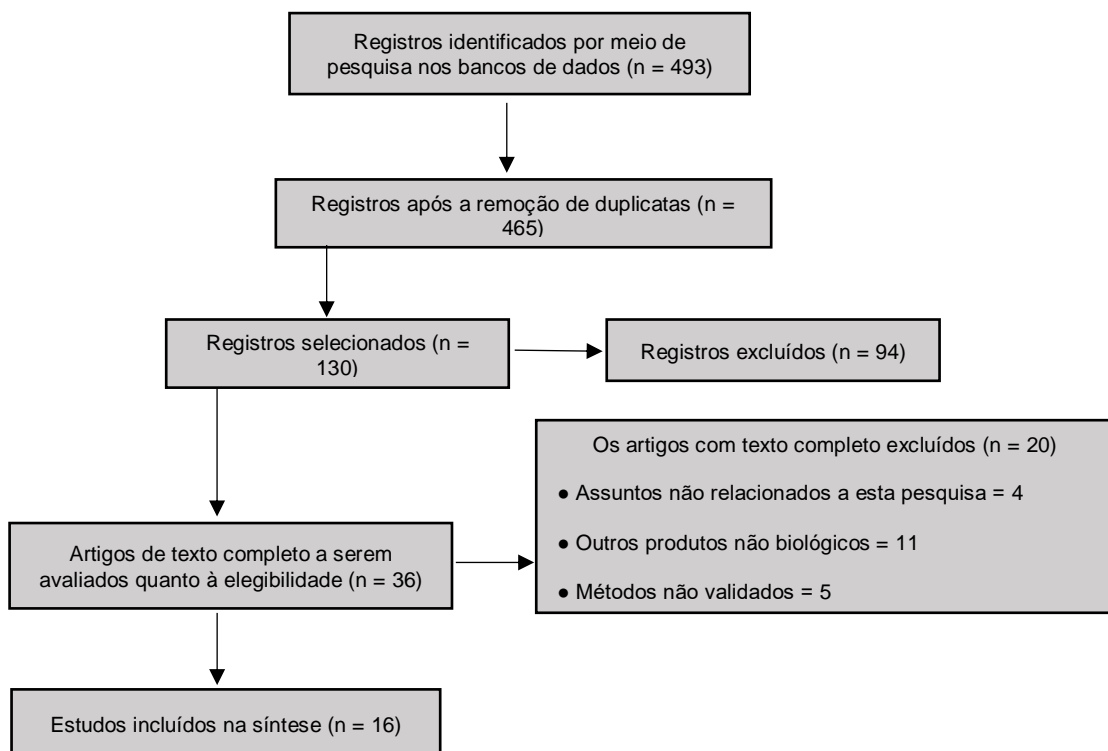
Os artigos selecionados foram analisados com base na classificação dos seus resultados: (i) vantagens, desvantagens e limitações do método utilizado e, (ii) se atendem aos princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento). Os resultados encontrados foram avaliados qualitativamente e interpretados pelos revisores. As evidências foram apresentadas em formato de tabela e narrativa complementar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e seleção dos estudos relevantes

Um total de 493 artigos foi identificado na pesquisa na base de dados PubMed. Os artigos duplicados foram removidos e restaram 465 estudos, dentro os quais, 335 foram excluídos após a leitura do título. Na sequência, os resumos dos 130 artigos foram avaliados sendo excluídos do estudo 94 artigos. Trinta e seis artigos foram lidos na íntegra e, após avaliação quanto à elegibilidade dos estudos, 20 estudos foram excluídos e 16 foram selecionados como sendo os elegíveis a serem avaliados criticamente. As justificativas para exclusão dos artigos com texto completo, assim como todo o processo de triagem e seleção dos artigos estão dispostos em fluxograma a seguir (Figura 10).

Figura 11: Fluxograma Prisma-ScR referente a seleção das fontes de evidências.



Prisma-ScR: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Extension for Scoping Reviews Checklist* (Itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e extensão de meta-análises para revisão de escopo).

Fonte: (Adaptado de TRICCO *et al.*, 2018).

4.2 Descrição dos estudos selecionados

Dos 16 artigos selecionados, o estudo mais antigo foi o artigo 13 publicado no ano 2000 e o mais recente foi o artigo 2 publicado no ano 2020. O ano de maior publicação foi 2019 com seis artigos publicados (3, 5, 6, 7, 8 e 16). Os EUA e o Brasil foram os países com maior número de publicações, ambos com cinco estudos, representados pelos artigos 1, 6, 10, 12 e 14 para o primeiro e, 4, 10, 11, 15 e 16 para o segundo país.

Para a Itália, a Alemanha e o Reino Unido foram obtidas duas publicações para cada país, artigos 2 e 8, 2 e 10, 5 e 7, respectivamente. Os países com menor representatividade, todos com um artigo, foram a Arábia Saudita e o Egito com o artigo 3, a Costa Rica com o artigo 9 e a Dinamarca com o artigo 13 (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição dos artigos selecionados para síntese segundo número de identificação, autores, título, ano de publicação, país e produto biológico pesquisado: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continua).

Número de identificação do artigo	Autor	Título	Ano de publicação	País	Produto(s) biológico(s) utilizado(s) na pesquisa
1	Bolden; Smith	<i>Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products.</i>	2017	EUA	Insulina e anticorpo monoclonal
2	Etna et al.	<i>Optimization of the monocyte activation test for evaluating pyrogenicity of tick-borne encephalitis virus vaccine</i>	2020	Itália Alemanha	Vacina viral
3	Sheraba et al.	<i>A validation study of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for Polyvalent Horse Snake Antivenom</i>	2019	Arábia Saudita Egito	Soro hiperimune
4	Mattos et al.	<i>Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) in the quality control of the 17DD yellow fever vaccine</i>	2018	Brasil	Vacina viral
5	Studholme et al.	<i>Evaluation of the monocyte activation test for the safety testing of meningococcal B vaccine Bexsero: A collaborative study</i>	2019	Reino Unido	Vacina bacteriana Bexsero
6	Zervos et al.	<i>Immunoglobulin G from single plasma donor in immune globulin intravenous causes false positive pyrogen test</i>	2019	EUA	Imunoglobulina humana

Tabela 2: Descrição dos artigos selecionados para síntese segundo número de identificação, autores, título, ano de publicação, país e produto biológico pesquisado: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

7	Vipond <i>et al.</i>	<i>Development and validation of a monocyte activation test for the control/safety testing of an OMV-based meningococcal B vaccine</i>	2019	Reino Unido	Vacina bacteriana Bexsero
8	Valentini <i>et al.</i>	<i>Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: An in vitro pyrogen test to overcome in vivo limitations</i>	2019	Itália	Vacina bacteriana Bexsero
9	Solano; Gómez; León	<i>Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL)</i>	2015	Costa Rica	Soro hiperimune
10	Silva <i>et al.</i>	<i>Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT)</i>	2016	Brasil EUA Alemanha	Soros hiperimunes
11	Andrade <i>et al.</i>	<i>Comparative evaluation of the human whole blood and human peripheral blood monocyte tests for pyrogens</i>	2003	Brasil	Albumina, eritropoetina e insulina
12	Geier; Geier	<i>Clinical implications of endotoxin concentrations in vaccines</i>	2002	EUA	Vacina tríplice e dupla bacteriana
13	Moesby; Hansen; Christensen	<i>Endotoxin testing of proteins for parenteral administration using the Mono Mac 6 assay</i>	2000	Dinamarca	Albumina e somatropina
14	Trivedi <i>et al.</i>	<i>Endotoxin content of standardized allergen vaccines</i>	2003	EUA	Vacinas alergênicas

Tabela 2: Descrição dos artigos selecionados para síntese segundo número de identificação, autores, título, ano de publicação, país e produto biológico pesquisado: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (conclusão).

15	Fingola <i>et al.</i>	<i>Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus ameobocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-bothropic serum</i>	2013	Brasil	Soro hiperimune
16	Fingola <i>et al.</i>	<i>Proposed reduction of the in vivo pyrogen test by the in vitro LAL assay for the quality control of anticrotallic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera</i>	2019	Brasil	Soros hiperimunes

EUA: Estados Unidos da América; MAT: *Monocyte Activation Test* (Teste de Ativação de Monócitos); OMV: *Outer membrane vesicle* (Vesícula de membrana externa); USP: *United States Pharmacopeia* (Farmacopeia dos Estados Unidos da América); LAL: *Limulus Ameobocyte Lysate* (Lisado de Amebócitos de *Limulus*); RPT: *Rabbit Pyrogen Test* (Teste de Pirogênio em Coelhos).

Fonte: (ELABORADO PELA AUTORA, 2022).

4.3 Síntese dos resultados

Os resultados de cada artigo elegível estão condensados na Tabela 3 e são discutidos, por assunto, a seguir.

4.3.1 Métodos alternativos utilizados para detecção de pirogênios

Nos estudos selecionados foram identificados três métodos alternativos farmacopeicos atualmente validados para avaliação de pirogênios conforme o compêndio nacional e os internacionais: o LAL presente na USP (USP, 2017), na FE (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2020a) e na FB (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019); o MAT e, o rFC, ambos presentes na FE (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2017, 2020b).

4.3.1.1 *Teste de endotoxina bacteriana (LAL)*

O LAL foi o teste alternativo mais estudado, já que 11 artigos do total selecionado abordaram o teste, seja em avaliação realizada de forma exclusiva com três artigos (artigos 3, 12 e 14) ou em estudos comparativos com outros métodos de detecção de pirogênios com oito artigos (artigos 1, 4, 6, 8, 9, 11, 15 e 16). Este resultado está relacionado ao fato de o teste do LAL possuir o *status* de ser o teste mais adotado e proposto tanto em nível de indústrias farmacêuticas quanto a entidades internacionais na área do controle da qualidade de medicamentos e alimentos. Este teste vem sendo utilizado por mais de 45 anos em consequência de sua aceitação em todos os países, por ser bem estudado e explorado e, por cumprir seu propósito na detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas com nenhum resultado falso-negativo documentado (GUIMARÃES, 2017; DUBCZAK; REID; TSUCHIYA, 2021).

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênios: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continua).

Número de identificação do artigo	Objetivo/propósito do estudo	Método(s) utilizado(s) para detecção de pirogênios	Resultados	Aplicabilidade do(s) método(s)	Principais conclusões que se relacionam com a questão da revisão de escopo
1	Avaliar a viabilidade do uso do rFC como uma alternativa adequada para o LAL de origem animal em produtos farmacêuticos.	- LAL cromogênico cinético - rFC	A comparabilidade do LAL foi demonstrada com e sem a presença de endotoxina na matriz das amostras testadas indicando que o uso de rFC é robusto como um substituto de LAL para BET e pode ser validado para a detecção de endotoxinas bacterianas em uma variedade de produtos farmacêuticos. Além disso, a rFC demonstrou ser insensível ao beta glucano, minimizando assim os resultados falso-positivos e melhorando a especificidade do ensaio.	rFC aplicável em insulina e anticorpo monoclonal	O método de fluorescência de ponto final usando reagente rFC é robusto na substituição do LAL para detecção de pirogênios endotoxinas em diversos produtos farmacêuticos, entre os quais, alguns produtos biológicos.
2	Investigar a possibilidade de substituir o RPT pelo MAT no controle da qualidade de uma vacina contra o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV).	- MAT (PBMC criopreservadas; quantificação de IL-6; Método A e Método B)	Ao aplicar o método A um desvio significativo da linearidade foi alcançado na curva dose-resposta e, portanto, o teste resultou inválido. Tal resultado não foi devido à resposta da vacina em termos de conteúdo de pirogênio, mas ao não cumprimento dos critérios para a curva padrão de endotoxina. O método B foi aplicado com sucesso na quantificação de IL-6 em PBMC criopreservadas quando modificado, com substituição de limite de detecção (LOD) por sensibilidade do ensaio (AS) tanto para a definição da dose de pico de RSE quanto para o limite do conteúdo de pirogênio. O formato CryoPBMC/IL-6 foi reativo na liberação de citocinas frente aos estímulos pirogênicos de endotoxina e não endotoxina.	MAT método B adaptado aplicável em vacina TBEV. Método A não	Foi necessária a adaptação dos critérios de validade dos dois métodos para atender melhor aos requisitos da FE. O método B foi modificado a fim de se obter resultados confiáveis de pirogenicidade em EU/ml estabelecendo uma máxima diluição válida (MVD) estável desta vacina.

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

3	Identificar e superar os fatores de interferência do soro hiperimune polivalente contra o veneno das serpentes <i>Cerastes cerastes</i> , <i>Naja hajee</i> e <i>Naja nigricollis</i> ao testar amostras para controle de endotoxinas pelo LAL.	- LAL (método coágulo em gel)	Os resultados da Fase I revelaram que a diluição do produto não interferente foi de 1:80 sendo esta escolhida para validação do produto (Fase II). As amostras sofreram ativação por calor a 70-80°C por 10 minutos para coagular as proteínas interferentes e o reagente LAL foi reidratado com solução tampão específica de endotoxina para bloquear α -glucanas e material reativo ao LAL. Os resultados do teste de validação foram considerados válidos porque os controles negativos não gelificaram, os controles positivos formaram um gel firme e as medições foram me pH 7.	LAL (método coágulo em gel) aplicável em soro hiperimune	O método de coágulo em gel do LAL pode ser utilizado na avaliação de endotoxinas em soro hiperimune desde que realizadas às adaptações para eliminar as interferências, como encontrar a diluição da amostra não interferente e submeter a amostra por ativação por calor a 70-80°C por 10 minutos com rehidratação do reagente LAL com solução tampão específica para endotoxina. A mesma metodologia pode ser aplicada para produtos semelhantes.
4	Avaliar a capacidade de detecção de pirogênio endotoxina e não endotoxina pelo MAT e, confrontar os resultados deste com o LAL, na avaliação da vacina contra o vírus da febre amarela.	- LAL (cromogênico cinético) - MAT (WB fresco e criopreservado; quantificação de IL-6 e IL-1 β ; Método A)	A diluição 1:10 da vacina foi escolhida para uso no ensaio MAT para ambos os marcadores IL-1 β e IL-6. A correlação dos resultados apresentados pelo MAT frente ao LAL foi positiva tanto em lotes apirogênicos quanto nos enriquecidos com endotoxina. O formato CryoWB foi aplicável nas respostas de ambas as citocinas quando estimulado pela vacina enriquecida com pirogênio endotoxina (LPS) e não endotoxina (LTA) e o método A foi aplicável satisfatoriamente. O sistema CryoWB/IL-6 proposto no estudo provou ser aplicável como um formato alternativo para detectar pirogênicos no MAT.	MAT (método A) aplicável em vacina contra o vírus da febre amarela	O MAT é capaz de detectar possíveis contaminantes pirogênicos não endotoxinas que não são avaliados pelo ensaio LAL recomendado na monografia da vacina da febre amarela da FB como teste para avaliação de pirogenicidade. O MAT não sofre interferência dos produtos residuais da produção da vacina como a ovalbumina assim como, a leitura das citocinas marcadoras não é afetada pela presença de vírus vivo.

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênios: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

5	<p>Avaliar a robustez do MAT por meio de um estudo colaborativo, sob seus diversos sistemas teste, em quantificar o conteúdo pirogênico da vacina meningocócica B Bexsero, que contém vesícula da membrana externa (OMV), com a avaliação de três lotes de Bexsero associados a uma atividade relativa superior, equivalente e inferior a um lote de referência.</p>	<p>- MAT: (MM6 e THP-1; WB fresco e criopreservado; PBMC fresco e criopreservado); (quantificação de IL6, IL1β e TNFα); (Método C)</p>	<p>Todos os 15 sistemas teste do MAT dos nove laboratórios participantes do estudo em nove países, foram aptos em avaliar o conteúdo pirogênico de três lotes da vacina Bexsero, com atividade relativa superior (amostra A), moderada (amostra C) e inferior (amostra B) mensuradas em unidades pirogênicas relativas (RPU), comparando as respectivas respostas das amostras com as respostas estimuladas pelo lote da Bexsero de referência. Todos os formatos do MAT aplicados (linhagem celular, PMBC ou sangue total) e as citocinas avaliadas foram capazes de mostrar que a amostra A teve maior atividade relativa no MAT como esperado.</p>	<p>MAT (método C) aplicável em vacina meningocócica B Bexsero</p>	<p>O método C do MAT que tem por base um teste de comparação de lote de referência é robusto para medir o conteúdo pirogênico desta vacina intrinsecamente pirogênica. É recomendada a validação intralaboratorial dos métodos assim como, a escolha criteriosa do sistema de teste do MAT tendo em vista que o RPU quantificado pode ser influenciado pela fonte de monócitos e sensibilidade do doador.</p>
6	<p>Investigar a causa raiz da reprovação por falso-positivo no teste de pirogênio em coelhos de um lote de imunoglobulina G humana intravenosa.</p>	<p>- RPT; - LAL (turbidimétrico cinético); - MAT (WB fresco; quantificação de IL6; Método A)</p>	<p>Foi comprovado que a resposta febril induzida em coelhos foi pela IgG de um "Doador X" que mostrou ser um fenômeno específico, causado pela reatividade do IgG do "Doador X" com leucócitos de coelho. A imunoglobulina humana em estudo não acusou presença de pirogênios nos testes LAL e MAT. Os lotes de IGIV-C derivados do "Doador X" não causariam atividade pirogênica em humanos, pois foi demonstrado pelo resultado negativo do LAL ausência de endotoxinas assim como, a ligação mínima de IgG do "Doador X" a leucócitos humanos e a falta de liberação de citocinas pelos leucócitos humanos incubados <i>in vitro</i> com IGIV-C derivado de "Doador X" no MAT.</p>	<p>LAL (turbidimétrico cinético) e MAT (método A) aplicáveis em imunoglobulina humana</p>	<p>O uso de ensaios alternativos de pirogênio <i>in vitro</i>, como LAL e MAT, pode ser mais apropriado do que o teste de pirogênio em coelho evitando a rejeição desnecessária de produtos aceitáveis. O uso do MAT evitaria a reprovação do lote pois segue o mecanismo da febre por meio de substratos humanos não havendo assim extrapolação de resultados entre espécies diferentes.</p>

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

7	Desenvolver e validar o MAT para substituir o RPT no controle da pirogenicidade associado à vacina meningocócica B Bexsero.	- MAT (PBMC criopreservado; quantificação de IL6; Método C)	O método desenvolvido teve por base o método C do MAT onde utilizou-se um lote da vacina bem caracterizado com um limite superior de 1,8 de RPU estipulado, em vez do padrão de endotoxina como referência para a análise comparativa. O lote teste da Bexsero é aprovado se os quatro doadores iniciais do PBMC tiveram uma resposta igual ou inferior a 1,8 RPU. Caso um doador apresente um valor acima deste limite o lote é testado em mais quatro doadores e sete dos oito valores encontrados devem ser iguais ou abaixo de 1,8 RPU. O uso de CryoPBMC/IL-6 foi satisfatório com atendimento aos critérios de validação.	MAT (método C) aplicável em vacina meningocócica B Bexsero	Os métodos A e B do MAT não são aplicáveis a vacinas que contêm OMV, pois não é possível mensurar precisamente o valor de endotoxina equivalente (EE) do produto devido a comparação das respostas do produto de teste com as respostas a um padrão de endotoxina não ser possível pela falta de paralelismo das curvas dose-resposta. Como não consta na FE especificações da análise pelo método C do MAT, adaptações deste método foram realizadas a fim de se calcular a potência da amostra em relação ao lote de referência do produto. O equilíbrio entre a identificação de lotes pirogênicos do produto assim como a reprovação equivocada de lotes que não estavam contaminados, foi alcançada ao se definir um valor de corte do RPU. Particularidades do produto a ser analisado devem ser ponderadas assim como a escolha do método na validação se a indicação do mesmo em tal produto é a mais adequada.
---	---	---	---	--	---

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

8	<p>Descrever o desenvolvimento e validação do método MAT adaptado com base nas propriedades específicas da vacina meningocócica B Bexsero.</p>	<p>- RPT; - LAL; - MAT (PBMC criopreservado; quantificação de IL6, IL1β e TNFα; Método A e Método C)</p>	<p>IL-6 foi confirmado como a leitura mais adequada para MAT aplicada a Bexsero. Foi observada uma correlação positiva entre os resultados do MAT tanto frente ao RPT quanto ao LAL. Os três antígenos de proteína recombinante na ausência do OMV não induziram a produção de IL-6, enquanto PBMCs exibiram uma resposta dependente da dose a OMV com níveis de IL-6 diretamente proporcionais ao conteúdo de OMV na amostra testada. A avaliação gráfica dos resultados mostrou que as curvas de endotoxina e de Bexsero não exibiram o mesmo comportamento, com uma evidente falta de paralelismo, tornando inadequado o uso do Método A do MAT aplicado a vacina meningocócica B Bexsero. Ao se aplicar o método C houve uma redução significativa na variabilidade dos resultados entre os doadores usando um lote de Bexsero como referência em relação ao padrão de endotoxina. Na avaliação de outras duas vacinas com componentes derivados de <i>N. meningitidis</i> sorogrupo B, Trumenba (<i>Pfizer's vaccine</i>) e Comvax (<i>Merck's vaccine</i>), foi observado uma resposta maior ainda de IL-6 na Trumenba enquanto na Comvax a resposta de liberação de IL-6 foi semelhante ao Bexsero.</p>	<p>MAT método C aplicável em vacina meningocócica B Bexsero Método A não</p>	<p>O Método C foi identificado como o único método aplicável a Bexsero devido à falta de paralelismo com a curva padrão de endotoxina. Este método é recomendado quando o conteúdo pirogênico de um produto for inerentemente alto ou para lidar com uma grande variabilidade de doadores. O conteúdo pirogênico da vacina Bexsero está associada à presença de OMV. O MAT é aplicável em outras vacinas intrinsecamente pirogênicas na quantificação destes contaminantes.</p>
---	--	---	--	--	---

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

9	Comparar a capacidade dos testes RPT e LAL na avaliação da contaminação por endotoxina em soro antiofídico.	- RPT; - LAL (método coágulo em gel)	O valor de 3,5 EU/mL foi estabelecido como o limite aceitável de endotoxina para o soro antiofídico em estudo. Contudo, os autores destacam que os valores limites de endotoxina podem variar de acordo com outros tipos de soros antiofídicos tal como as diferentes formulações de potência. Endotoxinas ambientais de diferentes origens podem induzir pirogenicidade variável no RPT, mesmo produzindo respostas iguais no LAL. A amostra do soro é aprovada tanto no RPT como no LAL se o valor de endotoxina encontrado for inferior a 1,7 EU/mL. Se o conteúdo de endotoxina na amostra for maior do que o limite de endotoxina, o soro falha em ambos os testes. Os critérios de aceitação do RPT e do LAL devem ser harmonizados para eliminar as diferenças entre os métodos.	LAL (método coágulo em gel) aplicável em parte em soro hiperimune: durante as fases de produção, mas na avaliação final deve ser realizado também o RPT	Tanto RPT quanto LAL podem ser utilizados para avaliar endotoxinas em soros hiperimunes purificados a partir da precipitação com ácido caprílico. Mas, a resposta pirogênica produzida no RPT pode ser diferente conforme os tipos de endotoxinas ambientais, mesmo sendo avaliadas em concentrações (EU/mL) iguais. Assim, é possível encontrar lote de soro antiofídico que foi aprovado nas especificações do ensaio LAL porém, que no RPT foi reprovado. Os autores indicaram utilizar o LAL na avaliação de endotoxinas durante todo o processo de fabricação do soro hiperimune, mas que para a liberação do produto final as especificações de ambos os ensaios devem ser atendidas.
---	---	---	---	---	---

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

10	Comparar paralelamente os resultados do RPT e do MAT em lotes de soros hiperimunes analisados durante a rotina de um laboratório de controle de qualidade.	<p>- RPT;</p> <p>- MAT (WB criopreservado; quantificação de IL-6 e IL-1β; Método A e método B)</p>	<p>Não houve resultados falso-negativos no MAT e na comparação com o método <i>in vivo</i>, os resultados aprovados no RPT, mas condenados pelo MAT, reforçam a capacidade deste método alternativo em detectar concentrações limites de endotoxina que não é apontado pelos coelhos em vista da variação biológica. Com base nos resultados, o uso do MAT na detecção de contaminantes pirogênicos em produtos biológicos como o soro hiperimune, é apropriado, pela elevada sensibilidade e especificidade apresentadas. Os resultados positivos ou negativos no RPT também seguiram o mesmo padrão no MAT. Na comparação entre os Métodos A e B, ambos apresentaram 100% de sensibilidade, mas, houve diferença da resposta de cada um frente aos resultados falso-negativos, ou seja, que foram apirogênicos no RPT mas pirogênicos no MAT. Foi observado que para alguns lotes do soro avaliado, a reprovação ocorreu somente no Método B e não no A. Os autores justificam tal diferença entre os métodos devido ao ajuste da curva padrão de endotoxina no Método A, determinando a concentração de endotoxina correspondente à densidade óptica, enquanto no Método B o resultado é do tipo aprovado/reprovado. Ambas as citocinas apresentaram respostas satisfatórias ao estímulo imune em sangue total criopreservado.</p>	MAT (métodos A) e B aplicáveis em soro hiperimune	<p>A variação biológica inerente dos coelhos pode interferir na detecção de pirogênicos quando estes não estiverem em quantidade suficiente para desencadear a resposta febril nos animais. Contudo isto não ocorre no MAT, devido este método ser mais sensível que o RPT além de, ser capaz de detectar pirogenicidade antecipadamente comparado ao RPT.</p>
----	--	---	---	---	--

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

11	Avaliar os novos ensaios de pirogênio <i>in vitro</i> com base na cultura de monócitos de sangue periférico humano e células do sangue total e, comparar estes com o teste LAL e o teste de pirogênio em coelho <i>in vivo</i> para a triagem de produtos farmacêuticos parenterais, com vista à sua avaliação como alternativas possíveis aos testes atuais para pirogênicos/endotoxinas.	- RPT; - LAL (método coágulo em gel); - MAT (WB e PBMC frescos; quantificação de IL-6; método A)	Os produtos testados em sangue total e em PBMC frescos apresentaram resultados consistentes tanto entre si quanto entre o LAL e o RPT na resposta frente a endotoxina. Na avaliação mais detalhada do sistema WB/IL-6 foi demonstrado sua sensibilidade em detectar outros pirogênicos como endotoxina de <i>E. coli</i> , como a bactéria Gram-positiva <i>S. aureus</i> e o fungo <i>C. albicans</i> .	MAT (método A) aplicável em insulina, albumina e eritropoetina	No geral, o teste PBMNC/IL-6 é menos sujeito à interferência do produto do que o WB/IL-6, permitindo que drogas menos diluídas sejam testadas. Isso é muito importante na análise de pirogênicos não endotoxinas, pois se diluem mais rapidamente do que a endotoxina.
12	Determinar as concentrações de endotoxinas nas vacinas DTP (difteria, tétano e coqueluche) de célula inteira, DTP acelular (DTaP) e DT (difteria e tétano) e determinar a experiência clínica com cada vacina.	- LAL (método coágulo em gel)	Os resultados do ensaio LAL mostraram que as vacinas DTP de células inteiras continham consideravelmente mais endotoxinas do que as vacinas DTaP ou DT e, o estudo demonstrou que esta observação estava relacionada à presença quase que exclusivamente do componente pertussis desta vacina. Dentre as três vacinas, a DTP de células inteiras foi a que obteve maior índice de eventos adversos.	LAL (método coágulo em gel) aplicável em vacinas DTP de células inteiras e acelular e DT	O LAL de coagulação em gel embora seja um teste qualitativo, neste estudo foi utilizado quantitativamente por meio da análise de sensibilidade do ensaio determinando um valor, em EU/mL, de endotoxina para um resultado positivo.

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (continuação).

13	Avaliar o uso do ensaio com Mono Mac 6 para detecção quantitativa de endotoxina em proteínas.	- MAT (linhagem celular MM6; quantificação de IL6; Método A)	A albumina apresentou interferência na liberação de IL-6 induzida por endotoxina nas células MM6, aumentando a secreção de IL-6 de maneira dose dependente de sua concentração. O estudo observou que a albumina em si não tem efeito indutor de IL-6, mas de aumentar a resposta à endotoxina. Provavelmente a interferência se deve pela presença de contaminantes no plasma onde a albumina foi extraída, como a presença de proteína de ligação de lipopolissacarídeo, que facilita a transferência de endotoxina para seu receptor alvo (CD14) encontrado na superfície das células MM6. A somatropina não apresentou efeitos interferentes no sistema de liberação de IL-6 em MM6 sendo possível mensurar a endotoxina a partir da curva padrão de endotoxina preparada e água apirogênica.	MAT (método A) aplicável em albumina e somatropina	O problema de interferência da albumina foi contornado por meio de uma curva padrão em uma diluição de albumina humana apirogênica em uma concentração igual a do produto a ser testado com endotoxina. O estudo reforça a necessidade de validar o ensaio para cada tipo de produto farmacêutico, pois fatores estimulantes ou inibitórios de IL-6 podem ser encontrados. O ensaio MM6 demonstrou elevada sensibilidade sendo capaz de detectar endotoxina em concentrações muito inferiores das exigidas na FE nos testes recomendados para estes produtos biológicos.
14	Quantificar endotoxina em vacinas alergênicas padronizadas.	- LAL (método coágulo em gel)	Foi observado ser pequena a interferência de β -glucanas e proteases endógenas nas vacinas alergênicas avaliadas no estudo pelo ensaio LAL de coágulo em gel. A concentração de endotoxinas de diferentes vacinas de alérgenos é altamente variável sendo inclusive, diferente em vacinas de mesmo tipo, mas produzidas por fabricantes diferentes. Nas vacinas para gato e poeira de ácaro foram encontradas as maiores concentrações de endotoxina, porém, com comportamento variável, ora com altos níveis ora com pouca ou nenhuma endotoxina. O estudo aponta que a concentração de endotoxina encontrada em algumas vacinas principalmente nos alérgenos de poeira de ácaro e gato poderia causar tanto efeitos locais quanto sistêmicos tendo por base a dose humana máxima de endotoxina.	LAL (método coágulo em gel) aplicável em vacina antialérgica	Não há na literatura dados que indiquem que as endotoxinas são responsáveis por eventos adversos ou que esta influencie nos efeitos benéficos das vacinas para alergias sendo recomendado mais estudos na área. Foi possível calcular o conteúdo de endotoxinas com um intervalo para o último resultado positivo e o primeiro resultado negativo para de cada vacina por meio da sensibilidade do lisado em EU/mL.

Tabela 3: Síntese dos resultados dos artigos elegíveis como testes alternativos utilizados para detecção de pirogênicos: período 01 de janeiro a 30 de março de 2021 (conclusão).

15	Validar intralaboratorialmente o uso do ensaio LAL cromogênico cinético para detectar endotoxina bacteriana em soro antibotrópico, como um substituto para o teste clássico de pirogênio em coelho, determinando o limite de endotoxina permitida (EL) e a máxima diluição válida (MVD) para este soro.	- RPT; - LAL cromogênico cinético	O limite de endotoxina (EL) estabelecido para o soro antibotrópico foi de 2,9 EU/mL e a máxima diluição válida (MDV) foi determinada como 1:580. Os resultados no RPT e LAL foram confluentes onde todas as amostras aprovadas no RPT também seriam aprovadas no LAL. Nas configurações especificadas, o ensaio LAL cromogênico cinético na análise de endotoxinas em soro antibotrópico foi válido, por ter atendido a todos os parâmetros de validação exigidos pela Anvisa, FDA e USP 35.	LAL (cromogênico cinético) aplicável em soro antibotrópico	Na prática, o cálculo de limite de endotoxina demonstrou ser viável na avaliação da concentração deste contaminante em soro antibotrópico. Os autores recomendam trabalhar com a diluição do soro antibotrópico de 1:10, contudo qualquer diluição abaixo do MDV pode ser utilizada.
16	Estudar o ensaio LAL aplicado aos soros anticrotático (SAC), antiescorpiônico (SAE), antirrábico (SAR) e antitetânico (SAT), visando a redução do uso do RPT para detecção de endotoxinas e, estabelecer o limite de concentração de endotoxina e a diluição de trabalho para cada soro específico, permitindo o uso do teste LAL.	- RPT; - LAL cromogênico cinético	Em todos os tipos de soros avaliados, foi observada uma correlação significativa entre os níveis de endotoxina determinados pelo ensaio LAL e a soma das variações individuais de temperatura dos coelhos. A diluição de trabalho definida para os soros foi 1:10, exceto para o soro antiescorpiônico, onde uma diluição de 1:100 foi usada. Foram definidos os EL e MDV para cada soro: SAC (EL = 1.75 EU/mL; MVD = 350); SAE (EL = 7.0 EU/mL; MVD = 1400); SAR (EL = 23,3 EU/mL; MVD = 4660); SAT (EL = 3.5 EU/mL; MVD = 700). Os parâmetros de desempenho descritos no protocolo da Anvisa, FDA e USP foram atendidos por todos os soros pelo ensaio LAL.	LAL (cromogênico cinético) aplicável nos soros anticrotático, antiescorpiônico, antirrábico e antitetânico.	O ensaio LAL cromogênico cinético é aplicável na quantificação de endotoxinas em soros hiperimunes quando estabelecidos a MVD e o EL.

rFC: Fator C Recombinante; LAL: *Limulus Amebocyte Lysate* (Lisado de Amébócitos de *Limulus*); BET: *Bacterial Endotoxins Test* (Teste de Endotoxinas Bacterianas); RPT: *Rabbit Pyrogen Test* (Teste de Pirogênio em Coelhos); MAT: *Monocyte Activation Test* (Teste de Ativação de Monócitos); TBEV: *Tick-borne encephalitis virus* (Vírus da encefalite transmitida por carrapatos); PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell* (Células Mononucleares do Sangue Periférico); LOD: *Limit of the detection* (Limite de detecção); AS: *Sensitivity of the assay* (Sensibilidade do ensaio); RSE: *Reference Standard*

Endotoxin (Endotoxina Padrão de Referência); Cryo: cryopreserved (criopreservado); FE: Farmacopeia Europeia; EU/mL: Unidades de endotoxina por mililitro; MVD: *Maximum valid dilution* (Máxima diluição válida); WB: *Whole Blood* (Sangue Total); LPS: Lipopolissacarídeo; LTA: *Lipoteichoic acid* (Ácido lipoteicóico); FB: Farmacopeia Brasileira; OMV: *Outer membrane vesicle* (Vesícula de membrana externa); MM6: Mono Mac 6; IL: Interleucina; TNF: Fator de Necrose Tumoral; RPU: *Relative Pyrogen Units* (Unidades Pirogênicas Relativas); IGIV-G: Imunoglobulina G Humana Intravenosa; EE: Endotoxina Equivalente; *E. coli*: *Escherichia coli*; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *C. albicans*: *Candida albicans*; DTP: *Diphtheria/Tetanus/Pertussis Vaccine* (Vacina para difteria, tétano e pertussis de células inteiras); DT: *Diphtheria/Tetanus Vaccine* (Vacina para difteria e tétano); DTaP: *Diphtheria/Tetanus/Pertussis Acellular Vaccine* (Vacina acelular para difteria, tétano e pertussis); EL: *Endotoxin Limit* (Limite de Endotoxina); Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; FDA: *Food and Drug Administration* (Agência Norte Americana de Alimentos e Drogas); USP: *United States Pharmacopeia* (Farmacopeia dos Estados Unidos da América); SAB: Soro Antibotrópico; SAC: Soro Anticrotálico; SAE: Soro Antiescorpiônico; SAT: Soro Antitetânico; SAR: Soro Antirrábico. Fonte: (ELABORADO PELA AUTORA, 2022).

Dentre as possibilidades de análise pelo teste do LAL (métodos turbidimétrico, cromogênico ou coágulo em gel), o teste do LAL de coagulação em gel foi o mais observado nos estudos com um total de cinco artigos (artigos 3, 9, 11, 12 e 14) demonstrando que embora a metodologia deste formato seja mais simples comparada aos outros e sua avaliação tenha um cunho qualitativo ou semiquantitativo com determinação da concentração de endotoxina a partir do valor estabelecido da sensibilidade do ensaio, este é válido, inclusive com estudos apontando resultados compatíveis ao método cromogênico cinético (SILVEIRA *et al.*, 2004). O teste do LAL cromogênico cinético foi o segundo método mais estudado nas pesquisas selecionadas com quatro artigos (artigos 1, 4, 15 e 16) mesmo sendo este método quantitativo, juntamente com o turbidimétrico (artigo 6), por meio de estudos cinéticos fotométricos em tempo real (JACKIE *et al.*, 2019).

O ensaio do LAL mantém sua relevância ao longo dos anos com pesquisas que proporcionam sua evolução e comprovam a sua irrefutável aplicabilidade no controle da contaminação por endotoxinas nos produtos farmacêuticos. No ramo de produtos farmacêuticos é bem estabelecido o foco no controle da qualidade deste contaminante por ser a fonte pirogênica com maior relevância neste campo industrial. As endotoxinas são constituídas por complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas constituídos de lipídeos, carboidratos e proteínas, podendo também estar sob sua forma purificada na qual é denominada de LPS, caracterizando sua natureza química. A terminologia endotoxinas desta forma é mais adequada tendo em vista a possibilidade de se encontrar unidades não purificadas nas fases de produção dos produtos farmacêuticos. Cabe ao produtor, seja de produtos parenterais de grande ou pequeno volume ou de artigos vinculados à sua administração, sobrepor os pontos críticos relacionados a este contaminante como sua termoestabilidade, universalidade e capacidade de causar danos fisiológicos quando administrado pela via parenteral, para detecção e eliminação eficiente das endotoxinas (PALLA, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

4.3.1.2 *Teste de ativação de monócitos (MAT)*

O MAT foi o segundo método alternativo com maior representatividade nos estudos elegíveis (Tabela 3). O MAT foi estudado em um total de nove artigos

(artigos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 13), sendo quatro artigos (artigos 2, 5, 7 e 13) voltados para avaliação exclusiva do MAT e cinco artigos (artigos 4, 6, 8, 10 e 11) avaliando o MAT em paralelo com outros métodos para detecção de pirogênio. As pesquisas empregando PBMC criopreservadas bem como, aquelas com WB fresco, foram as mais encontradas, cada uma com quatro artigos (artigos 2, 5, 7, 8 e 4, 5, 6, 11, respectivamente). A principal citocina marcadora quantificada nos estudos foi a IL-6 com nove estudos (artigos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 13), seguida da IL-1 β com quatro artigos (artigos 4, 5, 8 e 10). Das opções de métodos de análise do MAT, o método A foi o mais estudado com sete artigos (artigos 2, 4, 6, 8, 10, 11 e 13), seguido do método C com três artigos (artigos 5, 7 e 8) e método B com dois artigos (artigos 2 e 10).

Desde seu desenvolvimento há 25 anos, a princípio denominado teste de pirogênio de sangue total, o MAT vem ganhando espaço frente ao RPT e ao LAL na avaliação de pirogênios, embora alguns países ainda apresentem resistência na sua adoção. Nota-se inclusive, que sua adesão tem sido crucial na queda do número de animais utilizados nos testes de pirogênio, pelo menos na Europa, no qual o método é reconhecido como oficial pela FE desde 2010 (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2010). Este resultado é atribuído também ao longo processo de aceitação e implementação do método com validação internacional. É notável a expectativa depositada no MAT de assumir o papel de ser um dos melhores candidatos dentre os métodos alternativos validáveis para completa substituição do RPT, pois tem por base o conhecimento da fisiopatologia da pirogenicidade como um método que avalia a reação da febre humana utilizando as células específicas da própria espécie na detecção de uma ampla gama de pirogênios (HARTUNG, 2021). O aumento das pesquisas tem por intuito aprimorar o teste para torná-lo aplicável em larga escala, já que o MAT é um ensaio multiforme no sentido que o formato do método selecionado para avaliação de pirogênios é passível de combinações entre as fontes de monócitos e citocinas marcadoras para leitura, além do sistema de avaliação que pode ser quantitativo ou semiquantitativo. Daí, a grande importância da validação específica por produto para o uso do MAT como recomendado pela FE (NAVEGA *et al.*, 2015; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2017).

4.3.1.3 Ensaio do fator C recombinante (rFC)

Nesta revisão o rFC foi o teste menos estudado, com somente um artigo (artigo 1). Bolden e Smith (2017) (artigo 1) avaliaram a viabilidade do uso do ensaio rFC na detecção de endotoxinas bacterianas em vários produtos farmacêuticos, dentre estes alguns produtos biológicos, com o propósito de sustentar a substituição do ensaio LAL pelo ensaio rFC. Para isto, análises comparativas de especificidade, sensibilidade e robustez dos resultados do ensaio rFC e do ensaio LAL cromogênico cinético foram realizadas além, do cumprimento dos critérios de validação para adoção de um método de fluorescência de ponto final usando reagente rFC na detecção de pirogênios endotoxinas.

A investigação de endotoxinas na indústria farmacêutica é uma parte imprescindível não restando dúvidas desta forma, de que testes de endotoxina precisos, confiáveis e sustentáveis são essenciais na garantia da segurança de medicamentos injetáveis e dispositivos médicos. O ensaio rFC tem se mostrado um método alternativo à utilização dos ensaios baseados no LAL pois é viável na detecção de endotoxinas em diferentes matrizes como água, produtos farmacêuticos, dispositivos médicos e alimentos, com elevada sensibilidade, sendo constatada sua aplicabilidade na detecção de diferentes estruturas de LPS na dose de picogramas assim como sua correlação positiva com a liberação de IL-6 em linhagem MM6 (ABATE *et al.*, 2017).

Mesmo com evidências de que o rFC é tão eficaz quanto o LAL ou melhor na detecção de endotoxinas, tem sido difícil por parte das indústrias incorporarem esse método tendo por uma das justificativas que, o rigoroso controle de um contaminante tão relevante como a endotoxina, exige cautela em sua avaliação, e um método regulamentado como o LAL já proporciona tal garantia de segurança ao produto. Embora o quantitativo de estudos com o rFC avaliados nesta revisão tenha sido ínfimo, a tendência de implementação em larga escala deste teste é aparentemente inevitável num futuro próximo dado que, o panorama de aceitação regulatória do teste do rFC vem ganhando espaço, já com seu próprio capítulo na FE, sua introdução na Farmacopeia Chinesa, aceitação pela FDA e, um capítulo em planejamento pela Farmacopeia Japonesa introduzindo brevemente este teste em mais esse compêndio. Como reflexo desse processo, um medicamento para enxaqueca foi aprovado pela FDA e tornou-se o primeiro a ser liberado para avaliação de endotoxinas usando o rFC ao invés do LAL (BIOMERIEUX, 2021; TINDALL; DEMIRCIUGLU; UHLIG, 2021; UHLIG; WILLIAMS; TINDALL, 2021).

No entanto, apesar da adesão iminente do teste rFC e sua promessa de respostas rápidas e específicas, é importante ressaltar que os produtos sintéticos, como o reagente rFC, apresentam seus próprios conjuntos de desafios sendo necessário um amplo estudo para sanar preocupações fundamentadas quanto aos parâmetros de precisão, de robustez, de especificidade e de reprodutibilidade pois, a confiabilidade deste novo método alternativo só poderá ser garantida com base em uma validação sólida. O ensaio rFC deve comprovar sua especificidade em detectar endotoxinas de uma gama de bactérias Gram-negativas (EUREKA, 2018).

4.3.1.4 *Configuração dos métodos alternativos utilizados*

Entre os 16 artigos selecionados, mais da metade, nove artigos (artigos 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 15 e 16) foram comparativos, os quais avaliaram o desempenho dos testes de detecção de pirogênio paralelamente. Dentre estes estudos, foram contrapostos os resultados entre os diferentes testes/métodos: LAL cromogênico cinético + rFC no artigo 1; LAL cromogênico cinético + MAT no artigo 4; RPT + LAL turbidimétrico cinético + MAT no artigo 6; RPT + LAL cromogênico cinético + MAT no artigo 8; RPT + LAL coágulo em gel no artigo 9; RPT + MAT no artigo 10; RPT + LAL coágulo em gel + MAT no artigo 11 e, RPT + LAL cromogênico cinético nos artigos 15 e 16. A quantidade expressiva desse tipo de estudo se deve ao pilar principal no estudo de validação de um método alternativo: comparação deste frente ao método padrão ouro para avaliar se o método proposto está apto a reproduzir os resultados esperados no mesmo nível de confiabilidade que os obtidos em experimentos de origem animal. É suficiente a comparação com o ensaio LAL quando o método alternativo se propõe a analisar somente endotoxinas enquanto, é necessário ao mínimo a conferência com o RPT, quando o teste alternativo envolver a pesquisa de pirogênios de origem não endotoxinas. Espera-se que os resultados do método alternativo apresentem uma correlação positiva frente ao método oficial, porém, com o adicional de não utilizar ou utilizar menos animais ou realizar procedimentos menos invasivos para o cumprimento prático dos conceitos de Substituição, Redução e Refinamento de testes em animais do Princípio dos 3Rs. A avaliação em paralelo dos métodos deve ser criteriosa uma vez que tais testes alternativos devem estar bem definidos e validados para que seja possível substituir o uso de animais

em certos ensaios analíticos (HARTUNG *et al.*, 2001; PRESGRAVE, 2002; ESKES *et al.*, 2009).

Sheraba e colaboradores (2019), Geier e Geier (2002a) e Trivedi e colaboradores (2003), artigos 3, 12 e 14, respectivamente, avaliaram exclusivamente a aplicabilidade do método do teste do LAL de coagulação em gel para a detecção de pirogênios de origem endotoxinas. No estudo de Sheraba e colaboradores (2019) foram aplicadas estratégias para superar os fatores de interferência de inibição ou intensificação do teste do LAL, como ativação por calor da amostra a 70-80°C por 10 minutos para coagular as proteínas interferentes e rehidratação do reagente LAL com solução tampão específica de endotoxina para bloquear β -D-glucanas e material reativo ao LAL, além do uso de uma diluição da amostra não interferente.

Em razão da peculiar sensibilidade do ensaio do LAL, o limite de endotoxina pode ser detectado em um determinado produto ou material de forma mais que a necessária. Com exceção da água, a maioria das substâncias testadas possui algum grau de interferentes para endotoxina com o ensaio do LAL sendo assim fundamental que, independentemente do método do teste do LAL escolhido, este deve estar apropriadamente adaptado para inativar ou remover seus fatores de interferência em amostras diversas (TWOHY; DURAN; MUNSON, 1984; COOPER, 1990). A interferência no ensaio do LAL pode ser do tipo inibitória ou por intensificação. No primeiro, o ensaio LAL é impossibilitado de reagir com a endotoxina pela interferência de um determinado material e conseqüentemente, a quantidade de endotoxina na amostra fica subestimada. Já na interferência por intensificação, a concentração de endotoxina em uma determinada amostra é superestimada, pois a sensibilidade do ensaio é aumentada pelo efeito de materiais interferentes no método. Desenvolver e aplicar as estratégias certas para sobrepor esses fatores que impedem resultados sólidos pelo LAL demanda um entendimento por parte dos pesquisadores dos diferentes mecanismos de determinada interferência como observado nos estudos realizados por Sheraba e colaboradores (2019) e mais adiante por Trivedi e colaboradores (2003) (GUTIERREZ, 2007). Não realizar o controle de inibição em um ensaio LAL é um ato imprudente, pois um produto contaminado pode estar sendo liberado em consequência de um suposto resultado negativo para a presença de endotoxinas. É importante que o ensaio possua controles confiáveis para a detecção de possível interferência de inibição a fim de se garantir a confiabilidade de que resultados negativos são realmente

devidos a ausência de endotoxinas e não pela inibição de substâncias. A inibição de intensificação representa menos risco à saúde pública já que o resultado desse fenômeno sobre o LAL implicará somente na reprovação de produtos seguros quanto ao nível de endotoxina. As fontes de interferências podem ser diversas: pela presença de compostos de polissacarídeos de alto peso molecular, sais de cátions divalentes, pH fora da faixa especificada, modificação enzimática ou proteica, agregação ou adsorção da endotoxina, ativação não específica do reagente LAL (compostos β -D-glucana). Os compostos β -D-glucana são procedentes da celulose e também de fungos e promovem resultados falso-positivos no LAL por ativação de uma via enzimática alternativa (fator G) que de igual forma culmina na reação de gelificação do ensaio (DAWSON, 2005; FUKUMORI, 2008).

Geier e Geier (2002a) e Trivedi e colaboradores (2003) nos artigos 12 e 14 se propuseram a aplicar o método do teste do LAL de coagulação em gel quantitativamente para determinar a concentração de endotoxinas tendo por base os valores estabelecidos de sensibilidade do ensaio para um resultado positivo ou intermediário. A avaliação da concentração de endotoxina é semiquantitativa por ser um teste limite, ou seja, as endotoxinas são quantificadas até o nível de sensibilidade em que um gel sólido se forma. A sensibilidade do ensaio de coagulação em gel do LAL vem rotulada pelo fabricante, estando disponíveis no mercado reagentes com sensibilidades de 0,03; 0,06 e 0,12 EU/mL (unidades de endotoxina por mililitro) (MORALES, 2004; CHARLES RIVER, 2021).

Trivedi e colaboradores (2003) utilizaram as mesmas estratégias que Sheraba e colaboradores (2019) para excluir os fatores de interferência e assim como Geier e Geier (2002a) mensuraram a quantidade de endotoxina a partir do valor de sensibilidade do ensaio.

Dois estudos compararam a aplicabilidade do método LAL de coagulação em gel para a detecção de pirogênios de origem endotoxinas frente a outros métodos farmacopeicos. No artigo 9, Solano, Gómez e León (2015) estudaram a capacidade do RPT e do método LAL de coagulação em gel em detectar concentrações diferentes de LPS padrão a fim de sustentar a substituição do RPT pelo LAL na avaliação da contaminação por endotoxinas. Para isso, diferentes concentrações do LPS padrão foram injetadas nos coelhos e adicionadas ao ensaio LAL. Os critérios de aceitação entre os testes foram harmonizados calculando o limite de endotoxina como o quociente da dose pirogênica limiar e a dose terapêutica e, a dose

administrada nos coelhos como o quociente da dose pirogênica limiar e o limite de endotoxina. O estudo realizado por Andrade e colaboradores (2003), artigo 11, envolveu uma avaliação comparativa entre métodos de detecção de pirogênios, também com a participação do ensaio do LAL pelo método de coagulação em gel. No estudo se buscou avaliar em paralelo o desempenho do MAT com duas fontes de monócitos distintas, WB e PBMC frescos, frente ao método do teste do LAL de coagulação em gel e o RPT. O ensaio do LAL de coagulação em gel seguiu as diretrizes da USP e FE e testes preparatórios foram realizados para garantir que não houvesse fatores de interferência nos produtos testados. A realização do MAT teve por base o método A (método quantitativo) com pesquisa de IL-6 como leitura para os novos testes propostos para pirogênios.

A pesquisa realizada por Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6) recorreu simultaneamente a várias estratégias para detectar um possível pirogênio apontado na amostra pelo RPT. Os métodos farmacopeicos do ensaio do LAL turbidimétrico cinético e MAT com método A em sangue total fresco para pesquisa de IL-6 foram utilizados. Dentre os tipos de ensaio LAL observados nos estudos elegíveis para esta revisão, o turbidimétrico foi o menos expressivo, talvez pela insegurança de resultados falso-positivos que não são incomuns neste método (JOINER; KRAUS; KUPIEC, 2002).

O ensaio do LAL cromogênico cinético foi avaliado frente ao RPT por Fingola e colaboradores (2013, 2019) em dois estudos semelhantes (artigos 15 e 16), diferindo somente o produto em análise. Ambas as pesquisas tiveram por objetivo tornar o método proposto válido desafiando-o nos diversos parâmetros de desempenho exigidos pela Anvisa, FDA, USP e *International Conference on Harmonization* (ICH) como seletividade, linearidade da curva padrão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão bem como, avaliar sua correlação com os resultados do RPT.

Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4) também realizaram o ensaio do LAL cromogênico cinético e confrontaram os resultados deste ensaio, o qual é o teste farmacopeico preconizado na avaliação de pirogênios no produto estudado, com os resultados encontrados no ensaio MAT pelo método A (método quantitativo) em WB fresco e criopreservado com quantificação de IL-6 e IL-1 β como citocinas marcadoras. Os níveis de endotoxina foram quantificados pelo ensaio do LAL

cromogênico cinético classificando o produto como pirogênico (P) ou não pirogênico (NP) conforme diretrizes das FB e FE.

Valentini e colaboradores (2019), Studholme e colaboradores (2019) e Vipond e colaboradores (2019), artigos 8, 5 e 7, respectivamente, estudaram a aplicabilidade do ensaio MAT para detecção de pirogênios no mesmo produto biológico, o qual possui singularidades quanto ao seu conteúdo pirogênico inerente. Valentini e colaboradores (2019) propuseram o desenvolvimento e validação de um ensaio MAT, comparando a aplicabilidade dos métodos A (teste quantitativo) e C (teste de comparação com lote referência) frente ao RPT, assim como, estudaram qual seria a citocina marcadora ideal avaliando a mensuração de IL-6, IL-1 β e TNF- α simultaneamente em uma análise multiplex, tendo por fonte monócitos PBMC criopreservados. Semelhantemente, Vipond e colaboradores (2019) também realizaram uma avaliação comparativa da aplicabilidade dos métodos A (teste quantitativo) e C (teste de comparação com lote referência) do ensaio MAT além de, terem desenvolvido e validado um método de análise interno por meio de adequações do método C, tendo em vista a ausência de uma prescrição específica de análise na FE para calcular a potência em relação ao lote de referência. As especificações complementares do ensaio MAT utilizadas no formato desenvolvido para avaliação de contaminantes pirogênicos neste produto em particular, foram a mensuração de IL-6 como citocina marcadora e PBMC criopreservados como fonte de monócitos. Os critérios de aprovação e reprovação para o ensaio MAT desenvolvido foram definidos a partir da configuração de um limite superior de Unidades Pirogênicas Relativas (RPU, sigla no inglês *Relative Pyrogen Units*) com base em um lote do produto em estudo conhecidamente pirogênico, o qual norteou os limites discriminatórios adequados para avaliação de cada doador individual dos PBMC.

Studholme e colaboradores (2019) realizaram um estudo colaborativo de cunho mais abrangente, avaliando a aplicabilidade do ensaio MAT na detecção de pirogênios neste mesmo produto, sob seus diversos formatos possíveis com relação à fonte de células e leitura pelas citocinas. Nove laboratórios cobrindo 15 sistemas de testes avaliaram três lotes do produto em estudo (um lote com atividade superior, outro equivalente e, outro com atividade inferior) em relação a um lote de referência no MAT. Assim como Vipond e colaboradores (2019) a atividade foi medida em RPU com base no método C do MAT.

Silva e colaboradores (2016), no artigo 10, estudaram o desempenho do ensaio MAT com uma comparação paralela entre os resultados gerados por este método alternativo e os obtidos do RPT, realizado em lotes do produto biológico analisados na rotina de um laboratório de controle de qualidade. As citocinas IL-6 e IL-1 β foram mensuradas nos métodos A (teste quantitativo) e B (teste semiquantitativos) determinando a concentração do contaminante como unidades equivalentes de endotoxina (EEU, sigla no inglês *endotoxin equivalents units*) na leitura da curva dose-resposta de endotoxina padrão de 0,125 a 5 EU/mL (método A) ou na comparação estimada com as respostas à solução de endotoxina padrão (método B). Como fonte de monócitos, o formato utilizado foi o WB criopreservado.

Nota-se o empenho de autoridades regulatórias em tornar válidos, métodos alternativos como o MAT pela notável dificuldade que os métodos existentes para detecção de pirogênios tem em transpor suas limitações, principalmente para os novos compostos biológicos e dispositivos médicos produzidos conforme o avanço da biotecnologia e da nanotecnologia. A FE em particular, tem por alvo a implementação do MAT nos diversos textos do compêndio onde o RPT é recomendado no prazo de aproximadamente até 2026 para eliminação completa do teste em coelhos. É consensual que apesar do RPT possuir o *status* de padrão ouro para avaliação de contaminantes pirogênicos pela sua capacidade de detectar pirogênios de diferentes origens, seu uso não é mais admissível dado a uma série de fatores: a aplicabilidade de um método alternativo atestada por validação para um produto, a questão ética do uso de animais, o fato de ser um teste caro por envolver toda a estrutura de criação de coelhos, por demandar maior tempo de operação e, por possuir o fator de variabilidade fisiológica dos animais (WILLIAMS, 2007; ICCVAM, 2008; COUNCIL OF EUROPE, 2021).

Assim como nos estudos realizados por Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5) e Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7), o ensaio MAT também foi avaliado de forma isolada por Etna e colaboradores (2020) e por Moesby, Hansen e Christensen (2000), artigos 2 e 13, respectivamente. Etna e colaboradores (2020) avaliaram a possibilidade de substituir o RPT pelo MAT no controle de qualidade do produto biológico em estudo levando em consideração a aplicabilidade deste por meio de análise dos dados gerados pelos métodos A (teste quantitativo) e B (teste semiquantitativo) e também, qual a citocina marcadora ideal para a leitura do ensaio, com mensuração da liberação de IL-6, IL-1 β e TNF- α em PBMC criopreservadas

como fonte celular. Ambos contaminantes endotoxinas (endotoxina padrão de referência USP) e não endotoxinas (lipoproteína diacilada sintética FSL-1 e composto de imidazoquinolina Resiquimod R848, ambos agonistas de receptores *Toll-Like* (TLR, sigla no inglês *toll-like receptors*)) foram utilizados como estímulos pirogênicos e suas respectivas curvas dose-resposta foram executadas para avaliação do ensaio MAT. Diferentemente, o estudo realizado por Moesby, Hansen e Christensen (2000) teve por objetivo avaliar a capacidade do ensaio MAT somente na detecção quantitativa de endotoxinas em outros produtos biológicos. O formato do ensaio MAT pesquisado teve por parâmetros avaliar a resposta da citocina IL-6 induzida por endotoxina no produto em estudo em linhagem celular MM6 com o método A (teste quantitativo) do MAT.

4.3.1.5 *Métodos alternativos não farmacopeicos em desenvolvimento para detecção de pirogênios*

O campo de pesquisa em métodos alternativos segue em progresso com o empenho de instituições públicas e privadas que fomentam pesquisas e estudos colaborativos com este fim e, a pesquisa para detecção de pirogênios é uma das áreas inclusas nesse foco. Assim, além dos testes e métodos farmacopeicos validados já mencionados, há outros métodos sendo investigados como potenciais candidatos para avaliação da contaminação pirogênica. Estes métodos ainda precisam percorrer o longo processo de validação e aceitação regulatória até serem disponibilizados mundialmente através das farmacopeias e da OECD (SILVA; RIBEIRO; RODRIGUES, 2020).

As tendências de pesquisas relacionadas à detecção de pirogênios podem ser de base biológica ou química. Os ensaios RPT, LAL e MAT compreendem os testes de detecção biológica e, os ensaios com base na biologia sintética com o aprimoramento dos ensaios biológicos, engloba os ensaios rFC, LAL modificado e o uso de sensores aptâmeros eletroquímicos que se ligam a endotoxinas com alta afinidade. Nos ensaios químicos ou ainda nos bioensaios modificados eletroquimicamente, a premissa da composição estrutural das endotoxinas, seja ela intacta ou em partes exclusivas da molécula, fundamenta a identificação deste tipo de pirogênio. O reconhecimento da presença de endotoxinas pelas análises químicas, como técnicas de detecção sensorial eletroquímica, é mais bem

executado que a quantificação da mesma e, seu uso otimiza a preparação de amostras tendo em vista necessitar de uma amostra menor que contenha apenas uma pequena quantidade de LPS bruto (JACKIE *et al.*, 2019).

O teste do lisado do amebócito de *Tachypleus* (TAL, sigla no inglês *Tachypleus Amebocyte Lysate*) é uma variante do ensaio LAL que tem sido estudada por ser aplicável também na pesquisa de endotoxinas, embora não seja mais vantajosa que o ensaio original pela necessidade de uso do caranguejo-ferradura de qualquer forma. O caranguejo-ferradura do Atlântico *Limulus polyphemus* é a fonte do ensaio LAL e a espécie principalmente utilizada no ensaio TAL, é o caranguejo-ferradura nativo do sul da Ásia, *Tachypleus tridentatus*. Este método é sugerido pela Farmacopeia Japonesa e por possuir o mesmo escopo do LAL, o lisado de amebócitos deste caranguejo pertencente à família Limulidae frente a endotoxinas, desencadeia a mesma cascata enzimática e apresenta resultados muito semelhantes ao ensaio LAL. Assim, deduz-se que o BET é um termo usual que abrange as possíveis formas de ensaios de lisado de amebócitos com os reagentes LAL/TAL (HUOVINEN; NUMMELA; KOPPINEN, 1990; DING; HO, 2001; AKBAR *et al.*, 2012; JACKIE *et al.*, 2019; SPOLADORE *et al.*, 2021). Uma outra variante alternativa ao ensaio LAL é o Reagente em Cascata Recombinante (rCR, sigla no inglês *Recombinant Cascade Reagent*). Neste método é utilizado a mesma cascata de reagentes do LAL sendo que o Fator C, Fator B e a Enzima Pró-Coagulante são de origem sintéticas e, quando ativados, resultam na clivagem proteolítica de uma molécula cromogênica. O novo método recombinante alternativo se propõe a detectar endotoxinas com elevada sensibilidade sem interferência de β -glucanas devido à ausência do Fator G (MUROI *et al.*, 2019).

A fim de se minimizar os impactos na população do caranguejo-ferradura, levantar a discussão sobre a sustentabilidade da produção dos reagentes oriundos do *Limulus*, metodologias alternativas físico-químicas, também conhecidas como ensaio não LAL, estão sendo desenvolvidas. A espectrometria de massa por cromatografia gasosa pode ser aplicada na detecção do lipídeo A e suas moléculas de ácido graxo 3-hidroxi o qual é o componente menos variável da estrutura do LPS e o principal responsável pela toxicidade do LPS. Semelhantemente, é possível identificar moléculas do ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosônico (Kdo) que são encontradas somente no LPS por meio da espectrometria de massa por cromatografia gasosa-líquida. Outra técnica focada na identificação de uma estrutura

comum do LPS, no intuito de alcançar a versatilidade de detectar LPS de quase todas as espécies e cepas bacterianas, é a análise de endotoxinas pela eletroforese de zona capilar combinada com detecção de fluorescência induzida por laser. Um ensaio eletroquímico competitivo também emerge como metodologia alternativa para detecção de endotoxinas onde uma estratégia de reconhecimento químico é aplicada com seletividade de uma proteína recombinante antimicrobiana de origem do sistema imune do caranguejo-ferradura incorporada a um eletrodo (BINDING *et al.*, 2004; PRIANO; BATTAGLINI, 2005; RYBKA; GAMIAN, 2006; FUNG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019; TAMURA; REICH; NAGAOKA, 2021).

Em razão da pesquisa no campo da imunologia e compreensão da via de sinalização ativada por pirogênio, é conhecido o importante papel dos receptores TLR4, MD2 e CD14 na reação de pirogênio. Assim, outro modelo para teste de pirogênio *in vitro* tem sido proposto, no qual uma linhagem celular é desenvolvida com métodos *knock-in* com super expressão específica para estes receptores utilizando tecnologia de edição de genes. Este modelo de célula construída é sensível ao LPS assim como a pirogênios não endotoxinas como o LTA, levando a liberação de citocinas como IL-6 e TNF- α que são quantificadas por ELISA, com elevada sensibilidade. O limite de detecção deste modelo de célula de teste de pirogênio para o LPS tem se mostrado muito inferior comparado ao LAL (HAN *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019).

A atividade endotóxica também pode ser avaliada pelo ensaio de detecção de PGE2. Este consiste em outro método *in vitro* alternativo que mensura o PGE2 induzido em sangue periférico após estímulo de endotoxinas. O uso de sangue periférico de coelhos e de bovinos tem sido relatado e em ambos foi observada uma curva dose-resposta linear entre a concentração de PGE2 e de endotoxina padrão além de, demonstrar paralelismo com o RPT. Assim, com bons indícios de sensibilidade e reprodutibilidade, este método pode se tornar uma alternativa na garantia do controle de endotoxinas frente aos métodos validados. Os pesquisadores justificam que o uso do sangue animal ao invés do humano se deve pela interferência deste com produtos biológicos, pela exposição a um possível risco biológico e, ao atendimento dos requisitos éticos. Além do mais, a sensibilidade e a precisão na detecção de endotoxinas foram equivalentes nos dois tipos de sangue. O próximo passo dessa linha de pesquisa visa demonstrar se este ensaio também é

aplicável a pirogênios não endotoxinas com uso prático (OCHIAI *et al.*, 2007; USUI; NAGAI; TAMURA, 2013; WUNDERLICH; SCHUMACHER; KIETZMANN, 2015).

4.3.2 Produtos biológicos avaliados pelos métodos alternativos

Oito diferentes produtos biológicos foram submetidos à avaliação de contaminação por pirogênio pelos métodos alternativos nos estudos elegíveis, sendo: insulina, anticorpo monoclonal, albumina, eritropoietina, somatropina, vacina, soro hiperimune e imunoglobulina humana.

A vacina foi a mais estudada dentre todos os produtos biológicos encontrados. Este imunobiológico teve a maior representação com sete artigos (artigos 2, 4, 5, 7, 8, 12 e 14), seguido do soro hiperimune com cinco artigos (artigos 3, 9, 10, 15 e 16). A albumina e insulina obtiveram ambas, dois artigos (artigos 11, 13 e 1, 11, respectivamente). O anticorpo monoclonal (artigo 1), somatropina (artigo 13), eritropoietina (artigo 11) e imunoglobulina humana (artigo 6), foram estudadas em um artigo cada.

O resultado expressivo dos artigos relacionados à vacina demonstra quão importante este produto biológico é na saúde pública mundial e que os investimentos em pesquisa buscam aprimorar a cada dia esse medicamento que salva muitas vidas e impede a propagação de doenças que poderiam até devastar o planeta. Progressivamente mais pessoas estão fazendo uso de vacinas seja de forma voluntária ou não, na tentativa do controle de doenças que de alguma forma possam ameaçar a sociedade. Em todo o mundo tem sido assumido o compromisso de tornar sólido os programas de vacinação, principalmente nos países em desenvolvimento, e assim a perspectiva de uso deste imunobiológico só tende a aumentar para atingir coberturas satisfatórias com as vacinas já tradicionais além, da introdução das novas com alto valor agregado em alguns países (PONTE, 2003; HOMMA *et al.*, 2011). Embora com uma quantidade um pouco menor, o soro hiperimune tal como a vacina, se destaca dentre os produtos biológicos estudados nos artigos selecionados para esta revisão. Juntos estes dois imunobiológicos compõem o poderoso duo vacinas e imunizações que promovem com excelência a prevenção e o controle de doenças imunopreveníveis. O controle de pirogênios é determinante na garantia da qualidade de cada lote desses medicamentos e pelo crescente incentivo dos programas de imunização, a demanda do aprimoramento

dos mecanismos destinados a garantir tal qualidade é uma realidade (HOMMA *et al.*, 2011; NAVEGA, 2016).

4.3.2.1 Vacinas

Nos artigos foram encontradas vacinas virais (artigos 2 e 4), bacterianas (artigos 5, 7, 8 e 12) e alergênicas (artigo 14) as quais foram avaliadas de acordo com suas respectivas particularidades intrínsecas.

Tanto Etna e colaboradores (2020) (artigo 2) quanto Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4) estudaram a aplicabilidade do ensaio MAT no controle da qualidade de vacinas virais. Etna e colaboradores (2020) avaliaram a vacina inativada contra o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV, sigla no inglês *tick-borne encephalitis virus*) produzida com cepas cultivadas em fibroblastos de embrião de galinha e inativadas por formalina. Esta vacina é fabricada na Europa devido à doença ser endêmica neste continente e em parte da Ásia e, o RPT é o único método prescrito pela FE no controle da qualidade da pirogenicidade deste produto biológico. Não há conservantes, albumina de soro humano ou outros estabilizadores derivados de proteínas na vacina, contudo, ela difere na dose adulta e infantil. A vacina contra o TBEV consiste na única intervenção atualmente disponível por não haver tratamento estabelecido para esta doença do sistema nervoso central que pode até levar à morte, com graves quadros de síndromes neurológicas (DEMICHELI; DEBALINI; RIVETTI, 2009). O produto sofreu uma otimização específica e foram avaliados parâmetros e condições recomendados pela FE para o ensaio MAT como, a garantia dos critérios para a curva padrão de endotoxinas para avaliação de correlação significativa entre as doses da mesma, avaliação de interferência no sistema de detecção, teste para fatores de interferência onde a taxa de recuperação de endotoxina nas diluições definidas da vacina deveria estar na faixa de 50-200% e, a validação do método para contaminantes não endotoxinas avaliando a correlação significativa entre as doses de pirogênio não endotoxina. Foi determinado neste estudo que a diluição da vacina a 1:100, correspondendo a 0,03 µg/mL do produto, foi a primeira diluição adequada incluída no *layout* final da placa. Foi observado que, interferências com a dose da vacina superior a 0,03 µg/mL eram inteiramente atribuídas à matriz do excipiente e, que a vacina anti-TBEV não interfere no sistema de detecção de ELISA. Já Mattos e colaboradores (2018)

estudaram a vacina contra o vírus da febre amarela. Essa vacina tem por base o vírus da febre amarela vivo atenuado, cultivado em ovos de galinha embrionados, como na vacina anti-TBEV. Entretanto, diferente da vacina anti-TBEV, o ensaio LAL cromogênico cinético é o único método farmacopeico, recomendado pela FB, para avaliação de pirogênio endotoxina como um dos testes de segurança biológica. O controle criterioso dos níveis de endotoxina em vacina contra a febre amarela é destacado pela WHO a qual reforça que o lote final da vacina deve ser testado para endotoxina com um teste de lisado de amebócito *Limulus* e que este conteúdo deve ser consistente com os níveis considerados aceitáveis pelas autoridades regulatórias do país (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a). Esta vacina também não continha fatores interferentes ao ensaio MAT, como interações com ovalbumina residual de ovos embrionados usados na produção da vacina, ou pela influência de vírus vivos nas leituras de marcadores de citocinas. A diluição mínima da preparação da vacina de 1:10 foi estabelecida para a avaliação das citocinas marcadoras frente aos contaminantes pirogênicos endotoxinas e não endotoxinas.

As pesquisas desenvolvidas por Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5), Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7) e Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8) avaliaram a vacina Bexsero, uma vacina contra a doença meningocócica invasiva causada pela bactéria *Neisseria meningitidis* do grupo B. Bexsero é uma vacina multivalente que contém três proteínas recombinantes expressas em *E. coli* e vesículas de membrana externa (OMV, sigla no inglês *outer membrane vesicles*), derivadas de uma cepa meningocócica de *N. meningitidis*, as quais contêm endotoxinas (LPS) e pirogênios não endotoxinas (porinas, muramilpeptídeo, DNA bacteriano e peptidoglicano) como componentes intrínsecos provenientes da membrana externa de bactérias Gram-negativas ou como subproduto da produção, conferindo desta forma a esta vacina, a característica de ser inerentemente pirogênica. Todos estes componentes da vacina são adsorvidos em hidróxido de alumínio. É utilizada na Europa em indivíduos a partir de dois meses de idade e seu uso no Brasil foi aprovado pela Anvisa em 2015, porém somente na rede particular de imunização. O controle da qualidade de pirogênios desta vacina é realizado com o RPT adaptado onde o imunobiológico é diluído para uma dose subpirogênica pré-estabelecida antes de ser injetado nos coelhos. Foi observado por Vipond e colaboradores (2019) e Valentini e colaboradores (2019) que a Bexsero não possui fatores de interferência no sistema de detecção de citocinas pelo MAT, sendo

inclusive, a diluição de 1:50 considerada pelo último estudo como a diluição mínima da Bexsero livre de interferentes. Valentini e colaboradores (2019) ainda concluíram que o conteúdo pirogênico desta vacina está relacionado as OMV além, de avaliar e comparar com a Bexsero, às respostas de outras duas vacinas (Trumenba e Comvax) intrinsecamente pirogênicas com componentes derivados de *N. meningitidis* sorogrupo B pelo MAT.

Devido os componentes reatogênicos da OMV, uma resposta febril frequente é observada após o uso desta vacina sendo recomendada a administração de paracetamol junto com a vacinação. A sinalização de alguns receptores como TLR4 e TLR2 tem demonstrado forte correlação com a pirogenicidade da Bexsero, sugerindo o LPS como o principal fator responsável pela resposta da febre, além da participação de outros componentes como lipoproteínas. O desenvolvimento de ensaios com alto potencial preditivo para análise do risco da reatogenicidade da vacina Bexsero tem sido proposto, embora novas abordagens tanto químicas quanto genéticas têm permitido modular o equilíbrio entre a reatogenicidade e a imunogenicidade da tecnologia OMV para o uso em humanos. As pesquisas relacionas com OMV norteiam a ideia de que uma vacina contra o sorogrupo B deve ser desenvolvida a partir de múltiplos antígenos para que se possa cobrir um maior número de tipos de *N. meningitidis*. Assim, as plataformas vacinais com OMV têm sido utilizadas como ferramentas poderosas pela auto adjuvanticidade intrínseca e capacidade de apresentar vários antígenos em conformação natural (MATOS, 2015; RAPPUOLI, 2019; KEMP *et al.*, 2021; ROSSI; CITIULO; MANCINI, 2021).

Geier e Geier (2002a) (artigo 12) avaliaram outros três tipos de vacinas bacterianas: a vacina DT (contra tétano e difteria), a vacina DTP (contra tétano, difteria e coqueluche) de célula inteira e a vacina DTP acelular (DTaP). A avaliação da concentração de endotoxinas pelo ensaio LAL teve por objetivo correlacionar tais tipos de vacinas produzidas com tecnologias diferentes com a incidência de efeitos adversos de cada uma. Para análise de endotoxinas pelo método alternativo proposto, as amostras de cada uma das vacinas comercialmente disponíveis adquiridas foram analisadas sem diluição, sendo retiradas em condições estéreis por seringas e agulhas sem endotoxinas e injetadas diretamente nos frascos de teste contendo o lisado.

O uso de vacinas combinadas traz benefícios em diversos âmbitos, tanto a nível econômico, com menos vacinas sendo necessárias para proteger contra mais

doenças e consequente economia de custos nos orçamentos de saúde, quanto a nível de adesão pela população assim como pela comunidade médica, com a conveniência da administração de várias vacinas em uma só promovendo a ampliação da cobertura vacinal e o sucesso dos programas de imunização. No entanto, pode ocorrer o aumento da reatogenicidade quando os componentes antigênicos estão combinados, mesmo não sendo esta resposta observada quando administrados separadamente. Em vacinas combinadas para difteria, tétano, coqueluche e tifo o possível aumento do conteúdo de endotoxinas quando utilizados componentes derivados de bactérias Gram-negativas é um fator a ser considerado (EMEA, 1998).

A vacina DTP, também conhecida como DPT de célula inteira ou tríplice bacteriana, foi criada em 1940 com a união dos toxóides tetânicos e diftéricos e com a vacina para coqueluche. O termo DTP de célula inteira faz referência ao *status* do componente pertussis desta vacina com a presença da própria bactéria inteira inativada, enquanto na vacina DTaP ou também conhecida como DTP acelular, as proteínas imunogênicas da *Bordetella pertussis* causadora da coqueluche estão em quantidades estabelecidas para alcançar seu potencial imunogênico. A vacina acelular advém de pesquisas relacionadas ao conhecimento do agente e do isolamento dos componentes envolvidos na patogenia da doença para sanar os agravos associados à reatogenicidade da vacina de células inteiras por conter endotoxinas e outras toxinas ativas. Assim, a vacina DTaP mostra-se mais segura quanto aos possíveis eventos adversos como febre, reação local, vômitos entre outros (CHERRY, 1996; LEMOS, 2007; PLOTKIN, 2011; FERNANDES, 2017).

Vacinas alergênicas de variados tipos foram avaliadas por Trivedi e colaboradores (2003) (artigo 14) com o intuito de estudar o conteúdo de endotoxinas desconhecido nesta classe de vacina que não é obrigada a passar por avaliação para a presença de pirogênios. Os autores analisaram 14 vacinas alergênicas padronizadas incluindo extratos como pólen de gramíneas, pelos de gato, ácaros e outros. Para a realização do ensaio LAL de coagulação em gel proposto pelo estudo, as vacinas foram submetidas à preparação com glicerina sozinha, ou com solução aquosa com fenol, ou com glicerina e fenol ou ainda, foram reconstituídos em água apirogênica. A fim de se evitar fatores de interferência das vacinas com o ensaio LAL, como a presença de β -D-glucana e proteases, as amostras foram seletivamente esgotadas de endotoxina por meio de uma proteína neutralizante de

endotoxina (ENP, sigla no inglês *endotoxin-neutralizing protein*) altamente específica e, aquecidas a 95°C por 15 minutos.

A imunoterapia contra alérgenos é eficaz na articulação das repostas imunes frente a antígenos ambientais relativamente inofensivos que induzem uma reação imunológica com produção de imunoglobulinas da classe E. A produção de vacinas alergênicas é baseada na técnica de extração de conteúdo aquoso de materiais de origem animal assim como de plantas biológicas complexas, mas de forma pouco seletiva. Assim, o conteúdo de endotoxinas nesta classe de produto biológico se mostra variável com composições aleatórias podendo causar efeitos colaterais. Este risco ao paciente é mais bem visualizado quando atentamos para a quantidade máxima do imunobiológico com alérgeno contaminado com endotoxinas que pode ser administrada, podendo alcançar a dose de 15 EU/Kg de peso corporal, a qual é muito superior a dose limite estabelecida de 5 EU/Kg de peso corporal para outros produtos biológicos. Em vista da variabilidade, torna-se oportuno a padronização dos níveis de endotoxina nesses produtos uma vez que sua ocorrência é de caráter independente por se derivarem de fontes diversas. A tecnologia de clonagem molecular tem sido utilizada no desenvolvimento de alérgenos sob a forma recombinante e, deste modo, a ameaça de contaminação do produto por endotoxinas diminui, paralelo ao aumento das expectativas em cima das novas vacinas alergênicas que prometem serem mais apropriadas na garantia da eficácia e da segurança (FINKELMAN, LEMPITSKI, SLATER, 2006; NORIEGA; BOURG; LABRADA, 2009; LINHART; VALENTA, 2012).

4.3.2.2 *Soros hiperimunes*

Os soros hiperimunes foram os produtos biológicos avaliados nos estudos realizados por Sheraba e colaboradores (2019) (artigo 3), Solano, Gómez e León (2015) (artigo 9), Silva e colaboradores (2016) (artigo 10) e Fingola e colaboradores (2013, 2019) (artigos 15 e 16). Estes possuem extrema relevância no contexto sanitário epidemiológico, mas seu uso também é passível de causar reações adversas desencadeadas por vários fatores, dentre eles a participação de contaminantes pirogênicos. A contaminação ocorre principalmente por falhas de medidas preventivas na fabricação do produto sendo assim, essencial a implementação de requisitos rígidos de qualidade, com a implementação de BPF,

nos laboratórios de produção de soros hiperimunes que possam cobrir desde matérias-primas, equipamentos e instalações, até sistemas de processo (MORAIS; MASSALDI, 2009). A reação pirogênica normalmente é de natureza aguda sendo comumente observada na primeira hora a partir do início da administração e, o principal tipo de pirogênio envolvido é o LPS bacteriano. Podem ser observadas febre, mialgia, taquicardia, dor de cabeça e queda da pressão arterial pela vasodilatação (LEÓN *et al.*, 2013; SILVA; RYAN; SILVA, 2016). A pesquisa no campo de métodos alternativos para avaliação de pirogênios aplicada a soros hiperimunes é benquista e será um avanço proeminente no cumprimento do princípio dos 3Rs tendo em vista que este produto biológico é avaliado obrigatoriamente pelo RPT e, em países como o Brasil, representam quase 70% dos produtos biológicos analisados unicamente pelo RPT (SILVA *et al.*, 2015).

Sheraba e colaboradores (2019) (artigo 3) analisaram o conteúdo de endotoxinas em um soro polivalente contra o veneno das serpentes *Cerastes cerastes*, *Naja hajee* e *Naja nigricollis* pelo ensaio do LAL de coagulação em gel. Este soro é fabricado no Egito pela Companhia Egípcia de Produção de Vacinas, Soros e Medicamentos (EGYVAC, sigla no inglês *Egyptian Company for Sera, Vaccines and Drugs*) e distribuído em países da Ásia e África. Sua fabricação é realizada a partir do fracionamento das imunoglobulinas heterólogas, do plasma de equídeos hiperimunizados com os antígenos específicos, por precipitação com sulfato de amônio e digestão com pepsina para obtenção dos fragmentos F(ab')₂. A pirogenicidade deste soro hiperimune é avaliada pelo RPT conforme prescrição da Farmacopeia Indiana.

Solano, Gómez e León (2015) (artigo 9) avaliaram o soro hiperimune polivalente contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* e *Lachesis stenophrys*. Diferente do soro estudado por Sheraba e colaboradores (2019), este soro contém a IgG sob sua forma íntegra purificada pelo método de precipitação com ácido caprílico e possui apresentação na forma liofilizada. É produzido pelo Instituto Clodomiro Picado na Costa Rica, sendo o RPT o método com aceitação regulatória para avaliação de pirogênios deste produto. Na pesquisa os autores deduziram não haver na formulação do soro hiperimune fatores que interferem no ensaio LAL.

A presença de pirogênios, principalmente endotoxinas, também está associada ao sistema de produção dos soros hiperimunes no que tange as etapas

de purificação e concentração das imunoglobulinas heterólogas. A precipitação com sal é o método adotado pelos fabricantes para eliminar as proteínas indesejadas e assim, isolar e concentrar as imunoglobulinas, seja em sua molécula inteira ou os seus fragmentos ativos produzidos pela digestão enzimática, normalmente com a pepsina. Na formulação dos soros hiperimunes que apresentam a IgG íntegra, a precipitação ocorre pela ação do ácido caprílico enquanto nos soros onde a imunoglobulina encontra-se sob a forma fragmentada, a precipitação se dá sobretudo com o uso de sulfato de amônio pela capacidade seletiva deste sal em precipitar globulinas e não albuminas. A endotoxina tem por característica possuir uma grande interação com proteínas e tal propriedade aplicada à produção de soros hiperimunes, significa que nas etapas onde ocorre a concentração de proteínas há também concentração de endotoxinas e vice-versa, com eliminação de endotoxinas nas etapas de purificação de proteínas. Desta forma, pelo procedimento de concentração de proteínas fazer parte do processo produtivo dos soros hiperimunes, é possível a decorrência de uma conseqüente concentração elevada de endotoxinas. No sistema de produção que envolve a precipitação pelo sulfato de amônio, a concentração de endotoxinas tende a ser maior quando comparado à precipitação com ácido caprílico devido não somente pela concentração mais elevada de endotoxina nas matérias-primas assim como no tempo maior de processamento, mas, também, pela concentração maior de endotoxinas no precipitado final correspondentes às frações de IgG. Portanto, a escolha de procedimentos de produção específicos de igual forma causa impacto na incidência de efeitos colaterais por contaminantes pirogênicos em soros hiperimunes sendo a seleção de procedimentos mais aprimorados de purificação e padronização de proteínas de grande valia para uma produção mais segura de soros hiperimunes (MASSALDI; MORAIS, 2007; MORAIS; MASSALDI, 2009; LOVRECEK; TOMIC, 2011).

Os estudos realizados por Silva e colaboradores (2016) (artigo 10) e Fingola e colaboradores (2013,2019) (artigos 15 e 16) envolveram a análise de diferentes tipos de soros hiperimunes produzidos no Brasil. O soro antibotrópico contra o veneno das serpentes do gênero *Bothrops sp.*, foi estudado por Silva e colaboradores (2016) e Fingola e colaboradores (2013). Os soros anticrotálico contra o veneno da serpente do gênero *Crotalus sp.*, antiescorpiônico contra o veneno de escorpião do gênero *Tityus sp.*, antirrábico contra o vírus rábico e antitetânico contra a toxina

tetânica produzida pela bactéria *Clostridium tetani*, foram estudados tanto por Silva e colaboradores (2016) quanto por Fingola e colaboradores (2019). Os soros antibotrópico-laquéutico contra o veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops* sp. e *Lachesis* sp., e o soro antielapídico contra o veneno de serpentes do gênero *Micrurus* sp. foram estudados somente por Fingola e colaboradores (2019). O controle da qualidade de contaminantes pirogênicos nestes produtos é realizado somente pelo RPT conforme diretrizes das monografias dos respectivos soros hiperimunes na FB. Tal como Sheraba e colaboradores (2002), o processo de produção deste produto biológico envolveu precipitação com sulfato de amônio e digestão péptica para apresentação final da imunoglobulina heteróloga em fragmentos F(ab')₂.

4.3.2.3 Outros produtos biológicos: albumina, eritropoietina, insulina e somatropina

Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11) avaliaram o conteúdo pirogênico, tanto de endotoxinas quanto não endotoxinas, de vários produtos farmacêuticos de uso parenteral no Brasil dentre estes, a albumina, a eritropoietina e a insulina. Os produtos biológicos em estudos se mostraram livres de fatores interferentes com o teste alternativo pesquisado, o ensaio MAT. Normativamente, o controle de contaminantes pirogênicos em albumina é realizado pelo RPT e, em insulina e eritropoietina, pelo LAL.

Outro estudo que avaliou a albumina foi realizado por Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13). A pesquisa foi realizada na Dinamarca tendo por objetivo detectar quantitativamente endotoxinas em proteínas como a albumina, além da somatropina. Pela FE, a albumina também é avaliada pelo RPT para controle de pirogênios e, a somatropina pelo LAL na avaliação de endotoxinas. Diferente do encontrado por Andrade e colaboradores (2003), neste estudo a albumina revelou interferir no teste alternativo estudado, o MAT, potencializando a recuperação de endotoxina de forma dose-dependente. Já a somatropina, não demonstrou possuir fatores interferentes ao método aplicado.

A albumina humana é um medicamento que integra os hemoderivados e pode apresentar risco de transmissão de agentes patogênicos, sendo essencial o monitoramento dos efeitos adversos atribuídos ao seu uso, mesmo sendo esses episódios considerados casuais e na maioria das vezes, de rápida resolução com a

descontinuidade do procedimento terapêutico. Os medicamentos derivados do plasma, como a albumina, apresentam em seu processo de fabricação propriedades quanto à contaminação por microrganismos em virtude da ocasional contaminação inicial das unidades de plasma assim como da fragilidade das etapas iniciais do processo produtivo à exposição de contaminação por bactérias. Além de que, podem ser encontradas nas soluções comerciais de albumina componentes inerentes do plasma humano como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α , que são as principais citocinas participantes no mecanismo da febre. As citocinas indutoras de febre podem ser enriquecidas em certas frações no decorrer do processo de fracionamento do plasma, sendo incorporadas à composição do medicamento e desta forma, podem levar a ocorrência de reações adversas pirogênicas pelo consumo do produto. Um caso de reação pirogênica associado à albumina é indicativo de desvio de qualidade do produto pela não conformidade com as BPF na seleção dos doadores, na coleta do plasma e, no processo de fabricação, armazenamento e administração da albumina. As manifestações observadas de caráter de hipersensibilidade associadas com contaminação bacteriana e pirogênica variam entre febre, náuseas, tremores, mal-estar, calafrios, desconforto abdominal, cefaleia, dispneia, colapso, hipotensão e taquicardia. A albumina é a proteína de maior concentração no plasma e atua principalmente na manutenção da pressão oncótica dos vasos sanguíneos e no transporte de diversos compostos endógenos e exógenos. É indicada nos casos de perda de volume biológico como em casos graves de queimaduras, nefrose e cirrose hepática. Por este produto biológico possuir a característica de ser imunogênica, a segurança do controle de contaminantes pirogênicos no mesmo é imperativo, sendo necessária desta forma, uma estratégia de teste de segurança aprimorada para pirogênios neste medicamento. Nesse sentido, organizações internacionais como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) tem se manifestado a favor e estimulam o uso de testes alternativos como o LAL e o MAT na substituição do RPT em medicamentos derivados do plasma como a albumina (POOL; MCLEOD, 1995; SPREITZER *et al.*, 2002; MATOS; ROZENFELD, 2005; MATOS, 2006; EMA, 2009; PERDOMO-MORALES *et al.*, 2011).

Embora a eritropoietina e a somatropina façam parte dos produtos biológicos menos avaliados nos estudos encontrados nesta revisão, não se deve desconsiderar quanto ao risco que pode ser apresentado por estes tipos de medicamentos com

relação à danos causados por meio de contaminantes pirogênicos. A eritropoietina consiste em uma glicoproteína produzida pelo rim e participa do processo de formação de eritrócitos. É disponibilizada sob a forma de eritropoietina humana recombinante (rhEPO) desde quando sua produção em larga escala foi possibilitada por meio da clonagem do gene responsável pela síntese desse hormônio e, é utilizada no tratamento de anemia relacionada com a insuficiência renal crônica, tratamentos oncológicos e na redução de transfusões sanguíneas durante procedimentos cirúrgicos nos diversos casos em que se faz necessário o seu uso (MEDEIROS, 2013). É considerado um medicamento de alto custo e com impacto na saúde pública promovendo melhor qualidade de vida aos milhões de pacientes, principalmente com doenças crônicas, que são beneficiados com o uso da rhEPO. Em pacientes submetidos à hemodiálise, a rhEPO é o medicamento eletivo para estimular a eritropoiese e tratar as severas anemias comumente observadas. O controle de pirogênios fica a cargo da avaliação de endotoxinas bacterianas sendo mais este parâmetro da qualidade fundamental neste produto de suma importância terapêutica (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A somatropina consiste na versão sintética do hormônio do crescimento humano que é liberado endogenamente no organismo pela glândula pituitária anterior e tem a função de estimular o crescimento, a reprodução e a regeneração celular. A deficiência desse hormônio em crianças implica em falha no desenvolvimento de altura e peso e em adultos, alterações na composição corpórea normal com reflexos no estímulo do crescimento muscular além de, complicações no metabolismo lipídico podendo levar ao descontrole da taxa de colesterol (MEHTA; HINDMARSH, 2002; CELLI; ARNAULT; BAUMSTUMMLER, 2018). Assim como para os outros produtos biológicos, devido a somatropina se destinar como um medicamento injetável, sua preparação exige elevado grau de pureza e baixo nível de pirogênios e, a menos que medidas sejam tomadas a fim de se evitar a contaminação no processo produtivo ou de se retirar os pirogênios na fase de purificação do produto, concentrações instáveis de contaminantes pirogênicos possivelmente serão encontradas em drogas como a somatropina que são de origem proteica (GU *et al.*, 1995).

Além de Andrade e colaboradores (2003), a insulina também foi avaliada por Bolden e Kelly (2017) (artigo 1) nos Estados Unidos. Os autores avaliaram a insulina e outros sete anticorpos monoclonais sem especificação, contudo de quais os

medicamentos eram em si. Ambos os produtos biológicos são submetidos ao ensaio LAL para o controle de endotoxinas pela USP.

A insulina é um hormônio que possui a função de regular os níveis sanguíneos de glicose sendo produzido pelas células β no pâncreas. É indicada para o tratamento clínico de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo I e II onde a hiperglicemia é caracterizada. A trajetória evolutiva deste produto biológico teve início com sua extração a partir do pâncreas bovino e suíno seguido de purificação e cristalização da proteína. Hoje, com o uso da engenharia genética, a produção deste medicamento é realizada de forma sintética por meio da clonagem do gene humano da insulina e posterior expressão em microrganismos como *E. coli*. Dentre os testes que são realizados lote a lote para garantir a qualidade do produto, está o ensaio para pesquisa de endotoxinas bacterianas como parte do controle biológico, haja vista que a contaminação por endotoxinas é uma das desvantagens encontradas ao se utilizar o sistema de expressão por *E. coli* na produção de proteínas recombinantes (FERREIRA, 2007; BAESHEN *et al.*, 2014; SCHRAMM, 2016).

Quanto aos anticorpos monoclonais, seu uso principalmente como agentes terapêuticos ganha destaque progressivo na indústria farmacêutica com diversos medicamentos já consolidados no mercado e outros em desenvolvimento. Só nos Estados Unidos, em torno de 80 anticorpos monoclonais tem sua aprovação pelo FDA e estão no mercado sendo em sua maioria, utilizados no tratamento de câncer e doenças autoimunes. São moléculas que agem de forma específica e controlada sobre um determinado alvo e são produzidas a partir de imunoglobulinas modificadas. A plataforma produtiva deste tipo de produto biológico fundamenta-se na propriedade intrínseca de cada linfócito B de sintetizar especificamente anticorpos para um antígeno particular e, a partir deste princípio, basta somente se produzir um clone da referida célula B de interesse e suas linhagens de células-filhas para então se obter a produção, em grande escala, de anticorpos específicos para um antígeno. A técnica de produção de hibridomas foi a primeira estabelecida para a produção de anticorpos monoclonais onde células B de camundongos imunizados com um antígeno específico são perpetuadas. Com o passar dos anos, devido a desvantagens inerentes ao uso de anticorpos murinos aliado ao desenvolvimento da engenharia genética, surgiram várias técnicas com a proposta de aumentar a produção, segurança e eficácia deste produto, como os anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, criados no intuito de se alcançar menor

antigenicidade e menos efeitos colaterais por meio de moléculas com padrões mais próximos ao do humano. O processo de fabricação deve ter como produto final, anticorpos monoclonais seguros e previsíveis de forma que sejam retiradas impureza diversas como as endotoxinas bacterianas, tendo ao mesmo tempo, a preocupação do rendimento aceitável do produto (LIU *et al.*, 2010; BUSS *et al.*, 2012; COELHO, 2014; LU *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO, 2021).

Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6) foram os únicos autores, dos artigos selecionados, a estudarem a imunoglobulina humana como produto biológico. Nos Estados Unidos, país onde a pesquisa foi realizada, o conteúdo pirogênico na IgG humana é avaliado somente pelo RPT conforme diretrizes da USP. Um lote de IgG humana foi fabricado a partir do plasma de milhares de doadores que adquiriram imunidade através da vacinação e assim possuíam elevados títulos de anticorpos específicos. O *pool* desse plasma é submetido ao fracionamento com álcool seguido das etapas de purificação e formulação para administração intravenosa. A nível industrial, a imunoglobulina juntamente com os fatores de coagulação sanguínea, tem papel predominante dentre todos os hemoderivados produzidos, perdendo somente para a albumina (FRAGATA, 2014). Seu uso é direcionado para conferir proteção passiva específica contra determinados microrganismos ou toxinas, em doenças como hepatite B, tétano, varicela e raiva e, possui como benefícios principais a rapidez da proteção conferida além de causar raros episódios de reações por hipersensibilidade (BRASIL, 2006). Um controle rigoroso a fim de se evitar a contaminação e introdução de material estranho deve ser realizado em todas as etapas de produção e um dos parâmetros cruciais de qualidade durante a fabricação é o monitoramento dos níveis de endotoxinas bacterianas (EMEA, 2011).

4.3.3 Aplicabilidade do método alternativo nos produtos biológicos

4.3.3.1 *Aplicabilidade dos testes de endotoxina bacteriana (LAL) e de ativação de monócitos (MAT)*

Com exceção dos estudos realizados por Bolden e Smith (2017) (artigo 1) e Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4) cuja avaliação de endotoxinas bacterianas pelo ensaio LAL procede pelo fato deste método ser o oficial para seus respectivos produtos biológicos avaliados, a aplicabilidade do ensaio LAL como método

alternativo sob suas diversas formas analíticas, foi satisfatória em todos os estudos desta revisão.

O ensaio do LAL de coagulação em gel se mostrou aplicável na avaliação de endotoxinas em diferentes tipos de soros hiperimunes com diferentes formulações nos processos produtivos: o soro polivalente estudado por Solano, Gómez e León (2015) (artigo 9) contra a picada das serpentes *Bothrops asper*, *Crotalus simus* e *Lachesis stenophrys*, com IgG sob sua forma íntegra purificada pelo método de precipitação com ácido caprílico e, o soro polivalente estudado por Sheraba e colaboradores (2019) (artigo 3) contra a picada das serpentes *Cerastes cerastes*, *Naja haje*, e *Naja nigricollis* com apresentação de imunoglobulina em fragmentos de F(ab')₂ e precipitação com sulfato de amônio além da digestão com pepsina. Sheraba e colaboradores (2019) dividiram o estudo em duas fases em que na primeira fase foi determinada a diluição do soro hiperimune não interferente a qual foi utilizada na segunda fase nos estudos de validação propriamente dito. Os autores deduziram que as estratégias de termo ativação da amostra e rehidratação do reagente LAL com Solução Tampão Específica de Endotoxina foram determinantes na obtenção dos resultados válidos.

Solano, Gómez e León (2015), conforme estudos partiram do princípio que o limite de endotoxinas aceito para uma formulação de um soro hiperimune particular é definido com base na dose administrada. Foi constatado no estudo que tanto o RPT quanto o LAL, são capazes de detectar todas as concentrações de endotoxinas nas doses estabelecidas entre 20 e 120 mL correspondendo aos valores limites de EU/mL na faixa de 17,5 e 2,9. Para o soro hiperimune avaliado na pesquisa, a dose máxima recomendada para envenenamento severo foi de 100 mL com limite de endotoxina de 3,5 EU/mL. Contudo, o estudo destaca que os critérios de aceitação do RPT e do LAL devem ser harmonizados ajustando-se a dose administrada aos coelhos a partir do limite de endotoxina encontrado para o soro para evitar diferenças entre ambos os testes, pois com o limite de endotoxina de 3,5 EU/mL administrado aos coelhos na dose de 3 mL/Kg, a quantidade total de LPS administrada excederia ao valor necessário para produzir uma resposta pirogênica no RPT (5 EU/Kg), conferindo assim, um resultado satisfatório no LAL mas fracassado no RPT. Embora o teste do LAL tenha se mostrado aplicável no produto em estudo, outra importante consideração é feita pelos autores, já que eles recomendam a utilização do ensaio do LAL de coagulação em gel para avaliar o conteúdo de

endotoxinas ao longo do processo de fabricação do soro hiperimune, mas enfatizam que para a liberação dos produtos finais, os resultados de ambos os métodos devem ser considerados.

Assim como Solano, Gómez e León (2015) (artigo 9), Fingola e colaboradores (2013, 2019) (artigos 15 e 16) também tiveram por base o cálculo de limite de endotoxina para conseguir na prática mensurar endotoxinas de forma adequada nos diferentes tipos de soros hiperimunes avaliados. Em ambos os estudos realizado por Fingola e colaboradores (2013, 2019), o ensaio LAL cromogênico cinético foi aplicado com êxito nos soros estudados, todos com apresentação de imunoglobulina em fragmentos de F(ab')₂ e precipitação com sulfato de amônio e digestão com pepsina. A diluição 1:10 foi estabelecida como a diluição de trabalho para todos os soros, exceto para o antiescorpiônico, onde a diluição 1:100 foi a determinada. Foram ainda definidos, os valores limites de endotoxina para cada soro: 2,9 EU/mL para o soro antibotrópico, 1,75 EU/mL para o soro anticrotálico, 23,3 EU/mL para o soro antirrábico, 3,5 EU/mL para o soro antitetânico e, 7,0 EU/mL para o soro antiescorpiônico.

Um estudo realizado na Índia onde a finalidade era avaliar a homogeneidade e a presença de contaminantes em três lotes do soro hiperimune Combipack, o qual é um dos mais utilizados na África no tratamento contra o veneno de mais de dez serpentes nativas, o ensaio LAL cromogênico também se mostrou um método viável para medição dos níveis de endotoxina em soros hiperimunes. Por meio do teste do LAL, foi possível demonstrar segurança dos três lotes avaliados quanto aos níveis de endotoxina tendo por base os valores encontrados de EU/mL os quais estavam todos abaixo do limite de 0,7 a 1,1 EU/mL estabelecido (PATRA; KALITA; MUKHERJEE, 2018). Uma pesquisa semelhante foi realizada no Sri Lanka só que o produto estudado foi um novo soro hiperimune desenvolvido para neutralizar a toxicidade dos venenos das espécies de serpentes do país já que, o soro hiperimune polivalente produzido na Índia para as mesmas espécies de serpentes, é pouco eficaz provavelmente devido à variação na composição do veneno nas diferentes regiões geográficas. Os dois lotes do novo soro foram submetidos à avaliação por uma série de parâmetros onde foram analisadas sua potência e suas propriedades físico-químicas, além da pureza da substância ativa com a pesquisa de contaminantes endotoxinas. O nível de endotoxinas foi mensurado de igual forma com êxito pelo ensaio LAL cromogênico sendo verificado que a carga de endotoxina

de ambos os lotes estava dentro da faixa estabelecida de 1,5 a 1,7 EU/mL, atestando assim, a segurança do soro hiperimune elaborado quanto à presença destes contaminantes (PATRA *et al.*, 2021).

Sheraba e colaboradores (2015) realizaram uma avaliação da qualidade do processo produtivo de soros hiperimunes na principal unidade fabril do Egito por meio do monitoramento das várias etapas produtivas, desde o plasma bruto até o produto acabado, com testes de esterilidade e endotoxina validados. O ensaio do LAL de coagulação em gel foi utilizado e apontou contaminação por este tipo de pirogênio em todas as amostras avaliadas, inclusive no produto final, sendo possível concluir mediante o uso deste método que, a esterilidade do produto não garante a ausência de endotoxinas no mesmo. Na Costa Rica, foi desenvolvido no Instituto Clodomiro Picado um soro hiperimune para o tratamento potencial da COVID-19 por Léon e colaboradores (2021). Este produto passou por avaliações quanto a sua qualidade físico-química e microbiológica no qual foi realizado o ensaio do LAL de coagulação em gel para a detecção e quantificação de endotoxinas em amostras do produto em processo e final. A segurança em relação aos níveis de endotoxinas neste promissor produto biológico foi atestada pelo ensaio LAL a partir da dose recomendada pelos autores de 10 mL para o mesmo e, segundo o cálculo do limite de endotoxina aceitável para esta formulação que foi de 35 EU/mL. Todas as amostras avaliadas pelo ensaio do LAL de coágulo em gel testaram negativo com valores de concentração de endotoxinas abaixo do limite estabelecido.

Geier e Geier (2002a) (artigo 12) determinaram quantitativamente e com sucesso, a concentração de contaminantes endotoxinas nas vacinas bacterianas DT, DTP e DTaP pelo ensaio do LAL de coagulação em gel por meio da avaliação da sensibilidade do ensaio a partir de amostras fornecidas de controle positivo e negativo, sendo assim estabelecido pelos autores, que amostras com valores de limites de endotoxina a contar de 0,304 EU/mL, foram determinadas como positivas. Apesar da pesquisa de endotoxinas bacterianas não fazer parte do escopo regulatório da qualidade para a liberação de lotes desses tipos de vacinas bacterianas, seu emprego é sugerido como ferramenta de validação para os procedimentos de inativação e para o monitoramento interno da qualidade da vacina. Não há um limite para endotoxinas internacionalmente estabelecido para esses produtos biológicos ficando tais produtos isentos da obrigatoriedade em atender a um determinado nível de endotoxina. Contudo, é de responsabilidade dos

fabricantes destas vacinas comprovarem por meio de ensaios clínicos a segurança e a eficácia do produto, estabelecendo um valor interno limite com a avaliação do maior número de lotes possível a fim de se estabelecer o valor médio que represente o limite do conteúdo de endotoxinas em lotes normais (BRITO; SINGH, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013b).

Brito e Singh (2011) em seu estudo propuseram valores limites de endotoxina para vários tipos de vacina, os quais julgaram os autores serem recomendados conforme cada tipo de vacina produzida com base nos achados da literatura e o valor mais alto recomendado foi referente às vacinas de toxóides com o valor permissivo de até 200.000 EU/mL, pelo fato de seu processo de produção envolver bactérias com purificação mínima e pela complexidade dessas formulações. O ensaio LAL tem sido utilizado de forma aplicável em estudos para pesquisa e quantificação dos níveis de endotoxinas em vacinas relacionadas a esta problemática como a DTP desde muito tempo (GEIER; STANBRO; MERRIL, 1978).

Outro estudo também realizado por Geier e Geier (2002a) semelhantemente avaliou, por meio do ensaio do LAL de coagulação em gel, vacinas DTP e DTaP de diferentes produtores e determinou de igual forma com êxito, que o valor limite de 0,304 EU/ml é considerado como um resultado positivo para endotoxinas. Pelo uso do ensaio do LAL os autores concluíram que a DTP continha os maiores índices de endotoxinas bacterianas frente à DTaP sendo este resultado atribuído principalmente ao componente pertussis da vacina. Este achado foi correlacionado no estudo a uma maior incidência de reações adversas graves com imunizações com DTP com base no banco de dados do Sistema de Notificação de Eventos Adversos de Vacinas dos Estados Unidos (GEIER; GEIER, 2002b). Similarmente, o ensaio do LAL de coagulação em gel foi utilizado na pesquisa realizada por Martins (2006) como sendo um dos ensaios avaliados paralelamente para investigar a participação das vacinas DTP, DT e DTaP na resposta inflamatória em camundongos. Controles positivo e negativo em duplicata foram utilizados para garantir a validade do ensaio e o cálculo de sensibilidade do ensaio foi utilizado para determinação da concentração de endotoxinas nas amostras. As vacinas DTaP e DT apresentaram níveis aceitáveis de endotoxinas, enquanto a duas vacinas DTP analisadas apresentaram valores bem mais elevados, contudo, não sendo maior que a concentração de endotoxinas na vacina de referência. O estudo conclui que se deve controlar as endotoxinas bacterianas nesses produtos biológicos

estabelecendo um limite ou um intervalo viável visto que, pelo ensaio do LAL foi demonstrado quão variável pode ser a concentração dessas substâncias contaminantes. Entretanto, cabe destacar que quando estudada a aplicabilidade do ensaio MAT em avaliar conteúdo pirogênico nesta vacina trivalente, este método foi superior ao LAL por demonstrar quão relevantes são as reações induzidas por componentes pirogênicos não-endotoxinas presentes na mesma. Um componente Gram-positivo, o toxóide diftérico, foi o principal responsável por induzir a secreção significativa de IL-6 em WB fresco não sendo associada a uma resposta positiva no LAL, destacando desta forma, uma diferença considerável entre os métodos quanto à avaliação de pirogênios neste produto (CARLIN; VIITANEN, 2003; 2005).

Trivedi e colaboradores (2003) (artigo 14) avaliaram o conteúdo de endotoxinas em vacinas alergênicas pelo ensaio do LAL de coagulação em gel e, novamente, este método demonstrou também ser aplicável para este fim. O conteúdo de endotoxinas em vacinas alergênicas provou neste estudo ser altamente variável e foi calculado tendo por base a sensibilidade do lisado de 0,06 EU/mL, onde o valor recíproco da diluição da amostra foi multiplicado pela sensibilidade do lisado sendo estabelecido o intervalo de endotoxina quantificada de cada vacina para o último resultado positivo e o primeiro resultado negativo. Foi concluído, ser este método, o mais confiável para a triagem de vacinas com alérgenos para endotoxina quando combinado com a adsorção de Solução Tampão Específica de Endotoxina para eliminar a interferência causada por β -glucanas.

Na comparação realizada no estudo de Siraganian e colaboradores (1979) quanto aos níveis de endotoxina em preparações comerciais de extrato de poeira doméstica, foram encontradas inesperadamente, grandes quantidades de endotoxinas e, de igual forma, o ensaio do LAL de coágulo em gel foi utilizado para este fim satisfatoriamente, apresentando resultados com boa correlação com a pirogenicidade apontada pelo RPT. Na Coreia do Sul o ácaro *Dermatophagoides farinae* presente na poeira doméstica foi novamente alvo de estudo com o desenvolvimento de uma nova vacina a qual foi submetida à avaliação de suas propriedades, dentre estas o nível de endotoxina, frente aos demais extratos comerciais. O estudo utilizou o ensaio do LAL cromogênico cinético ao invés do ensaio do coágulo em gel e, também, se mostrou aplicável em medir os níveis de endotoxinas neste tipo de vacina (KIM *et al.*, 2021).

Na pesquisa realizada por Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11) o ensaio do LAL de coagulação em gel e o ensaio MAT com pesquisa de IL-6 em PBMC e WB com o método A (teste quantitativo) foram satisfatórios na avaliação de substâncias pirogênicas em vários medicamentos estudados, dentre os quais a insulina, albumina e eritropoetina. Os resultados de ambos os métodos alternativos acrescidos do RPT, demonstraram boa correlação entre si. Ambos os sistemas PBMC/IL-6 e WB/IL-6 foram válidos apresentando valores congruentes de seus limites de detecção para endotoxinas. A sensibilidade do sistema WB/IL-6 para detecção de pirogênio não endotoxinas também foi testada com o fungo *C. albicans* e a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e, apresentou linearidade entre a quantidade de IL-6 liberada e a concentração de cada contaminante pirogênico não endotoxina. Uma importante consideração foi apontada pelos autores, que em geral, o teste PBMC/IL6 é menos sujeito à interferência do produto do que o WB/IL-6, permitindo que drogas menos diluídas sejam testadas, sendo isto relevante para pirogênios não endotoxinas, pois se diluem mais rapidamente do que a endotoxina.

A contaminação por pirogênios na albumina humana também foi avaliada simultaneamente pelos ensaios RPT e LAL turbidimétrico cinético frente aos sistemas de teste *in vitro* com clones de células desenvolvidos a partir das linhagens MM6 e THP-1 na pesquisa de Eperon e colaboradores (1997). No geral, foi observado que todos os três métodos de avaliação na albumina humana apresentaram resposta pirogênica à contaminação por endotoxinas coerentes entre si, com uma significativa resposta proporcional de TNF- α no modelo celular desenvolvido, sendo aplicáveis na avaliação de pirogênios neste produto biológico. Porém, com a observação de reações positivas no LAL não compatíveis aos outros métodos analíticos, os autores na análise comparativa, sinalizaram uma variabilidade quanto à resposta deste ensaio ao analisar produtos biológicos e sugeriram o uso do método em células para eliminar possíveis falso-positivos advindos do ensaio LAL por possuir maior especificidade que qualquer formato de ensaio de *Limulus*.

Já Perdomo-Morales e colaboradores (2011) com base em seus achados ao avaliarem em paralelo por meio dos ensaios RPT, LAL do tipo cromogênico cinético e MAT, lotes de albumina humana de uso parenteral, foram categóricos ao afirmarem que o ensaio do LAL, mesmo sendo específico para a detecção de endotoxinas, não é adequado para testar este tipo de produto biológico pelo

resultado inaceitável quanto a recuperação de endotoxinas devido a interferências. Eles presenciaram no experimento a não detecção de endotoxinas pelo teste do LAL em lotes comprovadamente contaminados por meio de experimentos com MAT e polimixina B. Foi demonstrado, entretanto, boa correlação do MAT com o RPT pela análise de ambos os marcadores de leitura IL-1 β e IL-6 em WB fresco. O paralelismo entre os resultados do ensaio MAT em WB fresco com pesquisa de IL-6 e o RPT foi, semelhantemente, observado por Pool e colaboradores (1998) assim como a imprecisão do ensaio LAL na avaliação de endotoxinas em albuminas humanas.

Spreitzer e colaboradores (2002) constataram em seu estudo que o ensaio MAT, sob o formato de WB fresco com quantificação de IL-1 β , também se mostrou aplicável na avaliação de endotoxinas em albumina. Os resultados foram comparáveis e, até superiores no quesito sensibilidade, com o RPT tanto em amostras apirogênicas quanto em amostras enriquecidas propositalmente com endotoxinas. Em outro estudo, Solati e colaboradores (2015) apontaram como favorável a aplicabilidade do ensaio MAT na avaliação de contaminantes pirogênicos endotoxinas e não endotoxinas na albumina humana em PBMC criopreservadas com a mensuração de IL-6. A pesquisa demonstrou inclusive sensibilidade comparável entre os formatos fresco e criopreservado das PBMC.

A albumina também foi um dos produtos biológicos, juntamente com a somatropina estudados por Moesby, Hansen e Christensen (2000) no artigo 13, os quais afirmaram que o método A do MAT no formato MM6/IL-6 é um método confiável na detecção de endotoxinas em proteínas como estas, mesmo a albumina tendo apresentado interferência no método aplicado. Foi demonstrado que a interferência da albumina não se tratava de uma resposta deste produto em si na liberação de IL-6, mas, no aumento da resposta à endotoxina pela presença no soro de um fator potencializante que facilita a transferência de endotoxina para o receptor alvo nas superfícies das células MM6. Contudo, tais problemas de interferência foram contornados preparando uma curva padrão de solução de albumina apirogênica em uma concentração igual à do produto a ser testado. O MM6 como fonte celular com IL-6 para leitura do sistema, teve sua alta sensibilidade comprovada na avaliação de produtos diluídos, sendo inclusive destacado pelos autores sua capacidade de cumprir exigências mais rigorosas sobre o conteúdo de endotoxinas em preparações farmacêuticas. A validação do ensaio para cada

produto é recomendada no estudo, pois como observado, as interferências podem tanto potencializar ou inibir a liberação de IL-6 em MM6.

Ao avaliar o conteúdo pirogênico da eritropoetina humana, Andrade e colaboradores (2003) constataram pouca influência de interferentes deste produto biológico quando analisado pelo ensaio do LAL reafirmando a aplicabilidade deste método. Entretanto, os autores salientaram que o método MAT demonstrou ser muito mais sensível e robusto que o teste do LAL estando menos sujeito à inibição por fatores interferentes da solução de eritropoetina. Hassan e colaboradores (2017), também demonstraram a viabilidade do ensaio do LAL de coagulação em gel na avaliação de endotoxinas em eritropoetina, mas, em contrapartida, destacaram que a interferência de potencialização por conta do conteúdo proteico originário deste produto biológico deve ser superado por meio da coagulação das proteínas com aquecimento da amostra a 90°C por 15 minutos antes da realização do teste juntamente com a diluição da amostra.

No estudo realizado por Silveira e colaboradores (2004) os resultados, de igual forma, apontam para a necessidade de se avaliar das limitações do ensaio LAL, independentemente de seu tipo, e assim aprimorar a metodologia para uma avaliação segura de produtos parenterais como a eritropoetina. A eritropoetina também apontou reações falso-positivas por interferência de β -glucanas quando avaliado pelo reagente LAL de coagulação em gel reativo à glucanas, contudo, após verificação de resultados comparáveis com o ensaio do LAL cromogênico e ao RPT, o estudo concluiu a validade de ambos os métodos LAL para avaliação de endotoxinas contanto que seja levado em conta a seleção adequada do reagente *Limulus* além, de transpor os fatores de interferência.

Foi evidenciada a aplicabilidade de ambos os métodos rFC, abordado no artigo de Bolden e Smith (2017) (artigo 1) e, o método do LAL de coagulação em gel e o MAT do estudo de Andrade *et al.* (2003) (artigo 11), na detecção de contaminantes pirogênicos em insulina. Corroborando de igual forma para a viabilidade do uso dos ensaios do LAL na avaliação de endotoxinas em insulinas produzidas para uso humano, um dos resultados encontrados por Silveira e colaboradores (2004) em seu estudo foi o emprego de forma satisfatória dos ensaios do LAL cromogênio e de coagulação em gel, com resultados coerentes entre ambas as metodologias na análise deste produto biológico assim como, no estudo de McNef e colaboradores (1999) com o uso do ensaio do LAL turbidimétrico cinético

demonstrando elevada sensibilidade na captação do nível real da contaminação de endotoxinas por dose de insulina.

O ensaio do LAL turbidimétrico cinético e MAT com método A em sangue total fresco para pesquisa de IL-6 foram utilizados por Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6) demonstrando serem aplicáveis na pesquisa de pirogênios em imunoglobulinas humanas. Os resultados apresentados por estes métodos alternativos para detecção de pirogênios foram convergentes entre si apontando ambos para ausência de pirogênio em amostras que, em contrapartida, foram consideradas pirogênicas no ensaio RPT. No MAT não houve liberação de citocina na presença da amostra testada indicando que a amostra estava apirogênica bem como no LAL, que confirmou a segurança da amostra para a presença de um possível pirogênio de origem endotoxina. Esses resultados contribuíram significativamente para a conclusão de que o resultado insatisfatório no RPT não se tratava de um contaminante pirogênico, mas sim de uma especificidade incomum do IgG de um determinado doador, que compunha o *pool* do lote do plasma humano, com os leucócitos de coelho.

Montag e colaboradores (2007) avaliaram e discutiram a abordagem do ensaio MAT na análise experimental de LPS em lote de imunoglobulina destinada ao uso humano previamente aprovado no RPT tanto pelo fabricante quanto pelo órgão competente pela qualidade e segurança dos produtos biológicos no devido país de origem. O método alternativo em sua forma semiquantitativa com a leitura de IL-1 β e IL-6 em WB criopreservado foi realizado com sucesso, e os autores concluíram ser o MAT um bom exemplo de como um teste alternativo ao uso de animais pode fornecer resultados pelo menos comparáveis quanto ao nível de segurança, além de permitir o acesso a informações essenciais não possíveis ao RPT, como a definição da concentração de endotoxina no produto analisado.

No estudo realizado por Eperon e colaboradores (1997), o ensaio do LAL turbidimétrico e o MAT em clones de cultivos celulares de MM6 e THP-1 com pesquisa de TNF- α se mostraram aplicáveis na avaliação de endotoxinas em diversos produtos parenterais dentre eles a imunoglobulina humana. Ambos os métodos alternativos apresentaram resultados com forte correlação com o RPT, contudo quando analisados individualmente, o MAT foi superior ao LAL por corresponder melhor ao RPT no quesito sensibilidade e ser mais específico para endotoxina que o LAL. O ensaio do LAL de coagulação em gel no estudo de Huszar

e colaboradores (2002) também detectou de forma eficaz o LPS bacteriano em preparações de imunoglobulinas humanas quando sanada a interferência de β -glucanas, sendo inclusive, destacado na pesquisa, a capacidade deste método do LAL em detectar contaminação por endotoxinas neste produto biológico não apontada pelo RPT.

Etna e colaboradores (2020) (artigo 2) ao avaliarem o conteúdo pirogênico na vacina TBEV pelo ensaio MAT, verificaram que ambos os métodos A e B apresentaram limitações quanto à sua aplicabilidade embora a escolha da quantificação de IL-6 como citocina marcadora na plataforma celular PBMC criopreservada tenha sido satisfatória na garantia da validade do teste. As dificuldades retratadas nos métodos A (teste quantitativo) e B (teste semiquantitativo) se deve principalmente pela sensibilidade do lisado do BET em lambda (λ) ter sido mal traduzido para limite de detecção (LOD, sigla no inglês *limit of the detection*) no capítulo do MAT na FE. O método A foi considerado inválido, não pela resposta da vacina em termos de conteúdo de pirogênio, mas pelo cumprimento não alcançado dos critérios para a curva padrão de endotoxina, que requer um comportamento paralelo das diluições do produto *versus* a curva padrão da endotoxina de referência e, conseqüentemente, uma resposta linear do sistema celular. Já o método B (teste semiquantitativo) foi aplicado com sucesso na vacina TBEV com as modificações propostas pelos autores que sustentaram a possibilidade de substituir o LOD pela sensibilidade do ensaio (AS, sigla no inglês *sensitivity of the assay*) para definir uma máxima diluição válida (MVD, sigla no inglês *maximum valid dilution*) estável da vacina, aprimorando desta forma o método B para uma avaliação confiável, uma vez que AS é o valor mais baixo da curva de endotoxina padrão de referência onde uma estimativa mais precisa da pirogenicidade em EU/ml é possível. Neste estudo, a adaptação dos critérios de validade dos dois métodos foi necessária para atender melhor aos requisitos da FE.

Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4) demonstraram satisfatoriamente a aplicabilidade do método A do MAT na pesquisa de pirogênios na vacina contra o vírus da febre amarela, onde uma correlação positiva foi observada entre os ensaios do LAL cromogênico cinético e o MAT, de acordo com os dados de recuperação de LPS exógenos para cada ensaio além, da detecção de contaminantes pirogênicos não endotoxina em lotes comerciais do produto enriquecidos com LTA. Na comparação do sistema WB/IL-6 criopreservado em teste com o sistema WB/IL-6 já

validado internacionalmente, foi observado que o primeiro foi capaz de detectar LPS, tal como previsto no segundo. A avaliação das respostas das citocinas IL-6 e IL-1 β em WB criopreservado revelou que ambas as citocinas são capazes de avaliar pirogênios pelo MAT na vacina em estudo contudo, os autores destacaram a aplicabilidade da IL-6 como citocina marcadora ideal em WB criopreservado no MAT na avaliação deste produto.

A aplicabilidade do ensaio MAT na avaliação de conteúdo pirogênico na vacina Bexsero foi comprovada nos estudos 5, 7 e 8, realizados respectivamente, por Studholme e colaboradores (2019), Vipond e colaboradores (2019) e Valentini e colaboradores (2019). Dentre estes, somente Valentini e colaboradores (2019) estudou comparativamente os resultados do RPT, LAL e do MAT onde uma correlação estatisticamente significativa foi observada entre os valores do MAT e o aumento de temperatura dos coelhos bem como, com o LAL, embora com significância mais discreta, sendo necessário retirar da leitura comparativa dos métodos um valor atípico apresentado pelo LAL. O sistema de teste escolhido PBMC/IL-6 criopreservado do MAT foi responsivo de forma adequada à análise da vacina Bexsero. Na avaliação pelos autores quanto a aplicabilidade dos métodos A e C de uma vacina com pirogenicidade intrínseca como a Bexsero, o método C demonstrou ser o mais adequado pela inaplicabilidade do método A em consequência da falta de paralelismo entre as curvas de respostas de endotoxina e da vacina. O método C foi então adaptado e validado com êxito como um formato de ensaio linha paralela ajustado, considerando a média geométrica de quatro resultados individuais de quatro doadores de PBMC diferentes e, mesmo não havendo menção na FE deste cálculo, o estudo recomenda seu uso por apresentar um único resultado quantitativo para cada lote de teste.

Tal como Valentini e colaboradores (2019), Vipond e colaboradores (2019) obtiveram resultados satisfatórios com a escolha da IL-6 como leitura do MAT em PBMC criopreservado, apresentando ainda, respostas comparáveis ao PBMC fresco. Devido a FE não prescrever um método específico para calcular a potência do produto em relação ao lote de referência por meio do método C do MAT, este estudo desenvolveu um método interno onde são selecionadas três diluições na parte linear das curvas dose resposta para uma análise de linha paralela usando o programa Combistats sendo atribuído um valor de RPU para o lote do teste. Nesta adaptação do método C do MAT, o limite arredondado de 1,80 de RPU foi adotado

como resposta de RPU máxima permitida, em que qualquer lote de Bexsero que apresentasse um valor igual ou inferior a este estipulado, seria considerado aceitável para uso. A fim de abranger as diferenças potenciais de respostas, foi adotado o mesmo critério de decisão de aprovação/reprovação pela FE onde, o lote da vacina Bexsero é aprovado se o resultado de RPU de todos os quatro doadores for igual ou abaixo de 1,80. Caso ao menos um dos quatro doadores apresentar resultado maior que 1,80, o lote da vacina é testado em outros quatro doadores e, assim, o lote da vacina tem sua aprovação se não mais que um dos oito resultados estiverem fora de especificação.

Studholme e colaboradores (2019) realizaram um estudo colaborativo e foi observado que a consistência dos resultados do MAT, sob seus diversos formatos, em avaliar o conteúdo pirogênico da Bexsero por meio de um teste de comparação de lote de referência, foi satisfatório. Todos os sistemas de testes utilizados pelos laboratórios foram capazes de demonstrar que a amostra A apresentava atividade relativa superior, a amostra B inferior e, a amostra C moderada, sendo medida também em termos de RPU com comparação das respostas estimuladas de cada amostra e as respostas estimuladas pelo lote de referência por meio da análise de linha paralela pelo programa Combistats. Contudo, os autores salientaram a cautela na escolha do modelo estatístico, os critérios de validade do teste e a especificação de aprovado/reprovado para cada sistema além, da necessidade de os métodos serem validados internamente nos laboratórios, pois vários fatores podem influenciar a magnitude do RPU medido como, por exemplo, a fonte celular e a sensibilidade do doador.

O ensaio MAT tem sido desafiado a provar sua eficácia nos diversos tipos de vacinas disponíveis. Em uma vacina bacteriana, a meningocócica C conjugada, o conteúdo pirogênico tanto de origem endotoxinas quanto não endotoxinas foi avaliado com êxito no estudo de Silva e colaboradores (2018) ao se quantificar as citocinas IL-6 e IL-1 β em WB criopreservado quando desafiado por amostras da vacina contaminadas com padrões de LPS, zymozan e LTA. Resultados consistentes foram apresentados pelo MAT reafirmando a segurança de lotes desta vacina frente aos resultados do RPT e do ensaio LAL turbidimétrico cinético recomendados para liberação do produto e, assim como frisado por Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4), a IL-6 foi sugerida como a melhor escolha de leitura para o sistema criopreservado testado.

No estudo realizado por He e colaboradores (2018), o WB criopreservado também foi utilizado como fonte de monócitos demonstrando novamente sua capacidade de avaliar o conteúdo de endotoxinas por meio da mensuração de citocinas IL-6 e IL-1 β , só que nas vacinas virais contra hepatite B e raiva. Esse experimento teve por intenção estabelecer quais as condições ideais de congelamento do sangue para a resposta de citocinas e demonstrou a viabilidade do ensaio MAT como teste de pirogenicidade nessas vacinas por verificar a correspondência de ambas as citocinas em responder de forma dependente da dose de LPS nos produtos biológicos. O sangue armazenado com DMSO a 10% em uma temperatura de -196°C foi indicado como condição ideal, já que nesta configuração, a leitura das citocinas ao desafio de LPS apresentou melhor resposta.

Oliveira (2019) se dispôs a verificar a eficiência do ensaio MAT na detecção de LPS e LTA em uma vacina experimental desenvolvida contra o Zika Vírus. A autora adotou por marcador de leitura a IL-1 β liberada em WB criopreservado. No entanto, foi observado uma resposta não satisfatória do ensaio MAT na vacina proposta. As taxas de recuperação de endotoxina apresentaram valores fora dos limites estabelecidos indicando a não precisão, exatidão e reprodutibilidade do estudo além, de os resultados sugerirem que fatores interferentes da vacina tenham influenciado no teste devido aos baixos níveis constatados da citocina mesmo nas amostras contaminadas com endotoxina. Neste estudo, o MAT se mostrou instável, sem a robustez elementar necessária a um método alternativo.

No tocante a vacinas com tecnologia OMV envolvida, a vacina contra o tipo B da bactéria *N. meningitidis* foi submetida à avaliação da concentração de diferentes tipos de endotoxinas pelo MAT no estudo de Stoddard e colaboradores (2010). As citocinas TNF- α e IL-6 foram quantificadas em WB fresco e em PBMC de acordo com as respostas relativas as atividades endotóxicas de LPS sob a forma purificada ou na forma de moléculas variantes presentes na OMV da vacina meningocócica B. O MAT foi aplicável na detecção de endotoxinas na referida vacina e ainda apresentou desempenho superior com relação aos ensaios RPT e LAL que se mostraram insensíveis na discriminação dos diferentes tipos de LPS utilizados como desafio diferentemente do MAT. O WB fresco foi sugerido pelo estudo como a fonte celular de eleição para pesquisa de ambas as citocinas na vacina meningocócica B, visto que os ensaios realizados com os monócitos isolados apresentaram sensibilidade menor diante dos diferentes tipos de LPS.

Outra pesquisa relacionando o MAT e o aprimoramento da OMV com cepas recombinantes foi desenvolvida por Kaaijk e colaboradores (2013). Uma vacina meningocócica B melhorada com característica de atividade adjuvante intrínseca devido à presença de LPS menos tóxico foi avaliada com sucesso quanto a sua pirogenicidade pelo MAT por meio da mensuração de IL-6 em MM6. Pela análise do MAT, em consequência da menor quantidade de IL-6 liberada na linhagem monocítica comparada à vacina de referência do mesmo tipo com perfil de endotoxina já estabelecido para humanos, foi possível pressupor que a nova vacina apresentava um nível de pirogenicidade aceitável.

Gerke e colaboradores (2015) fizeram uso do ensaio MAT para avaliar a reatogenicidade da vacina contra a bactéria Gram-negativa *Shigella sonnei* desenvolvida com a tecnologia *Generalized Modules of Membrane Antigens* (GMMA) contendo LPS modificado a partir de uma cepa do agente alterado geneticamente. O MAT atendeu as expectativas dos pesquisadores que buscavam um ensaio que simulasse mais de perto a imunização humana com produtos que contêm LPS intrinsecamente e, por meio da quantificação de IL-6 em PBMC a segurança da nova vacina foi demonstrada, com uma liberação de IL-6 expressivamente menor em comparação com PMBC estimulado com o GMMA parental com LPS não modificado. A verificação da pirogenicidade específica para a vacina contra o agente *Shigella*, à base de GMMA foi atendida mais uma vez pelo MAT no estudo de Carson e colaboradores (2021). Variáveis importantes foram definidas como um padrão de referência apropriado visto que o método C do MAT foi considerado o mais adequado para avaliação desta vacina, o intervalo de diluição e a citocina para detecção. A citosina IL-6 foi adotada como leitura em PBMC. Segundo os autores, os resultados da pesquisa agregaram fundamentos para a implementação deste método alternativo para vacinas baseadas em GMMA.

Na avaliação comparativa entre os resultados do RPT, realizado em lotes de soros hiperimunes em um laboratório de controle da qualidade, e do MAT, Silva e colaboradores (2016) (artigo 10) atestaram que este método alternativo é aplicável e possui elevada sensibilidade e especificidade na detecção de contaminantes neste tipo de produto biológico. Ambas citocinas IL-6 e IL-1 β foram aplicáveis como marcadoras e tanto o método A como o B do MAT avaliados foram capazes de detectar, em WB criopreservado, concentrações limites de endotoxina as quais não foram detectadas pelo RPT devido à variação biológica, não havendo assim,

resultados falso-negativos. Foram observadas diferenças nas respostas entre os métodos A e B sendo conferido o resultado da amostra como pirogênica pelo método B e não no A, embora observado neste último, que a concentração equivalente de endotoxina estivesse muito próxima da dose limite. A explicação apresentada no estudo é que possivelmente essa resposta se deve a característica do método A, com ajuste da curva padrão de endotoxina diferente do método B, onde se considerou o valor de 5 EU/mL para controle positivo de endotoxina sendo as amostras avaliadas como pirogênicas ou não pirogênicas. Em um estudo semelhante envolvendo soros hiperimunes desenvolvido por Utescher e colaboradores (2018), a IL-1 β igualmente foi a citocina marcadora para a leitura em WB criopreservado e da mesma forma, foi verificada, satisfatoriamente, a pirogenicidade de diferentes tipos de soros hiperimunes com resultados positivos e negativos no RPT com o uso do ensaio MAT. Um *kit* comercial do MAT foi utilizado na avaliação dos soros hiperimunes e forneceu todo o aparato como, o *kit* ELISA para detecção da citocina bem como o sangue criopreservado e o LPS padrão e, se mostrou capaz de detectar endotoxinas nas amostras contaminadas e ainda com resultados equivalentes ao RPT. O estudo concluiu que o uso do *kit* comercial do MAT é uma alternativa adequada em uma rotina de controle de qualidade deste tipo de produto biológico, mas, destaca que a temperatura durante o transporte e armazenamento deste material deve estar de acordo com o indicado pelo fabricante devido a sensibilidade dos reagentes a esse fator crucial que pode acarretar instabilidade ao *kit*.

4.3.3.2 Aplicabilidade do ensaio do fator C recombinante (rFC)

No quesito aplicabilidade, o método alternativo o rFC mostrou-se aplicável no único estudo que o avaliou. Bolden e Smith (2017) (artigo 1) concluíram ser o rFC um método equivalente ou superior ao método compendial BET pelo ensaio LAL. Foi demonstrado que a técnica de fluorescência de ponto final usando reagentes de rFC aplicado em insulina e medicamentos à base de anticorpos monoclonais nesta pesquisa é um método viável na substituição do ensaio LAL para pesquisa de endotoxinas bacterianas. O estudo validou com sucesso os produtos biológicos comprovando a comparabilidade do rFC e do LAL nos resultados com e sem a presença de endotoxinas nas amostras além, de constatar que o rFC se mostrou

mais específico para endotoxina, não sofrendo interferência de beta glucanas, minimizando desta forma, os resultados falso positivos.

Medicamentos à base de anticorpos monoclonais também foram um dos produtos avaliados por Chen e Mozier (2013), dentre a variedade de amostras proteicas estudadas na comparação entre os métodos do LAL e rFC. E, embora seja desafiador realizar a medição de endotoxinas bacterinas a níveis baixos em produtos de origem proteica em virtude da própria característica intrínseca da proteína de causar interferência, além das propriedades de sua formulação e de possíveis substâncias presentes, o estudo demonstrou que oito em dez amostras apresentaram resultados comparáveis quanto aos níveis de endotoxinas quando avaliadas pelos métodos LAL turbidimétrico cinético, cromogênio cinético e de ponto final e o rFC. O estudo também reforçou a insensibilidade do rFC à β -glucanas, demonstrando que as amostras reativas aos métodos LAL e não reativas ao ensaio rFC eram devido a origem fúngica das mesmas com uma quantidade significativa de glucanas.

O ensaio rFC também tem demonstrado ser aplicável a outros produtos biológicos como vacinas. No estudo realizado por Marius, Vacher e Bonnevey (2020), quatro vacinas humanas cujas matrizes eram complexas e diferentes, foram avaliadas paralelamente pelo LAL cromogênico cinético e o rFC quanto ao seu conteúdo de endotoxinas. Uma vacina era de origem viral viva atenuada contendo proteases, outra também de origem viral só que inativada e sem fatores de interferência para o ensaio de endotoxina, mais outra vacina viral inativada só que com uma forte cor vermelha capaz de possivelmente interferir com a coloração amarela do produto final no ensaio clássico LAL cromogênico e, uma outra vacina era de origem bacteriana inativada com conteúdo de endotoxina natural de antígenos Gram-negativos intrínsecos da mesma. Os autores observaram que os resultados do ensaio rFC foram comparáveis ao ensaio LAL e apontam que o primeiro é adequado para detecção de endotoxinas nas respectivas vacinas mesmo com formatos de matrizes completamente distintas.

4.4 Análise crítica dos resultados

Todos os métodos alternativos para detecção de pirogênios em produtos biológicos encontrados nos estudos selecionados desta revisão são comparados

frente às suas respectivas vantagens, desvantagens, limitações e cumprimento aos critérios do princípio dos 3Rs na Tabela 4 de acordo com as opiniões dos respectivos autores.

4.4.1 Teste de endotoxina bacteriana (LAL)

O ensaio LAL foi o primeiro método alternativo ao RPT e, indiscutivelmente, cooperou para o avanço do controle de pirogênios de origem endotoxina em medicamentos e dispositivos médicos. Contudo, no que tange a sua aplicabilidade em produtos biológicos, este método é instável, sendo permitida ou não sua utilização nos diferentes tipos de produtos biológicos e, ainda que em produtos da mesma classe. Como por exemplo, na vacina contra o vírus da febre amarela avaliada no artigo 4 por Mattos e colaboradores (2018) onde o LAL é tido como método farmacopeico oficial para a liberação do produto, mas em contrapartida, em outra vacina viral, a vacina contra o vírus da encefalite causada por carrapatos estudada por Etna e colaboradores (2020) no artigo 2, o ensaio LAL não é o método regulamentado para liberação deste produto e sim, o RPT. Embora o LAL possua como ponto favorável a vasta aceitação mundial pela qualidade de ser extremamente sensível a endotoxinas bacterianas, este método somente detecta este tipo de pirogênio, deixando de contabilizar uma série de pirogênios de origem não endotoxina biologicamente relevantes. Somado a tal característica, a susceptibilidade do método LAL a substâncias interferentes presentes nas amostras como proteínas e compostos β - glucanas, além da natureza química da mesma que pode interferir dependendo do tipo do teste do LAL escolhido, explica em parte a limitação do uso prático do ensaio do LAL em alguns produtos biológicos (SPOLADORE *et al.*, 2021). Contudo, alguns fatores limitantes podem ser superados como constatado nos estudos de Sheraba e colaboradores (2019) (artigo 3), Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4), Trivedi e colaboradores (2003) (artigo 14) e Fingola e colaboradores (2013, 2019) (artigos 15 e 16), onde o ensaio do LAL se mostrou aplicável em diferentes produtos biológicos com eliminação dos fatores interferentes quando aplicadas as estratégias de diluição das amostras, de desnaturação das proteínas interferentes por meio de aquecimento, bem como, a utilização de um tampão específico para endotoxinas com bloqueio da ação de β -glucanas. Um aspecto negativo deste teste é a sua fonte de origem animal,

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (continua).

Teste alternativo	Sistema/configuração do método alternativo	Vantagens	Desvantagens	Limitações do método	Cumprimento aos 3Rs		
					Substituição	Redução	Refinamento
rFC ¹	Fluorescência de ponto final com reagente rFC	<ul style="list-style-type: none"> - Reagente de origem não animal; - Equivalente ou superior ao método LAL; - Insensível a glucanas sendo mais específico para endotoxinas; - Método quantitativo; - Elevada sensibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram-negativas; - Poucos estudos sobre o método; - Maior tempo de duração do ensaio comparado ao LAL 	<ul style="list-style-type: none"> - Não adesão em farmacopeias como USP, FB e JP; - Susceptível a interferentes de misturas heterogêneas; - Avaliação de amostras líquidas 	SIM (endotoxinas)	SIM	SIM
LAL ²	Coágulo em gel	<ul style="list-style-type: none"> - Metodologia simples e barata com formação de um gel sólido como resultado positivo; - Maior sensibilidade comparado ao RPT; - Aplicável em produtos que não podem ser testados no RPT; - Método validado e padronizados nas diversas farmacopeias; - Aplicado em drogas que não podem ser avaliadas no RPT (radiofármacos e hipnóticos); - Custo-benefício; - Menor tempo de duração do ensaio 	<ul style="list-style-type: none"> - Medição semiquantitativa; - Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram-negativas; - Reagente de origem animal (amebócitos do caranguejo-ferradura); - Extrapolação de resultados entre espécies diferentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Sofre interferência de glucanas e proteínas; - Não quantificação de endotoxinas abaixo do nível em que se forma o gel consistente; - Quantifica somente endotoxinas livres; - Não aplicável em alguns produtos como derivados de sangue, produtos com alto teor de proteínas e lipídeos, adjuvantes de hidróxido de alumínio comuns em vacinas; - Avaliação de amostras líquidas 	NÃO (endotoxinas)	NÃO	NÃO

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (continuação).

LAL ³	Cromogênico cinético	<ul style="list-style-type: none"> - Medição quantitativa; - Maior sensibilidade comparado ao RPT; - Aplicável em produtos que não podem ser testados no RPT; - Método validado e padronizados nas diversas farmacopeias; - Aplicado em drogas que não podem ser avaliadas no RPT (radiofármacos e hipnóticos); - Custo-benefício; - Menor tempo de duração do ensaio 	<ul style="list-style-type: none"> - Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram-negativas; - Reagente de origem animal (amebócitos do caranguejo-ferradura); - Extrapolação de resultados entre espécies diferentes; - Método sofisticado com equipamentos complexos e elevado custo comparado ao LAL em coagulação em gel 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração de endotoxina na amostra calculada a partir de uma curva padrão; - Sofre interferência de glucanas e proteínas; - Quantifica somente endotoxinas livres; - Não aplicável em alguns produtos como derivados de sangue, produtos com alto teor de proteínas e lipídeos, adjuvantes de hidróxido de alumínio comuns em vacinas; - Avaliação de amostras líquidas 	NÃO (endotoxinas)	NÃO	NÃO
LAL ⁴	Turbidimétrico cinético	<ul style="list-style-type: none"> - Medição quantitativa; - Maior sensibilidade comparado ao RPT; - Aplicável em produtos que não podem ser testados no RPT; - Método validado e padronizados nas diversas farmacopeias; - Aplicado em drogas que não podem ser avaliadas no RPT (radiofármacos e hipnóticos); - Custo-benefício; - Menor tempo de duração do ensaio 	<ul style="list-style-type: none"> - Detecta somente endotoxinas de bactérias Gram-negativas; - Reagente de origem animal (amebócitos do caranguejo-ferradura); - Extrapolação de resultados entre espécies diferentes; - Método sofisticado com equipamentos complexos e elevado custo comparado ao LAL em coagulação em gel 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentração de endotoxina na amostra calculada a partir de uma curva padrão; - Sofre interferência de glucanas e proteínas; - Quantifica somente endotoxinas livres; - Não aplicável em alguns produtos como derivados de sangue, produtos com alto teor de proteínas e lipídeos, adjuvantes de hidróxido de alumínio comuns em vacinas; - Avaliação de amostras líquidas 	NÃO (endotoxinas)	NÃO	NÃO

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (continuação).

MAT ⁵	Método A	<ul style="list-style-type: none"> - Medição quantitativa; - Elevada sensibilidade, especificidade; - Fundamentado no princípio da febre - Aplicável em produtos não avaliados no LAL e no RPT como quimioterápicos e imunossupressores; - Substratos de origem humana, sem extrapolação de resultados entre espécies diferentes; - Método compendial aceito para avaliação de endotoxinas; - Insensível a interferência de glucanas 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior tempo de resultado comparado ao LAL; - Maior custo comparado ao LAL 	<ul style="list-style-type: none"> - Poucos produtos validados; - Adotado somente pela FE; - Paralelismo entre as curvas de resposta de endotoxina e do produto 	SIM	SIM	SIM
MAT ⁶	Método B	<ul style="list-style-type: none"> - Medição quantitativa; - Elevada sensibilidade, especificidade; - Fundamentado no princípio da febre - Aplicável em produtos não avaliados no LAL e no RPT como quimioterápicos e imunossupressores; - Substratos de origem humana, sem extrapolação de resultados entre espécies diferentes; - Método compendial aceito para avaliação de endotoxinas; - Insensível a interferência de glucanas 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior tempo de resultado comparado ao LAL; - Maior custo comparado ao LAL 	<ul style="list-style-type: none"> - Poucos produtos validados; - Adotado somente pela FE; - Paralelismo entre as curvas de resposta de endotoxina e do produto 	SIM	SIM	SIM

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (continuação).

MAT ⁷	Método C	<ul style="list-style-type: none"> - Medição quantitativa; - Elevada sensibilidade, especificidade; - Fundamentado no princípio da febre - Aplicável em produtos não avaliados no LAL e no RPT como quimioterápicos e imunossupressores; - Substratos de origem humana, sem extrapolação de resultados entre espécies diferentes; - Método compendial aceito para avaliação de endotoxinas; - Insensível a interferência de glucanas; - Aplicável em produtos com conteúdo pirogênico inerentemente elevado 	<ul style="list-style-type: none"> - Maior tempo de resultado comparado ao LAL; - Maior custo comparado ao LAL 	<ul style="list-style-type: none"> - Poucos produtos validados; - Adotado somente pela FE; - Segurança na definição do lote do produto validado como referência 	SIM	SIM	SIM
MAT ⁸	WB fresco	<ul style="list-style-type: none"> - Sensível a todos os tipos de pirogênios; - Menor possibilidade de contaminação por não realizar isolamento das células; - Aplicável em amostras ambientais como poeira e ar e material sólido; - Matriz de monócitos em composição natural no sangue junto a outros componentes; - Menor custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de doadores de sangue a cada ensaio; - Risco de flebotomia; - Variabilidade biológica; - Risco de infecção; - Pouco tempo hábil de viabilidade das células; - Triagem dos doadores para garantir biossegurança quanto a patógenos 	<ul style="list-style-type: none"> - Normas legais para doação de sangue; - Biossegurança para pesquisa de patógenos com triagem dos doadores 	SIM	SIM	SIM

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (continuação).

MAT ⁹	WB criopreservado	<ul style="list-style-type: none"> - Sensível a todos os tipos de pirogênios; - Menor possibilidade de contaminação por não realizar isolamento das células; - Aplicável em amostras ambientais como poeira, ar e material sólido; - Maior biossegurança; - Disponibilidade das amostras de sangue; - Menos custoso que o WB fresco; - Maior praticidade; - Matriz de monócitos em composição natural no sangue junto a outros componentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de doadores de sangue; - Variabilidade biológica; - Presença de DMSO - Triagem dos doadores para garantir biossegurança quanto a patógenos 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizado imediatamente após o descongelamento; - Manutenção da temperatura de conservação (-70°C); - Biossegurança para pesquisa de patógenos com triagem dos doadores 	SIM	SIM	SIM
MAT ¹⁰	PBMC fresco	<ul style="list-style-type: none"> - Sensível a todos os tipos de pirogênios; - Podem ser obtidos de filtros leucocitários que são utilizados para a separação de sangue em centros de doação; - Elevada sensibilidade, especificidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de contaminação por manipulação; - Necessidade de doadores de sangue a cada ensaio; - Pouco tempo hábil de viabilidade das células 	<ul style="list-style-type: none"> - Normas legais para doação de sangue; - Biossegurança para pesquisa de patógenos com triagem dos doadores 	SIM	SIM	SIM
MAT ¹¹	PBMC criopreservado	<ul style="list-style-type: none"> - Sensível a todos os tipos de pirogênios; - Elevada sensibilidade, especificidade; - Disponibilidade para uso em escala industrial 	<ul style="list-style-type: none"> - Risco de contaminação por manipulação; - Necessidade de doadores de sangue; - Presença de DMSO 	<ul style="list-style-type: none"> - Manutenção da temperatura de conservação (-70°C); - Biossegurança para pesquisa de patógenos com triagem dos doadores 	SIM	SIM	SIM

Tabela 4: Análise crítica, segundo os autores, dos testes alternativos ao teste de pirogênio *in vivo* utilizados nos estudos selecionados (conclusão).

MAT ¹²	MM6	<ul style="list-style-type: none"> - Sensível a todos os tipos de pirogênios; - Praticidade com células pronto para uso, sem doador; - Padronização (ausência de outros produtos derivados do sangue); - Maior reprodutibilidade comparada ao WB e PBMC; - Elevada sensibilidade, especificidade (menos que o WB) 	- Monócitos fora da composição natural no sangue;	- Infraestrutura laboratorial	SIM	SIM	SIM
MAT ¹³	IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - Mais responsiva frente aos diferentes estímulos pirogênicos; - Permite medições mais sensíveis; - Marcador de leitura mais sensível em todas as fontes celulares 			SIM	SIM	SIM
MAT ¹⁴	IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> - Responsiva frente aos diferentes estímulos pirogênicos; - Marcador de leitura sensível em todas as fontes celulares 	- Não liberada totalmente do interior da célula		SIM	SIM	SIM
MAT ¹⁵	TNF α	<ul style="list-style-type: none"> - Responsiva frente aos diferentes estímulos pirogênicos; - Marcador de leitura sensível em todas as fontes celulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Não liberada totalmente do interior da célula; - Não sensível a todos os estímulos pirogênicos 	- Liberação suprimida pelos monócitos na presença de DMSO (fontes de monócitos criopreservados)	SIM	SIM	SIM

¹ Bolden e Smith (2017) (artigo 1).

² Sheraba e colaboradores (2019) (artigo 3); Solano, Gómez e León (2015) (artigo 9); Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11); Geier e Geier (2002a) (artigo 12); Trivedi e colaboradores (2003) (artigo 14).

³ Bolden e Smith (2017) (artigo 1); Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Fingola e colaboradores (2013, 2019) (artigos 15 e 16).

⁴ Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6).

⁵ Etna e colaboradores (2020) (artigo 2); Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8); Silva e colaboradores (2016) (artigo 10); Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11); Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13).

⁶ Etna e colaboradores (2020) (artigo 2); Silva e colaboradores (2016) (artigo 10).

⁷ Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8).

⁸ Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6); Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11).

⁹ Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Silva e colaboradores (2016) (artigo 10).

¹⁰ Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11).

¹¹ Etna e colaboradores (2020) (artigo 2); Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8).

¹² Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13).

¹³ Etna e colaboradores (2020) (artigo 2); Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6); Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8); Silva e colaboradores (2016) (artigo 10); Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11); Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13).

¹⁴ Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4); Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8); Silva e colaboradores (2016) (artigo 10).

¹⁵ Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5); Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8).

rFC: Fator C Recombinante; LAL: *Limulus Amebocyte Lysate* (Lisado de Amébócitos de *Limulus*); MAT: *Monocyte Activation Test* (Teste de Ativação de Monócitos); RPT: *Rabbit Pyrogen Test* (Teste de Pirogênio em Coelhos); PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell* (Células Mononucleares do Sangue Periférico); WB: *Whole Blood* (Sangue Total); MM6: Mono Mac 6; IL: Interleucina; TNF: Fator de Necrose Tumoral; USP: *United States Pharmacopeia* (Farmacopeia dos Estados Unidos da América); FB: Farmacopeia Brasileira; FE: Farmacopeia Européia; JP: *Japanese Pharmacopoeia* (Farmacopeia Japonesa); °C: Graus Celsius; DMSO: Dimetilsulfóxido

Fonte: (ELABORADO PELA AUTORA, 2022).

que são os amebócitos do caranguejo-ferradura sensíveis a endotoxina bacteriana, obtidos por meio da punção do sangue destes animais. Esta prática gera uma crescente ameaça de extinção da espécie de *Limulus* relacionada aos testes do LAL (TAMURA; REICH; NAGAOKA, 2021; TINDAL; DEMIRCIOGLU; UHLIG, 2021).

4.4.2 Teste de ativação de monócitos (MAT)

O ensaio MAT com uso de sangue humano é um método alternativo promissor por reunir vantagens consideráveis frente ao ensaio do LAL como a capacidade de detectar uma gama de pirogênios como o RPT, não sofrer intercorrência pela diferença entre espécies e, não ser de origem animal. A responsividade do MAT a pirogênios de diversas origens pôde ser verificada por desafios ao sistema com LPS, LTA e zymosan, como nos experimentos de Etna e colaboradores (2020), Mattos e colaboradores (2018) e Andrade e colaboradores (2003) nos artigos 2, 4 e 11, respectivamente. Um dos obstáculos para a implementação desta metodologia é principalmente o acesso aos monócitos humanos, mas, alternativas a essa questão como a criopreservação e o uso de linhagens celulares monocíticas que tornam o método analítico mais fácil, também foram explorados nos artigos de Etna e colaboradores (2020) (artigo 2), Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4), Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5), Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7), Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8), Silva e colaboradores (2016) (artigo 10) e Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13).

Embora cada vez mais o MAT comprove sua viabilidade por meio de estudos que embasam seu uso em diversos produtos, dentre eles os biológicos, ainda não há uma conformidade com relação a sua aceitação regulatória pelo mundo, sendo reconhecido somente por poucos compêndios internacionais (KORYAKINA; FREY; BRUEGGER, 2014; HARTUNG, 2021; SPOLADORE *et al.*, 2021). O ensaio permite várias possibilidades de configuração, não somente quanto à fonte de monócitos utilizada, mas, o tipo de citocina liberada pelos monócitos avaliada como marcador da leitura do MAT sendo IL-1 β , IL-6 e TNF- α as citocinas mais comuns. Ainda não está estabelecida a diferença e a aplicabilidade de cada citocina estimulada conforme o tipo de pirogênio e a fonte de monócitos e tal esclarecimento tem sido alvo de diversos estudos que avaliam paralelamente as respostas de cada citocina como observado nos estudos de Mattos e colaboradores (2018) (artigo 4),

Studholme e colaboradores (2019) (artigo 5), Valentini e colaboradores (2019) (artigo 8) e Silva e colaboradores (2016) (artigo 10). Contudo, a citocina IL-6 foi a mais utilizada dentre os estudos selecionados que fizeram uso do MAT nesta revisão sendo eleita como leitura do ensaio nas pesquisas de Etna e colaboradores (2020) (artigo 2), Zervos e colaboradores (2019) (artigo 6), Vipond e colaboradores (2019) (artigo 7), Andrade e colaboradores (2003) (artigo 11) e Moesby, Hansen e Christensen (2000) (artigo 13) talvez por ser totalmente liberado em meio de cultura diferentemente de IL-1 β e TNF- α em que uma fração permanece no interior das células e no geral responder com mais intensidade nos diferentes formas disponíveis dos monócitos (STOPPELKAMP *et al.*, 2017).

4.4.3 Ensaio do fator C recombinante (rFC)

O ensaio rFC mostra-se um forte candidato à substituição do ensaio LAL na garantia de segurança de produtos biológicos quanto à concentração de endotoxinas pois abrange em seu escopo qualidades-chaves de um método alternativo, como a padronização da especificidade e sensibilidade além de, atender ao princípio ético do não uso de animais. Seu advento vem suprir a concomitante necessidade de remoção de endotoxinas e, atuar no desenvolvimento de tecnologias terapêuticas e diagnósticas, de forma sensível, rápida e precisa, por meio de uma fonte confiável e com segurança de abastecimento. Assim, a consistência e a sustentabilidade aprimoradas são as principais vantagens do reagente rFC. Cabe destacar tamanha importância desses benefícios visto que podem facilitar o controle dos processos de fabricação assim como os testes, somado ao seu caráter sustentável já que pode ser realizado em quantidades ilimitadas (MARIUS; VACHER; BONNEVAY, 2020; USP, 2020). A natureza recombinante do rFC permite ao ensaio maior especificidade para endotoxina por não ser afetada pela via do Fator G, a qual pode atuar também no aparecimento de falso-positivos, melhor reprodutibilidade pela produção consistente do reagente e, maior sensibilidade ao utilizar a detecção por fluorescência ao invés da absorvância utilizada nas versões clássicas do LAL. De um modo geral, o método sofre menos interferências e apresenta uma menor taxa de resultados inválidos, impactando assim, na melhora da consistência dos lotes do produto (DING; HO, 2001; MARIUS; VACHER; BONNEVAY, 2020). O ensaio BET baseado em rFC tem por base a evolução tecnológica na área de estudos com

endotoxinas e produziu resultados equivalentes aos métodos compendiais do LAL por se apresentar como uma plataforma automatizada contribuindo para análises com menos probabilidade de erros humanos (TINDAL; DEMIRCIUGLU; UHLIG, 2021). No artigo 1, Bolden e Smith (2017) verificaram e apontaram muitos desses benefícios do rFC em seu experimento. Contudo, a estabilidade das proteínas do rFC, o tipo de amostra, o tempo de duração da análise e o custo do produto são alguns dos fatores limitantes ou que interferem neste teste (SCHNEIER *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

Esta revisão de escopo identificou que os testes alternativos farmacopeicos utilizados para avaliação da pirogenicidade (os ensaios rFC, LAL e MAT) enfrentam desafios quanto a sua aplicabilidade plena nos diferentes produtos biológicos para a completa substituição do ensaio RPT sendo necessário, que cada teste assim como cada uma das possibilidades de seus respectivos formatos, sejam avaliados individualmente para uma verificação específica por produto.

Contudo, de um modo geral, todos são passíveis de uso quando adaptados para superar as intercorrências que os afetam de acordo com as particularidades de cada produto biológico.

Embora modesto, o quantitativo de estudos selecionados nesta revisão demonstra, de um modo geral, que o uso dos métodos alternativos para avaliação de pirogênios nos principais produtos biológicos avaliados, não segue uma padronização, evidenciando desta forma a dificuldade em se estabelecer uma estratégia integrada dos mesmos em um campo tão abrangente como no de produtos biológicos. Não obstante a isso, uma proposta de uso conjunto dos testes do LAL e do MAT poderia ser uma possibilidade factível para os soros hiperimunes avaliados nos artigos 10, 15 e 16 onde os produtos com resultado negativo no teste do LAL passariam pela análise do MAT e assim, o uso de animais na avaliação de pirogenicidade neste produto biológico seria substituído.

Concernente a pesquisa de endotoxinas bacterianas em produtos biológicos, ambos os ensaios rFC e LAL demonstraram ser viáveis, no entanto, a substituição ao RPT é parcial, visto que tais métodos alternativos são aplicáveis somente para detecção deste tipo de pirogênio.

O ensaio rFC, por ser totalmente independente de fonte de origem animal, se mostrou um método alternativo propício à substituição do ensaio do LAL sendo validado para insulina e anticorpos monoclonais na detecção de endotoxinas. Os resultados do ensaio rFC foram equivalentes ou superiores aos do teste do LAL quando empregado a técnica de fluorescência de ponto final e, comprovaram, por meio da ausência de reação aos interferentes de beta glucanas, a especificidade deste teste para endotoxinas.

O método do LAL de coagulação em gel foi validado, satisfatoriamente, para uso em vários produtos biológicos como vacinas alergênicas bem como vacina

tríplice e dupla bacteriana, albumina, insulina e eritropoietina na condição de serem realizados testes para garantir a não ocorrência de fatores de interferência como as estratégias de diluição das amostras, de desnaturação das proteínas interferentes por meio de aquecimento, e a utilização de um tampão específico para endotoxinas com bloqueio da ação de β -glucanas. Somado a tais estratégias, a harmonização dos critérios de aceitação do RPT e do LAL para eliminar diferenças entre os métodos, também possibilitou a validação do método do LAL de coagulação em gel para uso em soros hiperimunes. Os métodos cinéticos cromogênico e turbidimétrico do teste do LAL também foram validados com êxito, respectivamente, para uso em soros hiperimunes quando estabelecidas as diluições não interferentes das amostras e os limites de endoxina para cada tipo de soro e, para imunoglobulina humana.

Presumivelmente, o ensaio MAT é o método alternativo com maior atributo para a completa substituição ao RPT, todavia, diante das diversas opções de métodos do ensaio, tanto relativo à escolha da citocina marcadora, da disposição dos monócitos a serem utilizados no ensaio bem como, a forma de avaliação do método podendo ser ou não comparado a uma curva padrão de endotoxina, ainda há uma lacuna de conhecimento relativo ao uso e funcionalidade de cada uma dessas variáveis para avaliação de produtos biológicos.

Apesar disso, todas as fontes de monócitos assim como as citocinas marcadoras desafiadas nos estudos do MAT comprovaram a aplicabilidade do teste em diferentes produtos biológicos como vacinas virais, vacina bacteriana com tecnologia de OMV, soros hiperimunes, imunoglobulina humana, insulina, albumina, eritropoietina e somatropina. Entretanto, a escolha do método de avaliação do MAT (A, B ou C) deve ser criteriosa para os diferentes produtos biológicos de acordo com suas particularidades, observando o atendimento ou não do requisito de paralelismo entre as curvas dose-resposta do produto em teste e do padrão de endotoxina, como notado na avaliação da pirogenicidade pelo MAT da vacina bacteriana com tecnologia OMV e na vacina viral TBEV.

Quanto ao cumprimento ao princípio dos 3Rs, os ensaios rFC e MAT demonstram ser os métodos alternativos ideais por não utilizarem nenhuma fonte de origem animal.

REFERÊNCIAS

- ABATE, W.; SATTAR, A. A.; LIU, J.; CONWAY, M. E.; JACKSON, S. K. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus ameobocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, p. 888-897. 2017.
- ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I.F. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 45, ano XIV, Brasília – DF, 2008.
- AKBAR, J. B.; KAMARUZZAMAN, B.Y.; JALAL, K. C. A.; ZALEHA, K. TAL - a source of bacterial endotoxin detector in liquid biological samples. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 2, p. 423-425. 2012.
- ALLEN, D.; CLIPPINGER, A.; MOREFIELD, S.; CASEY, W.; GHOSH, C.; GOODE, J.; BROWN, J. Using de Monocyte Activation Test for Medical Devices. MAT Workshop: SOT 2019 Annual Meeting. 2019. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/sot19/allen-poster-508.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2020.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.
- ANDRADE, S. M. **Avaliação de metodologias de controle de qualidade de biomedicamentos de tecnologia DNA recombinante de uso humano**. 2007. Monografia (Especialização) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.
- ANDRADE, S. S.; SILVEIRA, R. L.; SCHMIDT, C. A.; JÚNIOR, L. B.; DALMORA, S. L. Comparative evaluation of the human whole blood and human peripheral blood monocyte tests for pyrogens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 115-124. 2003.
- ARKSEY, H.; O'MALLEY, L. Scoping Studies: Towards a Methodological Framework. **International Journal of Social Research Methodology**, v. 8, n. 1, p. 19-32. 2005.
- BAESHEN, N. A.; BAESHEN, M. N.; SHEIKH, A.; BORA, R. S.; AHMED, M. M. M.; RAMADAN, H. A. I.; SAINI, K. S.; REDWAN, E. M. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 141. 2014.
- BALDY, J. L. S. Bases imunológicas para o uso de vacinas, soros e imunoglobulinas na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas. **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 15-28. 1981.
- BINDING, N.; JASCHINSKI, S.; WERLICH, S.; BLETZ, S.; WITTING, U. Quantification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxin) by GC–MS determination

of 3-hydroxy fatty acids. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 1, p. 65-70. 2004.

BIOMERIEUX. Bacterial endotoxin testing: 10 reasons to choose recombinant factor C. 2021. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/pharma-healthcare/resources/white-papers/2021-01-27-bacterial-endotoxin-testing-10-reasons-choose>. Acesso em: 23 set. 2021.

BOLDEN, J.; SMITH, K. Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 71, n. 5, p. 405-412. 2017.

BOOTH, A. The literature review: its role within research. *In*: BOOTH, A; SUTTON, A; PAPAIOANNOU, D. **Systematic approaches to a successful literature review**. Los Angeles: Ed. Sage, 2016.

BORTON, L. K.; COLEMAN, K. P. Material-Mediated Pyrogens in Medical Devices: Applicability of the In Vitro Monocyte Activation Test. **ALTEX**, v. 35, n. 4. 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 17, de 03 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 4 jul. 2014a. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-17-de-03.07.2014-D.O.U.-de-04.07.2014-Secao-I-Pag.-51.pdf. Acesso em: 07 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 25 set 2014b. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf. Acesso em: 07 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 19 ago. 2016. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf. Acesso em: 07 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 45, de 22 de outubro de 2019. Reconhece método alternativo Teste de Ativação de Monócitos ao uso de

animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 25 out. 2019b. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-45.pdf. Acesso em: 10 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria Nº 491, de 03 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 05 jul. 2012. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/portarias/migracao/Portaria_MCTI_n_491_de_03072012.html. Acesso em: 10 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 16 jun. 2014d. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170553/04145350-rdc-anvisa-34-2014.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 22 ago. 2019d. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-301-de-21-de-agosto-de-2019-211914064>. Acesso em: 26 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 73, de 21 de outubro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para procedimento de liberação de lotes de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 2 dez. 2008a. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0073_21_10_2008.html. Acesso em: 06 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 17 dez. 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_55_2010_COMP.pdf/bb86b1c8-d410-4a51-a9df-a61e165b9618. Acesso em: 20 set. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Instrução Normativa Nº 36, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Insumos e Medicamentos Biológicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 22 ago. 2019a. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-36-de-21-de-agosto-de-2019-211913888>. Acesso em: 28 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. 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**: Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**, 5 ed., Brasília/DF. 2019c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**, Brasília/DF. 2014c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais**, 3 ed., Brasília/DF. 2006.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 15 jul. 2009.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 13 fev. 1998.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 6.360, 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 24 set. 1976.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 10.205, de 8 de outubro de 2008. Dispõe sobre o estabelecimento de procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, DF, 8 out. 2008b.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable Levels of Endotoxin in Vaccine Formulations During Preclinical Research. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1. 2011.

BRUM, R. C. S. **Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco Alfainterferona 2b Humana Recombinante**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2009.

BUSS, N. A. P. S.; HENDERSON, S. J.; MCFARLANE, M.; SHENTON, J. M.; HAAN, L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, p. 615-622. 2012.

CALDEIRA, C. S. **Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária: comparação dos métodos in vitro e in vivo aplicados ao controle de qualidade**. 2015. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2015.

CARLIN, G.; VIITANEN, E. In vitro pyrogenicity of a multivalent vaccine: Infanrix. **Pharmeuropa**, v. 15, p. 418-423. 2003.

CARLIN, G.; VIITANEN, E. In vitro pyrogenicity of the diphtheria, tetanus and acellular pertussis components of a trivalent vaccine. **Vaccine**, v. 23, p. 3709-3715. 2005.

CARSON, D.; MYHILL, S.; PALMIERI, E.; NECCHI, F.; RIJPKEMA, S.; MICOLI, F.; NORDGREN, I. K.; ROSSI, O.; VIPOND, V. Development of a Monocyte Activation Test as an Alternative to the Rabbit Pyrogen Test for Mono- and Multi-Component Shigella GMMMA-Based Vaccines. **Microorganisms**, v. 9, n. 7. 2021.

CARVALHO, Y. M. Do velho ao novo: a revisão de literatura como método de fazer ciência. **Revista Thema**, v. 16, n. 4, p. 913-928. 2019.

CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Mecanismos de defesa contra infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 74, supl. 1. 1998.

CELLI, C.; ARNAULT, M.; BAUMSTUMMLER, A. Detection of pyrogens in hormone-based drugs with the PyroMAT™ System. Application Note – Millipore. 2018.

Disponível em:

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/293/740/quantif-pyrogens-in-hormone-an3292en-mk.pdf>. Acesso em: 11 out. 2021.

CHARLES RIVER. Gel-Clot Endotoxin Test. Disponível em:

<https://www.criver.com/products-services/qc-microbial-solutions/endotoxin-testing/lal-reagents-accessories/gel-clot-lal?region=3621>. Acesso em: 16 set. 2021.

CHEN, L.; MOZIER, N. Comparison of Limulus amoebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 80, p. 180-185. 2013.

CHERRY, J. D. Historical Review of Pertussis and the Classical Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, supl. 3, p. 259-263. 1996.

COCEANI, F.; BISHAI, I.; LESS, J.; SIRKO, S. Prostaglandin E₂ and fever: a continuing debate. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 59, p. 169-174. 1986.

COELHO, J. T. A. **Anticorpos monoclonais**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

COLQUHOUN, H. L.; LEVAC, D.; O'BRIEN, K. K.; STRAUS, S.; TRICCO, A. C.; PERRIER, L. KASTNER, M.; MOHER, D. Scoping reviews: time for clarity in definition, methods, and reporting. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 64, p. 1291-1294. 2014.

CONCEIÇÃO, A. B. A. **Anticorpos monoclonais**. 2021. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2021.

COOPER, J. F. Resolving LAL Interferences. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 13-15. 1990.

COUNCIL OF EUROPE. European Pharmacopoeia to put an end to the rabbit pyrogen test. Disponível em: <https://www.edqm.eu/en/news/european-pharmacopoeia-put-end-rabbit-pyrogen-test>. Acesso em: 19 set. 2021.

CUNHA, L. E. Soros antiofídicos: história, evolução e futuro. **Journal Health NPEPS**, n. 2, supl. 1, p. 1 – 4. 2017.

DAWSON, M. E. Interference with the LAL Test and How to Address It. **LAL Update**, v. 22, n. 3. 2005.

DEMICHELI, V.; DEBALINI, M. G.; RIVETTI, A. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 1. 2009.

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

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 22, p. 1413-1418. 1984.

DING, J. L.; HO, B. A new era in pyrogen testing. **TRENDS in Biotechnology**, v. 19, n. 8. 2001.

DOMINGUES, C. M. A. S.; ABREU, R. G.; OSPINA, M. L.; MONDRAGON, N. F. Produção de Antivenenos: experiências e desafios de Brasil e Colômbia. **Revista Saúde ao Sul**, n. 10, p. 3-4. 2017.

DOMINGUES, C. M. A. S.; WOYCICKI, J. R.; RESENDE, K. S.; HENRIQUES, C. M. P. Programa Nacional de Imunização: a política de introdução de novas vacinas. **Revista Eletrônica Gestão e Saúde**, v. 6, n. 4, p. 3250-74. 2015.

DUBCZAK, J.; REID, N.; TSUCHIYA, M. Evaluation of limulus amoebocyte lysate and recombinant endotoxin alternative assays for an assessment of endotoxin detection specificity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 159. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES. Hospitais Universitários Federais. Protocolo de Transfusão Segura de Hemocomponentes. 2018. Disponível

em:

<http://www2.ebserh.gov.br/documents/220250/3051126/Protocolo+de+Tranfus%C3%A3o+Segura+HULW+2018.pdf/a495501f-531d-4990-a6f7-202f10a08991>. Acesso em: 13 mar. 2021.

(EMA) – THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Guideline on plasma-derived medicinal products. 2011. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plasma-derived-medicinal-products_en.pdf. Acesso em: 12 out. 2021.

(EMA) – THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Guideline on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products. Londres, 2009. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-replacement-rabbit-pyrogen-testing-alternative-test-plasma-derived-medicinal-products_en.pdf. Acesso em: 09 out. 2021.

(EMA) – THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. Pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines. Londres, 1998. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-pharmaceutical-biological-aspects-combined-vaccines_en.pdf. Acesso em: 03 out. 2021.

EPERON, S.; GROOTE, D. D.; FELMAYER, G. W.; JUNGI, T. W. Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 207, n. 2, p. 135-145. 1997.

ESKES, C.; SÁ-ROCHA, V. M.; NUNES, J.; PRESGRAVE, O.; CARVALHO, D.; MASSON, P.; RIVERA, E.; COECKE, S.; KREYSA, J.; HARTUNG, T. Proposal for a Brazilian Centre on Alternative Test Methods. **ALTEX**, v. 26, n. 4. 2009.

ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; RIZZO, F.; SEVERA, M.; RICCI, D.; SHAID, S.; LAMBRIGTS, D.; VALENTINI, S.; STAMPINO, L. G.; ALLERI, L.; GAGGIOLI, A.; HUNOLSTEIN, C. V.; SPREITZER, I.; COCCIA, E. M. Optimization of the Monocyte-Activation-Test for Evaluating Pyrogenicity of Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccine. **ALTEX**, v. 37, n. 4, p. 532-544. 2020.

EUREKA. Eureka Staff. Recombinant Factor C Under the Microscope. 2018. Disponível em: <https://www.criver.com/eureka/recombinant-factor-c-under-the-microscope>. Acesso em: 22 set. 2021.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed., v. 1, Brasília: ANVISA, 2019.

FARMACOPEIA Europeia. 10 ed., Endotoxin test. General Method. Strasbourg: Council of Europe, cap. 2.6.14. 2020a.

FARMACOPEIA Europeia. 7 ed., Monocyte activation test. General Method. Strasbourg: Council of Europe, cap. 2.6.30. 2010.

FARMACOPEIA Europeia. 9 ed. Eur. Supplement 9.2 Monocyte-activation test. General Method. Strasbourg: Council of Europe, cap. 2.6.30, 2017.

FARMACOPEIA Europeia. 10 ed. Eur. Supplement 10.3 Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C, cap. 2.6.32, 2020b.

(FDA) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry - Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. 2012. Disponível em: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-pyrogen-and-endotoxins-testing-questions-and-answers#_Toc315937922. Acesso em 19 out. 2020.

(FDA) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. [Letter from Norris E. Alderson, PhD, FDA Associate Commissioner for Science, to RADM William S. Stokes, Director NICEATM]. U.S. 2009. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/pyrogen/transmitnov08/fda-response.pdf>. Acesso em 12 nov. 2020.

FERNANDES, E. G. **Avaliação de custo-efetividade da introdução da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) no calendário de imunização de adultos do Programa Nacional de Imunizações no Brasil**. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FERREIRA, B. Produção pública de insulina. Cadernos de Farmanguinhos. 2007. Disponível em: <http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/producaoinsulinabarbara.pdf>. Acesso em: 11 out. 2021.

FINGOLA, F. F.; ALBERTINO, S. R. G.; ABRANTES, S. M. P.; ZAMITH, H. P. S. Intralaboratory validation of kinetic chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for bacterial endotoxin determination in anti-botherpic serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 58, p. 93-98. 2013.

FINGOLA, F. F.; ALBERTINO, S. R. G.; ABRANTES, S. M. P.; ZAMITH, H. P. S. Proposed reduction of the in vivo pyrogen test by the in vitro LAL assay for the quality control of anticrotalic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera. **Toxicology in Vitro**, v. 59, p. 292-299. 2019.

FINGOLA, F.F. **Proposta de substituição do ensaio de pirogênio (*in vivo*) pelo ensaio do LAL (Método Cromogênico Cinético – *in vitro*) no controle de qualidade dos soros anticrotálico, antiescorpion, antirrábico e antitetânico**. 2018. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2018.

FINKELMAN, M. A.; LEMPITSKI, S. J.; SLATER, J. E. β -Glucans in standardized allergen extracts. **Journal of Endotoxin Research**, v. 12, n. 4, p. 241-245. 2006.

FRAGATA, C. G. **Plasma humano: componentes e derivados (conservação e utilização terapêutica em ambiente hospitalar)**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal, 2014.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao Teste de Pirogênio com soros hiperimunes sujeitos à Vigilância Sanitária.** 2008. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008.

FUKUMORI, N. T.O. **Determinação de Endotoxina Bacteriana (Pirogênio) em Radiofármacos pelo Método de Formação de Gel. Validação.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

FUNG, F. M.; SU, M.; FENG, H.; LI, S. F. Y. Extraction, separation and characterization of endotoxins in water samples using solid phase extraction and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1. 2017.

GEIER, D. A.; GEIER, M. R. Clinical Implications of Endotoxin Concentrations in Vaccines. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 36, n. 5, p. 776-780. 2002a.

GEIER, D. A.; GEIER, M. R. Serious neurological conditions following pertussis immunization: an analysis of endotoxin levels, the vaccine adverse events reporting system (VAERS) database and literature review. **Pediatric Rehabilitation**, v. 5, n. 3, p. 177-182. 2002b.

GEIER, M. R.; STANBRO, H.; MERRIL, C. R. Endotoxins in Commercial Vaccines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, n. 3, p. 445-449. 1978.

GERKE, C.; COLUCCI, A. M.; GIANNELLI, C.; SANZONE, S.; VITALI, C. G.; SOLLAI, L.; ROSSI, O.; MARTIN, L. B.; AUERBACH, J.; CIOCCIO, V. D.; SAUL, A. Production of a Shigella sonnei Vaccine Based on Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA), 1790GAHB. **PLoS One**, v. 10, n. 8. 2015.

GRANT, M. J.; BOOTH, A. A typology of reviews: an analysis of 14 review types and associated methodologies. **Health Information and Libraries Journal**, v. 26, n. 2, p. 91-108. 2009.

GU, T.; ZHENG, Y.; GU, Y.; HALDANKAR, R.; BHALERAO, N.; RIDGWAY, D.; WIEH, P. E.; CHEN, W. Y.; KOPCHIC, J. J. Purification of a Pyrogen-Free Human Growth Hormone Antagonist. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 48, p. 520-528. 1995.

GUIMARÃES, D. S. **Controle de Endotoxina na indústria Farmacêutica – Análise dos Métodos In Vivo e In Vitro.** 2017. Monografia (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Rio de Janeiro, 2017.

GUTIERREZ, F. B. **Implementação e otimização do teste LAL para análise de LPS de cianobactérias em cultura e da região estuarina da lagoa dos patos e praia adjacente.** 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2007.

HAN, Q.; HU, R.; LI, H.; LEI, Z.; ZHANG, X.; YU, X.; ZHANG, Q.; MAO, Y.; WANG, X.; IRWIN, D. M.; NIU, G.; TAN, H. Application of a TLR overexpression cell model in pyrogen detection. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 7, p. 1269–1279. 2019.

HANSEN, E. W.; CHRISTENSEN, J. D. Comparison of cultured human mononuclear cells, limulus amebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 15, p. 425-433, 1990.

HARTUNG, T. Pyrogen Testing Revisited on Occasion of the 25th Anniversary of the Whole Blood Monocyte Activation Test. **ALTEX**, v. 38, n. 1. 2021.

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: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. **ATLA**, v. 29, p. 99-123, 2001.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. **ALTEX**, v. 12, n. 2, p. 70-75, 1995.

HASIWA, N.; DANESHIAN, M.; BRUEGGER, P.; FENNRICH, S.; HOCHADEL, A.; HOFFMANN, S.; RIVERA-MARIANI, F. E.; ROCKEL, C.; SCHINDLER, S.; SPREITZER, I.; STOPPELKAMP, S.; VYSYARAJU, K.; HARTUNG, T. Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. **ALTEX**, v. 30, n. 2, p. 169-208. 2013.

HASSAN, R.; ELNAGAR, W.; HABIB, E. E.; EL-MOWAFY, M. A.; EL-SANDOUBY, A. A. Evaluation of lal test interference in some egyptian parenteral drugs alone and in combinations. **New Egyptian Journal of Microbiology**, v. 48. 2017.

HE, Q.; GAO, H.; XU, L.; LU, Y.; WANG, C.; RUI, J.; FAN, H.; WANG, X.; WANG, J. Analysis of IL-6 and IL-1b release in cryopreserved pooled human whole blood stimulated with endotoxin. **Innate Immunity**, v. 24, n. 5, p. 316-322. 2018.

HEMOCENTRO CAMPINAS. Manual de orientações em hemoterapia. UNICAMP. 2018. Disponível em: <https://www.hemocentro.unicamp.br/arquivos/2018/09/Manual-de-Orienta%C3%A7%C3%B5es-em-Hemoterapia-2018.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

HOFFMANN, S.; PETERBAUER, A.; SCHINDLER, S.; FENNRICH, S.; POOLE, S.; MISTRY, Y.; MONTAG-LESSING, T.; SPREITZER, I.; LOSCHNER, B.; AALDEREN, M. V.; BOS, R.; GOMMER, M.; NIBBELING, R.; WERNER-FELMAYER, G.; LOITZL, P.; JUNGI, T.; BRCIC, M.; BRUGGER, P.; FREY, E.; BOWE, G.; CASADO, J.; COECKE, S.; LANGE, J.; MOGSTER, B.; NAESS, L. M.; AABERGE, I.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 298, p. 161-173, 2005.

HOKAMA, D. A. **Avaliação das melhorias no sistema de controle de qualidade de vacinas em Bio-Manguinhos. Período 1999-2004.** 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; LEAL, M. L. F.; FREIRE, M. S.; COUTO, A. R. Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 445-458. 2011.

HU, R.; LI, H.; LEI, Z.; HAN, Q.; YU, X.; ZHOU, N.; ZHANG, X.; MAO, Y.; WANG, X.; IRWIN, D. M.; NIU, G.; TAN, H. Construction of a sensitive pyrogen-testing cell model by site-specific knock-in of multiple genes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 2652-2661. 2019.

HUOVINEN, P.; NUMMELA, L.; KOPPINEN, J. Detection of endotoxins with limulus amoebocyte lysates of *Limulus polyphemus* and *Tachypleustridentatus* origin. **Journal of Microbiological Methods**, v. 11, n. 2, p. 107-114. 1990.

HUSZÁR, G.; JENEI, B.; SZABO, G.; MEDGYESI, G. A. Detection of Pyrogens in Intravenous IgG Preparations. **Biologicals**, v. 30, n. 2, p. 77-83. 2002.

(ICCVAM) 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: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/pyrogen/tmer/pyrotmer2008.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2019.

INSTITUTO BUTANTAN. **Soros e Vacinas do Butantan**, 1. ed. 2018. Disponível em: http://publicacoeseducativas.butantan.gov.br/web/soros-vacinas/pages/pdf/soros_vacinas.pdf. Acesso em: 05 nov. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. **Análises de produtos biológicos.** Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=95. Acesso em: 06 jul. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Fundação Oswaldo Cruz. **Grupo Técnico de Sangue e Hemoderivados (GT/SH).** Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=89&Itemid=97. Acesso em: 13 mar. 2021.

JACKIE, J.; LAU, W. K.; FENG, H. T.; LI, S. F. Y. Detection of Endotoxins: From Inferring the Responses of Biological Hosts to the Direct Chemical Analysis of Lipopolysaccharides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49. 2019.

JESUS SILVA, L. F. **Produção de soro hiperimune no Instituto Vital Brazil: estudo de caso orientado à sustentabilidade através da avaliação do ciclo de**

vida. 2012. Dissertação (Mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca - CEFET/RJ, Rio de Janeiro, 2012.

JOINER, T. J.; KRAUS, P. F.; KUPIEC, T. C. Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 6, n. 6. 2002.

KAAIJK, P.; STRAATEN, I. V.; WATERBEEMD, B.; BOOT, E. P. J.; LEVELS, L. M. A. R.; DIJKEN, H. H.; DOBBELSTEEN, G. P. J. M. Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease. **Vaccine**, v. 31, n. 7, p. 1065-1071. 2013.

KEMP, G.; CARE, R.; NORDGREN, I. K.; VIPOND, C. Understanding the pyrogenic response to Bexsero (4CMenB) vaccine. 2021. Disponível em: <https://www.meningitis.org/getmedia/616aa6ef-92cf-454a-82a3-70ad6662f460/V3-George-Kemp-poster?disposition=attachment>. Acesso em: 02 out. 2021.

KIKKERT, R; BULDER, I; GROOT, ER; AARDEN, LA; FINKELMAN, MA. Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1→3) - β- D-glucans: implications for the monocyte activation test. **Journal of Endotoxin Research**, Amsterdam, v. 13, n. 3. 2007.

KIM, J. T.; KIM, H.; KIM, S. H.; KIM, D. J.; SHIN, Y.; KIM, J. D.; SONG, H.; JANG, S. W.; LEE, D. C.; PARK, K. H.; LEE, J. H.; JEONG, K. Y.; PARK, J. W. Comparison of Allergenic Properties among Commercially Available House Dust Mite Allergen Extracts in Korea. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 1, p. 86-90, 2021.

KIRK, R. G. W. Recovering the principles of humane experimental technique: the 3Rs and the human essence of animal research. **Science, Technology, & Human Values**, v. 43, n. 4, p. 622 – 648, 2018.

KORYAKINA, A.; FREY, E.; BRUEGGER, P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. **Journal of Immunological Methods**, v. 405, p. 181-191, 2014.

KUNIYOSH, A. K. **Eficácia do soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan: obtenção, caracterização e neutralização de serinopeptidases de interesse do veneno de *Bothrops jararaca***. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, São Paulo, 2017.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 88, v. 4, p. 177-180. 2007.

LEAL, J. **A memória do programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS e sua contribuição no cenário do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2017.

LEMOS, M. C. F. **Vigilância de eventos adversos após vacinação contra difteria, tétano, coqueluche e haemophilus influenzae tipo b no município do rio de janeiro, 1998-2005.** 2007. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.

LEÓN, G.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 76, p. 63-76. 2013.

LEÓN, G.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; ARGUEDAS, M.; SÁNCHEZ, A.; SEGURA, A.; GÓMEZ, A.; SOLANO, G.; AGUILAR, E. C.; RISNER, K.; NARAYANAN, A.; BAILEY, C.; VILLALTA, M.; HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, A.; CORDERO, D.; SOLANO, D.; DURÁN, G.; SEGURA, E.; CERDAS, M.; UMAÑA, D.; MOSCOSO, E.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.; MÉNDEZ, M.; CASTILLO, A. C.; SÁNCHEZ, L.; SÁNCHEZ, R.; GUTIÉRREZ, J. M.; DÍAZ, C.; ALAPE, A. Development and characterization of two equine formulations towards SARS-CoV-2 proteins for the potential treatment of COVID-19. **Scientific Reports**, v. 11, n. 9825. 2021.

LIMA, D. P. **Os sentidos da integralidade do cuidado em saúde: um olhar sobre as ações do Programa Nacional de Imunizações.** 2019. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

LINHART, B.; VALENTA, R. Vaccines for allergy. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, p. 354-360. 2012.

LIU, H. F.; MA, J.; WINTER, C.; BAYER, R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 5, p. 480-499. 2010.

LOPES, I. G. **Avaliação do teste de ativação de monócitos na determinação da contaminação pirogênica com ácido lipotecóico em produtos injetáveis.** 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2014.

LOVRECEK, D.; TOMIC, S. A Century of Antivenom. **Collegium Antropologicum**, v. 35, n. 1, p. 249-258. 2011.

LU, R. M.; HWANG, Y. C.; LIU, I. J.; LEE, C. C.; TSAI, H. Z.; LI, H. J.; WU, H. C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1. 2020.

MALONEY, T.; PHELAN, R.; SIMMONS, N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. **PLOS Biology**, v. 12. 2018.

MARIUS, M.; VACHER, F.; BONNEVAY, T. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices. **Biologicals**, v. 67, p. 49-55. 2020.

MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

MARTINS, J. F. **Estudo sobre a reação inflamatória produzida pela vacina contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) em camundongos**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2006.

MASSALDI, H.; MORAIS, V. Evolution of endotoxin contamination during production of a therapeutic serum. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 61, n. 5, p. 375-382. 2007.

MATOS, G. C. **Estudo de utilização da albumina humana em hospitais do Rio de Janeiro, Brasil**. 2006. Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2006.

MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de albumina humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 1224-1233. 2005.

MATOS, J. F. S. **Doença Meningocócica Invasiva Causada por Neisseria meningitidis do Grupo B: Da Patologia à Nova Vacina**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

MATTOS, K. A.; NAVEGA, E. C. A.; SILVA, F. V.; ALMEIDA, A. S.; SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; JUNIOR, D. S. G.; DELGADO, I. F. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) in the Quality Control of the 17DD Yellow Fever Vaccine. **ATLA**, v. 46, n. 1, p. 23-37. 2018.

MCNEF, C.; ZHAO, Q.; ALMLOF, E.; FLICKINGER, M.; CARR, P. W. The Efficient Removal of Endotoxins from Insulin Using Quaternized Polyethyleneimine-Coated Porous Zirconia. **Analytical Biochemistry**, v. 274, n. 2, p. 181-187. 1999.

MEDEIROS, E. A. S. Entendo o ressurgimento e o controle do sarampo no Brasil. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 33. 2020.

MEDEIROS, I. P. **Padronização e otimização de métodos analíticos para o controle de qualidade da eritropoietina humana recombinante**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2013.

MEHTA, A.; HINDMARSH, P. C. The Use of Somatropin (Recombinant Growth Hormone) in Children of Short Stature. **Pediatric Drugs**, v. 4, n. 1, p. 37-47. 2002.

MELANDRI, V. C. R.; FARIA, G. C.; CALDEIRA, C.; PRESGRAVE, O. A. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de

produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 8, n. 2, p. 69 – 95, jul/dez. 2010.

MINISTERIO DA SAUDE. **Calendário Nacional de Vacinação**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/c/calendario-de-vacinacao>. Acesso em: 03 jun. 2021.

MINISTERIO DA SAUDE. **Programa Nacional de Imunizações – 30 Anos**. Brasília – DF. 2003. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro_30_anos_pni.pdf. Acesso em: 26 set. 2020.

MIRANDA, D. P.; HENRIQUES, C. M. P. Imunobiológicos e Vigilância Sanitária. *In*: BUSS, P. M.; TEMPORÃO, J. G.; CARVALHEIRO, J.R. **Vacinas, soros e imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005. p. 125-130.

MOESBY, L.; HANSEN, E. W.; CHRISTENSEN, J. D. 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.

MONTANG, T.; SPREITZER, I.; LÖSCHNER, B.; UNKELBACH, U.; FLORY, E.; SANZENBACHER, R.; SCHWANIG, M.; SCHNEIDER, C. K. Safety Testing of Cell-based Medicinal Products: Opportunities for the Monocyte Activation Test for Pyrogens. **ALTEX**, v. 24, n. 2, p. 81-89. 2007.

MORAIS, V. M.; MASSALDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2-18. 2009.

MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). **Revista Cubana de Farmacia**, v. 38, n. 1. 2004.

MOURA, W. C. B. **Avaliação de custos federais do Programa Nacional de Imunizações. Brasil, 2004-2015**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

MUROI, M.; OGURA, N.; MIZUMURA, H.; AKETAGAWA, J.; ODA, T.; TANAMOTO, K. Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent, PyroSmart, for Bacterial Endotoxins Test Filed in the Pharmacopeias. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 12, p. 2024–2037. 2019.

NASCIMENTO, M. C.; ABREU, C. L. C.; COSTA, R. N.; MOURA, W. C.; DELGADO, I. F. A eritropoietina humana recombinante: uma breve revisão com ênfase no processo de controle da qualidade. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 43-55. 2013.

NAVEGA, E. C. A. **Estudo da aplicabilidade do teste de ativação de monócitos na detecção de pirogênios na vacina contra febre amarela**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2016.

NAVEGA, E. C. A.; SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. F.; ALMEIDA, A. S.; DELGADO, I. F.; MATTOS, K. A. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle de qualidade de produtos biológicos. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 4, p. 71-81. 2015.

NETTO, E. J. R.; LEAL, E. C.; DELGADO, I. F.; LEANDRO, K. C. Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba e rubéola utilizados no Programa Nacional de Imunizações do Brasil no período de 1999 a 2007. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 408-415. 2010.

NORIEGA, G.; BOURG, V.; LABRADA, A. Endotoxin content in industrially manufactured allergen extracts of House Dust Mites, including *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis*. Allergen Vaccines Conference. 2009. Disponível em: https://www-researchgate-net.translate.googleusercontent.com/publication/334001111_Endotoxin_content_in_industrially_manufactured_allergen_extract_of_House_Dust_Mites_including_Dermatophagoides_siboney_and_Blomia_tropicalis. Acesso em: 05 out. 2021.

OCHIAI, M.; YAMAMOTO, A.; KATAOKA, M.; TOYOIZUMI, H.; ARAKAWA, Y.; HORIUCHI, Y. A quantitative in vitro assay to detect biological activity of endotoxin using rabbit peripheral blood. **AATEX**, p. 641-645. 2007.

OGOINA, D. Fever, fever patterns and disease called “fever” – a review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, p. 108-124. 2011.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) para a detecção de pirógenos em Vacina Zika Inativada experimental**. 2019. Monografia (Especialização) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza” /Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

OLIVEIRA, V. O.; SILVA, O. V. Biotecnologia para a produção de biofármacos: farmacovigilância, regulamentação e mercado no Brasil. **Revista Oswaldo Cruz**. 2018. Disponível em: http://www.revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_19_Veridiana_Oliveira.pdf. Acesso em: 13 mar. 2021.

ONG, K. G.; LELAND, J. M.; ZENG, K.; BARRETT, G.; ZOUROB, M.; GRIMES, C. A. A rapid highly-sensitive endotoxin detection system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 2270-2274. 2006.

PALLA, M. B. **Análise de pirogênio em produtos injetáveis e soluções parenterais**. 2007. Monografia (Graduação) – Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2007.

PATRA, A.; KALITA, B.; KHADILKAR, M. V.; SALVI, N. C.; SHELKE, P. V.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of quality and pre-clinical efficacy of a newly developed polyvalent antivenom against the medically important snakes of Sri Lanka. **Scientific Reports**, v. 11, n. 18238. 2021.

PATRA, A.; KALITA, B.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of quality, safety, and pre-clinical toxicity of an equine polyvalent antivenom (Pan Africa): Determination of immunological cross-reactivity of antivenom against venom samples of Elapidae and Viperidae snakes of Africa. **Toxicon**, v. 153, p. 120-127. 2018.

PERDOMO-MORALES, R.; PARDO-RUIZ, Z.; SPREITZER, I.; LAGARTO, A.; MONTAG, T. Monocyte Activation Test (MAT) Reliably Detects Pyrogens in Parenteral Formulations of Human Serum Albumin. **ALTEX**, v. 28, n. 3, p. 227-235. 2011.

PETERS, M. D. J.; GODFREY, C.; MCLNERNEY, P.; MUNN, Z.; TRICCO, A. C.; KHAL. Chapter 11: Scoping Reviews (2020 version). *In*: AROMATARIS, E.; MUNN, Z. **JBI Manual for Evidence Synthesis**. JBI. 2020. Disponível em: <https://wiki.jbi.global/display/MANUAL/Chapter+11%3A+Scoping+reviews> . Acesso em 08 mai. 2021.

PINTO, E. F.; MATTA, N. E.; CRUZ, A. M. Vacinas: progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis. **Acta Biológica Colombiana**, v. 16, n. 3, p. 197-212, 2011.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2015.

PLOTKIN, S. A. History of Vaccine Development. 1. ed. New York/USA. Ed. Springer. 2011.

PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciência, Saúde**, v. 10, supl. 2, p. 619-653. 2003.

POOL, E. J.; JOHAAR, G.; JAMES, S.; PETERSEN, I.; BOUIC, P. The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay. **Journal of Immunoassay**, v. 19, n. 2-3, p. 95-111. 1998.

POOL, M.; MCLEOD, B. C. Pyrogen reactions to human serum albumin during plasma exchange. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 10, n. 2, p. 81-84. 1995.

POOLE, S.; THORPE, R.; MEAGER, A.; HUBRARD, A. R.; GEARING, A. J. H. Detection of pyrogen by cytokine release. **The Lancet**, p. 130. 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90338-8). Acesso em: 10 nov. 2019.

PORTO, M. Y. Uma revolta popular contra a vacinação. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, jan/mar, São Paulo. 2003.

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

PRESGRAVE, O. A. F. **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/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2003.

PRIANO, G.; BATTAGLINI, F. Use of an Antimicrobial Protein for Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15. 2005.

RAPPUOLI, R. Towards animal free and science based measures of critical quality attributes for vaccine quality control and release. **Vaccine**, v. 37, n. 29, p. 3745-3746. 2019.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, p. 97- 103. 2014.

ROSSI, O.; CITIULO, F.; MANCINI, F. Outer membrane vesicles: moving within the intricate labyrinth of assays that can predict risks of reactogenicity in humans. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 2, p. 601-613. 2021.

RYBKA, J.; GAMIAN, A. Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of Kdo with gas-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 171-184. 2006.

SANTOS, R. M. M. Contribuição da FUNED para a produção de soros antivenenos e antitóxicos no Brasil. **Revista Min. Saúde Pública**, A. 4, n. 6, p. 13 – 19, jan/jun. 2005.

SCHINDLER, S.; AULOCK, S. V.; DANESHIAN, M.; HARTHUNG, T. Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. **ALTEX**, v. 26, p. 4-9, 2009.

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

SCHNEIER, M.; RAZDAN, S.; MILLER, A. M.; BRICENO, M. E.; BARUA, S. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 1. 2020.

SCHRAMM, V. G. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para avaliação de teor/potência de insulina glargina**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio grande do Sul, 2016.

SHERABA, N. S.; DIAB, M. R.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A.; ZEDAN, H. H. A Validation study of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for Polyvalent Horse Snake Antivenom. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 73, n. 6, p. 562-571. 2019.

SHERABA, N. S.; DIAB, M. R.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A.; ZEDAN, H. H. Quality Control Testing for Tracking Endotoxin-Producing Gram-Negative Bacteria during the Preparation of Polyvalent Snake Antivenom Immunoglobulin. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 69, n. 4, p. 499-510. 2015.

SILVA, C. C.; CRUZ, M.; FREITAS, J. C.; PRESGRAVE, O.; MORAES, A.; DELGADO, I. F. Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis. **Revista Visa em Debate**, v. 3, n. 3, p. 41 – 46. 2015.

SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; HARTUNG, T.; MORAES, A. M. L.; DELGADO, I. F. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). **Toxicology in Vitro**, v. 32, p. 70-75. 2016.

SILVA, F. R.; CAULLIRAUX, H. M. A Desverticalização no Setor de Produção de Biomedicamentos e a Utilização das Empresas CMOs (Contract Manufacturing Organization). **Produto e Produção**, v. 17, n. 4, p. 1-18. 2016.

SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; SILVA, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 446-452. 2016.

SILVA JUNIOR, A. M. **Proposta de gestão on-line das informações de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA JUNIOR, J. B. 40 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma conquista da Saúde Pública brasileira. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n.1, mar., Brasília. 2013.

SILVA, L. L. C.; RIBEIRO, M. B.; RODRIGUEZ, T. T. Atestando os 3Rs na pesquisa. *In*: FISCHER, M. L.; JANKOSKI, L. G. Q. (Orgs.) **Comissões de ética no uso de animais**. Curitiba: Ed. PUCPRESS, 2020.

SILVA, V. F.; JUNIOR, D. S. G.; SILVEIRA, I. A.; ALMEIDA, A. S.; CONTE, F. P.; DELGADO, I. F.; SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; MATTOS, K. A. A Comparison of Pyrogen Detection Tests in the Quality Control of Meningococcal Conjugate Vaccines: The Applicability of the Monocyte Activation Test. **ATLA**, v. 46, p. 255-272. 2018.

SILVA, V. F. **Teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênios *in vitro* aplicado à vacina meningocócica C conjugada**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2017.

SILVEIRA, R. L.; ANDRADE, S. S.; SCHMIDT, C. A.; CASALI, R. G.; DALMORA, S. L. Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 35, p. 48-53. 2004.

SIRAGANIAN, R. P.; BAER, H.; HOCHSTEIN, H. D.; MAY, J. C. Allergenic and biologic activity of commercial preparations of house dust extract. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 64, n. 6, p. 526-533. 1979.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. Rubéola e poliomielite: doenças eliminadas voltam a ameaçar o Brasil. 2019. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/rubeola-e-poliomielite-doencas-eliminadas-voltam-ameacar-o-brasil/>. Acesso em: 11 mar. 2021.

SOLANO, G.; GOMEZ, A.; LEÓN, G. Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL). **Toxicon**, v. 105, p. 13-18. 2015.

SOLATI, S.; AARDEN, L.; ZEERLEDER, S.; WOUTERS, D. An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. **Innate Immunity**, v. 21, n. 7, p. 677-684. 2015.

SOUSA, L. M. M.; FIRMINO, C. F.; MARQUES-VIEIRA, C. M. A.; SEVERINO, S. S. P.; PESTANA, H. C. F. C. Revisões da literatura científica: tipos, métodos e aplicações em enfermagem. **Revista Portuguesa de Enfermagem de Reabilitação**, v. 1, jun., 2018.

SPENCER, I. M. **Febre: padrões de febre e o seu impacto na patologia**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina/Universidade de Coimbra, Coimbra/Portugal, 2015.

SPOLADORE, J.; GIMENES, I.; BACHINSKI, R.; NEGHERBON, J. P.; HARTUNG, T.; GRANJEIRO, J. M. ALVES, G. G. Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit Pyrogen testing (RPT): A scoping review. **Toxicology in Vitro**, v. 74. 2021.

SPREITZER, I.; FISCHER, M.; HARTRSCH., K.; LIIDERITZ-PIICHEL, U.; MONTAG, T. Comparative Study of Rabbit Pyrogen Test and Human whole Blood Assay on Human Serum Albumin. **ALTEX**, v. 19, supl.1, p. 73-75. 2002.

SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; MARCELINO, J. R.; CUNHA, L. E. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TAMBOURGI, D. V. Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab')₂ antivenoms. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 574-584. 2014.

STODDARD, M. B.; PINTO, V.; KEISER, P. B.; ZOLLINGER, W. Evaluation of a Whole-Blood Cytokine Release Assay for Use in Measuring Endotoxin Activity of Group B Neisseria meningitidis Vaccines Made from Lipid A Acylation Mutants. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 1, p. 98-107. 2010.

STOPPELKAMP, S.; WÜRSCHUM, N.; STANG, K.; LÖDER, J.; AVCI-ADALI, M.; TOLIASHVILI, L.; SCHLENSAK, C.; WENDEL, H. P.; FENNRICH, S. Speeding up pyrogenicity testing: Identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT). **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 2, p. 260-273. 2017.

STUDHOLME, L.; SUTHERLAND, J.; DESAI, T.; HOCKLEY, J.; CARE, R.; NORDGREN, I. K.; VIPOND, C. Evaluation of the monocyte activation test for the safety testing of meningococcal B vaccine Bexsero: A collaborative study. **Vaccine**, v. 37, n. 29, p. 3761-3769. 2019.

TAMURA, H.; REICH, J.; NAGAOKA, I. Outstanding Contributions of LAL Technology to Pharmaceutical and Medical Science: Review of Methods, Progress, Challenges, and Future Perspectives in Early Detection and Management of Bacterial Infections and Invasive Fungal Diseases. **Biomedicines**, v. 9, n. 536. 2021.

TAKTAK, Y. S.; SELKIRK, S.; BRISTOW, A. F.; CARPENTER, A.; BALL, C.; RAFFERTY, B.; POOLE, S. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **J Pharm Pharmacol**, v. 43, p. 578-582, 1991.

TEMPORÃO, J.G. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História, Ciências, Saúde**, v. 10, n. 2, p. 601 – 617, Manguinhos/Rio de Janeiro. 2003.

TINDALL, B.; DEMIRCIOGLU, D.; UHLIG, T. Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution. **BioTechniques**, v. 70, n. 5. 2021.

TRICCO, A. C.; LILLIE, E.; ZARIN, W.; O'BRIEN K. K.; COLQUHOUN, H.; LEVAC, D.; MOHER, D.; PETERS, M. D. J.; HORSLEY, T.; WEEKS, L.; HEMPEL, S.; AKI, E. A.; CHANG, C.; MCGOWAN, J.; STEWART, L.; HARTILING, L.; ALDCROFT, A.; WILSON, M. G.; GARRITTY, C.; LEWIN, S.; GODFREY, C. M.; MACDONALD, M. T.; LANGLOIS, E. V.; WEISER, K. S.; MORIARTY, J.; CLIFFORD, T.; TUNÇALPO.; STRAUS, S. E. PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR): Checklist and Explanation. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 7. 2018.

Trivedi, B.; Valerio, C.; Slater, J. E. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 777-783. 2003.

TWOHY, C. W.; DURAN, A. P.; MUNSON, T. E. Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the Limulus amoebocyte lysate method. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 190–201. 1984.

UHLIG, T.; WILLIAMS, K. L.; TINDALL, B. Recombinant Factor C Validation-Simpler Than You Think! **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 75, n. 4, p. 391–393. 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Curso básico em Vigilância Sanitária**. Unidade 2: Sistema Nacional em Vigilância Sanitária. Fortaleza, 2015.

(USP) UNITED STATES PHARMACOPEIA 35-NF 30. Bacterial Endotoxins Test, cap. 85. 2017.

(USP) UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP provides guidelines for Recombinant Factor C (rFC) a non-animal-derived reagent critical to development of vaccines and other sterile pharmaceutical products. 2020. Disponível em: <https://www.usp.org/news/rfc-horseshoe-crabs-statement>. Acesso em: 21 set. 2021.

USUI, M.; NAGAI, H.; TAMURA, Y. An in vitro method for evaluating endotoxic activity using prostaglandin E2 induction in bovine peripheral blood. **Biologicals**, v. 41, p. 158-161. 2013.

UTESCHER, C. L. A.; BUOSI, K. L.; BOTOSSO, V. F.; QUINTILIO, W. Monocyte Activation Test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2. 2018.

VALENTINI, S.; SANTORO, G.; BAFFETTA, F.; FRANCESCHI, S.; PALUDI, M.; BRANDINI, E.; GHERARDINI, L.; SERRUTO, D.; CAPECCHI, B. Monocyte-activation test to reliably measure the pyrogenic content of a vaccine: An in vitro pyrogen test to overcome in vivo limitations. **Vaccine**, v. 37, n. 29, p. 3754-3760. 2019.

VANHAECKE, E.; PIJCK, J.; VUYE, A. Endotoxin testing. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 12, p. 223-235. 1987.

VASCONCELOS, Y. Anticorpos de valor. **Revista Pesquisa FAPESP**. 2010. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2012/08/068-073-170.pdf>. Acesso em 14 mar. 2021.

VIPOND, C.; SUTHERLAND, J.; NORDGREN, K.; KEMP, G.; HEATH, A.; CARE, R.; STUDHOLME, L. Development and validation of a monocyte activation test for the control/safety testing of an OMV-based meningococcal B vaccine. **Vaccine**, v. 37, n. 29, p. 3747-3753. 2019.

WALLS, E. A.; BERKSON, J.; SMITH, S. A. The Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*: 200 Million Years of Existence, 100 Years of Study. **Fisheries Science**, v. 10, n. 1, p. 39-73. 2002.

WILLIAMS, K. L. **Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation**. 3 ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis vaccines**. 2013b. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80681/WHO_IVB_11.11_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 20 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Model List of Essential Medicines**. 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273826/EML-20-eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 19 out. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines**. 2013a. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/yellow-fever/trs_978_annex_5.pdf?sfvrsn=446b9c12_3&download=true. Acesso em: 01 out. 2021.

WUNDERLICH, C.; SCHUMACHER, S.; KIETZMANN, M. Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 2, p. 196-198. 2015.

ZERVOS, C.; ZIMMERMAN, T. P.; WILLIS, T.; FLEXMAN, G.; SRIVASTAVA, J.; SILVERSTEIN, R.; WILLIAMS, M.; VANDEBERG, P.; CULP, J. L.; BURNS, D.; BARHAM, V.; DURHAM, A.; MALINZAK, D. A. Immunoglobulin G from single plasma donor in immune globulin intravenous causes false positive pyrogen test. **Biologicals**, v. 59, p. 12-19. 2019.

ZHANG, C.; TIAN, F.; ZHANG, M.; ZHANG, Z.; BAI, M.; GUO, G.; ZHENG, W.; WANG, Q.; SHI, Y.; WANG, L. Endotoxin contamination, a potentially important inflammation factor in water and wastewater: A review. **Science of the Total Environment**, v. 681, p. 365-378. 2019.

ZOLFAGHARIAN, H.; MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, N. Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 1, p. 1 – 10, jun. 2013.

ANEXO A: PROTOCOLO PRISMA-ScR PARA REVISÃO DE ESCOPO.

Lista de Verificação PRISMA-ScR		
Seção	Item	Item da lista de verificação PRISMA-ScR
Título	1	Identifique o relatório como uma revisão de escopo
Resumo		
Resumo estruturado	2	Forneça um resumo estruturado que inclua (conforme o caso) histórico, objetivos, critérios de elegibilidade, fontes de evidências, métodos de mapeamento, resultados e conclusões que se relacionam com as questões e objetivos da revisão.
Introdução		
Justificativa	3	Descreva a justificativa para a revisão no contexto do que já é conhecido. Explique por que as questões / objetivos da revisão se prestam a uma abordagem de revisão de escopo.
Objetivos	4	Forneça uma declaração explícita das questões e objetivos sendo abordados com referência aos seus elementos-chave (por exemplo, população ou participantes, conceitos e contexto) ou outros elementos-chave relevantes usados para conceituar as questões e/ou objetivos da revisão.
Métodos		
Protocolo e registro	5	Indique se existe um protocolo de revisão; indique se e onde ele pode ser acessado (por exemplo, um endereço da web); e, se disponível, forneça informações de registro, incluindo o número de registro.
Critérios de elegibilidade	6	Especifique as características das fontes de evidência usadas como critérios de elegibilidade (por exemplo, anos considerados, idioma e status de publicação) e forneça uma justificativa.
Fontes de informação*	7	Descreva todas as fontes de informação na pesquisa (por exemplo, bancos de dados com datas de cobertura e contato com os autores para identificar fontes adicionais), bem como a data em que a pesquisa mais recente foi executada.
Busca	8	Apresente a estratégia de busca eletrônica completa para pelo menos 1 banco de dados, incluindo quaisquer limites usados, de forma que possa ser repetida.
Seleção das fontes de evidência**	9	Declare o processo de seleção de fontes de evidência (isto é, triagem e elegibilidade) incluídas na revisão do escopo.
Processo de mapeamento de dados	10	Descreva os métodos de mapeamento de dados das fontes de evidências incluídas (por exemplo, formulários calibrados ou formulários que foram testados pela equipe antes de seu uso, e se o mapeamento de dados foi feito de forma independente ou em duplicata) e qualquer processo para obter e confirmar dados de investigadores.
Itens de dados	11	Liste e defina todas as variáveis para as quais os dados foram buscados e quaisquer suposições e simplificações feitas.
Avaliação crítica das fontes individuais de evidência***	12	Se feito, forneça uma justificativa para conduzir uma avaliação crítica das fontes de evidência incluídas; descrever os métodos usados e como essas informações foram usadas em qualquer síntese de dados (se apropriado).
Medidas sumárias	13	Não aplicável para revisões de escopo.
Síntese de resultados	14	Descreva os métodos de tratamento e resumo dos dados mapeados.
Risco de viés entre os estudos	15	Não aplicável para revisões de escopo.
Análise adicional	16	Não aplicável para revisões de escopo.
Resultados		
Seleção das fontes de evidência	17	Forneça o número de fontes de evidências selecionadas, avaliadas quanto à elegibilidade e incluídas na revisão, com os motivos das exclusões em cada estágio, de preferência usando um diagrama de fluxo.
Características das fontes de evidência	18	Para cada fonte de evidência, apresente características para as quais os dados foram mapeados e que se relacionam com as questões e os objetivos da revisão.
Avaliação crítica dentro das fontes de evidência	19	Se feito, apresente os dados da avaliação crítica das fontes de evidências incluídas (ver item 12).
Resultados das fontes individuais de evidência	20	Para cada fonte de evidência incluída, apresente os dados relevantes que foram mapeados e que se relacionam com as questões e os objetivos da revisão.
Síntese de resultados	21	Resuma e / ou apresente os resultados do gráfico conforme se relacionam com as questões e os objetivos da revisão.
Risco de viés entre os estudos	22	Não aplicável para revisões de escopo.
Análise adicional	23	Não aplicável para revisões de escopo.
Discussão		
Resumo da evidência	24	Resuma os principais resultados (incluindo uma visão geral dos conceitos, temas e tipos de evidências disponíveis), faça um link para as questões e objetivos da revisão e considere a relevância para os grupos-chave.
Limitações	25	Discuta as limitações do processo de revisão do escopo.
Conclusões	26	Forneça uma interpretação geral dos resultados no que diz respeito às questões e objetivos da revisão, bem como às possíveis implicações e / ou próximos passos.
Financiamento	27	Descreva as fontes de financiamento para as fontes de evidências incluídas, bem como as fontes de financiamento para a revisão do escopo. Descreva a função dos financiadores da revisão do escopo.

PRISMA-ScR: Itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e extensão de meta-análises para revisões de escopo.

* De onde as fontes de evidência (veja a segunda nota de rodapé) são compiladas, como bancos de dados bibliográficos, plataformas de mídia social e sites.

** Um termo mais inclusivo/heterogêneo usado para explicar os diferentes tipos de evidências ou fontes de dados (por exemplo, pesquisa quantitativa e/ou qualitativa, opinião de especialistas e documentos de política) que podem ser elegíveis em uma revisão de escopo em oposição a apenas estudos. Isso não deve ser confundido com fontes de informação (veja a primeira nota de rodapé).

*** O processo de examinar sistematicamente as evidências de pesquisa para avaliar sua validade, resultados e relevância antes de usá-las para informar uma decisão. Este termo é usado para os itens 12 e 19 em vez de "risco de viés" (que é mais aplicável a revisões sistemáticas de intervenções) para incluir e reconhecer as várias fontes de evidência que podem ser usadas em uma revisão de escopo (por exemplo, quantitativa e/ou pesquisa qualitativa, opinião de especialistas e documentos de política).

Fonte: (Adaptado de TRICCO *et. al.*, 2018).

