
Teste de Pirogênio no Controle de Produtos Injetáveis: “Evolução Através dos Tempos”

Cátia Cristina Pereira de Sant’Anna

I. Introdução

1.1 Histórico

A documentação da evolução do Controle Sanitário no Brasil é escassa. Segundo Presgrave (2003), a história do Controle Sanitário brasileiro teve início no século XVI, seguindo o modelo adotado em Portugal, onde a regulamentação dos ofícios de físico, cirurgião e boticário eram enfatizadas. As Câmaras Municipais eram responsáveis por medidas de higiene pública, limpeza urbana, água e esgoto, comércio de alimentos, etc. Costa e Rozenfeld (2000) sugerem que a intensificação do cuidado com a saúde da população foi subsequente à chegada da família real ao Brasil em 1808, tendo como objetivo melhorar a imagem do país frente à Europa.

A partir de 1810, a saúde no Brasil passou a ser tida como um problema social. Várias medidas foram tomadas com o intuito de aumentar o Controle Sanitário. Em 1832, a Câmara Municipal do Rio de Janeiro promulgou o Código de Posturas, normalizando o controle de medicamentos e o licenciamento de fábricas. Na área estadual, desde a Proclamação da República, foram criados órgãos de Vigilância Sanitária. Medidas de controle sanitário se desenvolveram ainda mais com a regulamentação dos serviços sanitários da União. A instituição do Juízo dos Feitos (responsável pelo julgamento de causas relativas à Saúde Pública) e a criação de um Código Sanitário (pelo Decreto nº 5156) por volta de 1904, servem como exemplos do esforço investido na regulamentação das práticas sanitárias adotadas no país (Presgrave, 2003; Costa & Rozenfeld, 2000).

O Ministério da Saúde foi criado em 1953, através da Lei nº 1920/53. Em 1976, surgiu a Lei nº 6.360, denominada de Vigilância Sanitária, sendo regulamentada através do Decreto nº 79.094, de 05/01/1977. O La-

boratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA), criado em 1954 passou para a Fundação Oswaldo Cruz em 1981. O LCCDMA teve o seu nome modificado para Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Em 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criada através da Lei nº 9.782. A ANVISA tem como propósito a proteção da saúde da população mediando o Controle e a Vigilância Sanitária (Presgrave, 2003).

A Vigilância Sanitária tem como finalidade inspecionar as matérias primas antes de emitir os seus laudos, através das análises desses produtos. Esta inspeção abrange quatro estágios: registro de produtos, inspeção, controle de qualidade de insumos e produtos e monitoramento desses produtos. O registro de produtos é o processo inicial realizado antes dos mesmos entrarem no mercado. A finalidade da inspeção é verificar que as Boas Práticas de Fabricação estão sendo cumpridas. O Monitoramento dos produtos é realizado após a entrada destes no mercado. (Presgrave, 2003; Fundação Oswaldo Cruz, 1998).

1.2 Pirogênios nas preparações injetáveis

Produtos farmacêuticos de uso parenteral devem estar livres da contaminação pirogênica. O pirogênio pode ser definido como uma substância que causa febre. Os pirogênios mais comumente encontrados em produtos em produtos parenterais são endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeos; LPS de bactérias Gram-negativas). Existem dois testes para avaliar a contaminação pirogênica: o Teste de Pirogênio feito com coelhos, e o Teste de *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL). O Teste de Pirogênio ou determinação da presença de endotoxinas bacterianas (bioprodutos causadores de febre provenientes de bactérias gram-negativas), é obrigatório para produtos injetáveis. Trata-se de fixar em limites aceitáveis, os riscos de uma reação febril em paciente receptor do produto injetado. O teste “in vivo” envolve medir o aumento da temperatura de coelhos após a injeção intravenosa do produto em teste. O procedimento descrito pela Farmacopéia Brasileira recomenda o uso de coelhos de ambos os sexos, adultos e sadios.

De acordo com a necessidade atual de reduzir ao máximo os testes com animais, a determinação de pirogênio pode ser feita “in vitro”, de forma muito mais simples, rápida e precisa. Utiliza-se um derivado do lisado

de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*, conhecido como LAL, específico na determinação qualitativa de endotoxinas. O método baseia-se na reação entre a endotoxina e um componente protéico do LAL, produzindo um gel opaco facilmente reconhecido.

Frederick Bong, da Universidade de John Hopkins, observou a reação de coagulação intravascular causada por bactérias em caranguejos de espécie *L. polyphemus*. Essa coagulação ocorria uma vez que o agente responsável por este, estava nos amebócitos, ou células sanguíneas circulantes do caranguejo, e o pirogênio produzia uma reação de gelificação com o lisado obtido desses amebócitos por um processo enzimático. Um estudo comparativo realizado em 1970 demonstrou que o teste LAL é mais sensível que o ensaio feito em coelhos e que a formação do gel estava diretamente relacionada à concentração de endotoxina.

1.3 O conceito da febre

Durante o século XIX, Von Haller (1757-1766), em seu oitavo volume do livro de Fisiologia Humana, mencionou que a injeção intravenosa de um fluido pútrido em animais induzia severas reações febris. Em 1822, Gaspard publicou um artigo revisando a história de injeção intravenosa experimental em animais e a febre estava associada a este fato.

Ao injetar por via endovenosa uma determinada solução, verificou-se que podia surgir uma reação febril que era independente do agente terapêutico utilizado. Essa reação caracterizava-se pelo aparecimento de arrepios de duração variável, podendo-se manifestar uma hora após a injeção. Outras vezes, a este estado sucedia uma hipertemia que podia chegar a ultrapassar os 40°C, com duração de 4 a 12 horas. Essas reações eram devidas à presença nas soluções injetáveis de substâncias provenientes de bactérias vivas ou mortas, às quais se dava o nome de pirogênios.

Billbroth (1862), pareceu ser o primeiro pesquisador a utilizar o termo "pirogênio" que descreve o princípio da febre. Ao injetar água destilada em cachorros, produzia "hipertermia". Ele isolou a bactéria causadora da infecção, denominando o isolado de "*Coccobacteria*".

Em 1912, Hort e Penfold criaram o termo *pirogênicas* (*piros*=fogo + *genus*= gerador) para designar as águas que, quando injetadas, provocavam **hipertermia**. Esse termo denominou pirogênios às substâncias que elevam a temperatura, quer fossem bactérias mortas, intactas ou desinte-

gradas, patogênicas, ou não, ou produtos do metabolismo bacteriano, como as proteínas desnaturadas, endotoxinas ou exotoxinas (Florence Seibert, 1922).

Estes trabalhos deram um grande avanço para o estudo sistemático das espécies microbianas geradoras de pirogênios, pertencendo a estas muitas classes, tanto de Gram-positivo, como de Gram-negativo. As bactérias Gram-negativas são as maiores produtoras de pirogênios, já as bactérias Gram-positivas quando destruídas pelo calor, quase não dão pirogênios, sendo que nestas bactérias há formação de exotoxinas sendo facilmente desnaturáveis pelo calor. Já as bactérias Gram-negativas originam endotoxinas de origem polissacarídica, que são muito mais resistentes ao calor.

Hort e Penfold, em 1912, foram os primeiros a metodizar o Teste de Pirogênio em coelhos. Com esse procedimento, são capazes de classificar bactéria em tipos pirogênicos e não pirogênicos.

O estudo que media a pirogenicidade das soluções resultou no 1º Teste de Pirogênio, incorporado na 12ª Edição da Farmacopéia Americana (USP), em 1942.

Durante 20 anos de estudos, alguns trabalhos demonstraram que a porção LPS lipídica é responsável pela maioria das reações biológicas que são induzidas pela endotoxinas.

1.4 Endotoxinas

As endotoxinas são complexos de alto peso molecular associados com membrana externa de bactérias gram-negativas e tem uma grande importância no Pirogênio e na Indústria Farmacêutica. Entretanto, o termo endotoxina é ocasionalmente usado para referir ao lipopolissacarídeo associado com membrana externa de bactérias Gram-negativas como: *Escherichia coli*; *Salmonella typhimurium*.; *Shigella sp.*; *Pseudomonas aeruginosa*., *Neisseria meningitidis*.; *Haemophilus influenzae*., e outros patógenos (PEARSON, 1985).

As endotoxinas são compostos termoestáveis e podem resistir aos Ciclos de Esterilização pelo calor; entretanto, são inativadas por ciclos de calor seco, condições alcalinas, condições ácidas, polimixina B, e outras. A atividade biológica da endotoxina está associada com lipopolissacarídeo (LPS). A **toxicidade** está associada com o componente lipídico, denominado Lipídeo A e sua **imunogenicidade** está associada com componentes

polissacarídeos. Os antígenos da parede celular (Antígeno O) de bactéria Gram-negativa são componentes lipopolissacarídeos. O lipopolissacarídeo induz uma variedade de respostas inflamatórias no animal, pois ele ativa o Complemento por caminhos alternativos, fazendo parte de infecções bacterianas (PEARSON, 1985).

Em anos recentes, foi demonstrado que é a endotoxina que causa febre, a qual também tem profundo efeito em amplo espectro das atividades biológicas, algumas das quais serão aqui discutidas.

Endotoxinas são substâncias que estão nas paredes externas de bactérias Gram-negativas. Esse esquema é demonstrado na Figura 1.

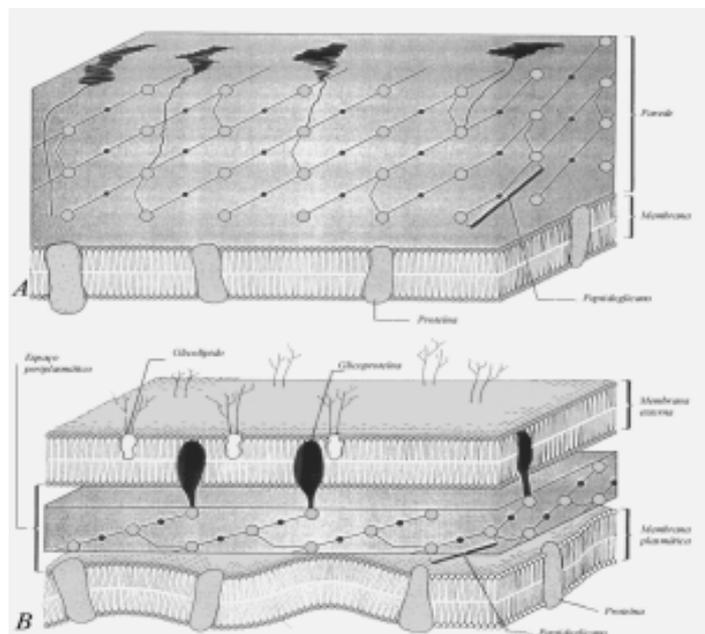


Figura 1 - Diagrama da membrana celular Gram positiva (A) e Gram-negativa (B), incluindo lipopolissacarídeo e membrana externa.

O lipopolissacarídeo consiste de três componentes ou regiões, **Lipídeo A**, **polissacarídeo R** e **polissacarídeo A**. O lipídeo A é o componente do lipopolissacarídeo, que contém uma região hidrofílica.

De acordo com Marlys Weary and Frederick Pearson III (1985), lipídeo A é composto de dissacarídeo glicosamina, o qual é substituído com

amida-unida e éster unido ácido graxo (Figura 1). A amina mais comum unida ao ácido graxo é C-14, cadeia do ácido graxo, ácido 3-hidroxi mirístico; entretanto, o éster unido a ácidos graxos tende a ser variável e comumente inclui o Cáprico, Láurico, Mirístico e Palmítico e ácidos esteáricos. Esses ácidos saturados têm vários átomos de carbono em suas cadeias. A remoção do éster unido ao resíduo do ácido graxo pode ser feita por uma base diluída.

O **antígeno Core (R)** ou **polissacarídeo R** consiste de uma cadeia pequena de açúcares.

O antígeno somático (O) ou polissacarídeo O é unido ao polissacarídeo. Ele consiste em subunidades oligossacarídeos formados de 3-4 açúcares. O principal determinante antigênico da célula bacteriana de bactéria Gram-negativa, reside na região polissacarídica A.

O antígeno somático O ou polissacarídeo O é ligado ao polissacarídeo, consiste na repetição de subunidades de oligopolissacarídeos de 3-5 açúcares. O maior determinante antigênico da parede Gram-negativa da célula reside no polissacarídeo O.

A perda do antígeno O resulta na perda da virulência, sugerindo que esta porção é importante na interação parasita-hospedeiro (TODAR, 2002).

A endotoxina pode ser inativada por detoxificação ou pela destruição da molécula de LPS. A endotoxina pode ser removida de uma substância utilizando métodos baseados na afinidade de ligação de várias superfícies ou características físicas como: tamanho, peso molecular e carga eletrostática.

O processo típico de inativação de endotoxinas bacterianas é denominado Despirogenização. Esse método é utilizado para determinar a natureza físico-química da endotoxina a ser despirogenizada. Os outros métodos são: hidrólise ácida e básica, alquilação, calor seco, radiação ionizante etc.

Estudos recentes demonstraram que o lipídeo A é responsável por quase toda as atividades biológicas da endotoxina. Preparações de lipídeo A mostram a indução da pirogenicidade, ativação do Complemento e mitogenicidade do linfócito B, entre outros fenômenos.

1.4.1 Efeitos biológicos da endotoxina

Na indústria farmacêutica a propriedade mais importante da endotoxina é a pirogenicidade, mas a endotoxina causa diversas outras alterações farmacológicas.

A endotoxina reage com elementos do sangue, incluindo plaquetas, hemácias, granulócitos, monócitos e macrófagos. Algumas dessas interações podem levar a profundas mudanças fisiológicas. A endotoxina ativa o Complemento e a cascata de coagulação. Em doses suficientes e em condições apropriadas, a endotoxina causa coagulação intravascular disseminada, reação de Shwartzman, toxicidade do fígado, patologia do pulmão, choque e morte, apresentando também, tem profundo efeito no sistema imune e no metabolismo lipídico, tais como efeitos endocrinológicos e neurológicos.

1.4.2 Atividade biológica e geração de Interleucina-1

As endotoxinas (pirogênicos) podem ser identificados por testes específicos, como o teste de LAL, o teste para célula mononuclear (MNC) e o teste para fragmentos de Lipopolissacarídeos marcados por radiação.

Substância Bacteriana	Peso Mol(Kd)	LAL teste	MNC teste
1. Lipopolissacarídeo (LPS)	>100	+	+
2. Fragmentos de LPS da camada A	2-4	+	+
3. Peptidoglicans	1-20	-	+
4. Muramyleptídios	0,4-1	-	+
5. Exotoxinas	20-50	-	+
6. Fragmentos de exotoxinas	>5	-	+

Quadro 1 - Substâncias Bacterianas Pirogênicas e seus Testes.

A endotoxina (ou LPS), é capaz de induzir as células mononucleares humanas (MNC) a produzir **INTERLEUCINA-1 (IL-1)**, bem como de **FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)**, que são duas citocinas integrantes da resposta imune. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da Interleucina-1 (IL-1), destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de Interleucina-2 (IL-2) (ação nas células T), e a produção de anticorpos (ação nas células B). As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais. Posteriormente, penetrando na circulação, ligam-se a proteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Esta diversidade de respostas fisiológicas é direcionada à eliminação de Endotoxinas,

seus fragmentos, e até mesmo bactérias Gram-negativas, e a seguir promover o reparo das lesões teciduais. Devido a altas concentrações ou maior sensibilidade a Endotoxinas, as ações dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, invés de contribuir, muitas destas respostas acabam sendo deletérias ao paciente (DOS SANTOS *et al.*, 2000).

1.5 Teste de Pirogênio em coelhos

Em 1920, Seibert concluiu que as reações febris causadas por injetáveis estavam relacionadas com produtos termo-estáveis de origem bacteriana.

O coelho foi selecionado como modelo de animal teste. Desde essa década, outras espécies demonstraram ter reações febris quando injetadas por pirogênio bacteriano. Por razões convenientes e econômicas, a seleção final de um modelo para o teste de pirogênio foi o cão e o coelho.

Em 1842, Co Tui teve experiência com essas duas espécies, descrevendo as vantagens e desvantagens de ambos, o coelho possui um mecanismo termolábil regulatório e freqüentemente dá resultado falso-positivo. Co Tui, concluiu que coelhos respondem melhor a ausência de pirogênios, enquanto que cães são bons indicadores da presença de pirogênios. (Co Tui, 1942)

O primeiro ensaio de Teste de Pirogênio em coelho foi oficializado e publicado **Farmacopéia Americana (USP) XII**, em 1942. De forma simples, o Teste de Pirogênio em coelho tem o objetivo de medir o aumento da temperatura nesses animais, aplicando uma injeção intravenosa da solução teste. Esse teste é designado para produtos que podem ser tolerados por coelhos em doses que não exceda 10 mL/Kg de peso do corpo, por injeção intravenosa dentro do período de não mais de 10 minutos (USP 27, 2004). Exceções são feitas em produtos individuais, como é o caso de antibióticos ou biológicos. As condições nas quais esse teste é conduzido estão definidas nas Farmacopéias Americana e Brasileira.

Os coelhos utilizados no teste devem ser cepas albinas, especialmente **Nova Zelândia e Belgium Brancos**. Os coelhos Belgium Brancos são mais comumente encontrados na Europa e Canadá e tem a vantagem de ter corpos pequenos e orelhas maiores do que os Nova Zelândia. Esse fato é importante porque é na veia marginal que são injetados os produtos. Outras cepas utilizadas também são **Chinchilas e Dutch Belts**, ambos

possuem desvantagens como pele pigmentada, a qual fica mais difícil administrar injeções intravenosas nesses animais do que em cepas albinas.

Coelhos pesando menos que 2000g têm baixa sensibilidade, já coelhos pesando de 2000 a 3500g dão respostas mais uniformes do que coelhos menores. O peso ideal para coelhos albinos está entre 2000 a 4000g (Probey and Pittman, 1945).

A Farmacopéia Brasileira requer que antes dos coelhos serem utilizados no Teste de pirogênio, eles sejam condicionados a um teste preliminar que inclui todo o procedimento com exceção da injeção do produto. Esse teste é realizado pelos 7 dias antes do teste de pirogênio. Também se determina a utilização de termômetros clínicos ou outros tipos de sondas calibradas, para assegurar uma precisão de + ou - 0,1°C. Essas sondas termo-sensíveis são inseridas no reto desses coelhos a uma profundidade de 7,5 cm. Antes desses termômetros serem utilizados, eles são lubrificadas com glicerina. A Farmacopéia também determina que o teste seja realizado nas condições similares nas quais os coelhos são mantidos. A área disponível para a realização desse teste deve ser livre de distúrbios para não excitá-los, e ter uma temperatura entre 20 a 23°C. Para evitar esses distúrbios, essa área deve ser calma com o mínimo de atividade ou ruído. Pessoas não autorizadas não serão permitidas durante o teste, pois pode gerar resultados **falso-positivos**.

Os coelhos utilizados neste treinamento devem entrar em teste, no máximo, em 48 horas. (USP 27, 2004).

A temperatura controle não deve variar de mais do que 1°C entre os animais do mesmo grupo. E o coelho não pode ser utilizado se a sua temperatura exceder de 39,8°C.

Antes da injeção, as soluções-teste são aquecidas a 37°C. Seringas, agulhas, e vidrarias utilizadas devem ser apirogênicas. A utilização de autoclaves não destrói pirogênio, para tal, se faz uso de fornos com temperatura de 250°C por 30 minutos. A veia marginal do coelho deve ser limpa com um algodão embebido no álcool 70% deixando a veia mais visível. A agulha é inserida na veia e a solução é injetada. As soluções teste são injetadas na veia marginal na dosagem de 10 mL por Kg de peso (USP 27, 2004). As injeções deverão ser feitas de forma lenta e deve-se levar em conta que em determinados produtos com ação farmacológica que interfere na resposta febril, podem ocorrer algumas reações severas, tais como morte. Além disso, com soluções ácidas, tais como Ca +2;

Mg +2; ou K+2 ou Soluções Hipertônicas ou Hipotônicas também podem interferir nos resultados.

Ao término da injeção o tempo é contado e as temperaturas são medidas por 3 horas em intervalos de 30 minutos. Os animais não podem ser perturbados durante o teste. Ao término do teste as temperaturas finais são registradas, as sondas são removidas e os coelhos retornam para suas gaiolas.

1.5.1 Interpretação do Teste

Uma amostra será considerada apirogênica se nenhum animal apresentar variação individual igual ou superior a 0,5°C. Caso contrário, o teste deverá ser repetido com cinco novos coelhos. Neste caso, a amostra será considerada apirogênica se, no máximo, três animais apresentam variação individual igual ou superior a 0,5°C e o somatório dos oito animais não for superior a 3,3°C.(USP 27, 2004).

1.6 Teste de Limulus Amebocyte Lysate- LAL

A procura de um teste “*in vitro*” alternativo ao Teste de Pirogênio realizado em coelhos começou com trabalhos inovadores de Frederick Bang, da Universidade John Hopkins, que observou a reação de coagulação intravascular causada por bactérias em caranguejos da espécie *L. polyphemus*. O teste de LAL baseia-se na reação da endotoxina com o lisado do amebócito do *Limulus polyphemus* (caranguejo ferradura) - Figura 2. Levin e Bang encontraram que o agente responsável por este fenômeno de coagulação estava nos amebócitos (um tipo de células sanguíneas) circulantes do caranguejo e que o pirogênio, (endotoxina bacteriana) produzia uma reação de gelificação com o lisado obtido de amebócitos através de um processo enzimático. A endotoxina junto com cátions divalentes ativam zimógenos de serina-protease encontrados nos amebócitos iniciando uma reação enzimática em cascata, que altera estruturalmente uma proteína chamada coagulôgeno levando assim a formação do gel proteináceo (Endosafe, River Charles). Esse teste é o mais sensível e específico meio disponível para a detecção e medida da endotoxina bacteriana, um bioproduto de bactérias gram-negativas capaz de provocar febre, comumente conhecida como pirogênio. A base desse teste é que a endotoxina bacteriana é capaz de produzir uma opacificação e gelificação do LAL. O método do

LAL cromogênico é bastante prático e simples, e é realizado reagindo-se o LAL e a amostra a ser testada, resultando uma coloração amarelada, diretamente proporcional à quantidade de endotoxina. A simplicidade e economia do teste fazem com que soluções em processo, matérias primas, produtos acabados, descartáveis e produtos biológicos sejam facilmente analisados. **A USP Bacterial Endotoxins Test and USFDA Guideline** para teste de LAL, fornece métodos padrões para a validação do método de LAL em substituição ao método de pirogênio feito em coelhos. (Endosafe-Qualidade Iso 9002)

O FDA elaborou em 1987 um guia para informar aos fabricantes de medicamentos e drogas de uso humano, uso animal e produtos descartáveis que entram em contato com o sangue circulante, os procedimentos que considera necessários para a validação do uso de LAL como um teste de endotoxina em produto final. Aqueles que usarem este teste devem considerar os procedimentos relevantes ao GMP (Boas Práticas de Fabricação). O limite geral da endotoxina para drogas parenterais é de 5 unidades de endotoxinas (EU) por Kg por dose, exceto para drogas intratecais cujo limite é de 0,2 EU/Kg. Os produtos descartáveis não devem exceder a 0,5 EU/MI. Os descartáveis que entram em contato com o fluido cérebro-espinhal tem um limite de 0,06 EU/mL.

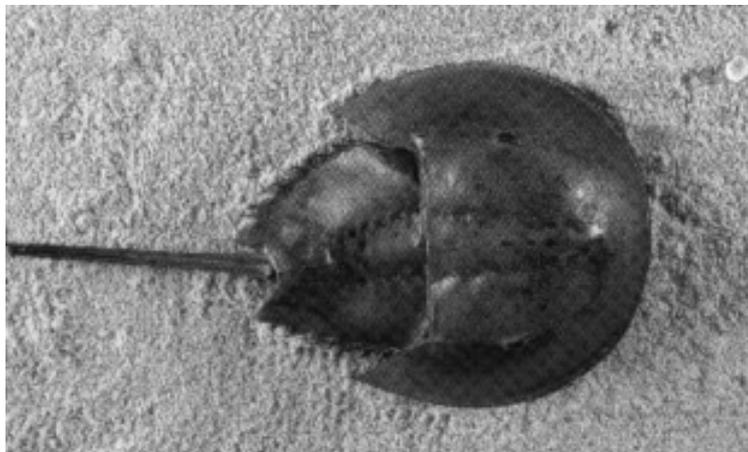


Figura 2 - *Limulus polyphemus* (Caranguejo -ferradura). (Foto extraída do folder da Whittaker Bioproducts, Inc.).

1.6.1 Coleta de amostras

Todo material ou reagente que entre em contato com a amostra deve ser apirógeno. Use técnicas assépticas. Uma vez que a reação LAL-Endotoxina depende do pH, a mistura LAL e amostra deve ter um pH entre 6,5 a 8,0. Usar o tampão da marca “Endosafe” (tris-buffer) se for necessário para o ajuste do pH.

1.6.2 Interferências

Este método deve ser validado para cada amostra, verificando-se a ausência de interferências. A inibição é normalmente dependente da concentração e é resolvida apenas com uma diluição com água apirogênica. As fontes mais comuns de inibição incluem aquelas que: 1- interfere com a reação enzimática; 2- alteram a difusão da endotoxina no controle positivo.

1.6.3 Interpretação dos resultados

Cada tubo no método de formação de gel é interpretado como positivo ou negativo. Um teste positivo apresenta a formação de um gel firme capaz de manter a sua integridade quando o tubo for invertido a 180°. O teste negativo caracteriza-se pela ausência do gel ou pela formação de uma massa viscosa que não se adere no fundo quando o tubo é invertido. Os resultados do teste só são válidos quando a água e os controles positivos na concentração de 2λ (lâmbda) e os controles negativos não mostrarem a formação do gel.

1.6.4 Máxima Diluição Válida (MVD)

A US. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION estabeleceu o limite de 5 EU/ Kg para produtos injetáveis e de 0,2 UE/ kg no caso de produtos intratecais. Limites específicos para outros itens podem ser adotados. Estes limites podem ser usados para se determinar qual deve ser a diluição a ser usada para se eliminar o problema da interferência sem exceder o limite da concentração da endotoxina. O MVD é calculado por fórmulas mostradas na USP ou FDA GUIDELINE. Para drogas que tenham o limite da endotoxina estabelecida, o MVD pode ser calculado através da fórmula abaixo.

$$\text{MVD} = \frac{\text{LIMITE DA ENDOTOXINA}}{\lambda(\text{lambda})}$$

1.7 Métodos Alternativos

De acordo com os testes e suas metodologias já utilizadas, surgiu uma tentativa de propor um código de ética para que a dor dos animais que são utilizados nestes testes fosse amenizada, além da substituição desses grandes animais por animais inferiores. Em 1842, foi fundada a British Society for Prevention of Cruelty to Animals, mas foi em 1959, com a publicação do livro *Principles of Humane Experimental Technique* (Princípios da Técnica Experimental Humana), que Russel e Burch lançaram o conceito dos 3 Rs- Replacement, Reduction and Refinement (Substituição, Redução e Refinamento)(PRESGRAVE, 2002).

Os métodos alternativos são procedimentos que podem substituir o uso de animais em experimentos, reduzir o número de animais necessários ou refinar a metodologia de forma a diminuir a dor ou desconforto sofrido pelos animais.

O sistema in vitro, como exemplo o teste de LAL, substitui um ensaio de pirogênio praticado em coelhos pela determinação quantitativa ou qualitativa da presença de endotoxinas numa solução injetável.

1.8 Testes de liberação de citocinas

Em 1988, Poole e colaboradores desenvolveram um método para substituir o teste de pirogênio em coelhos. Esta metodologia se baseava na liberação de mediadores inflamatórios(citocinas), principalmente Interleucina-1b (IL-1b) e Interleucina-6 (IL-6) a partir de uma cultura de monócitos humanos (MonoMac-6) exposta à diferentes concentrações de endotoxina (POOL E, 1988). Este método se mostrou bastante eficaz e apresentava uma curva dose dependente, isto é, quanto maior a concentração de endotoxina, maior a liberação de citocinas. Entretanto, aos poucos este método foi deixando de ser estudado, devido à dificuldade de crescimento dessa linhagem celular e em função de alguma instabilidade de resposta (NAKAGAWA *et al.*, 2002). Recentemente, este teste usando sub-clones da linhagem MonoMac-6 voltou a ser estudado, aparentemente, com uma resposta mais uniforme e com maior facilidade de manutenção da célula (NAKAGAWA *et al.*, 2002).

Na busca por um método que viesse substituir os coelhos, foi desenvolvido o método de sangue total, onde sangue humano é posto em con-

tato com a amostra a ser testada e a quantidade de citocinas liberadas é dosada por ELISA (HARTUNG & WENDEL, 1996).

II. Material e Métodos

A metodologia utilizada no presente trabalho foi a busca bibliográfica através da internet, livros-texto e revistas científicas que focam em seu escopo, principalmente, temas sobre métodos alternativos, inflamação, febre etc.

A busca na internet foi basicamente através do acesso aos *sites* MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>) e periódicos CAPES (<http://www.periodicos.capes.br>).

III. Resultados

A pesquisa nas fontes bibliográficas revelou que existem basicamente 4 métodos para a avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis: o teste em animais (coelhos), o Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL), o teste de liberação de citocinas usando linhagem celular de monócitos humanos MonoMac-6 (MM6) e o teste de liberação de citocinas usando sangue total humano. Os dois últimos prováveis substitutos do teste em animais.

Além disso, foi possível verificar que existem muitos grupos trabalhando em métodos alternativos que venham a substituir os testes em animais, em diversas áreas da toxicologia.

IV. Discussão

Apesar de ainda amplamente usado no controle de produtos para os quais o teste de LAL ainda não está validado, o ensaio de pirogênio em coelhos pode estar prestes a ser substituído por novos métodos *in vitro* (HARTUNG, 2002).

O teste de LAL, que primeiramente surgiu como forte substituto ao teste de coelhos possui a grande limitação de somente detectar endotoxinas, ou seja, produto de origem em bactérias Gram-negativas. Com isso, os outros tipos de pirogênios (fungos, bactérias Gram-positivas, pirogênios químicos etc.) não podem ser detectados por este método. Embora a grande

maioria das contaminações ocorra por endotoxinas, um controle completo fica prejudicado uma vez que uma parte das possíveis fontes de contaminação não poderão ser detectadas (HARTUNG, 2002; PRESGRAVE, 2003).

Outra grande limitação do teste de LAL é o seu uso em produtos biológicos, pois, a endotoxina uma vez ligada às proteínas plasmáticas não é possível formar o complexo com o substrato LAL, proporcionando assim, um falso negativo (PRESGRAVE, 2003). Entretanto, o teste de LAL é muito importante na produção de fármacos injetáveis e vacinas, por exemplo, pois ele pode detectar rapidamente contaminações que poderiam tornar o produto final inadequado ao uso. Assim, durante o processo de produção, pode-se fazer um controle bastante satisfatório sob o ponto de vista de ausência de endotoxinas.

Com o advento das manifestações populares no que diz respeito à proteção animal, muitos pesquisadores têm sido molestados e, até mesmo, impedidos de realizarem suas pesquisas. Esses fatos são mais acentuados na Europa. Diante disso, vários grupos iniciaram pesquisas na busca de métodos alternativos que venha a substituir o uso de animais de laboratório na experimentação, produção de cosméticos, controle da qualidade, etc. (HENRIQUES E SAMPAIO, 2002; PRESGRAVE, 2002). Essas pesquisas resultaram em algumas propostas de métodos visando não só a substituição, mas também a redução do uso de animais.

Diante da ainda grande utilização do coelho para a detecção de pirogênios, acoplado às limitações do teste de LAL, os dois teste de liberação de citocinas *in vitro* surgem como possíveis substitutos ao uso desses animais. Esses dois métodos (MM6 e Sangue Total) se baseiam na própria etiologia da febre, ou seja, uma vez que linfócitos ou monócitos entrem em contato com a endotoxina, as citocinas, que atuam como mediadores inflamatórios serão liberadas por essas células para, atingindo o hipotálamo, transformar o Ácido Aracdônico em Prostaglandina E₂ (PGE₂) e produzir a febre. No caso destes dois métodos *in vitro*, a liberação de citocinas da amostra teste comparada com a liberação do padrão positivo irá demonstrar se o produto ou substância sendo testada apresentam ou não contaminação pirogênica.

Os testes de liberação de citocinas apresentam as seguintes vantagens: a) não necessitam da infra-estrutura de criação e manutenção de animais, uma vez que não os utilizam; b) não necessitam de grande espaço físico para sua realização; c) utilizam células humanas; d) se baseiam no

mesmo princípio da febre; e) respondem a todos os tipos de pirogênios, da mesma forma que os coelhos e sem a limitação de se restringirem somente à detecção de endotoxinas, como o LAL; e f) representam uma redução de aproximadamente 60% em relação ao custo do teste em animais.

V. Conclusões

1) Os testes de liberação de citocinas se apresentam como fortes candidatos para a substituição dos coelhos no ensaio para detecção de contaminação pirogênica em produtos injetáveis;

2) Os testes de liberação de citocinas *in vitro* podem ser considerados, neste caso, mais eficientes, uma vez que são menos sujeitos à influências ambientais e interferências de produtos.

VI. Referências

A Von Haller. **Elements physiologiae corporis humani** . Vol III(1757-1766).

Bacterial Endotoxins; **Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. Endotoxins 2002**; Kenneth Todar University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

B Gaspard. **Memoire physiologique sur lês maladies purulentes et putrides, sur la vaccine etc.** J .Physiol.(Paris), 2, 1(1822).

Costa E A 2000. **Conceitos e area de abrangência**, In: Rozenfeld S(org), **Fundamentos de Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ.

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

Co Tui, Schrif M H 1942. **A tentative test for Pyrogen in infusion fluids**. Proc.Soc. exp. Biol. Med.,49, 320(1942).

E C Hort and, and W J Penfold. **The relation of salvarsan fever to other forms of injection fever**. Proc. R. Soc.Med (Pt 111),5,131(1912).

E Hort and W J Penfold. **A critical study of experimental fever.** Proc R Soc Lond{ Biol}, 85, 174(1912).

E Hort and W Penfold. **Microorganisms and their relation to fever.** J.Hyg, 12, 361(1912).

Estados Unidos da América, 2000. **United States Pharmacopoeia- USP XXIV.**

Estados Unidos da América 2004. **United States Pharmacopoeia- USP XXVII.**

F B Seibert. **The cause of many febrile reactions following intravenous injections.** Am. J. Physiol.,71,621(1925).

Hartung T, A aberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S., Fenrich S, Fisher M, Gommer H, Halder H, Haslov K, Jahnke M, Montag-Lessing T, Poole S, Schechtman 2, Wendel A, Werner Felmayer G 2000. **Novel pyrogen tests based on the human fever reaction.** ATLA; 29:99-123.

Hartung T, Wendel A 1996. Detection of pyrogens using human whole blood. In Vitro Toxicol.; 9(4); 353-359.

J Levin and F bang. **The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood.** Bill Johns Hopkins Hosp., 115(1964).

Nakagawa Y, Maeda H, Murai T 2002. **Evaluation of the in vitro test system base don proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with human blood culture system and with the rabbit pyrogen test.** Clin. Diagn. Lab. Immunol; 9(3) 588-597.

M J Shear and F C Tunner. **Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage- producing fraction from *Serratia marcescens*(*Bacillus prodigiosus*) culture filtrates.** J N C I, 4, 81(1943).

Pearson III F C 1985. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and depyrogenation.** New York: Marcel Dekker, Inc.:

P L Pannum. **Das putride gift, die bakterien, die putride infection oder intoxication und die septikämie.** Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med(Virchow's Arch.), 60,301(1874).

Pool E J, Johaar G, James S, Petersen I, Buic P 1998. **The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay.** J. Immunoassay:19(2&3); 95-111.

Presgrave O A F, 2002. **Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador.** In: Andrade A, Pinto S C, de Oliveira R S(orgs). Animais de laboratório-Criação e experimentação. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ.

Presgrave O A F, 2003. **Teste de Liberação de Citocinas como método alternativo ao Ensaio de Pirogênio em coelhos no Controle de Qualidade de Produtos Injetáveis.** Diisertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ.

River, Charles. **Endotoxins Detection Products and Services:** 2004;Endosafe (<http://www.endosafe.com/products/in vitro/endotoxin/endo-history...>).

Santos F, Santos G A, Raubach A, Bienat C J, Souza L E M, Aguirre A, Antoniazzi R V, Scorsatto K, Seibel I, Demin S S, Hickman C A, Oliveira P F, Borba V E, Simon S, Santos S. Endotoxina e Hemodiálise. Medicina on Line. Revista virtual de Medicina. Vol 1. Número 8. Ano I, 2000.

T Billbroth. **Beobachtungsstudien uber dos wundfieber und accidentalle wund-krankheiten.** Arch. Klin. Chir.,2, 578(1862).

T F Probey and M Pittman. **The pyrogenicity of bacterial contaminants found in biologic products.** J. Bactriolo.,50,397(1945).

Weary M 1985. **The rabbit pyrogen test.** In Pearson III F C **Pyrogens endotoxins, LAL testing, and depyrogenation.** New York. Marcel Dekker. Inc.