

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**Teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênios *in vitro* aplicado  
à vacina meningocócica C conjugada.**

**VÍTOR FERNANDES SILVA**

**Rio de janeiro  
2017**

# **INSTITUTUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**VÍTOR FERNANDES SILVA**

**Padronização do teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênios  
*in vitro* em substituição ao teste *in vivo*: verificação da aplicabilidade do  
ensaio à vacina meningocócica C conjugada.**

Defesa apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Ciências Biomédicas / CICT / FIOCRUZ - RJ

Silva, Vítor Fernandes

Padronização do teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênios *in vitro* em substituição ao teste *in vivo*: verificação da aplicabilidade do ensaio à vacina meningocócica C conjugada./Vítor Fernandes Silva. Rio de Janeiro: 2017.

Dissertação – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2017.

1. Teste de ativação de monócitos
2. Vacina Meningocócica C Conjugada
3. Pirogênios.

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação da Prof. Dra. Katherine Antunes de Mattos e do Prof. Dr. Daniel Da Silva Guedes Junior.

## **INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**VÍTOR FERNANDES SILVA**

**Padronização do teste de ativação de monócitos para detecção de pirogênicos  
*in vitro* em substituição ao teste *in vivo*: verificação da aplicabilidade do  
ensaio à vacina meningocócica C conjugada.**

Orientadores: Prof. Dra. Katherine Antunes de Mattos

Prof. Dr. Daniel Da Silva Guedes Junior

Examinadores:

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves

CPqRR/Fiocruz - Presidente

Prof. Dr. Octávio Augusto França Presgrave

INCQS/ Fiocruz

Prof. Dr. Gutemberg Alves

HUAP/UFF

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Fiocruz e Bio-manguinhos, pela oportunidade de ingressar no mestrado e desenvolver este trabalho, e pelo suporte técnico-científico.

Ao Departamento de Controle de Qualidade por permitir que eu conciliasse meus deveres profissionais com o tempo dedicado ao mestrado.

Aos meus pais, Clara e Alex, por me educarem e por me darem suporte em todas as minhas escolhas profissionais, obrigado mãe por aturar todos os meus momentos de mau humor, você é a única que realmente conviveu comigo durante toda esta fase. Aos meus irmãos, Wagner, Wander, Vinicius e Vívian, por partilharem da mesma filosofia de vida que nossos pais nos ensinaram e por serem sempre as primeiras pessoas com quem poderei contar ao longo da minha vida. A toda minha família, pois cada um da sua forma me tornou a pessoa que sou hoje, em especial a minha tia Wânia por ser um exemplo de força e perseverância e um espelho para minha vida acadêmica, e a minha prima Janaina por ter sido meu suporte emocional durante momentos de necessidade.

A minha orientadora Katherine Antune de Mattos, por ser a mente mais brilhante que já conheci, por todo aprendizado que me forneceu e pela paciência que teve comigo ao longo destes dois anos, sem você nada disso seria possível. Ao meu orientados Daniel Da Silva Guedes Junior, pelos momentos de clareza, por me acalmar nos momentos de maior estresse e pela amizade que sempre esteve presente independente desta jornada. A Alessandra Santos Almeida, minha pseudo-orientadora, que mesmo sem obrigação esteve sempre disposta a me ajudar, quebrou a cabeça comigo para solucionar problemas e foi a chefe mais compreensiva que alguém poderia querer neste momento de sobrecarga. Obrigado por abraçarem esta causa comigo.

Aos meus colegas de trabalho, Daiane Bellucio, Elaine Navega, Ricardo Gonçalves, por suprirem minha ausência dentro da seção. A todos da SETBI pelos debates científicos sobre pirogênios e pela amizade no âmbito de trabalho. Aos amigos da SEBCEL, especialmente Daniele Almeida pelo suporte no cultivo de células. A Ivna da Silveira por ceder as amostras para os experimentos, pelos inúmeros artigos fornecidos e pelo interesse demonstrado no projeto. A Darcy Hokama e Igor Barbosa, por acreditarem no meu potencial e autorizarem minha participação no programa de pós-graduação.

Aos meus colaboradores do INCQS, particularmente Octávio Presgrave e Cristiane Caldeira, que me iniciaram nos experimentos com MAT, obrigado por todo o suporte técnico, pela disponibilidade em ajudar e ceder material, equipamentos, instalações, torço para que esta parceria siga forte e aguardo o momento para poder retribuir.

Aos meus amigos do MPTI, por compartilharem esta estrada comigo, sempre um dando força para o outro, pelo compartilhamento da sala de aula ao longo do primeiro ano, e por todas as atividades extra-classe, em especial à Marina Vergne, Jéssica Malheiros, Nathália Costa, Carolina Lindenberg e Isabelly Pereira.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de forma pessoal ou profissional para concretização deste documento e a conclusão de mais uma etapa acadêmica, pessoal e profissional da minha vida.

## ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1: Doenças Meningocócicas.....	1
1.1.1: <i>Neisseria meningitidis</i> .....	2
1.1.1.1: Epidemiologia.....	3
1.1.1.2: Vacinas meningocócicas.....	6
1.1.1.2.1: Vacinas polissacarídicas.....	6
1.1.1.2.2: Vacinas conjugadas.....	7
1.2: Controle de qualidade.....	10
1.3: Pirogênios.....	10
1.3.1: Endotoxina.....	11
1.3.2: Pirogênios Não-Endotoxina.....	13
1.4: Métodos de detecção de pirogênios.....	16
1.4.1: Teste de Pirogênio em Coelhos.....	16
1.4.2: Métodos alternativos.....	18
1.4.2.1: Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> (LAL).....	19
1.4.2.2: Teste de Ativação de Monócitos (MAT).....	21
1.5: Aplicação do conceito dos 3R's em imunobiológicos.....	27
1.6: Justificativa.....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1: Objetivo geral.....	30
2.2: Objetivo específico.....	30
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
3.1: Matrizes celulares.....	31
3.1.1: Coleta do sangue total (WBT).....	32
3.1.2: Contagem das células sanguíneas.....	32
3.1.3: Sangue fresco.....	32
3.1.4: Sangue criopreservado.....	33
3.2: Referência de endotoxina.....	33



3.3: Referência de Ácido Lipoteicóico (LTA).....	34
3.4: Referência de zymosan A.....	35
3.5: Polimixina B.....	35
3.6: Vacina Meningocócica C Conjugada.....	36
3.7: Máxima Diluição Válida.....	38
3.8: Teste de interferentes.....	38
3.9: Teste de Ativação de Monócitos.....	39
3.9.1: Contato da MenCC com sangue.....	39
3.9.1.1: Contato da MenCC com sangue fresco.....	40
3.9.1.2: Contato da MenCC com sangue criopreservado.....	41
3.9.2: Dosagem de Citocinas.....	41
3.9.3: Interpretação do ensaio MAT.....	42
3.10: Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> .....	44
3.10.1: Controles.....	44
3.10.2: Preparo das amostras.....	45
3.10.3: Reagente LAL.....	46
3.10.4: Leitura da placa .....	46
3.10.5: Interpretação do ensaio do LAL.....	46
3.11: Teste de Pirogênio em Coelhos.....	46
3.11.1: Preparo das amostras.....	46
3.11.2: Animais.....	47
3.11.3: Procedimento.....	47
3.11.4: Interpretação do ensaio do RPT.....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
4.1: Vacina Meningocócica C Conjugada.....	49
4.1.1: Teste de Pirogênio em Coelhos.....	49
4.1.2: Teste do Lisado de Amebócito de <i>Limulus</i> .....	50
4.2: Teste de Ativação de Monócitos.....	51
4.2.1: Qualificação dos doadores.....	51
4.2.2: Qualificação das células provenientes dos doadores para o ensaio.....	52
4.3: Cálculo do MDV da MenCC.....	54
4.4: Avaliação da citotoxicidade da MenCC na matriz monocítica.....	55
4.5: Teste de interferentes para o sistema de detecção MAT.....	56
4.5.1: Teste de interferente para o adjuvante da MenCC.....	61

4.5.2. Avaliação da da intterfêrencia da vacina na produção da curva de LPS.....	64
4.5.3: Análise comparativa da curva dose-resposta de LPS em sangue total criopreservado utilizando IL-1 $\beta$ e IL-6 como parâmetros de leitura.....	66
4.6: Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT.....	66
4.6.1: Variabilidade dos sistemas do MAT.....	70
4.7: Detecção de NEPs pelo MAT.....	71
4.7.1: Detecção de contaminação com Ácido Lipoteicóico pelo MAT.....	71
4.7.1.1: Detecção de contaminação com Ácido Lipoteicóico pelo MAT na MenCC.....	74
4.7.1.2: Avaliação da curva de LTA no teste MAT em MenCC e NaCl.....	75
4.7.1.3: Método A realizado com LTA.....	77
4.7.2: Detecção de contaminação com zymosan pelo MAT.....	78
4.8: Análise comparativa do conteúdo pirogênico da MenCC por diferentes métodos farmacopeicos.....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
ANEXO I.....	101

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAMI	Associação Para Avanço Na Instrumentação Médica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BET	Bacterial endotoxin test (Teste de Endotoxina Bacteriana)
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Concentração da amostra
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
DH	Dose humana
DM	Doença Meningocócica
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECVAM	European Center for the Validation of Alternative Methods
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FDA	Food and Drug Administration
FB	Farmacopeia Brasileira
FE	Farmacopeia Europeia
Hib	Vacina Conjugada Contra Haemophilus Influenza Tipo B
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
LAL	Lisado de Amébócito de Limulus
LD	Limite de Detecção
LE	Limite de Endotoxina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Lipoteichoic acid (Ácido Lipoteicóico)
MAT	Monocyte Activation Test (Teste de Ativação de Monócitos)
MDV	Máxima Diluição Válida
MenCC	Vacina meningocócica C conjugada
NEPs	Non-Endotoxin pyrogens (Pirogênios Não-Endotoxina)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Periferal Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

PMB	Polimixina B
PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptores de Reconhecimento de Padrões)
PNI	Programa Nacional de Imunização
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RPT	Rabbit Pyrogen Test (Teste de Pirogênio em Coelhos)
TLR	Toll-like receptor (Receptores semelhantes à Toll)
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
UE	Unidades de Endotoxina
UEE	Unidades Equivalentes de Endotoxina
USP	United States Pharmacopeia
WBT	Whole Blood Test (Teste do Sangue Total)
WFI	Water For Injections

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Incidência da DM por faixa etária.....	2
Figura 1.2: Manifestação clínica da DM.....	3
Figura 1.3: Distribuição geográfica por sorogrupo da DM.....	4
Figura 1.4: Distribuição de sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> por regiões no Brasil.....	5
Figura 1.5: Incidência de DM em países com e sem introdução da MenCC.....	9
Figura 1.6: Desenho esquemático da parede celular de bactéria Gram-negativa.....	12
Figura 1.7: Desenho esquemático da parede celular de bactéria Gram-positiva.....	14
Figura 1.8: Desenho esquemático da parede celular de Fungo.....	15
Figura 1.9: Teste de pirogênio em coelhos.....	17
Figura 1.10: Coleta da hemolinfa do caranguejo ferradura.....	19
Figura 3.1: Preparo da curva padrão de endotoxina.....	34
Figura 3.2: Preparo da curva padrão de LTA.....	34
Figura 3.3: Preparo da Curva Padrão de zymosan.....	35
Figura 3.4: Fluxograma de produção e controle de qualidade da MenCC em desenvolvimento em Bio-manguinhos .....	37
Figura 3.5: Esquema de diluição das citocinas.....	42
Figura 3.6: Diluição seriada da curva-padrão de endotoxina.....	44
Figura 3.7: Disposição da curva-padrão, controles e amostras na placa de 96 poços.....	45
Figura 4.1: Curva de IL-6 na qualificação dos doadores.....	53
Figura 4.2: Gráfico da curva padrão de citocinas de teste de interferente da MenCC.....	58
Figura 4.3: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-6.....	60
Figura 4.4: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-1 $\beta$ .....	61
Figura 4.5: Teste de interferente da MenCC reconstituída com adjuvante para leitura com IL6.....	63
Figura 4.6: Recuperação de LPS em diferentes diluições do adjuvante, IL-6.....	64

Figura 4.7: Análise da interferência de MenCC na detecção de pirogênios utilizando sangue criopreservado/IL-6.....	65
Figura 4.8: Análise da interferência de MenCC na detecção de pirogênios utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .....	65
Figura 4.9: Relação entre os perfis de indução de IL-6 e IL-1 $\beta$ através da curva de endotoxina.....	66
Figura 4.10: Avaliação dos lotes da MenCC por diferentes sistemas do MAT.....	70
Figura 4.11: Curva de LTA gerada em NaCl e curva de LTA com PMB gerada em NaCl.....	72
Figura 4.12: Curva de LTA com PMB gerada através de contaminação proposital em MenCC e em NaCl/IL-6.....	73
Figura 4.13: Curva de LTA com PMB gerada através de contaminação proposital em MenCC e em NaCl/IL-1 $\beta$ .....	74
Figura 4.14: Análise da interferência de MenCC na detecção de NEPs utilizando sangue criopreservado/IL-6.....	76
Figura 4.15: Análise da interferência de MenCC na detecção de pirogênios utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .....	77
Figura 4.16: Detecção de LTA nos lotes da vacina através de leitura com IL-6.....	78
Figura 4.17: Curva de zymosan gerada em NaCl com e sem PMB.....	79
Figura 4.18: Curva de zymosan com PMB gerada em NaCl.....	79
Figura 4.19: Detecção de zymosan nos lotes da vacina através de leitura com IL-6.....	81
Figura 4.20: Ensaio do LAL para detecção de LPS e LTA em MenCC e NaCl.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Contato da MenCC com sangue fresco em microtubos.....	40
Tabela 3.2: Contato da MenCC com sangue criopresevado em microtubos.....	41
Tabela 4.1: Resultado do RPT realizado nos três lotes da MenCC.....	50
Tabela 4.2: Resultado do teste LAL cinético-cromogênico realizado nos três lotes da MenCC.....	51
Tabela 4.3: Perfil hematológico dos doadores.....	52
Tabela 4.4: Curva de IL-6 referente ao ensaio de qualificação das células dos doadores.....	53
Tabela 4.5: Resposta dos doadores ao estímulo com LPS.....	54
Tabela 4.6: Contagem de células do sangue após o contato com diferentes concentrações de MenCC e como controle salina e LPS.....	56
Tabela 4.7: Curva padrão de citocinas do teste de interferente da MenCC.....	57
Tabela 4.8: Liberação de citocinas pela curva de LPS no teste de interferente da MenCC.....	59
Tabela 4.9: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-6.....	59
Tabela 4.10: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-1 $\beta$ .....	60
Tabela 4.11: Teste de Interferente da MenCC reconstituída com adjuvante.....	62
Tabela 4.12: Teste de Interferente no Adjuvante da Vacina.....	63
Tabela 4.13: Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT utilizando sangue criopresevado/IL-6.....	67
Tabela 4.14: Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT utilizando sangue criopresevado/IL-1 $\beta$ .....	67
Tabela 4.15: Avaliação da MenCC reconstituída com adjuvante, sangue criopresevado/IL-6.....	68
Tabela 4.16: Avaliação dos três lotes da MenCC/Salina, sangue fresco/IL-6.....	69
Tabela 4.17: Variação na resposta de IL-1 $\beta$ e IL-6 em sangue fresco e criopresevado.....	71
Tabela 4.18: Curva de LTA em Cloreto de Sódio, sangue criopresevado/IL-6.....	73
Tabela 4.19: Curva de LTA em Cloreto de Sódio, sangue criopresevado/IL-1 $\beta$ .....	74

Tabela 4.20: Curva de LTA em MenCC, utilizando sangue criopreservado/IL-6.....	75
Tabela 4.21: Curva de LTA em MenCC, utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .....	75
Tabela 4.22: Detecção de LTA na MenCC, sangue criopreservado/IL-6.....	78
Tabela 4.23: Detecção de zymosan na vacina através de leitura com IL-6/sangue criopreservado.....	80
Tabela 4.24: Comparação entre os três métodos de detecção de pirogênios.....	83



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Incidência de meningite bacteriana no Brasil por diferentes agentes infecciosos.....	7
Quadro 1.2: Vacina Meningocócica: Polissacarídica <i>versus</i> Conjugada.....	8
Quadro 1.3: Incorporação dos testes de detecção de pirogênio nas principais farmacopeias.....	16
Quadro 1.4: Fatores interferentes nos testes de pirogênio e suas limitações no controle da qualidade de produtos biológicos.....	21
Quadro 1.5: Limitações do RPT e LAL frente ao MAT.....	22
Quadro 1.6: Variantes dos sistemas do ensaio MAT na literatura.....	24
Quadro 1.7: Vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de detecção.....	25
Quadro 1.8: Produtores do kit do MAT.....	25
Quadro 3.1: Variantes dos sistemas do ensaio MAT.....	31
Quadro 3.2: Recomendações para o controle de qualidade do produto final da MenCC.....	37
Quadro 3.3: Parâmetros e especificações dos resultados .....	43

## RESUMO

A detecção de pirogênios em produtos parenterais é mandatória pelas agências reguladoras. Atualmente, para avaliar o conteúdo de pirogênios, as principais farmacopeias preconizam o teste de pirogênio em coelhos (RPT), o lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) e o teste de ativação de monócitos (MAT). Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade do MAT ao CQ da vacina Meningocócica C conjugada (MenCC) como alternativa ao uso de coelhos no teste de pirogenia *in vivo*, ampliar a detecção de potenciais fontes de pirogênios não-endotoxina (NEPs), realizar análise comparativa entre os diferentes sistemas do MAT, comparando sistemas validados (ICCVAM 2008) com uma proposta original, sangue criopreservado/IL-6 e confrontar os dados dos três ensaios de detecção de pirogênios, RPT, LAL e MAT, aplicados a lotes da MenCC. Os sistemas do MAT combinaram a utilização de matrizes monocíticas (sangue total fresco e criopreservado) e a detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) como parâmetros de leitura. Lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicóico (LTA) e zymozan A (ZA) foram utilizados como padrões moleculares associados à pirogenia de Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, respectivamente. Foram avaliados 3 lotes de MenCC produzidos por Bio-Manguinhos. Estes foram incubados em contato com a matriz monocítica em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C e após 16 horas foram quantificadas IL-1 $\beta$  e IL-6 pelo ensaio de ELISA (R&D Systems). Em paralelo, os lotes foram analisados frente aos métodos farmacopeicos clássicos de detecção de pirogênios, o LAL e o RPT. A validação produto específica, MenCC frente ao MAT não apresentou interferência, mostrando aplicabilidade do teste ao produto. Todas as diluições da vacina, bem como a presença do adjuvante não interferiram na detecção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , induzidos pelo padrão exógeno de LPS. O sistema foi capaz de identificar NEPs (LTA e ZA) na presença de MenCC. Análises estatísticas demonstraram uma boa correlação entre os sistemas de leituras (IL-1 $\beta$  e IL-6) para curvas de LPS em NaCl ( $r=0,9918$  e  $p=0,0001$ ) e em MenCC ( $r=0,9702$  e  $p=0,0028$ ). Os ensaios de linhas paralelas das curvas de LPS e LTA em NaCl *versus* MenCC demonstraram que o p-valor para o não-parallelismo não foi significativo para IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p > 0,05$ ). Os ensaios quantitativos demonstraram que os 3 lotes foram considerados não pirogênicos, reforçando os resultados obtidos pelos métodos clássicos RPT e LAL. O presente estudo demonstrou a aplicabilidade do MAT para a MenCC, observando uma correlação positiva com os ensaios clássicos RPT e LAL, bem como a análise diferencial e quantitativa de NEPs, potenciais alvos de contaminação na indústria. Os resultados abrem uma avenida de oportunidades atendendo o recrutamento internacional de esforços para redução de animais, principalmente para fins industriais, dando início a uma missão preventiva às futuras regulamentações referentes ao uso de animais no Brasil.

Palavras-chave: Teste de ativação de monócitos (MAT), Vacina Meningocócica C Conjugada (MenCC), pirogênios.

## ABSTRACT

The detection of pyrogens in parenteral products is mandatory by regulatory agencies. Currently, to evaluate the pyrogen content, the main pharmacopoeias recommend pyrogen test in rabbits (RPT), *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) and monocyte activation test (MAT). The objective of this study was to evaluate the applicability of MAT to CQ of Meningococcal C conjugate vaccine (MenCC) as an alternative to the use of rabbits in the *in vivo* pyrogen test, to increase the detection of potential non-endotoxin pyrogenic sources (NEPs), to perform a comparative analysis between different MAT systems, comparing validated systems (ICCVAM 2008) with an original proposal, cryopreserved blood / IL-6 and confront data from the three pyrogen detection tests, RPT, LAL and MAT, applied to batches of MenCC. The MAT systems combined the use of monocytic matrices (fresh and cryopreserved whole blood) and the detection of proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 $\beta$ ) as reading parameters. Lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA) and zymozan A (ZA) were used as molecular standards associated with Gram-negative, Gram-positive and fungal pyrogens, respectively. Three batches of MenCC produced by Bio-Manguinhos were evaluated. These were incubated in contact with the monocytic matrix at 37 ° C with CO<sub>2</sub> and after 16 hours IL-1 $\beta$  and IL-6 were quantified by the ELISA assay (R & D Systems). In parallel, the lots were analyzed against the classical pharmacological methods of detection of pyrogens, the LAL and the RPT. The specific product validation, MenCC vs MAT did not present interference, showing applicability of the test to the product. All dilutions of the vaccine, as well as the presence of the adjuvant did not interfere in the detection of IL-6 and IL-1 $\beta$ , induced by the exogenous pattern of LPS. The system was able to identify NEPs (LTA and ZA) in the presence of MenCC. Statistical analyzes showed a good correlation between the reading systems (IL-1 $\beta$  and IL-6) for LPS curves in NaCl ( $r = 0.9918$  and  $p = 0.0001$ ) and in MenCC ( $r = 0.9702$  and  $p = 0.0028$ ). The parallel line assays of the LPS and LTA curves in NaCl versus MenCC demonstrated that the  $p$ -value for non-parallelism was not significant for IL-1 $\beta$  and IL-6 ( $p > 0.05$ ). The quantitative tests showed that the 3 lots were considered non-pyrogenic, reinforcing the results obtained by the classical RPT and LAL methods. The present study demonstrated the susceptibility of MenCC to MAT analysis, observing a positive correlation with the classic RPT and LAL assays, as well as the differential and quantitative analysis of NEPs, potential contamination targets in the industry. The results open a range of opportunities, taking into account the international recruitment of efforts to reduce the animal use, mainly for industrial purposes, starting a preventive mission to future regulations regarding the use of animals in Brazil.

Keywords: Monocyte Activation Test (MAT), Meningococcal C Conjugate Vaccine (MenCC), pyrogens.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doenças Meningocócicas

O termo meningite expressa a ocorrência de um processo inflamatório das meninges, membranas que envolvem o cérebro. A meningite pode ser causada por diversos agentes infecciosos como bactérias, vírus e fungos, dentre outros. As meningites infecciosas causadas por bactérias e vírus são as mais importantes do ponto de vista da saúde pública, pela magnitude de sua ocorrência e potencial de produzir surtos. Os principais agentes bacterianos causadores de meningite são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Haemophilus influenzae* (Ministério da Saúde 2009).

A meningite é uma síndrome na qual, em geral, o quadro clínico é grave e caracteriza-se por febre, cefaleia intensa, náusea, vômito, rigidez da nuca, prostração e confusão mental, sinais de irritação meníngea, acompanhados de alterações do líquido cefalorraquidiano (Ministério da Saúde 2009).

A susceptibilidade à doença é geral, entretanto a maior incidência ocorre em infantes com menos de um ano de idade, e permanece alta até aproximadamente os 5 anos de idade, a incidência volta a aumentar em adolescentes e jovens adultos, e em adultos com mais de 65 anos (Stephen 2016), podemos observar a variação na incidência da DM de acordo com a faixa etária na Figura 1.1. Os neonatos raramente adoecem, em virtude da proteção conferida por anticorpos maternos, porém esta imunidade vai declinando até os 3 meses de idade, com o consequente aumento da susceptibilidade (Ministério da Saúde 2009, Bosis 2015).

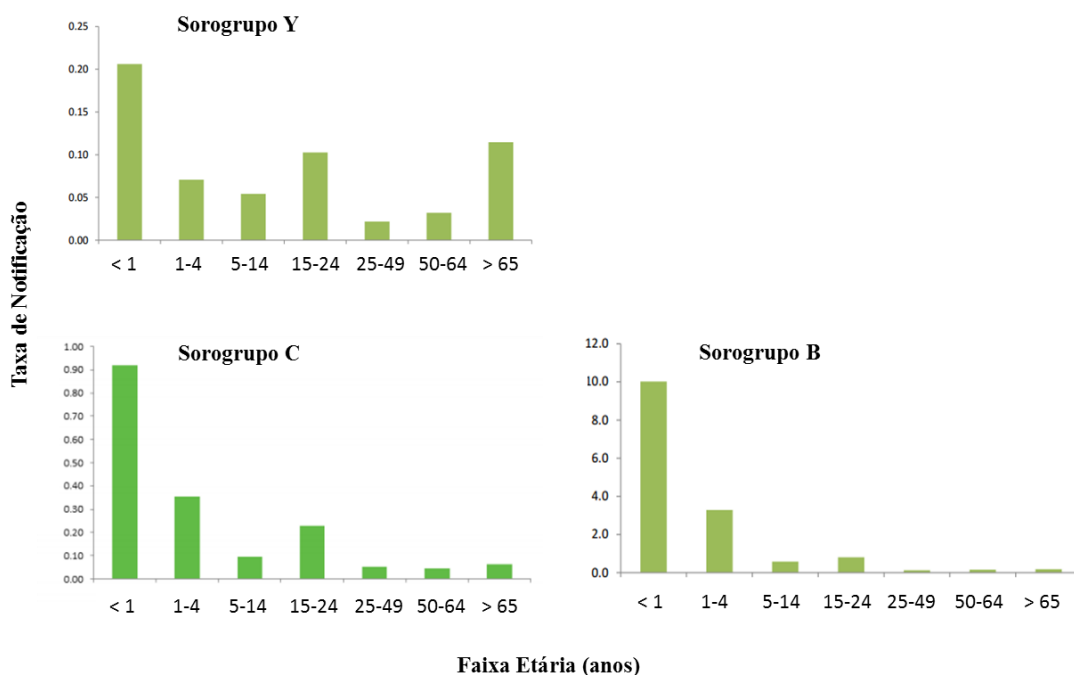


Figura 1.1: Incidência da DM por faixa etária.

Fonte: Adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control (2011).

### 1.1.1. *Neisseria meningitidis*

*Neisseria meningitidis* é uma bactéria Gram-negativa microaerófila em forma de coco, geralmente orientada em pares, que infecta exclusivamente humanos. É causadora da DM, o que representa um problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade ao redor do mundo (Dwilow 2015, Bosis 2015, Cohn 2015).

*N. meningitidis* é dividida em 13 sorogrupos, baseado na imunquímica de sua cápsula polissacarídica, entretanto apenas os sorogrupos A, B, C, Y e W135 são os mais frequentes causadores de doenças (WHO 2004; Bosis 2015; Silveira et al. 2007; Stephen 2016). Podem também ser classificados em sorotipos ou subtipos, de acordo com os antígenos proteicos da parede externa do meningococo (Ministério da Saúde 2009).

*N. meningitidis* é um dos patógenos mais importantes ao redor do mundo. Infecção invasiva por *esta* bactéria resulta em um amplo espectro clínico sendo a meningite e a septicemia as apresentações clínicas mais comuns (WHO 2004), como observado em dados de vigilância na Europa (Figura 1.2). DM causam grande medo na população devido ao seu início

repentino, rápido progresso, alta letalidade, potencial epidêmico e sequelas encontradas em sobreviventes (Bosis 2015).

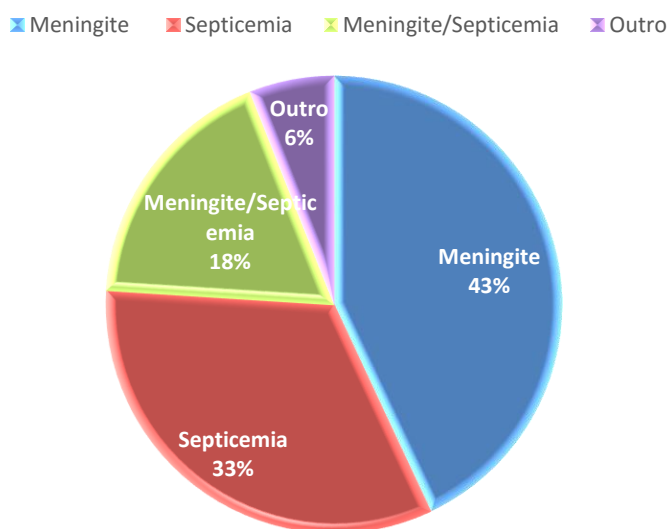


Figura 1.2: Manifestação clínica da DM.

Fonte: Adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control (2011).

Antibioticoterapia precoce e cuidados clínicos permitem a redução na taxa de mortalidade relacionada à DM, entretanto a doença ainda apresenta altas taxas de letalidade e risco de sérias sequelas, particularmente em países em desenvolvimento. Por esta razão a vacinação é considerada a melhor forma de prevenção e de controle estratégico (Silveira et al. 2007).

#### 1.1.1.1. Epidemiologia

A DM tem distribuição mundial e sua expressão epidemiológica depende de diferentes fatores, como a existência de aglomerados populacionais, características sócioeconômicas dos grupos populacionais e meio ambiente (Ministério da Saúde 2009). O sorogrupo causador da DM varia geograficamente, principalmente devido a diferenças na imunidade populacional e fatores ambientais (Figura 1.3). O meningococo A ocorre na África e em algumas áreas da Ásia,

enquanto sorogrupos B, C e Y são predominantes em outros continentes, incluindo Europa e América do Norte (Bosis 2015).

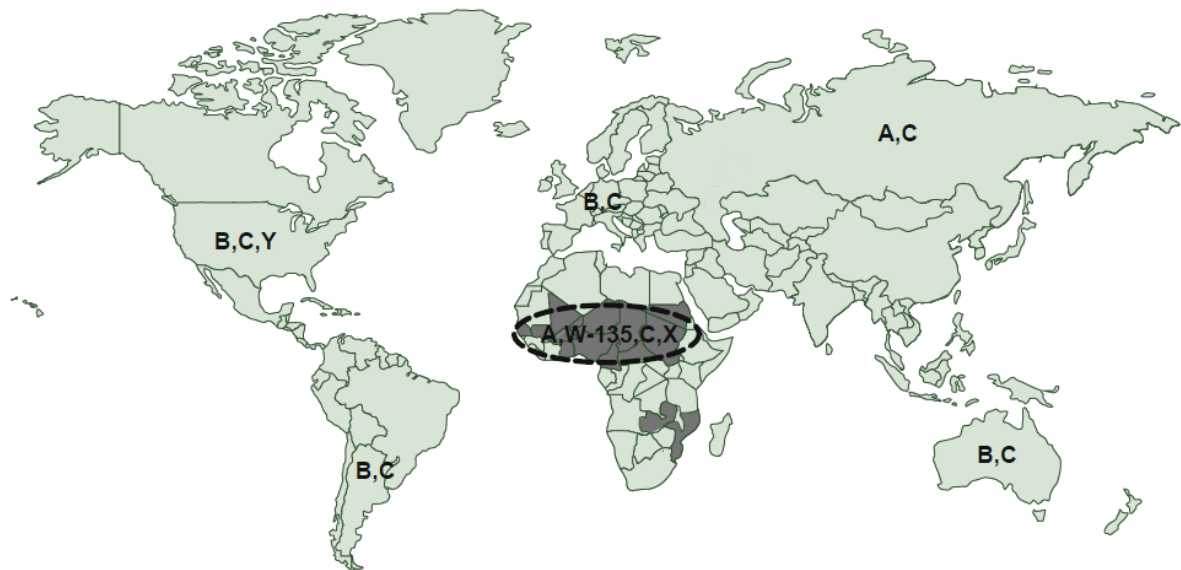


Figura 1.3: Distribuição geográfica por sorogrupo da DM.

A, B, C, W: sorogrupos de *N. meningitidis*.

Fonte: Stephen (2016)

A DM pode se manifestar de forma endêmica com casos esporádicos, ou de forma epidêmica com surtos de tamanho e duração variados. A incidência da doença é maior em crianças menores de um ano, porém ocorre também em adolescentes e jovens adultos por apresentarem altas taxas de colonização da nasofaringe por *N. meningitidis*, que é um constituinte comum da microbiota da nasofaringe humana, esta colonização é um precursor necessário para o desenvolvimento da DM. As taxas da DM podem aumentar em certos grupos durante surtos e epidemias, associando-se a grupos onde existem aglomerações e que tenham contato próximo, facilitando a contaminação através do ar, como escolas, dormitórios universitários e quartéis, o que demonstra a alta transmissibilidade da *N. meningitidis* pelo aumento nas taxas de portadores (Dwilow 2015, Stephen 2016).

No Brasil a DM é endêmica, com ocasionais surtos localizados. Nas décadas de 70 e 80, ocorreram epidemias em várias cidades do país devido aos sorogrupos A e C e, posteriormente ao B (Ministério da Saúde 2009). Vários surtos ocasionados pelo sorogrupo C vêm ocorrendo em diferentes regiões do Brasil desde o início do século, com taxas de letalidade em torno dos

20%, o que pode ser relacionado à condição de vida precária e falta de acesso a serviços da saúde em determinadas regiões do país (Silveira et al. 2007).

Também vem sendo relatado alta incidência entre crianças com menos de dois anos de idade, e 40% dos casos ocorrendo em crianças menores de 4 anos de idade. Atualmente o sorogrupo C é o maior responsável pelas DM no país (Figura 1.4) (grupo C 68,1%, grupo B 19,8%), se tornando um sério problema para saúde pública (Silveira et al. 2007).

A introdução de vacinas sorogrupo específicas contra *N. meningitidis* vem demonstrado a redução na prevalência da DM. Para maximizar o benefício destas vacinas é imperativo compreender a epidemiologia local da área geográfica onde estas serão aplicadas (Stephen 2016).

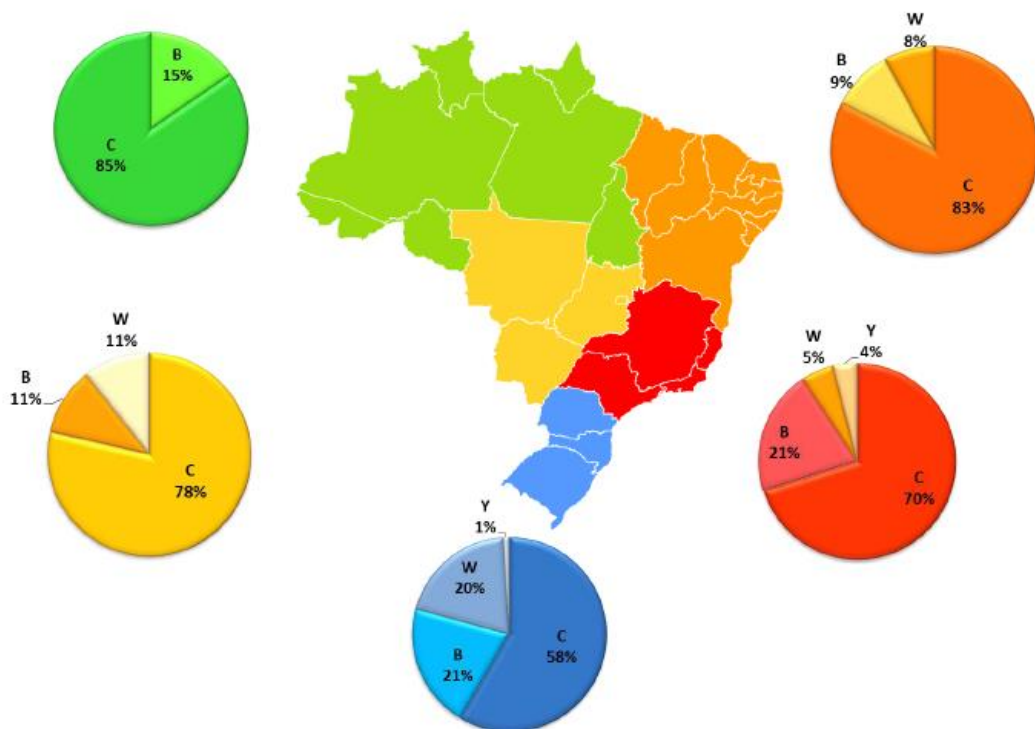


Figura 1.4: Distribuição de sorogrupos de *N. meningitidis* por regiões no Brasil.

A, B, C, W: sorogrupos de *N. meningitidis*.

Fonte: SINAN/SVS/MS. \*Dados atualizados em: 28/05/2015



### **1.1.1.2. Vacinas meningocócicas**

Recentemente, novas vacinas meningocócicas vêm sendo introduzidas no mundo todo, resultando na redução de forma geral da doença (Bosis 2015). Formulações vacinais contra DM incluem tanto vacinas polissacarídicas como vacinas com polissacarídeo conjugado à proteína carreadora. Em contraste a outras doenças, a DM tem um curto período de incubação, logo suficientes níveis de anticorpos são constantemente necessários, ao invés de basear-se apenas na geração de memória (Dwilow 2015), por isso a importância de diferentes estratégias vacinais.

#### **1.1.1.2.1. Vacinas polissacarídicas**

As vacinas polissacarídicas promovem adequada atividade de anticorpos bactericidas em indivíduos imunologicamente maduros, e vêm sendo utilizadas efetivamente no controle de epidemias e surtos localizados. A primeira vacina meningocócica polissacarídica desenvolvida tinha como alvo o combate aos sorogrupos A e C, com o intuito de combater uma epidemia de meningite entre militares americanos em 1970 (Pellegrino et al. 2014). Atualmente as vacinas polissacarídicas licenciadas e presentes no mercado são a bivalente (sorogrupo A e C), trivalente (sorogrupo A, C e W-135) e a tetravalente (sorogrupos A, C, W-135 e Y) (Hedari et al. 2014).

Entretanto, apesar de serem seguras e gerarem anticorpos bactericidas em crianças e adultos, vacinas baseadas apenas no polissacarídeo apresentam sérios inconvenientes, como variação na imunogenicidade de acordo com a idade, aumento da resposta em subsequente exposição ao polissacarídeo e falha na geração de memória imunológica, pois os polissacarídeos são antígenos células T-independente que não estimulam células B de memória (WHO 2004, Hedari et al. 2014). Além disso, vacinas polissacarídicas são pouco imunogênicas em infantes, por esta razão vêm sendo substituídas por vacinas de polissacarídeos conjugados a proteínas, para aumentar a imunogenicidade e introduzir resposta de memória (Silveira et al. 2007).

### 1.1.1.2.2. Vacinas conjugadas

Após a introdução da vacina conjugada contra *Haemophilus influenza* tipo B (Hib) em diversos países latino americanos, *N. meningitidis* se tornou a principal causa de meningite bacteriana em crianças e jovens adultos (Pellegrino 2014, Bastos et al. 2015) (Quadro 1.1). Experiências com a vacina Hib demonstraram que a imunogenicidade do polissacarídeo poderia ser aumentada através de conjugação química a uma proteína carreadora, desta forma promovendo uma resposta anti-sacarídica dependente de células T (WHO 2004).

Quadro 1.1: Incidência de meningite bacteriana no Brasil por diferentes agentes infecciosos.

ETIOLOGIA	CASOS	%
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.617	28
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	947	16
<i>Haemophilus influenzae</i>	118	2
Outras bactérias	1.371	23
Bactéria não especificada	1.795	31
<b>Total</b>	<b>5.848</b>	<b>100</b>

Fonte: Moraes (2015)

Seguindo o sucesso da introdução da vacina Hib, considerável progresso veio sendo feito no desenvolvimento de uma vacina conjugada similar, baseada no sorogrupo C do polissacarídeo capsular meningocócico. Desde 1990, o uso de vacinas meningocócicas conjugadas tem se disseminado no mundo. Em ensaios clínicos controlados, as vacinas conjugadas vêm se mostrando superiores a vacinas polissacarídicas, sendo altamente imunogênicas, em todas as faixas etárias, e indutoras de memória imunológica, diferente do observado para as vacinas polissacarídicas, como exemplificado no Quadro 1.2 (WHO 2004, Pellegrino 2014). A MenCC é constituída por polissacarídeo meningocócico C, conjugado ao

toxóide tetânico. É indicada na prevenção da DM pelo meningococo C em crianças acima de 2 meses de idade (Ministério da Saúde 2009).

O Reino Unido, em 1999, foi o primeiro país a utilizar a MenCC, e instituiu uma campanha de vacinação em massa, tendo como alvo a faixa etária entre 1 e 17 anos de idade. O programa também destacou o impacto que vacinas conjugadas têm na transmissão e na imunidade de rebanho, sendo observado diminuição nas taxas de portadores de *N. meningitidis* após programas de vacinação empregando a tecnologia de conjugação à proteína carreadora. Após 24 meses, a taxa de portadores adolescentes do meningococo C na nasofaringe caiu 67% e as taxas da incidência da doença caíram 52% e 35% em crianças não vacinadas e adultos menores de 26 anos, respectivamente (Dwilow 2015, Stephen 2016). Seguindo o sucesso no Reino Unido, outros países europeus também licenciaram e introduziram a MenCC em seus programas nacionais de imunização (WHO 2004).

Quadro 1.2: Vacina Meningocócica: Polissacarídica *versus* Conjugada.

<b>Aspecto Imunológico</b>	<b>Vacina Polissacarídica</b>	<b>Vacina Conjugada</b>
<b>Resposta imune T-dependente</b>	Não	Sim
<b>Memória imunológica</b>	Não	Sim
<b>Efeito booster</b>	Não	Sim
<b>Persistência de proteção</b>	Não	Sim
<b>Imunidade de rebanho</b>	Não	Sim
<b>Redução do estado de portador</b>	Não	Sim

Fonte: Centro de vigilância epidemiológica (2010)

No Brasil, administração da vacina polissacarídica A/C durante período de surto não teve efeito nas taxas de portadores do patógeno. Entretanto, em 2010, quando a vacinação com a MenCC foi introduzida no programa nacional de imunização, foi observada uma redução sorogrupo específica no estado portador de *N. meningitidis*. Diferente de outros países, a

implementação da MenCC no Brasil teve como alvo apenas crianças menores de dois anos de idade, excluindo a vacinação de adolescentes (Bastos et al. 2015, Stephen 2016).

Dados de vigilância de países como Reino Unido, Espanha, Austrália e Canadá, que introduziram a vacinação em larga escala, demonstraram significativa redução na incidência da doença meningocócica até mesmo em grupos etários que não foram vacinados. Isto demonstra a proteção de rebanho em países onde a vacinação foi estendida para adolescentes e jovens adultos (Bastos et al. 2015).

O impacto da vacina conjugada na doença e em carreadores com nasofaringe colonizada com meningococo C vem sendo considerável, com eficácia acima de 90% e redução de 67% da transmissão, resultando numa importante proteção de rebanho (Silveira et al. 2007). Na Figura 1.5 conseguimos observar o impacto na incidência da DM após programa de vacinação com a MenCC.

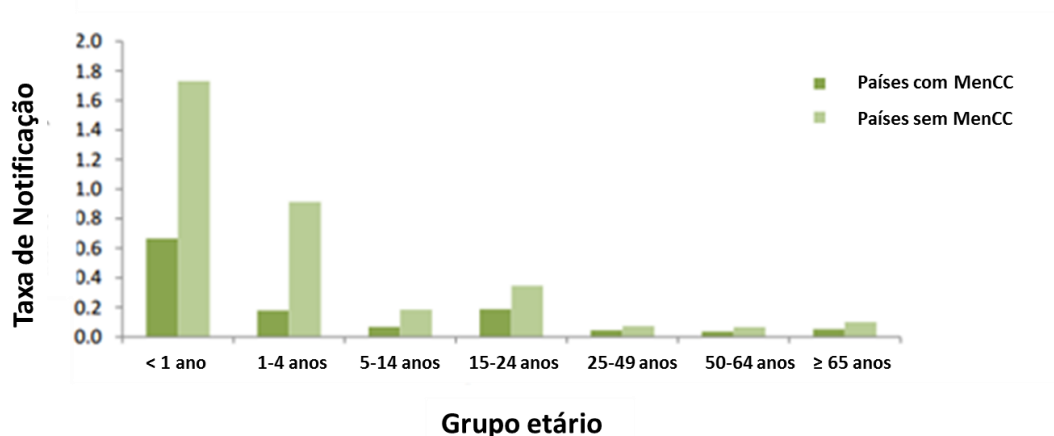


Figura 1.5: Incidência de DM em países com e sem introdução da MenCC.

Países com MenCC: Áustria, Bélgica, França, Alemanha, Grécia, Islândia, Irlanda, Itália, Holanda, Portugal, Espanha, Reino Unido. Países sem MenCC: República Tcheca, Dinamarca, Estônia, Finlândia, Hungria, Lituânia, Malta, Noruega, Polónia, Roménia, Eslováquia, Eslovênia, Suécia.

Fonte: Adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control (2011).

Baseado na situação epidemiológica do Brasil, onde são observados surtos de doenças meningocócicas causadas pelo sorogrupo C, um método de conjugação por aminaçãõ redutiva modificada vem sendo utilizado para produção da MenCC brasileira, desenvolvida no Instituto

de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). A estratégia de conjugação foi baseada na reação química entre o polissacarídeo meningocócico C oxidado com periodato e o toxóide tetânico monomérico ativado por hidrazida, como proteína carreadora. A população alvo desta vacina são crianças, adolescentes e jovens adultos (Bastos et al. 2015).

## **1.2. Controle de qualidade**

O controle total da qualidade em produtos farmacêuticos encerra o esforço organizado de uma empresa, com o escopo de projetar, produzir, manter e assegurar as características especificadas em cada unidade do produto distribuído para comercialização. A atividade de prover, em toda a amplitude, a evidência necessária para estabelecer confiabilidade de que a função da qualidade está sendo adequadamente realizada faz parte do Sistema de Gestão da Qualidade (Pinto et al. 2003).

A preocupação com a qualidade associada à atividade produtiva sempre foi inerente ao ser humano na busca de aperfeiçoar, desenvolver, superar limites com vistas a atender aos anseios da sociedade (Pinto et al. 2003).

Por conseguinte, para que os produtos farmacêuticos mantenham as características de estrutura, identidade, pureza, concentração, potência e inocuidade, existe um conjunto de normas e atividades relacionadas entre si denominadas Boas Práticas de Fabricação (BPF), sendo este, regulamentado no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da RDC número 210, de 04 de agosto de 2003 (BRASIL 2003). Nesse contexto de controle total da qualidade, é mandatório que os agentes parenterais de uso humano e animal tenham sua atividade pirogênica monitorada.

## **1.3. Pirogênios**

O termo pirogênio foi primeiramente utilizado por Burdon-Sanderson em 1875 para uma substância hipotética encontrada em carne estragada, livre de bactérias, que causou febre em animais após inoculação (Hartung 2015). Wechselman demonstrou em 1911, que a reação febril em pacientes tratados com o medicamento Salvarsan, foi decorrente da contaminação da água destilada, presumidamente por bactéria. Salvarsan era administrado na forma de injetável,

pois não era biodisponível oralmente, estimulando a disseminação da utilização de drogas injetáveis, e conseqüentemente, a necessidade de controle de pirogênios (Hartung 2015).

Pirogênios são substâncias quimicamente heterogêneas, indutoras de febre, derivadas de componentes de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, micobactérias, fungos, vírus e outras moléculas. Estas moléculas são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês Pattern Recognition Receptor), como receptores semelhantes a Toll (TLR, do inglês Toll-like receptor) na superfície de monócitos e macrófagos circulantes no sangue e residentes em tecidos (ICCVAM 2008, Nordgren 2016). Este reconhecimento leva à ativação do receptor, transdução do sinal e por fim à liberação de mediadores pró-inflamatórios pela célula, incluindo prostaglandinas e citocinas como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Não é necessário para o organismo microbiano permanecer intacto ou capaz de replicar ou infectar para esta indução ocorrer, por esta razão pirogênios podem ser encontrados até mesmo em ambientes estéreis, produtos injetáveis e dispositivos médicos (Shindler et al. 2009, Gimenes et al. 2015, Nordgren 2016).

A resposta inflamatória desencadeada pelo pirogênio prepara as defesas do organismo contra a ameaça microbiana através de inúmeras alterações fisiológicas, a mais clássica e talvez historicamente mais enfatizada é a febre. Os mediadores pró-inflamatórios podem levar a uma série de eventos inflamatórios incontroláveis, potencialmente resultando na disfunção de múltiplos órgãos, choque, e em casos graves, morte. Com o potencial de contaminação inadvertida de produtos parenterais, a presença de pirogênios é uma preocupação para agências regulatórias e para indústria farmacêutica (Nordgren 2016).

Apesar de a endotoxina, proveniente de bactérias Gram-negativas, ser o pirogênio mais bem caracterizado e ser um contaminante encontrado em produtos injetáveis, de uso humano e veterinário, há outros pirogênios não-endotoxina (NEPs) negligenciados, que representam um grande problema na saúde pública (Williams 2007, Montag et al. 2007, Gimenes 2015).

### **1.3.1. Endotoxina**

O termo endotoxina foi introduzido no século XIX para descrever o componente da parede de bactérias Gram-negativas, responsável pelo fenômeno fisiológico associado a infecções por Gram-negativas. A endotoxina, referida como uma fração inerente presente na

membrana externa de bactérias Gram-negativas é liberada após a morte de células bacterianas, causando efeitos tóxicos como febre, choque séptico, falência múltipla de órgãos e até mesmo a morte (Su & Ding 2016).

A endotoxina, também designada de lipopolissacarídeo (LPS) é constituída por uma porção polissacarídica designada de polissacarídeo-O e uma unidade lipídica, o lipídio A, que é a porção que ancora a molécula de LPS à membrana externa, sendo este composto por um esqueleto diglucosamina bifosforilada de caráter hidrofílico e um domínio hidrofóbico com 6 ou 7 cadeias acilas (Figura 1.6). O lipídio A é responsável pela função biológica, especificidade e afinidade da molécula de LPS por determinados alvos, sendo o responsável pela resposta imunogênica da molécula (Rietschel 1984, Gustmann 2007).

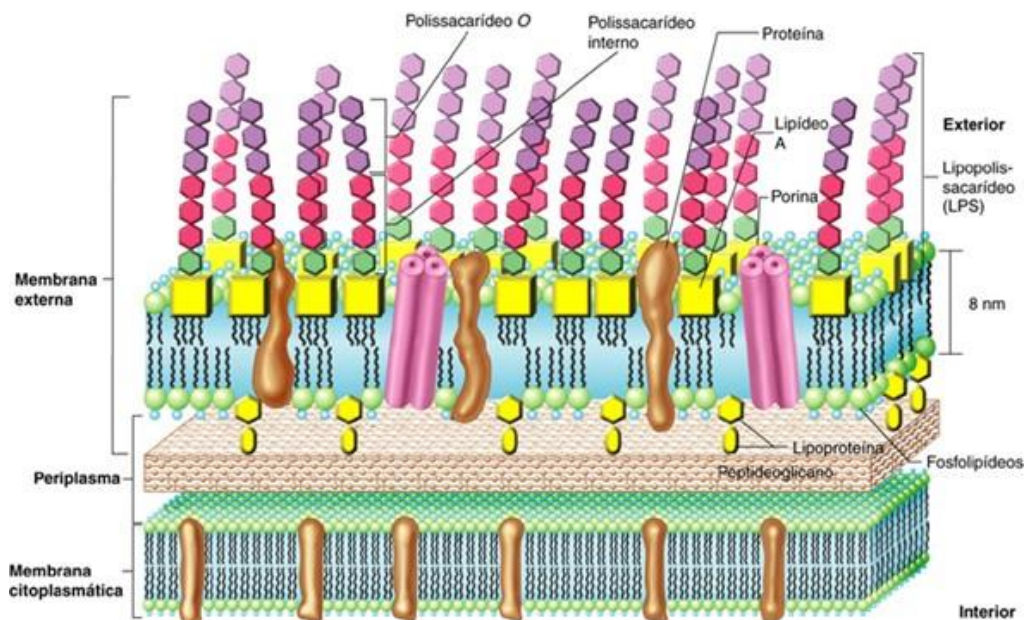


Figura 1.6: Desenho esquemático da parede celular de bactéria Gram-negativa.

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/359600/> (Madigan et al. 2004)

Com a morte de células bacterianas Gram-negativas, as moléculas de LPS de alta estabilidade química são liberadas no ambiente. Quando moléculas de LPS acessam o sistema circulatório, ao passar pelo fígado, várias citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , são liberadas em maiores níveis, pela ativação do sistema imune inato, desencadeando alterações fisiológicas na função e estrutura de órgãos e células (Bhattacharyya et al. 2004, Stuart et al. 2014).

No contexto do controle de qualidade a endotoxina é um fator crítico, uma vez que a molécula não é eliminada por processos de esterilização que atuam diretamente na viabilidade bacteriana e induzem a liberação de LPS durante a morte celular. Por este motivo, mesmo que um produto tenha sido esterilizado, a endotoxina permanece, caso bactérias Gram-negativas tenham estado presentes previamente à esterilização. Assim, a detecção de LPS no produto acabado é uma ferramenta importante para garantir a segurança do mesmo, especialmente em se tratando de produtos biológicos, dispositivos médicos, drogas parenterais, alimentos e água (Su & Ding 2016).

### **1.3.2. Pirogênios Não-Endotoxina**

Pirogênios não-endotoxina (NEP, do inglês non-endotoxin pyrogens) são substâncias provenientes de componentes de micro-organismos, exceto bactérias Gram-negativas, capazes de promover alterações fisiológicas em humanos, como reação inflamatória e elevação da temperatura corporal, através do reconhecimento por PRR (Nordgren 2016).

É reconhecido que contaminações com NEP, como os derivados de bactérias Gram-positivas, fungos e vírus, por exemplo, também são capazes de causar eventos adversos tão significativos quanto os gerados pelas endotoxinas (Nordgren 2016).

Um importante pirogênio proveniente de bactérias Gram-positivas é o ácido lipoteicoico (LTA). A molécula de LTA é ligada à membrana citoplasmática através de uma âncora glicolípídica e o seu esqueleto consiste em unidades repetidas de glicerol fosfato e D-alanina ester ou  $\alpha$ -N-acetilglucosamina (Morath et al. 2000, 2002) (Figura 1.7).

De acordo com Bennett e Beeson, 1950, do ponto de vista investigativo, as bactérias Gram-negativas são mais pirogênicas que Gram-positivas (Shindler et al. 2003) em estudos utilizando coelhos. Em contrapartida, a resposta pirogênica em coelhos não traduz a resposta para humanos, provavelmente, devido a problemas inerentes a extrapolação inter-espécies.

Assim, o significado clínico do pirogênio não-endotoxina é provavelmente subestimado, já que sua presença não é normalmente detectada, contribuindo para uma grave subnotificação que poderia ser antecipada com o adequado controle de qualidade (Schindler et al. 2009).



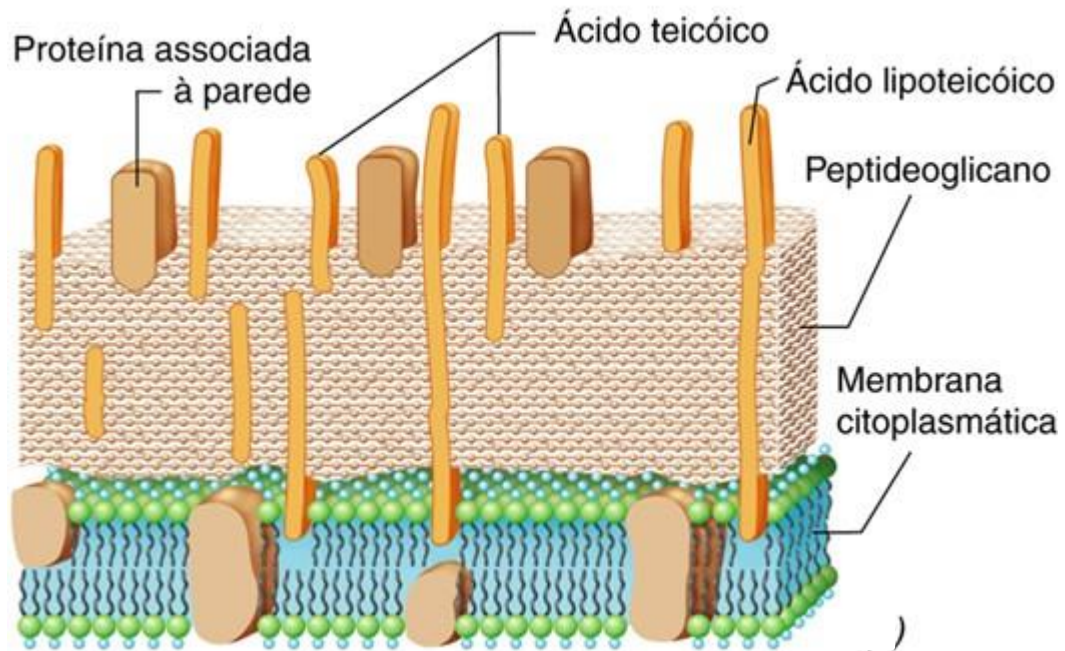


Figura 1.7: Desenho esquemático da parede celular de bactéria Gram-positiva.

Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/359600/> (Madigan et al. 2010)

Este ponto de vista tem enviesado a pesquisa a focar apenas em pirogênicos provenientes de Gram-negativos como observado na literatura científica, onde existem mais de 60 mil artigos científicos publicados no PubMed sobre LPS e apenas alguns milhares sobre Gram-positivos (Hartung 2015).

Um outro exemplo de NEP, denominado zymosan, é uma preparação da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada a mais de 50 anos como modelo de estímulo fagocítico e anti-inflamatório, tanto *in vivo* como *in vitro*. O zymosan é composto primariamente de glucanas, manoproteínas e quitina (Figura 1.8), onde cada um destes componentes tem sido implicado no reconhecimento de fungos e leveduras pelo sistema imune inato. Nas células mielóides, zymosan estimula a fagocitose, a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e é um potente adjuvante no estímulo da resposta imune adaptativa (Gantner et al. 2003, Hasiwa et al. 2013).

Já foi observado anteriormente que a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos, induzida por zymosan é mediada por TLRs e não requer internalização de partículas. O zymosan ativa macrófagos via TLR2 e CD14, e é reconhecido pela Dectina-1, um receptor fagocítico expresso em macrófagos e células dendríticas, colaborando com TLR2 e

TLR6, aumentando a resposta imune engatilhada pelo reconhecimento do zymosan por cada um destes receptores (Gantner et al. 2003, Hasiwa et al. 2013).

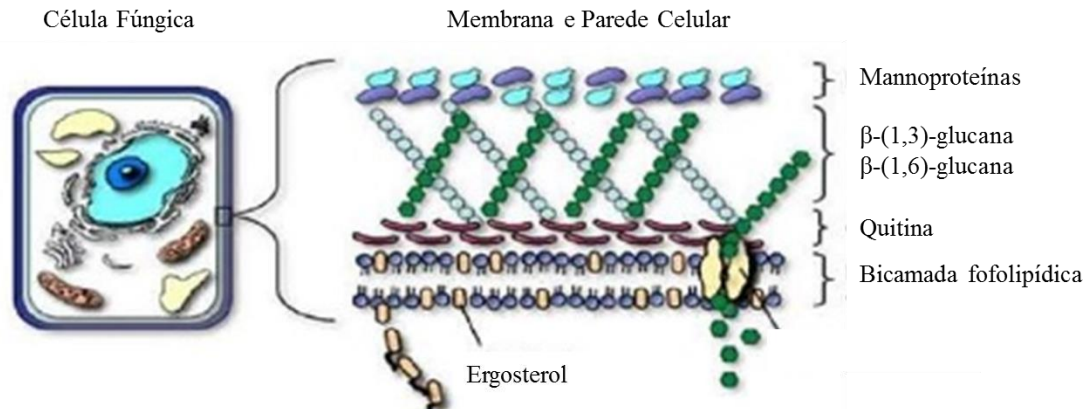


Figura 1.8: Desenho esquemático da parede celular de Fungo.

Fonte: Adaptado de <https://pt.slideshare.net/VivianePorto1/polissacardeos-da-parede-celular-fngica>.

Dentre os componentes do zymosan, as  $\beta$ -glucanas desempenham um importante papel no estímulo do sistema imune, são homopolímeros de glucose compostos por uma cadeia linear  $\beta$ -(1,3)-ligada com cadeias laterais  $\beta$ -(1,6)-ligadas de variados comprimentos e distribuição, que podem formar estruturas terciárias complexas estabilizadas por ligações de hidrogênio. São encontradas principalmente na parede celular de leveduras e são reconhecidos por PRR, estimulando desta forma a resposta imune inata (Pardo-Ruiz 2016).

De forma geral  $\beta$ -glucanas têm importantes atividades imunoestimulatórias, como ativação de células do sistema imune e indução de secreção de citocinas, mediadas por exemplo por TLR. A principal fonte de  $\beta$ -glucanas em injetáveis farmacêuticos é proveniente de filtros de celulose utilizados para clarificação e esterilização, porém a contaminação fúngica pode ser outra fonte deste material (Pardo-Ruiz 2016).

O FDA (Food and Drug Administration) não regula a presença de  $\beta$ -glucanas e LTA em produtos farmacêuticos, deixando as companhias farmacêuticas decidirem controlar ou não a presença destes componentes em seus produtos, entretanto, por outro lado o FDA afirma que qualquer substância adicionada não-intencionalmente em injetáveis deve ser considerada um contaminante (Pardo-Ruiz 2016).

## 1.4. Métodos de detecção de pirogênicos

Como declarado pela Associação para Avanço na Instrumentação Médica (AAMI), para se obter uma autorização regulatória, todos os produtos com contato direto ou indireto com a circulação sistêmica ou com a linfa, ou que interajam sistemicamente com o corpo devem ser testados para avaliar o conteúdo pirogênico, antes de serem liberados para o mercado (AAMI 2001, Nordgren 2016).

Atualmente, os ensaios utilizados para avaliar o conteúdo de pirogênicos incluem o Teste de Pirogênio em Coelhos (RPT), o Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL) e o Teste de Ativação de Monócitos (MAT), implementados em farmacopeias conforme informação abaixo (Quadro 1.3).

Quadro 1.3: Incorporação dos testes de detecção de pirogênio nas principais farmacopeias.

Testes	Farmacopeia Americana	Farmacopeia Europeia	Farmacopeia Brasileira
RPT	1942 – 2001*	1971	1976 – 2003*
LAL	1980	1987	1996
MAT	-	2010	-**

\*Modificações tornando o teste em coelhos mais rigoroso quanto aos critérios de temperatura.

\*\*Parecer favorável para incorporação pela Farmacopeia Brasileira.

### 1.4.1. Teste de Pirogênio em Coelhos

O RPT foi o primeiro teste de detecção de LPS aprovado pelo FDA, sendo desenvolvido na década de 1920, baseado na elevação de temperatura corporal de coelhos, após administração intravenosa do material a ser testado (Williams 2001) (Figura 1.9). É um teste qualitativo, aplicado a preparações parenterais, que mede a variação de temperatura em coelhos após administração da amostra (Vipond et al. 2016).

A alta demanda por soluções intravenosas durante a segunda guerra mundial levou ao aumento do uso do RPT, sendo este introduzido na USP (United States Pharmacopeia) em 1942.

Hoje o teste é utilizado, por fabricantes de vacinas e por laboratórios nacionais de controle de qualidade, para avaliar o conteúdo pirogênico de diversas vacinas (Roberts 2007, Vipond et al. 2016).



Figura 1.9: Teste de pirogênio em coelhos.

Fonte: <https://www.youtube.com/watch?v=-GHzbMLsJJQ>

O teste em coelhos é um teste farmacopeico clássico tido como padrão ouro para detecção de pirogênios, por este motivo é o mais recomendado para assegurar a ausência de contaminação pirogênica em produtos injetáveis (Vipond et al. 2016). A resposta do coelho a pirogênios apresenta semelhantes padrões de indução da febre em humanos (Hochstein 1990). A interpretação do teste é baseada no número de coelhos em que a temperatura se eleva acima de 0,5 °C (febre) e na soma da elevação das temperaturas de todos os coelhos testados (Farmacopéia Brasileira 2010, United States Pharmacopeia 2014).

Apesar de este método detectar todos os tipos de endotoxinas e NEPs, apresenta limitações e conflitos éticos relacionados à utilização de animais (ICCVAM 2008). Além disso, a relevância deste modelo, que deve representar o sistema humano, é questionável, especialmente considerando a natureza homogênea (peso, idade, sadios) da população de coelhos utilizada. Adicionalmente, o ensaio não é quantitativo, podendo ser afetado por parâmetros auxiliares como, por exemplo, a forma como os coelhos são manipulados e mantidos, impossibilidade de utilização para avaliação de produtos como radiofarmacêuticos ou agentes quimioterápicos do câncer (Nordgren 2016).

O RPT apresenta conflitos éticos, por depender da utilização de animais, e desvantagens relacionadas a custo e tempo, pois engloba a estrutura para manutenção da instalação animal, além de incluir a variação fisiológica dos animais. Por esta razão vem sendo gradualmente substituído pelo teste de LAL (Su & Ding 2016, Williams 2007, ICCVAM 2008). Assim, do ponto de vista regulatório, o ensaio de endotoxina LAL foi definido como teste oficial para detecção de endotoxina, sendo substitutivo quando possível ao RPT conforme recomendado pela USP “O teste de pirogênio em coelhos deve ser testado somente se o produto é incompatível com o teste de LAL”, visto que este apresenta reações enzimáticas que podem ser afetadas por vários fatores inerentes ao produto biológico.

#### 1.4.2. Métodos alternativos

Dentro do contexto da bioética animal, questões envolvendo manejo de animais estimularam o desenvolvimento de métodos alternativos (Poole & Gaines Das, 2001). Atualmente, estima-se o uso de mais de 400 mil coelhos e aproximadamente 30 mil caranguejos por ano, destinados aos ensaios de pirogênio e endotoxina, respectivamente, nos setores de fármacos e produtos biológicos (Hartung 2015). Com relação ao LAL, apesar de o *Limulus* ser mantido vivo durante o processo de punção da hemolinfa e ser devolvido ao mar, é importante destacar que aproximadamente 20% dos animais não sobrevivem a este procedimento (Rudloe & Hernkind 1983, Walls & Berkson 2003).

Assim, o debate sobre a possibilidade de desenvolver cientificamente alternativas válidas aos experimentos em animais (principalmente os sencientes), com a capacidade de detecção de um amplo espectro de pirogênios, vêm ganhando destaque. A partir desta proposta, uma nova geração de métodos alternativos tem sido desenvolvida com o objetivo de melhor esclarecer os mecanismos fisiológicos humanos e diminuir os impactos ambientais pela redução, substituição ou refinamento na experimentação animal (Russel & Burch 1959). O princípio dos 3R's preconiza os conceitos da (i.) substituição (do inglês, Replacement) da experimentação animal pelos ensaios *in vitro* utilizando associação de células animais e culturas de tecido, métodos físico-químicos e ensaios *in silico* utilizando a bioinformática, da (ii.) redução (do inglês, Reduction) que tem como objetivo reduzir o número de animais e do (iii.) refinamento (do inglês, Refinement) que visa utilizar os avanços tecnológicos direcionados para *endpoints* humanos, trazendo maior relevância para os resultados, além da preocupação com o

bem-estar animal. Desta forma, o desenvolvimento e implementação dos métodos alternativos requerem estratégias integradas através da cadeia de pesquisa fundamental e aplicadas, além da aprovação regulatória (Cazarin et al. 2004).

No Brasil, a ANVISA tem adotado medidas de incentivo e desenvolvimento de métodos alternativos, como o apoio à criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos - BraCVAM, ligado ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/Fiocruz, e sua efetiva participação na Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), do governo federal (ANVISA 2014).

#### 1.4.2.1. Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL)

Levin e Bang (1964) demonstraram que a hemolinfa do caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus* (Figura 1.10), coagula quando em contato com a endotoxina, sendo este o princípio do teste de LAL, que é utilizado para detectar a contaminação por endotoxina em algumas drogas parenterais.



Figura 1.10: Coleta da hemolinfa do caranguejo ferradura.

Fonte: <http://www.mdig.com.br/?itemid=20818>

O LAL é um dos métodos alternativos de maior sucesso, do ponto de vista econômico, superado apenas pelo teste de gravidez, que tornou a utilização de sapos em farmácias obsoleta.

Hoje em dia, mais de 90% dos testes de pirogênios são feitos pelo LAL. O LAL é relativamente barato e fácil de utilizar, mas sua maior limitação é a incapacidade de detectar NEP, em decorrência da especificidade por apenas endotoxina. Adicionalmente, algumas formulações biofarmacêuticas são incompatíveis com o método do LAL, como aqueles que contem alto conteúdo proteico, agentes quelantes e certos íons metálicos (Hartung 2015, Nordgren 2016).

O teste de LAL é baseado numa reação enzimática, logo, quando aplicado a um lisado celular, os resultados do LAL ficam susceptíveis ao efeito de proteases. Além disso, foi relatado que o LAL apresenta reatividade a algumas formas poliméricas de glucose, apesar destas glucanas não serem pirogênicas, elas podem ativar o Fator G, que é capaz de ativar a cascata de coagulação, interferindo na resposta do LAL na detecção ao LPS, gerando resultados falsos-positivos (Su & Ding 2015). Esta reatividade a glucanas pode se traduzir em um grande problema no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, visto que filtros de celulose que são utilizados no processo produtivo de algumas drogas são compostos por glucanas (Hartung 2015).

Em contrapartida, o LAL pode gerar resultados falsos-negativos em vacinas que utilizem hidróxido de alumínio como adjuvante, visto que este se liga à endotoxina livre, não disponibilizando a molécula para ativar a cascata de coagulação (Lindblad 2004, Hartung 2015). No quadro 1.4 são evidenciados os principais interferentes nos testes de pirogênios.

Com o desenvolvimento da pesquisa, vários tipos de proteínas e substâncias sintéticas com afinidade por LPS foram adquiridos, promovendo a detecção de LPS por sensores eletroquímicos ou óticos. Porém, estes sensores podem se ligar a outros alvos além do LPS, quando a especificidade não é tão alta quanto o esperado, causando uma grande margem de erro no processo de detecção (Su & Ding 2015).

Apesar de todas as limitações apresentadas pelo LAL, a validação produto-específica para transição do RPT para o LAL é bem simples. É necessário demonstrar equivalência de resultados para três lotes e ausência de interferentes no produto avaliando a taxa de recuperação em amostras contaminadas propositalmente com endotoxinas exógenas. Porém, um detalhe a ser considerado é que a contaminação proposital no produto é realizada em um período curto de tempo antes do teste, o que pode mascarar a ligação da endotoxina com algum interferente do produto avaliado (Hartung 2015).

Quadro 1.4: Fatores interferentes nos testes de pirogênio e suas limitações no controle da qualidade de produtos biológicos.

Produto biológico	Origem	Interferente	Resultado	Mecanismo de Ação	Limitação
Vacinas	Formulação (adjuvante)	Al(OH) <sub>3</sub> . Ex. Vacina DTaP, Hepatite B	Falso -	Liga a endotoxina	LAL
Vacinas	Produto de purificação	β-Glucana	Falso +	Mimetiza a endotoxina	LAL
Vacinas e imunobiológicos	Formulações	EDTA, citrato, inibidores de protease	Falso -	Inibição das enzimas	LAL
Vacinas e imunobiológicos	Formulações	Elevado conteúdo de proteínas (Ex. Albumina, soro hiperimune)	Falso-	Liga ao LPS	LAL
Imunobiológicos e vacinas				Turbidez e cor	LAL
Imunobiológicos	Princípio ativo	Imunoglobulinas (ex. Pentaglobulin)	Falso +	Induz reação imunológica	RPT/LAL
Vacinas	Princípio ativo	Vírus que induzem febre (Ex. vacina contra Influenza)	Falso +	Induz mecanismo de febre	RPT
Imunobiológicos	Princípio ativo	IFN	Falso +	Indução de citocinas	MAT
Vacinas e Imunobiológicos	Princípio ativo e formulações	Agentes citotóxicos	Falso -	Morte celular	MAT

Falso negativo (-): resultados que apesar da presença do pirogênio, não foi possível detectá-lo, Falso +: resultados que na prática detectaram o pirogênio, apesar da ausência do mesmo.

Fonte: Navega et al. (2015)

#### 1.4.2.2. Teste de Ativação de Monócitos (MAT)

O MAT foi desenvolvido para sanar as limitações encontradas pelo RPT e pelo LAL (Quadro 1.5). O ensaio é baseado na ativação *in vitro* de monócitos humanos, para permitir a detecção de contaminantes pirogênicos utilizando a liberação de citocinas como parâmetro de



leitura. Desta forma o MAT proporciona uma relação direta entre a liberação *in vitro* de citocinas e potenciais eventos adversos *in vivo*, o que pode acontecer como resultado de contaminação microbiana (Nordgren 2016).

Quadro 1.5: Limitações do RPT e LAL frente ao MAT.

<b>RPT</b>	<b>MAT</b>
<b>Uso de animais</b>	Nenhum
<b>Custoso e Laborioso</b>	Custa menos de 10% do RPT
<b>Variação entre espécies</b>	Baixa diferença inter-indivíduo
<b>Estudado apenas para endotoxina</b>	Amplo espectro de pirogênios estudados
<b>Ensaio qualitativo</b>	Ensaio quantitativo
<b>Temperatura corporal afetada pelo estresse</b>	Não afetado
<b>Reutilização de animais</b>	Não há reuso
<b>Não há controles positivos</b>	Controles positivos são parte do protocolo
<b>Não aplicado a certas drogas</b>	Se mostrou aplicável a todos os produtos testados, apropriadamente diluídos
<b>LAL</b>	<b>MAT</b>
<b>Detecta apenas endotoxina</b>	Detecta endotoxina e NEPs
<b>Influenciado por componentes com afinidade por endotoxina</b>	Não observado
<b>Não reflete a potência do pirogênio</b>	Capaz de determinar a potência do pirogênio
<b>Falso-positivo para glucanas, celulose e preparações vegetais</b>	Não ocorre
<b>Não extingue o uso de animais</b>	Não utiliza animais

Fonte: Adaptado de Hartung, 2015.

A ideia de detectar pirogênios através da ativação de monócitos foi proposta por Charles Dinarello e colaboradores (1984), utilizando o coelho como parâmetro de leitura, e posteriormente refinado por Stephen Poole e colaboradores (1988), utilizando o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detectar as citocinas. A inovação foi apenas a combinação de dois testes bem estabelecidos, a utilização da ativação de monócitos para detecção de pirogênios e o teste de liberação de citocinas utilizando sangue total (Hartung 2015).

Devido à inerente limitação do RPT e do LAL, assim como sua dependência na utilização de animais ou material de fonte animal, respectivamente, a aplicação do MAT no

lugar destes testes tem sido fortemente encorajada. Em 2013, na Europa, o diretório 2010/63/EU fortaleceu a legislação em torno da realização de testes em animais, reforçando o princípio dos 3R's. Entretanto, a difusão da implementação do MAT tem sido desafiadora, principalmente devido à dificuldade na obtenção de sangue fresco como fonte de monócitos (Nordgren 2016).

Diferentes sistemas do MAT foram investigados para a detecção de diferentes fontes pirogênicas (LPS e NEP), utilizando diferentes matrizes fornecedoras de monócitos humanos, variando entre sangue total e sangue total criopreservado, e diferentes parâmetros de leitura, dentre eles IL-1 $\beta$  e IL-6 (Tabela 1.4). Dentre os ensaios avaliados até o momento, apenas cinco variantes do MAT foram padronizadas e validadas pelo “Interagency Coordinating Committee On The Validation Of Alternative Methods” (ICCVAM) como uma alternativa ao RPT para o teste de detecção de pirogênio (Quadro 1.6), e todos provaram ter um limite de detecção mais baixo que o RPT (Hoffmann et al. 2005a, 2005b). Estes testes são mais precisos, economicamente vantajosos e são realizados em menor tempo, além de serem capazes de detectar NEPs. O MAT fornece resultados confiáveis e reprodutíveis, podendo ser empregado a qualquer produto, realizando-se adaptações, se necessário (Hartung et al. 2001, Andrade et al. 2003). Cada um destes sistemas apresenta vantagens e desvantagens (Quadro 1.7).

Com a introdução do sangue total criopreservado, o qual é testado de acordo com padrões utilizados para transfusão sanguínea, preocupações quanto à disponibilidade, variabilidade entre doadores e ameaças de infecções foram superadas (Shindler et al. 2004). Dado que uma doação de 500 mL de sangue é suficiente para mais de 50 mil testes, o sangue não será um fator limitante (Hartung 2015). A introdução do sangue criopreservado contribuiu também para a profissionalização do MAT, através de desenvolvimento de kits que se encontram disponibilizados no mercado (Quadro 1.8).

O MAT demonstra-se um método alternativo promissor, pois preenche lacunas das limitações dos ensaios preconizados atualmente pela farmacopeia, principalmente em biológicos, que apresentam complexidade estrutural e funcional. Interferências do produto no MAT podem ser superadas através da diluição correta do produto (Hartung 2015). Além disso, a resposta de células humanas, amebócitos do caranguejo ferradura e do coelho à endotoxina tem sido extensivamente estudada, e a comparação revela uma boa correlação entre o RPT e o MAT (Fennrich et al. 1999, Shindler 2009).

Quadro 1.6: Variantes dos sistemas do ensaio MAT na literatura.

Testes	Sistemas	Leitura	Fonte
<b>WBT/IL-1<math>\beta</math>*</b>	Sangue Total Humano	Interleucina-1 $\beta$	ICCVAM, 2008
<b>Cryo WBT/IL-1<math>\beta</math> *</b>	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-1 $\beta$	ICCVAM, 2008
<b>WBT/IL-6*</b>	Sangue Total Humano	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
<b>PBMC/IL-6*</b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
<b>MM6/IL-6*</b>	Linhagem Celular Monocítica Monomac-6 (MONOMAC-6)	Interleucina-6	ICCVAM, 2008
<b>THP-1/TNF-<math>\alpha</math></b>	Linhagem celular THP-1	Fator de necrose tumoral alfa	Eperon e Jungi, 1996.
<b>THP-1/neopterin</b>	Linhagem celular THP-1	Neopterin	Werner-Felmayer <i>et al.</i> , 1995; Peterbauer and Werner-Felmayer, 1999.
<b>MM6/TNF-<math>\alpha</math></b>	Linhagem Celular Monocítica MONOMAC-6	Fator de necrose tumoral alfa	Poole <i>et al.</i> , 1988; Ziegler-Heitbrock <i>et al.</i> , 1988.
<b>PBMC/IL-1<math>\beta</math></b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Interleucina-1 $\beta$	Hansen, 1990; Christensen, 1990
<b>bWBT/PGE<sub>2</sub></b>	Sangue Total Bovino	Prostaglandina E <sub>2</sub>	Wunderlich <i>et al.</i> , 2014
<b>rWBT/ PGE<sub>2</sub></b>	Sangue Total de coelho	Prostaglandina E <sub>2</sub>	Ochiai <i>et al.</i> , 2003
<b>rWBT/ IL- 1<math>\beta</math></b>	Sangue Total de coelho	Interleucina-1 $\beta$	Schindler, 2003
<b>rWBT/ IL- 8</b>	Sangue Total de coelho	Interleucina-8	Schindler, 2003
<b>rWBT/ IL- 6</b>	PBMC isolado de filtros linfocitários	Interleucina-6	<u>Koryakina</u> <i>et al.</i> , 2014

WBT: Teste do Sangue Total (*Whole Blood Test*), Cryo/WB: Sangue Total Humano Criopreservado (*Cryopreserved Whole Blood*), PBMC: Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*), bWBA: Sangue Total Bovino (*bovine Whole Blood Assay*), rWBT: Sangue Total de coelho (*Rabbit Whole Blood Test*), MM6: MonoMac-6. \* Sistemas do MAT validados pela ICCVAM.

Fonte: Navega et al. (2015)

Quadro 1.7: Vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de detecção.

<b>MATRIZ MONOCÍTICA</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
Linhagem Celular	- Não necessita de doador	- Alta variabilidade - Laborioso
PBMC	- Maior sensibilidade	- Manuseio de artefatos
Sangue Total Fresco	- Suspensão celular - Fisiológico - Fortemente tamponado	- Risco de infecção
Sangue Total Criopreservado	- Fisiológico - Padronizado - Disponibilidade de kit comercial (PyroDetect system, Merck Millipore)	- Presença de DMSO

Fonte: Adaptado de Hartung (2015).

Quadro 1.8: Produtores do kit do MAT.

<b>Fabricante</b>	<b>Nome do kit</b>	<b>Disponibilidade no mercado</b>
DPC Biermann, Bad Nauheim, Germany	Pyrocheck	1996-2000
Charles-River Endosafe, Charleston, US	Endosafe IPT ( <i>in vitro</i> Pyrogen Test)	2001-2008
Biotest, Dreieich	PyroDetect	2009-2011
Merck-millipore, Merck KG, Darmstadt, Germany	PyroDetect	2012-Atual

Fonte: Adaptado de Hartung (2015).

O mais recente guia de teste de pirogênio para indústrias (FDA 2012) afirma que empresas fabricantes de produtos que requerem o teste de pirogênio, devem utilizar métodos alternativos se estes fornecerem vantagens em termos de acurácia, sensibilidade, precisão, seletividade ou adaptabilidade para automação ou redução de dados computadorizados. Métodos alternativos devem ser submetidos à validação apropriada e demonstrar alcançar resultados melhores, ou equivalentes, comparando-se ao método padrão (Hartung 2015).

Em 2010, o MAT foi implementado na Farmacopeia Europeia (FE) (EDQM 2010), e desde então pode ser empregado como um terceiro método para a detecção de pirogênios em injetáveis. O mesmo foi estabelecido pelo FDA em 2009, porém, restringindo a aplicação do MAT apenas à detecção de endotoxinas. O MAT também obteve aceitação em países como Cuba e Brasil (Hartung 2015). No Brasil as Resoluções Normativas no. 17 de 03 de julho de 2017 e no. 31 de 18 de agosto de 2016 do CONCEA, reconhecem 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. Com o reconhecimento dos métodos alternativos em Resoluções Normativas, fica estabelecido o prazo de até 5 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

Porém, apesar do aceite do MAT pela FE e pelo FDA, é comum observar a preferência pelo LAL, por parte das agências regulatórias e indústrias, devido ao LAL ser mais barato, mais rápido e mais bem estabelecido no mercado. O interesse no MAT surge apenas quando o LAL, por alguma limitação, não é aplicável a dado produto ou quando o teste de pirogênio ainda é realizado utilizando o RPT (Hartung 2015).

O aceite parcial do MAT pelo ICCVAM, apenas como um teste para detecção de endotoxina, teve um efeito negativo, pois desta forma o MAT torna-se um competidor do LAL, que é um teste mais barato e mais bem estabelecido, e não pode competir com o RPT (Hartung 2015).

Um fator limitante para todos os métodos alternativos reside no fato de que os produtos farmacêuticos, especialmente drogas, são comercializados internacionalmente, o que significa que apenas testes aceitos em todos os mercados podem ser empregados para a liberação de um lote. Atualmente o MAT representa menos de 1% do mercado de testes de pirogênio. Isto ocorre porque a utilização de métodos alternativos com aceite internacional não é incentivada pelas agências reguladoras. Mesmo após aceitação do MAT, a utilização de coelhos para testes de pirogênio subiu de 10 mil para mais de 170 mil ao ano, na Europa. Este aumento é devido à inclusão, pela FE, do teste de pirogênio para injetáveis abaixo de 25 mL, muitos destes produtos são lipofílicos e não podem ser testados pelo LAL, logo são testados pelo RPT (Hartung 2015).

Este número de 170 mil coelhos utilizados ao ano deve ser comparado com os 5 mil coelhos utilizados por ano para os testes de irritação ocular e de irritação cutânea em coelhos. Desde o aceite regulatório do MAT, apesar do diretório da União Europeia (2010/63/EU) sobre o uso de animais para fins científicos, 800 mil coelhos foram utilizados (Hartung 2010, 2015).

Outra questão que coloca em discussão a utilização dos testes atualmente mais empregados na indústria farmacêutica (RPT e LAL) é a quantificação correta do conteúdo de LPS e NEP nas amostras testadas. Em contraste ao RPT, o MAT é quantitativo, inclui controles positivos e amplia o espectro de pirogênicos detectáveis e produtos aplicáveis (Hartung 2015) e em contraste com o LAL, o MAT reflete a potência de LPS proveniente de diferentes espécies (Fennrich 1999, Hasiwa et al. 2007).

Quando comparada a potência de diferentes LPS no MAT, foi observado que o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* foi 1000 vezes menos potente na indução da liberação de citocinas que o LPS de *Escherichia coli* ou *Salmonella*, porém no LAL os LPS se mostraram equipotentes. Isto significa que o conteúdo de pirogênicos nas amostras testadas pode estar sendo dramaticamente superestimado ou subestimado (Dehus et al. 2006).

Outro ponto importante é que o MAT é baseado no mesmo mecanismo biológico da resposta de febre induzida por pirogênicos em humanos, não havendo a necessidade de extrapolação entre espécies (Gimenes 2015).

Até o momento pouca informação científica sobre o estado da arte do MAT tem sido relatada, levando a crer que o MAT seria aplicável em todas as situações em que o LAL ou RPT não se aplicam. Porém, fatores inerentes à interferência com a matriz, como por exemplo a citotoxicidade, ou substâncias indutoras de citocinas podem tornar o produto não susceptível para avaliação pelo MAT (Hartung 2015).

### **1.5. Aplicação do conceito dos 3R's em imunobiológicos**

Como descrito anteriormente, alguns produtos possuem características que interferem nos testes de pirogênicos, RPT e LAL. Dentre estes, podemos destacar os produtos biológicos que apresentam peculiaridades devido a sua complexidade estrutural e funcional, sendo uma classe de produtos que merece atenção especial, de modo a evitar problemas de interpretação de resultados. Tendo em vista os pontos abordados, o MAT é um substituto potencial para o teste de pirogênicos em muitos produtos biológicos, porém, até o momento o seu uso foi validado apenas para alguns medicamentos, o que levou as agências regulatórias a exigirem a validação da aplicabilidade do teste por produto. Devido à falta de informação sobre a plena aplicabilidade do MAT, principalmente em produtos biológicos, o RPT na Farmacopeia Brasileira (FB) ainda

é amplamente utilizado e preconizado para a maioria destes produtos de uso parenteral, conforme revisado por Caldeira e colaboradores (2015). O trabalho faz um diagnóstico dos principais produtos de interesse nacional e avalia as monografias dos produtos injetáveis fornecendo um banco de dados que norteia estudos sobre a aplicabilidade do MAT para produtos não contemplados no processo de validação. Apesar do grande número de biológicos exigirem exclusivamente o ensaio de RPT conforme preconizado pela FB, outras farmacopeias também orientam realizar o RPT em imunobiológicos não contemplados na FB (ex. vacina pneumocócica e seus polissacarídeos constituintes), somando ao percentual de ensaios *in vivo* contabilizados pelos autores.

Adicionalmente, todo produto originário de inovação biotecnológica deve ser avaliado pelo teste de pirogenicidade RPT, porém a FE ressalta e recomenda que todos os novos produtos para administração parenteral devem ser testados pelo MAT, reforçando a nova conduta de substituição de animais como padrão ouro e acompanhando a tendência mundial do desenvolvimento de biotecnológicos.

Torna-se cada vez mais evidente que a vacina é o único meio para interromper a cadeia de transmissão de algumas doenças imunopreveníveis. Entretanto, o cumprimento do calendário de vacinação e dos critérios de qualidade descritos nas normas oficiais é imprescindível para o sucesso da vacinação e controle das doenças infecto-contagiosas (BRASIL, 2003). Com o aumento do quadro vacinal, a combinação de vacinas para diferentes doenças tornou-se uma estratégia importante para diminuir os custos e também alcançar níveis desejados de cobertura. Em especial, Bio-Manguinhos tem um importante papel na produção de vacinas que atendam o calendário de vacinação do Ministério da Saúde, dentre elas a prevenção das doenças meningocócicas (DM), devido a altas taxas de fatalidade da doença e graves sequelas resultantes da infecção, apesar de imediato tratamento com antibióticos (Silveira 2007).

## **1.6. Justificativa**

Na rotina de liberação lote a lote da MenCC a FE (2010) exige apenas o teste do LAL para detecção de endotoxina no produto final, entretanto, a OMS (2004) sugere a utilização ou do LAL ou do RPT para análise do produto final desta vacina. Logo, por se tratar de um produto em desenvolvimento por Bio-Manguinhos, a aplicação do RPT é importante para demonstrar

que não existe nenhuma contaminação por NEPs nestes lotes, e para dar mais consistência aos resultados do controle de qualidade desta vacina. A intenção deste estudo é demonstrar que o MAT pode ser aplicado, quando necessário, como substituto do RPT, especialmente para produtos em desenvolvimento, que são constantes nas indústrias farmacêuticas e de imunobiológicos. A aplicação do MAT a este produto segue recomendação da FE “MAT deve ser aplicado a todos os novos produtos que pretendem ser administrados por via parenteral que necessitam ser testados para presença de contaminantes ativadores de monócitos”, que incentiva a análise de pirogênios por este novo método alternativo aplicado a produtos em desenvolvimento. Assim, a avaliação da MenCC pelos três métodos farmacopeicos torna a detecção de pirogênios robusta e consistente para produtos em desenvolvimentos, reforçando a exclusão do uso de animais pela análise de contingência e comparativa entre os métodos.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Padronizar o protocolo para implementação do teste de ativação de monócitos, para detecção de pirogênios *in vitro*, a ser realizado no controle de qualidade da vacina meningocócica C conjugada, produzida por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- A) Estabelecer curva dose-resposta de LPS pelo MAT em sangue total humano, fresco e criopreservado, utilizando como leitores de pirogenicidade, a detecção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6;
- B) Analisar comparativamente os resultados obtidos entre as matrizes (sangue criopreservado, sangue fresco) utilizando os diferentes indicadores, IL-1 $\beta$  e IL-6, e determinar as melhores condições de ensaio;
- C) Verificar a resposta de sistema de detecção combinando sangue criopreservado, como matriz monocítica, e IL-6, como parâmetro de leitura.
- D) Avaliar a aplicabilidade do MAT na detecção de LPS e NEPs na rotina de liberação de lotes da MenCC utilizando o método quantitativo descrito na FE;
- E) Comparar os dados de determinação de potencial pirogênico nos lotes de MenCC em desenvolvimento em Bio-Manguinhos, obtidos pelo MAT e pelos testes preconizados pela FE, LAL e RPT.

### 3. METODOLOGIA

O MAT foi realizado em diferentes matrizes monocíticas humanas, avaliando os sistemas de detecção de citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$  liberadas após estímulo com pirogênicos, aplicado às amostras da MenCC. Os ensaios foram realizados conforme parâmetros descritos na FE (2010) e validados pelo ICCVAM (2008).

#### 3.1. Matrizes celulares

Para melhor adequação do MAT para indústrias de grande porte como Bio-Manguinhos, matrizes criopreservadas são a melhor proposta para a implementação do teste na rotina do controle de qualidade. Assim, os sistemas validados pelo ICCVAM/FE foram verificados e avaliados comparativamente com uma adequação do sistema sangue total criopreservado para a leitura de IL-6, conforme descrito na tabela 3.1.

Quadro 3.1: Variantes dos sistemas do ensaio MAT.

Teste	Sistema	Leitura	Fonte
<b>Cryo WBT/IL-1<math>\beta</math>*</b>	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-1 $\beta$	ICCVAM, 2008, FE, 2010
<b>WBT/IL-6*</b>	Sangue Total Humano	Interleucina-6	ICCVAM, 2008, FE, 2010
<b>Cryo WBT/IL-6</b>	Sangue Total Humano Criopreservado	Interleucina-6	Proposta original

WBT: Sangue Total Humano (*Whole Blood Total*), Cryo/WBT: Sangue Total Humano Criopreservado (*Cryopreserved Whole Blood*), \* Sistemas do MAT validados pelo ICCVAM.

### **3.1.1. Coleta do Sangue total (WBT)**

A coleta do sangue total foi realizada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), sob aprovação do comitê de ética da Fiocruz e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE) sob o número 368/07 (Anexo I). Os doadores voluntários devem se declarar em bom estado de saúde, livres de infecções virais ou bacterianas, e relatar ausência de sintomas infecciosos por um período de uma semana precedente à doação do sangue. Não devem ter ingerido drogas anti-inflamatórias por pelo menos sete dias antecedentes ao dia da doação. Indivíduos que fazem uso de qualquer outra droga que possa influenciar na detecção das citocinas de leitura não estarão aptos como doadores. O sangue foi coletado utilizando uma agulha hipodérmica calibre 21 e uma seringa de 10 mL, e transferido imediatamente para um tubo heparinizado, afim de evitar a coagulação do sangue. Foi coletado aproximadamente 10 mL de sangue de cada um dos 10 doadores voluntários.

### **3.1.2. Contagem das células sanguíneas**

Uma parte do sangue fresco de cada doador foi separada para a contagem diferencial de células sanguíneas utilizando o contador Hemogram 60 BioClin®, sendo discriminado tipos celulares como leucócitos totais, linfócitos totais e percentual de granulócitos, sendo estes alguns dos itens avaliados para excluir possíveis doadores fora dos parâmetros especificados pelo fabricante do aparelho. Este procedimento foi adotado em todos os ciclos de coleta de doadores, realizados com intervalo de aproximadamente 3 meses, utilizando doadores distintos com pelo menos 4 doadores em cada ciclo. Os mesmos doadores foram utilizados para os ensaios de sangue fresco e criopreservado.

### **3.1.3. Sangue fresco**

Parte do sangue coletado e analisado foi utilizada para preparar o contato com amostras e controles. Este procedimento foi realizado até 4 horas após a coleta. A matriz do MAT foi composta pelo sangue total de 4 doadores. Outra parte do sangue foi destinada à

criopreservação, para utilização em ensaios posteriores.

### **3.1.4. Sangue criopreservado**

A criopreservação do sangue total foi realizada em até quatro horas após a coleta. As etapas do procedimento seguem protocolo desenvolvido por Schindler e colaboradores (2006).

A solução crioprotetora foi composta por tampão Sörensen (Acila AG, Mörfelden Walldorf, Germany) misturado com 20% v/v de dimetil sulfóxido (DMSO) (Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Germany), ambos livres de endotoxina. A solução crioprotetora é adicionada ao sangue na proporção 1:1. Um volume de 0,5 mL de sangue de cada doador sadio foi transferido, em cabine de segurança biológica, para criotubos de 1,8 mL. Posteriormente a solução crioprotetora foi adicionada aos criotubos na mesma quantidade. Os tubos foram gentilmente agitados e colocados em suporte, mantendo espaço entre eles para garantir congelamento homogêneo, e estocado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , não excedendo um período de 3 meses.

## **3.2. Referência de endotoxina**

LPS de *Escherichia coli* sorotipo O55:B5 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), foi utilizado como padrão de endotoxina. O padrão foi reconstituído com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica estabelecendo uma concentração de 10 ng/mL. Considerando 1 ng/mL = 5 Unidades de Endotoxina (UE) foi preparada uma curva de LPS. De acordo com a FE, uma UE equivale a uma Unidade Internacional (UI). O padrão foi agitado vigorosamente por 20 minutos antes de realização da diluição seriada. A partir desta solução foram realizadas diluições para obtenção da curva de endotoxina com 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL, de acordo com a Figura 3.1. As diluições e o controle negativo foram realizados com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica. Nos intervalos de cada diluição a solução é agitada por dois minutos, e imediatamente utilizada no ensaio. O teste foi realizado utilizando-se 4 replicatas para cada concentração da curva padrão. O ponto 0,5 UE/mL foi utilizado para aditar as amostras na realização do ensaio do método A (item 3.9).

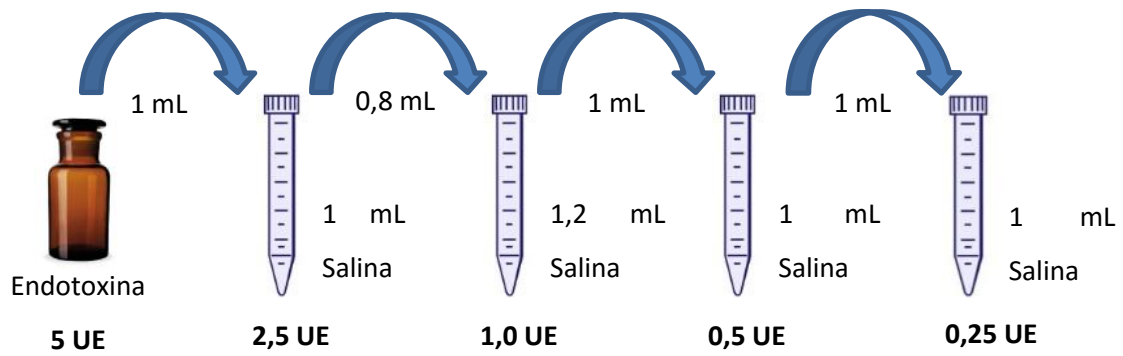


Figura 3.1: Preparo da curva padrão de endotoxina. Diluição seriada realizada em salina.

### 3.3. Referência de Ácido Lipoteicóico (LTA)

O LTA (do inglês Lipoteichoic acid) de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado em nossos ensaios como padrão de pirogênio de bactérias Gram-positivas. O padrão foi reconstituído com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica e posteriormente foram realizadas diluições seriadas até atingir a concentração de 50.000 pg/mL. A partir desta solução foram realizadas diluições de acordo com a Figura 3.2 para obtenção da curva de LTA com 20.000; 7.500; 5.000 e 1.000 ng/mL. As diluições e o controle negativo foram realizados com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica. O teste foi realizado utilizando-se 4 replicatas para cada concentração da curva padrão. Para realização do ensaio do Método A (item 3.9) as amostras foram aditadas com LTA 5.000 ng/mL. Os pontos da curva padrão de LTA foram escolhidos baseando-se em resultados previamente encontrados (Gimenes et al. 2015).

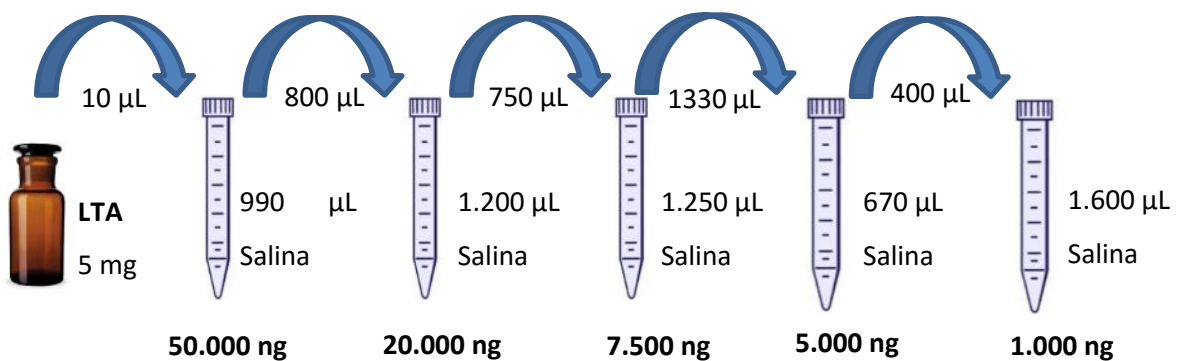


Figura 3.2: Preparo da curva padrão de LTA. Diluição seriada realizada em salina.

### 3.4. Referência de zymosan A

Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado em nossos ensaios como padrão de pirogênio de fungos. O padrão foi reconstituído com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica e posteriormente foram realizadas diluições seriadas até atingir a concentração de 10.000 ng/mL. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas (Figura 3.3) para obtenção da curva de zymosan com 5.000; 2.500; e 1.000 ng/mL (Pardo-Ruiz 2016). As diluições e o controle negativo foram realizados com solução fisiológica de NaCl 0,9% apirogênica. O teste foi realizado utilizando-se 4 replicatas para cada concentração da curva padrão. Para realização do ensaio do Método A (item 3.9) as amostras foram aditadas com zymosan 2.500 ng/mL.

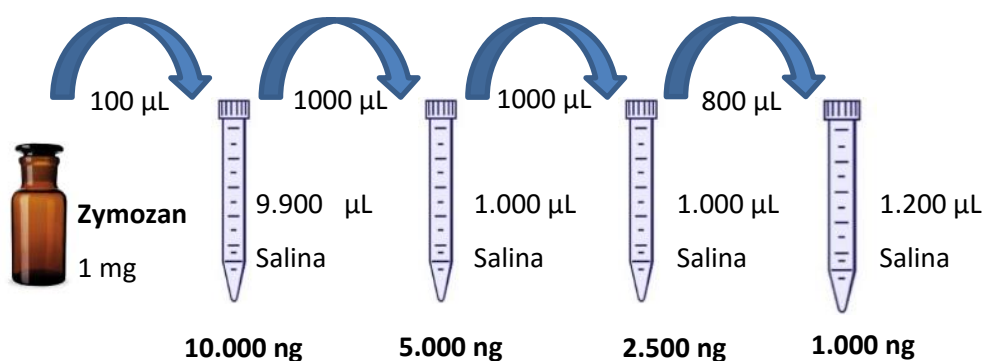


Figura 3.3: Preparo da Curva Padrão de zymosan. Diluição seriada realizada em salina.

### 3.5. Polimixina B

Dados da literatura indicam que o LTA comercialmente disponível pode conter níveis detectáveis de contaminantes de endotoxina, o que contribui para pelo menos algumas das atividades biológicas observadas do LTA (Gao et al. 2001). Assim, para evitar qualquer interferência de possíveis contaminantes de LPS no estímulo da matriz do MAT com LTA e zymosan, utilizados como estímulos NEPs, as soluções primárias destas moléculas foram tratadas com polimixina B (PMB) (Sigma-Aldrich, USA). Conforme descrito por Solati e

colaboradores (2015), foram adicionados 80 µg de PMB para cada mililitro de LTA (1 mg) ou zymosan (1 mg) utilizados, afim de excluir qualquer possível contaminação proveniente de LPS presentes nas soluções de NEPs utilizadas como estímulos no MAT.

### **3.6. Vacina Meningocócica C conjugada**

Os lotes da vacina MenCC avaliados pelo MAT foram produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). Os polissacarídeos constituintes da vacina são provenientes do polissacarídeo capsular da *Neisseria meningitidis cepa* 2135. A avaliação foi realizada em 3 lotes da vacina em desenvolvimento que já foram aprovados pelo Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) do Departamento de Qualidade (DEQUA), conforme as especificações contidas na monografia do produto na FE.

Os testes de pirogênios realizados pelo controle de qualidade são aplicados às etapas do processo produtivo da MenCC (Figura 3.4) seguindo diretrizes recomendadas pela OMS e FE (Tabela 3.2). Para o polissacarídeo e para o concentrado antigênico (BULK) é realizado apenas o teste do LAL, e no produto final são sugeridos tanto o teste do LAL quanto o RPT. Neste estudo o MAT será aplicado ao produto final com o objetivo de se realizar uma análise comparativa entre os três métodos atualmente recomendados pela FE para análise de pirogênios.

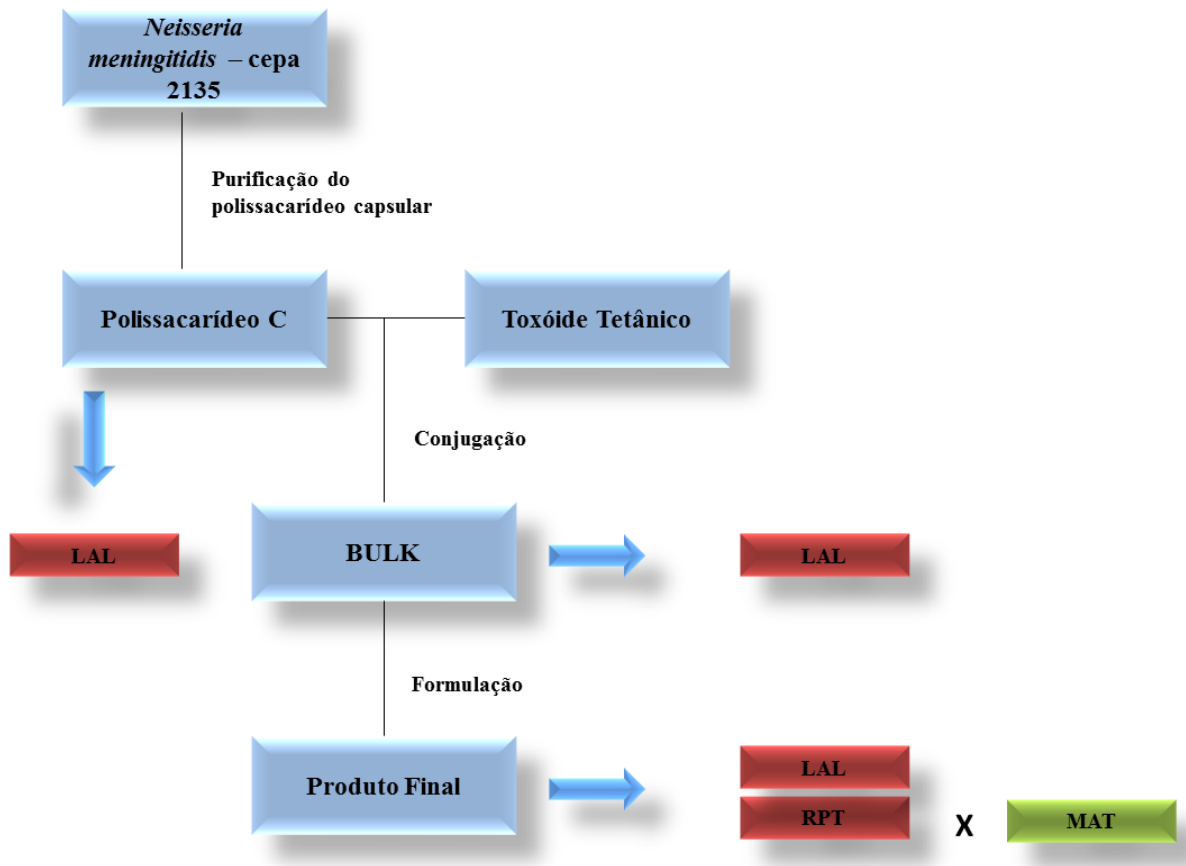


Figura 3.4: Fluxograma de produção e controle de qualidade da MenCC em desenvolvimento em Bio-Manguinhos.

Quadro 3.2: Recomendações para o controle de qualidade do produto final da MenCC.

	<b>RPT</b>	<b>LAL</b>
<b>Método</b>	Qualitativo	Quantitativo
<b>Especificação</b>	Aumento individual da temperatura > 0,5 °C	< 25 UI/DH
<b>FB</b>	Não consta	Não consta
<b>FE</b>	Não recomenda	Recomenda
<b>OMS</b>	Recomenda	Recomenda

FB: Farmacopeia Brasileira; FE: Farmacopeia Europeia; OMS: Organização Mundial da Saúde;

UI: unidades internacionais; DH: dose humana



### 3.7. Máxima Diluição Válida

Para assegurar a validade do ensaio, a vacina MenCC não pode ser diluída acima da máxima diluição válida (MDV), que foi calculada conforme equação abaixo.

$$MDV = (LE \times C) / LD$$

LE: Limite de endotoxina

C: Concentração da amostra

LD: Limite de detecção

A concentração das amostras foi fornecida pelos fabricantes da vacina em teste. O limite de endotoxina foi calculado de acordo com a fórmula estabelecida pelo padrão da FE:

$$LE = K/M$$

Onde K é o limite de endotoxina permitido em produtos farmacêuticos e dispositivos médicos, estabelecido pelo FDA e M é a dose terapêutica administrada no paciente humano. Como o LE para MenCC já foi estabelecido na monografia do produto pela FE, o cálculo do LE não foi necessário, adotando-se como LE 25 UE/DH.

O limite de detecção foi determinado através da curva padrão de endotoxina. O LD é a concentração de endotoxina correspondente ao valor do “*cut-off*”, expresso em equivalentes de endotoxina por mililitro.

### 3.8. Teste de interferentes

O teste de interferentes foi realizado para assegurar a validade do teste no produto específico. Assim, as amostras da MenCC foram diluídas em escala geométrica, com todas as diluições não excedendo o valor da MDV. As vacinas foram testadas com e sem a adição de volume conhecido de endotoxina, próximo ao ponto médio da curva padrão.

Foram adicionados 900 µL de NaCl a 0,9%; 100 µL de cada amostra diluída com e sem LPS e 200 µL de sangue criopreservado em microtubos apirogênicos identificados. Para se obter uma concentração final igual a 0,5 UE/mL foram adicionados 10 µL de LPS a 5 UE/ mL

em 990 µL correspondentes a cada diluição da vacina.

O cálculo da recuperação de endotoxina foi realizado subtraindo-se a média de endotoxina detectada nas amostras puras, daquelas aditadas. As amostras de vacina são consideradas livres de interferentes se, sob as condições do experimento, o conteúdo de endotoxina encontrado nas amostras aditadas estiver com recuperação entre 50 e 200% do volume previamente adicionado.

### **3.9. Teste de Ativação de Monócitos**

O MAT foi realizado de acordo com o Método A (teste quantitativo), descrito na FE. O Método A envolve a comparação do material em análise com um curva dose-resposta padrão de endotoxina. A concentração de contaminantes no produto em análise deve ser menor que o limite de endotoxina especificado para o produto para aprovação no teste.

A solução em análise deve ser preparada respeitando o MDV e deve ser posta em contato com a matriz monocítica (sangue fresco ou criopreservado). Este contato deve ser realizado em quadruplicata. A solução deve ser também analisada em quatriplicata aditando à mistura, padrão de endotoxina na concentração referente a um ponto no meio da curva padrão (5,0 UE/mL). Como controle negativo deve ser utilizado solução salina apirogênica.

A concentração em equivalentes de endotoxina encontrada na solução aditada, após subtração dos valores encontrados na solução não aditada, deve ter uma recuperação, em relação ao ponto da curva padrão utilizado como dopagem, na faixa de 50-200 %.

#### **3.9.1. Contato da MenCC com sangue**

A MenCC foi reconstituída em solução de NaCl 0,9% apirogênica, ou no adjuvante da vacina. Posteriormente, a vacina foi diluída com solução de NaCl a 0,9% de acordo com a diluição adequada para o ensaio obtida a partir dos resultados do teste de interferência, respeitando a MDV.

Para o contato da MenCC com o sangue foram utilizados diferentes volumes de NaCl

0,9% apirogênica, MenCC diluída com e sem adição de LPS e sangue, sendo estas concentrações ajustadas conforme a matriz monocítica, sangue fresco (item 1.9.1.2) ou sangue criopreservado (1.9.1.3).

Para amostras contaminadas propositalmente com LPS exógeno, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de LPS a 5 UE/ mL em 990  $\mu\text{L}$  de amostra da MenCC previamente diluída, para obter uma concentração final igual a 0,5 UE/mL.

Em paralelo, uma curva de LPS nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 5,0 UE/mL de NaCl foi realizada para validação de cada ensaio. Após essa etapa, os microtubos foram incubados em uma estufa à 37°C (CO<sub>2</sub> a 5%), por aproximadamente 16 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram imediatamente analisadas ou congeladas até o momento da análise por ELISA.

### 3.9.1.1. Contato da MenCC com sangue fresco

Para o contato da MenCC com o sangue fresco, foram adicionados NaCl 0,9% qsp 1200  $\mu\text{L}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de MenCC diluída, 10  $\mu\text{L}$  de LPS (5 UE/mL) nas amostras correspondentes e 100  $\mu\text{L}$  de sangue fresco provenientes de uma matriz contendo sangue de 4 doadores em microtubos apirogênicos identificados. O preparo das amostras encontra-se resumido na tabela 3.3.

Tabela 3.1: Contato da MenCC com sangue fresco em microtubos.

Componentes do contato	Não contaminada	Contaminada (0,5 UE/mL)
	$\mu\text{L}/\text{microtubo}$	
<b>MenCC diluída</b>	100	100
<b>NaCl 0,9%</b>	1000	990
<b>Sangue fresco</b>	100	100
<b>LPS / LTA / zymosan</b>	-	10
<b>Total</b>	1200	1200

### 3.9.1.2. Contato da MenCC com sangue criopreservado

Após processo de descongelamento, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do sangue criopreservado proveniente de uma matriz contendo sangue de 4 doadores a uma solução contendo qsp 1200  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,9%, 100  $\mu\text{L}$  da MenCC diluída e 10  $\mu\text{L}$  de LPS (5 UE/mL) nas amostras correspondentes. O preparo das amostras se encontra resumido na tabela 3.4.

Tabela 3.2: Contato da MenCC com sangue criopreservado em microtubos.

Componentes do contato	Não contaminada	Contaminada (0,5 UE/mL)
	$\mu\text{L}/\text{microtubo}$	
<b>MenCC diluída</b>	100	100
<b>NaCl 0,9%</b>	900	890
<b>Sangue criopreservado</b>	200	200
<b>LPS / LTA / zymosan</b>	-	10
<b>Total</b>	1200	1200

### 3.9.2. Dosagem de citocinas

Para determinar a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-6 nas matrizes celulares após o contato da MenCC com diferentes pirogênios, foram utilizados os kits comerciais da R&D Systems™. A curva padrão das citocinas foi preparada de acordo com instruções do fabricante, ilustrada na Figura 3.5.

Para realização da dosagem de citocinas, foram adicionados 100 ou 200  $\mu\text{L}$  (IL-6 e IL-1 $\beta$ , respectivamente) do sobrenadante do contato com a matriz monocítica, em poços da placa de ELISA do kit. Após incubação por 2 horas em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com 400  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do conjugado a cada poço, e a placa foi incubada por mais 2 horas, sendo repetido o procedimento de lavagem após este período. O volume de 200  $\mu\text{L}$  do substrato foi adicionado a cada poço e após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, a reação foi interrompida com adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de parada (ácido sulfúrico). A leitura da placa foi realizada por espectrofotometria na faixa de 450 nm para determinação da densidade ótica.

A leitora de microplacas e o software de análise utilizados foram Tecan-Sunrise™ e Magellan™ V. 7.1, respectivamente.

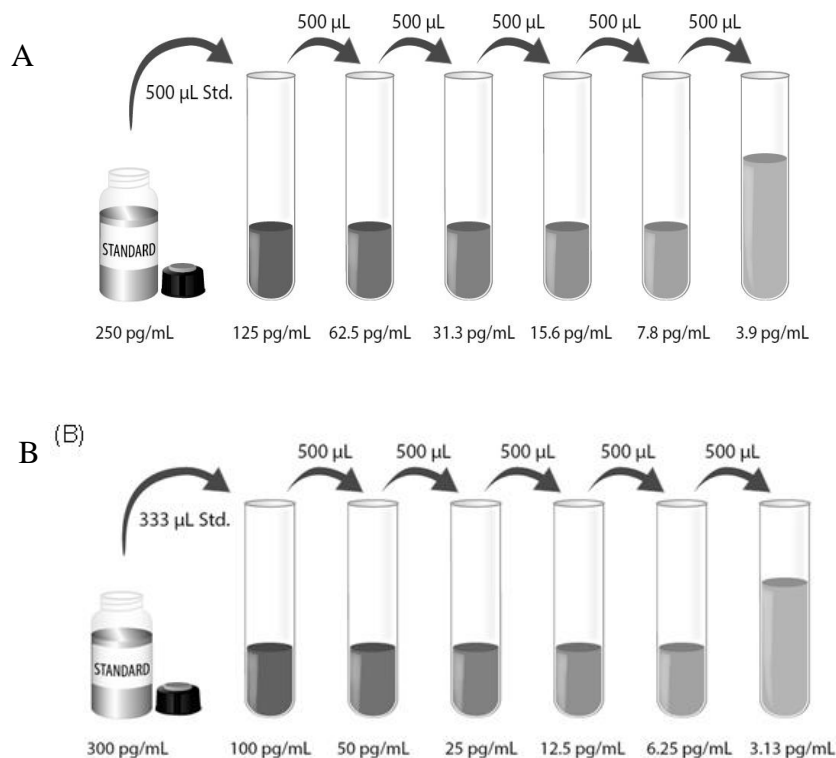


Figura 3.5: Esquema de diluição das citocinas, conforme recomendação do fabricante. (A) IL-1 $\beta$  e (B) IL-6.

### 3.9.3. Interpretação do Ensaio MAT

Existem dois critérios de aceitação para a curva padrão de citocina, (1) a regressão das respostas deve ser estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), (2) a regressão das respostas, em escala logarítmica não deve desviar significativamente da linearidade ( $p > 0,05$ ), cálculo obtido no programa Microsoft Excel 2016. Os valores da curva padrão observados no resultado do ensaio não devem desviar significativamente dos valores da curva padrão teórica. Para análise das curvas de citocinas, IL-1 $\beta$  e IL-6, foram utilizados parâmetros de validação especificados pelo ICCVAM (2008), sendo estes sumarizados na tabela 3.5.

A recuperação em UEE, calculada a partir da amostra aditada com LPS, após subtração da referente amostra não aditada, deve estar entre 50-200 %. A solução em análise está em concordância com os requerimentos do teste, se a concentração em UEE, medida após correção da diluição, for menor que o LE especificado para o produto em questão.

Quando a matriz monocítica consiste em *pool* de células, proveniente de um certo número de doadores, o produto em análise deve ser aprovado pelo ensaio realizado com um *pool* de células.

Quadro 3.3: Parâmetros e especificações dos resultados.

<b>Componentes do protocolo</b>	<b>Recomendações do ICCVAM</b>		<b>Adequação dissertação</b>
<b>Componentes do protocolo</b>	Sangue total Criopreservado IL-1 $\beta$	Sangue total fresco IL-6	Sangue total Criopreservado IL-6
<b>Substância teste</b>	Testar sem diluir e diluições seriadas para avaliar a interferência, MDV		
<b>Número de doadores</b>	Mínimo de 3 (independentes ou reunidos)		
<b>Critério de decisão para interferência</b>	Controle positivo entre 50% e 200% de 0,5 UE/mL		
<b>Contato amostra/sangue</b>	Curva, amostras e controles medidos em quadruplicata		
<b>ELISA</b>	Incluir 7 pontos da curva IL-1 $\beta$ em duplicata	Incluir 7 pontos da curva IL-6 em duplicata	
<b>Critério de aceitabilidade</b>	Função quadrática de IL-1 $\beta$ $\geq 0,95$	Função quadrática de IL-6 $\geq 0,95$	
<b>Decisão de critério de pirogenicidade</b>	Concentração de endotoxina da substância teste > concentração limite de endotoxina da substância teste		

UE: Unidade de Endotoxina; IL: Interleucina

Fonte: ICCVAM (2008)

### 3.10. Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus*

O método realizado foi o cinético cromogênico. É o método mais sensível (0,0050 UE/mL) e específico para detecção e medida de endotoxina bacteriana. O método LAL cromogênico é simples, reprodutível e é realizado através da reação da amostra a ser testada com o reagente LAL. Baseia-se na quantificação da coloração amarela durante a reação, que é proporcional à concentração de endotoxinas.

#### 3.10.1. Controles

O padrão de endotoxina utilizado foi LPS de *Escherichia coli* sorotipo O55:B5 (Charles River ENDOSAFE). A endotoxina foi reidratada com quantidade de WFI (Water For Injection) indicada pelo fabricante, obtendo-se uma concentração de 50 UE/mL de endotoxina padrão, a qual foi utilizada para preparo da curva-padrão através da diluição seriada nas concentrações 5; 0,5; 0,05; 0,005 UE/mL (Figura 3.6), cada diluição foi homogeneizada por 3 minutos em cada etapa. Posteriormente 100 µL de cada ponto da curva foram pipetados nos poços correspondentes em placa de 96 poços. Como controle negativo foi utilizada água WFI previamente aprovada, disposta na placa conforme esquema evidenciado na figura 3.7.

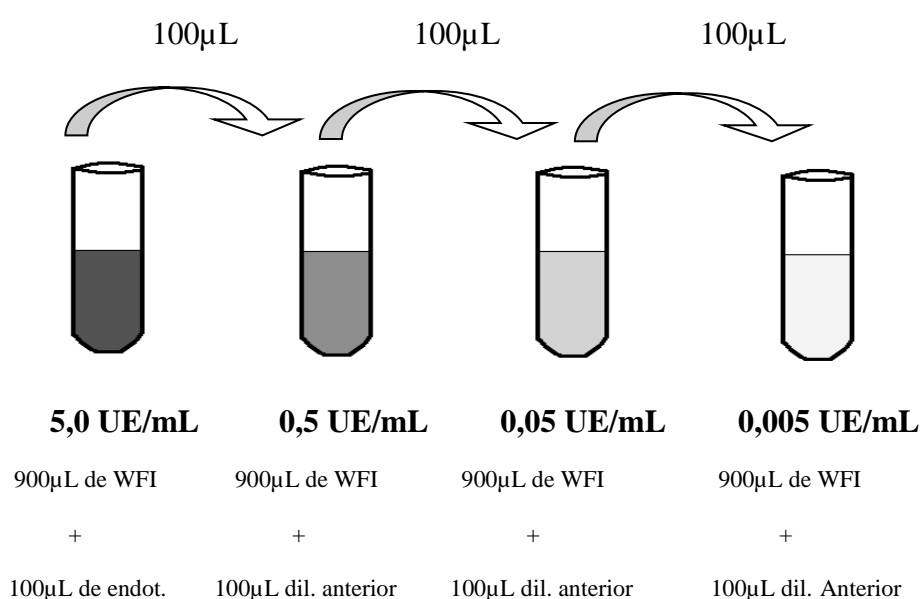


Figura 3.6: Diluição seriada da curva-padrão de endotoxina.

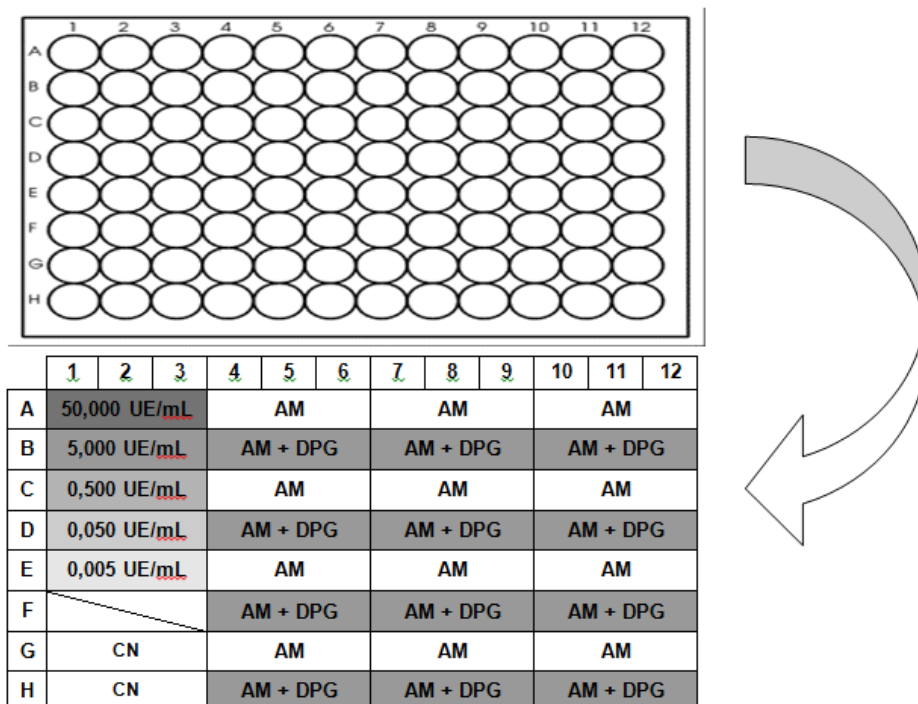


Figura 3.7: Disposição da curva-padrão, controles e amostras na placa de 96 poços.

CN: controle negativo. AM: amostra. DPG: dopagem.

### 3.10.2. Preparo das amostras

A MenCC foi reconstituída com NaCl 0,9% ou adjuvante específico da mesma, de forma que a combinação dos lotes da vacina e adjuvante fosse a mesma utilizada para a vacinação, obtendo-se uma concentração final de 5 doses humanas (dose humana: 10 $\mu$ g/0,5mL). O ensaio foi realizado a partir de um pool de 3 frascos do produto final da MenCC. Cada frasco foi homogeneizado de 1 a 2 minutos. Após o preparo das amostras foram transferidos 100 $\mu$ L da amostra diluída (1:100) para seis cavidades da placa. As três primeiras cavidades correspondem à amostra pura e as três abaixo correspondem à amostra aditada com LPS (5 UE/mL) (Figura 3.7).



### **3.10.3. Reagente LAL**

O reagente LAL, Endochrome-K (ENDOSAFE), foi reidratado com a quantidade de água apirogênica indicada no rótulo. O mesmo foi homogeneizado levemente para não formar espuma, evitando-se exposição à luz. Distribuiu-se 100 µL do reagente em todas as cavidades amostradas da placa.

### **3.10.4. Leitura da Placa**

Imediatamente após adição do reagente LAL a placa foi lida na leitora BIOTEK, no comprimento de 340 nm, utilizando-se o programa ENDOSCAN, para determinação da densidade ótica dos poços correspondentes aos controles, curva-padrão e amostras.

### **3.10.5. Interpretação do Ensaio do LAL**

Os critérios de validação do ensaio são (1) coeficiente de correlação da curva padrão entre -1 e -0,98, (2) inclinação da curva padrão entre -0,3 e -0,1, (3) interseção da curva padrão de 2,5 a 3,5, (4) recuperação do controle positivo do produto entre 50 e 200 %, (5) coeficiente de variação das replicatas < 10 %. A amostra é considerada satisfatória quando o valor de endotoxina encontrado for menor que o valor da especificação do produto.

## **3.11. Teste de Pirogênio em Coelhos**

### **3.11.1. Preparo das amostras**

A MenCC foi reconstituída com água apirogênica, obtendo-se uma concentração final de 5 doses humanas (DH: 10µg/0,5mL), mantendo a concentração especificada pelo fabricante.

O ensaio foi realizado a partir de um pool de 3 frascos do produto final da MenCC. Foi inoculado nos coelhos o quantitativo de produto equivalente a 1 mL/Kg do animal.

### **3.11.2. Animais**

Foram utilizados três coelhos por lote, adultos, sadios, da mesma espécie, pesando no mínimo 1,5 kg. Após a seleção, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em sala com temperatura uniforme entre 20 e 23 °C livre de perturbações que pudessem stressá-los. Animais que apresentaram elevação de temperatura igual ou superior a 0,5 °C, em relação à temperatura inicial, não foram utilizados no teste.

Foi introduzido a sonda (pyromon Ellab®), para medição da temperatura, no reto dos animais em profundidade aproximada de 6 centímetros. Durante o período do teste, os coelhos foram contidos de maneira que ficaram em postura natural de repouso.

### **3.11.3. Procedimento**

Quarenta minutos antes da injeção da dose da amostra, foi registrada a temperatura de cada animal mediante duas leituras efetuadas com intervalo de 30 minutos. A média das duas leituras foi adotada como temperatura de controle necessária para avaliar qualquer aumento individual de temperatura subsequente à injeção da amostra.

Foram injetados 1 mL/Kg das amostras de MenCC não diluída (DH, 10 µg/0,5mL), pela veia marginal da orelha de três coelhos (agulha de calibre 25x0,7mm) como recomendado pela FB. O Registro da temperatura de cada animal foi realizado em intervalos de 30 minutos durante 3 horas após a injeção. Em caso de re-teste são utilizados mais 5 coelhos, seguindo o mesmo procedimento, contabilizando um total de 8 coelhos por lote quando ocorre re-teste.

#### **3.11.4. Interpretação do ensaio do RPT**

O aumento de temperatura foi verificado pela diferença entre a maior temperatura apresentada pelo coelho durante o teste e a sua temperatura de controle. O produto cumpre com os requisitos do teste de pirogênios quando nenhum dos três coelhos apresenta aumento individual da temperatura igual ou superior a 0,5 °C, em relação às suas respectivas temperaturas controle. Quando um dos três coelhos apresenta elevação da temperatura corporal acima de 0,5 °C deve-se realizar outro ensaio utilizando 5 coelhos. O produto em teste cumpre os requisitos para ausência de pirogênios se no máximo três dos oito coelhos apresentarem aumentos individuais de temperatura iguais ou superiores a 0,5 °C, ou se a soma dos aumentos individuais de todos os coelhos não exceder a 3,3 °C.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Vacina Meningocócica C Conjugada**

#### **4.1.1. Teste de Pirogênio em Coelho**

Os três lotes provenientes da produção da MenCC foram avaliados quanto ao seu conteúdo de pirogênios pelo RPT. Todos os coelhos utilizados no ensaio apresentaram peso na faixa de 1648-1979 gramas, acima de 1,5 Kg, como especificado pela FB. Quarenta minutos anterior a inoculação das amostras, os animais apresentaram temperatura inicial abaixo de 39,8 °C, não apresentando variação superior a 1 °C, respeitando exigências da FB (Tabela 4.1). Nos ensaios de cada lote, nenhum dos coelhos apresentou variação individual de temperatura superior a 0,5°C, e todos os decréscimos de temperatura apresentado pelos animais foi desconsiderado, segundo recomendação da FB. Além disso, a soma da elevação de temperatura dos 3 coelhos do ensaio de cada lote não excedeu 3,3°C, estando assim todos os 3 lotes aprovados no teste de pirogênios realizado em coelhos.

Tabela 4.1: Resultado do RPT realizado nos três lotes da MenCC.

Coelho Nº	Temperatura média (°C)	T0 + 30' (°C)	T0 + 60' (°C)	T0 + 90' (°C)	T0 + 120' (°C)	T0 + 150' (°C)	T0 + 180' (°C)	Varição individual temperatura (°C)	Σ Varição individual temperatura (°C)
<b>Lote A</b>									
01	39,00	39,00	39,10	39,00	39,10	39,10	39,10	0,15	0,65° C
02	38,90	39,10	39,10	39,10	39,20	39,20	39,30	0,40	
03	39,10	39,10	39,20	39,10	39,10	39,10	39,10	0,10	
<b>Lote B</b>									
01	39,20	39,20	39,20	39,25	39,25	39,25	39,30	0,10	0,40° C
02	39,15	39,10	39,05	39,00	39,00	39,00	39,10	0,00	
03	39,00	39,05	39,20	39,25	39,15	39,30	39,20	0,30	
<b>Lote C</b>									
01	39,10	39,05	39,00	39,05	39,00	39,05	38,95	0,00	0,05° C
02	39,30	39,35	39,25	39,35	39,20	39,35	39,25	0,05	
03	39,15	39,15	38,95	39,05	39,05	38,95	39,10	0,00	

T: temperatura; Σ: Somatório da variação individual de temperatura.

#### 4.1.2. Teste do Lisado de Amebócito de *Limulus*

Os três lotes provenientes da produção da MenCC foram avaliados quanto ao seu conteúdo de endotoxina pelo método LAL cinético-cromogênico. O resultado do teste de endotoxina para os três lotes foi menor que 0,5000 UE/mL (< 0,25 UE/DH). Os lotes A, B e C apresentaram recuperações da contaminação com LPS de 87%, 153% e 152%, respectivamente (Tabela 4.2), conforme especificado como parâmetro de validade do teste pela FE. Todos os lotes foram aprovados e a quantificação de endotoxina das amostras se mostrou dentro da especificação.

Tabela 4.2: Resultado do teste LAL cinético-cromogênico realizado nos três lotes da MenCC.

<b>Lotes</b>	<b>Resultado (UE/mL)</b>	<b>Resultado (UE/DH)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Aprovado/Reprovado</b>
<b>A</b>	< 0,5000	< 0,25	87	Aprovado
<b>B</b>	< 0,5000	< 0,25	153	Aprovado
<b>C</b>	< 0,5000	< 0,25	152	Aprovado

UE: Unidade de Endotoxina; DH: Dose Humana.

## 4.2. Teste de Ativação de Monócitos

### 4.2.1. Qualificação dos doadores

A avaliação do sangue dos doadores foi realizada inicialmente pelo perfil hematológico. Alguns parâmetros foram considerados como indicadores importantes para qualificar os doadores como contagem de células brancas (**WBC#**), linfócitos (**LYM#**) e granulócitos (**GRA#**). O perfil hematológico foi comparado com valores de referência (Tabela 4.3), sendo aqueles doadores que apresentaram os elementos figurados dentro da faixa limite considerados aptos para avaliação do ensaio de liberação de citocinas pelo MAT.

Pela avaliação hematológica, todos os doadores obtiveram perfil de acordo com os valores de referência. Exceto o doador 3, que apresentou contagem de células brancas e granulócitos acima do especificado pelos valores de referência. Entretanto, devido ao resultado de ensaios subsequentes, o mesmo não foi excluído da composição da matriz monocítica.

Tabela 4.3: Perfil hematológico dos doadores.

Doador	Parâmetros do Hemograma avaliados		
	WBC#	LYM#	GRA#
Valor de referência	4,0 - 10,0	0,80 - 4,0	2,0 - 7,0
1	4,36	1,48	2,28
2	6,87	1,7	3,93
3	11,64	2,16	7,49
4	5,21	1,81	2,5
5	6,53	2,31	2,77
6	6,02	2,14	2,49
7	6,65	2,69	2,6
8	6,42	2,29	3,02
9	6,02	1,69	3,36
10	6,72	1,96	3,83

WBC#: contagem de células do sangue total; LYM#: contagem de linfócitos; GRA#: contagem de granulócitos.

#### 4.2.2. Qualificação das células provenientes dos doadores para o ensaio

Para este ensaio foi utilizada uma alíquota do sangue de cada doador, pré-qualificado de acordo com a FE. O sangue dos mesmos foi desafiado frente a uma contaminação proposital com quantidade conhecida de LPS de *E. coli* (0,5 UE/mL) e controle negativo.

A qualificação das células dos doadores foi realizada pela dosagem de citocinas, liberadas pelo sangue com e sem adição de LPS, pelo método de ELISA. Cada ponto da curva de citocina foi quantificado em duplicata, e cada amostra foi avaliada em quadruplicata. A validade do ensaio foi avaliada pela curva de IL-6 (Tabela 4.4), que obteve  $R^2 = 0,9963$ .

Tabela 4.4: Curva de IL-6 referente ao ensaio de qualificação das células dos doadores.

Curva	Concentração pg/mL	D.O. (média)	D.P.	C.V. (%)
P01	3,13	0,036	0,002	5,5
P02	6,25	0,052	0	0,1
P03	12,5	0,113	0,001	8,7
P04	25	0,224	0,005	2,3
P05	50	0,441	0,022	5,1
P06	100	0,855	0,014	1,6
P07	300	2,176	0,021	0,9

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica; D.P.: Desvio Padrão; C.V.: Coeficiente de Variação. Valores referentes a quatro replicatas.

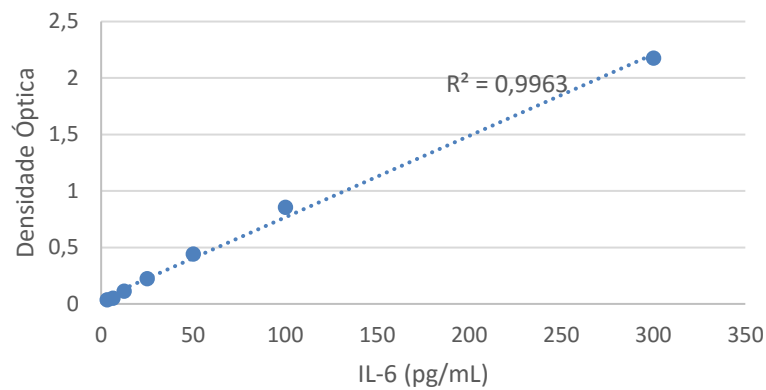


Figura 4.1: Curva de IL-6 na qualificação dos doadores.

Foi observado que nas amostras aditadas com LPS (equivalente a 0,5 UE/mL), houve liberação da citocina IL-6, não havendo interferência no nível basal de citocinas no sangue dos doadores não estimulados, com exceção do doador 7 que apresentou valor basal de IL-6 discrepante dos outros doadores (Tabela 4.5). Por esta razão, as amostras deste doador não compuseram a matriz monocítica utilizada nos ensaios. Os outros doadores foram qualificados para composição da matriz monocítica aplicada aos ensaios seguintes do MAT.



Tabela 4.5: Resposta na liberação de IL-6 pelo sangue dos doadores após estímulo com LPS.

Doadores	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
1 +	191,929	7,429	3,9
1 -	-6,282	0,265	4,2
2 +	247,024	4,703	1,9
2 -	-3,038	0,303	10
3 +	162,625	8,396	5,2
3 -	-4,695	0,390	8,3
4 +	458,700	5,574	1,2
4 -	-5,488	0,220	4
5 +	232,176	5,082	2,2
5 -	0,783	0,647	82,6
6 +	108,810	4,484	4,1
6 -	-0,187	0,513	274,6
7 +	160,980	2,689	1,7
7 -	47,659	3,741	7,8
8 +	490,052	6,915	1,4
8 -	-2,065	0,676	32,7
9 +	155,623	6,554	4,2
9 -	-5,980	0,700	11,7
10 +	280,517	3,368	1,2
10 -	-6,008	0,740	12,3

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. Valores referentes a quatro replicatas.

### 4.3. Cálculo da MDV da MenCC

O cálculo do MDV foi realizado conforme descrito na FE, utilizando dados fornecidos pela monografia da MenCC presente na FE. O limite de endotoxina (LE) utilizado foi de 25 UE/DH, seguindo especificações do produto, e a concentração (C) utilizada foi o valor referente à dose humana da MenCC (10 µg/0,5mL). Os limites de detecção (LD) foram utilizados de acordo com cada parâmetro de leitura, tendo a aplicação do teste a cada citocina apresentado limites de detecção distintos. O LD foi definido a partir do resultado do branco do ensaio realizado em quadruplicata na matriz monocítica. De acordo com a FE (2010) o LD é a concentração de endotoxina correspondente ao valor do *cut-off* (“background” do ensaio). De

acordo com cálculo abaixo a diluição 1/11 fica estabelecida como a MDV da MenCC para aplicação do ensaio.

$$MDV = \frac{LE \times C}{LD}$$

$$LE = 25 \text{ EU/DH}$$

$$C = 10 \mu\text{g}/0,5\text{mL} \text{ (} 0,01 \text{ mg}/0,5\text{mL)}$$

$$LD \text{ (IL-1}\beta\text{)} = 0,045$$

$$LD \text{ (IL-6)} = 0,042$$

$$MDV \text{ (IL-1}\beta\text{)} = \frac{25 \text{ UE} \times 0,01 \text{ mg}/0,5\text{mL}}{0,045} = 11,11$$

$$MDV \text{ (IL-6)} = \frac{25 \text{ UE} \times 0,01 \text{ mg}/0,5\text{mL}}{0,042} = 11,90$$

#### **4.4. Avaliação da citotoxicidade da MenCC na matriz monocítica**

Para assegurar a integridade das células dos doadores, foi realizado um ensaio de viabilidade celular no sangue total por contagem automatizada no Countess™ (Invitrogen™) (Tabela 4.6). Para avaliar um possível efeito citotóxico da MenCC nas células e sua influência na liberação de citocinas, foi avaliada a viabilidade celular de células do sangue após o contato com diferentes concentrações de MenCC, baseando-se no cálculo da MDV, e com os controles salina e LPS. As amostras foram coradas com azul de tripan, e adicionadas a lamínula para contagem de células totais pelo equipamento. De acordo com a tabela 4.6, não foi possível observar taxas de morte celular discrepantes dos valores encontrados nos controles.

Tabela 4.6: Contagem de células do sangue após o contato com diferentes concentrações de MenCC e como controle salina e LPS.

Amostras	Células/mL		
	Totais	Viáveis	Mortas
<b>Branco</b>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>LPS 0,25</b>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>LPS 0,5</b>	2,7 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>LPS 1,0</b>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>LPS 2,5</b>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC -</b>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:2 -</b>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	8,0 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:4 -</b>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:6 -</b>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:8 -</b>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:10 -</b>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC +</b>	1,6 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:2 +</b>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:4 +</b>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:6 +</b>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:8 +</b>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>MenCC 1:10 +</b>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>Salina -</b>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>Salina +</b>	1,6 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>4</sup>

+: amostra com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura.

#### 4.5. Teste de interferentes para o sistema de detecção MAT

Uma vez determinada a MDV, diferentes diluições do produto MenCC foram testadas para avaliar a presença de fatores interferentes no sistema de detecção. O teste de interferente foi realizado com o produto diluído nas seguintes proporções: não diluído, diluição 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10, utilizando cloreto de sódio apirogênico como diluente. O sistema de detecção aplicado foi o ELISA, utilizando IL-1 $\beta$  e IL-6 como parâmetros de leitura.

As curvas padrões de citocinas de ambos os ensaios apresentaram valores de R<sup>2</sup> 0,9984 e 0,9987 para IL-6 e IL-1 $\beta$ , respectivamente (Tabela 4.7) (Figura 4.2). Foi observada uma relação dose-resposta nas curvas de LPS, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias

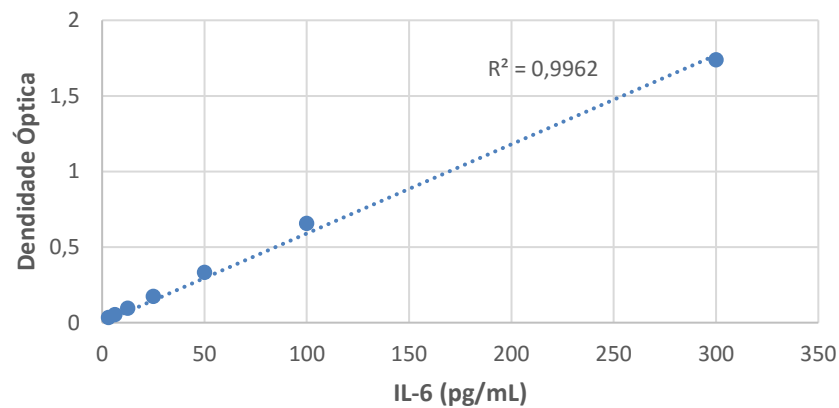
(Tabela 4.8). As curvas das citocinas seguem critério de aceitação especificado pelo ICCVAM (2008), que diz (1) a função quadrática da curva padrão deve produzir um  $R^2$  maior ou igual a 0,95; (2) a densidade óptica do branco da curva padrão deve estar abaixo de 0,15. Para todos os ensaios realizados neste experimento as curvas de citocinas apresentaram o mesmo perfil demonstrado neste ensaio, por esta razão estes dados foram omitidos nos demais ensaios. As curvas de LPS seguem critérios estabelecidos pela FE (2010).

Tabela 4.7: Curva padrão de citocinas do teste de interferente da MenCC.

<b>IL-6</b>					
<b>Curva</b>	<b>Concentração (pg/mL)</b>	<b>D.O. (média)</b>	<b>IL-6 (pg/mL)</b>	<b>D.P.</b>	<b>C.V. (%)</b>
<b>P01</b>	3,13	0,0155	<3,13	0,0007	2,1108
<b>P02</b>	6,25	0,0335	3,660	0,0007	1,3217
<b>P03</b>	12,5	0,0535	10,801	0,0007	0,7482
<b>P04</b>	25	0,0945	24,472	0,0070	4,0873
<b>P05</b>	50	0,1730	52,075	0,0063	1,9197
<b>P06</b>	100	0,3315	108,760	0,0070	1,0763
<b>P07</b>	300	0,6570	296,930	0,0280	1,6686
<b>IL-1<math>\beta</math></b>					
<b>Curva</b>	<b>Concentração (pg/mL)</b>	<b>D.O. (média)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	<b>D.P.</b>	<b>C.V. (%)</b>
<b>P01</b>	3,9	0,0615	<3,9	0,0007	1,1498
<b>P02</b>	7,8	0,0980	5,886	0,0028	2,8862
<b>P03</b>	15,6	0,1570	14,178	0,0113	7,2062
<b>P04</b>	31,3	0,2850	32,166	0,0070	2,8411
<b>P05</b>	62,5	0,5330	67,017	0,0212	3,9800
<b>P06</b>	125	0,9760	129,270	0,0084	0,8993
<b>P07</b>	250	1,8125	246,820	0,0417	2,3018

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica; D.P.: Desvio Padrão; C.V.: Coeficiente de Variação. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL para IL-6 e 3,9 pg/mL para IL-1 $\beta$ . Valores referentes a quatro replicatas.

(A)



(B)

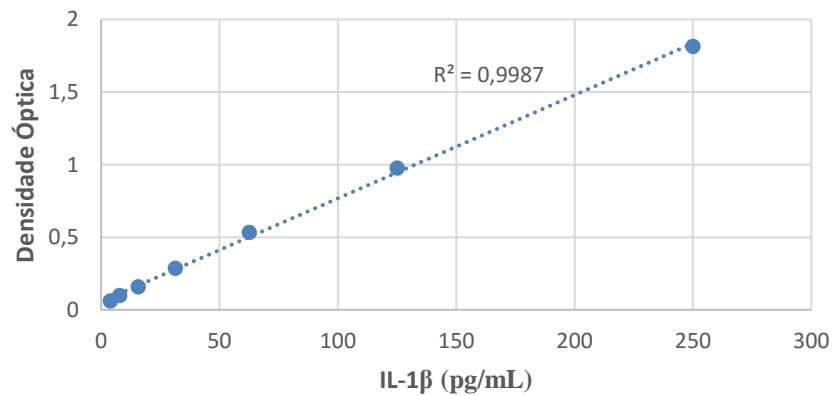


Figura 4.2: Gráfico da curva padrão de citocinas de teste de interferente da MenCC. (A) curva padrão de IL-6 e (B) curva padrão de IL-1 $\beta$ .

Após apurar todos os critérios de validação do ensaio, verificamos que todas as diluições da MenCC demonstraram não interferir na detecção de IL-6 (Tabela 4.9) e IL-1 $\beta$  (Tabela 4.10), apresentando recuperação de LPS dentro da faixa especificada de 50-200%, exceto para leitura de IL-1 $\beta$  na vacina não diluída, como observado na tabela 4.8. Nas figuras 4.3 e 4.4, podemos observar, respectivamente para IL-6 e IL-1 $\beta$ , a comparação das taxas de recuperação de LPS em todas as diluições, evidenciando os valores mínimo e máximo de recuperação necessários para validade do ensaio, assim como o valor real, recuperação de 100% que equivale a 0,5 UE/mL.

Tabela 4.8: Liberação de citocinas pela curva de LPS no teste de interferente da MenCC.

IL-6					
Curva LPS	Concentração (UE/mL)	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
Branco	-	0,0990	11,715	0,0220	22,9250
P01	0,25	0,8210	137,370	0,0920	11,3110
P02	0,5	0,9820	165,490	0,0520	5,3210
P03	1,0	1,0500	177,290	0,0300	2,9390
P04	2,5	1,1380	192,570	0,0220	2,0110
IL-1 $\beta$					
Curva	Concentração (UE/mL)	D.O. (média)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
Branco	-	0,0630	<3,9	0,0020	3,4290
P01	0,25	1,7737	241,380	0,1870	10,5680
P02	0,5	2,4953	>250	0,0520	2,1207
P03	1,0	2,7938	>250	0,0580	2,0802
P04	2,5	2,8130	>250	0,0550	1,9804

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica; D.P.: Desvio Padrão; C.V.: Coeficiente de Variação; UE: Unidade de Endotoxina. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,9 pg/mL, e o limite superior é 250 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

Tabela 4.9: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-6.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC -	0,250	37,93	0,0066	2,6380	56
MenCC +	0,815	136,36	0,0268	3,2926	
MenCC 1:2 -	0,056	4,18	0,0017	3,0656	92
MenCC 1:2 +	0,964	162,27	0,0389	4,0436	
MenCC 1:4 -	0,114	14,24	0,0027	2,4103	103
MenCC 1:4 +	1,135	192,09	0,0571	5,0363	
MenCC 1:6 -	0,113	14,23	0,0094	8,3330	115
MenCC 1:6 +	1,251	212,25	0,0758	6,0646	
MenCC 1:8 -	0,029	<3,13	0,0020	7,0565	87
MenCC 1:8 +	0,889	149,16	0,0208	2,3398	
MenCC 1:10 -	0,035	<3,13	0,0059	16,9830	98
MenCC 1:10 +	0,999	168,45	0,0413	4,1341	

D.O.: Densidade e Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE de LPS; -: amostra pura. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

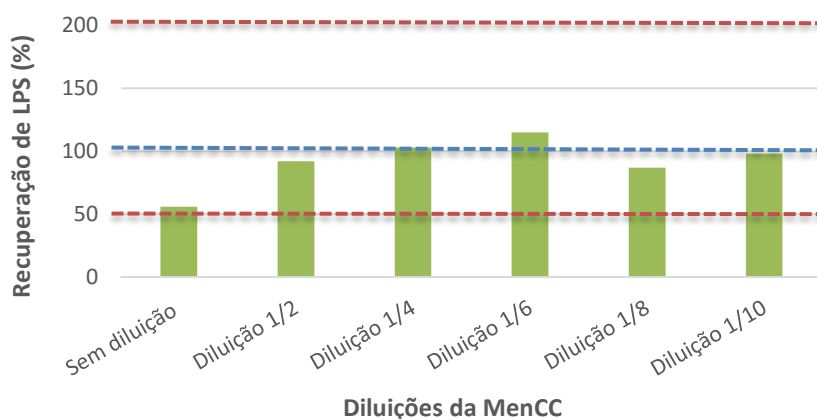


Figura 4.3: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-6. Eixo x: diluições da MenCC; Eixo y: recuperação de LPS (%). Tracejado vermelho: limites de recuperação válida; Tracejado azul: Valor real aditado.

Tabela 4.10: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-1 $\beta$ .

Amostras	D.O. (média)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC -	0,091	4,93	0,0010	1,9048	45
MenCC +	1,194	159,94	0,0009	1,7648	
MenCC 1:2 -	0,205	20,92	0,0045	8,5887	65
MenCC 1:2 +	1,791	243,87	0,0017	3,3001	
MenCC 1:4 -	0,088	4,51	0,0040	8,0049	85
MenCC 1:4 +	2,171	>250	0,0043	6,1912	
MenCC 1:6 -	0,060	<3,9	0,0035	7,4866	77
MenCC 1:6 +	1,952	>250	0,0017	2,6444	
MenCC 1:8 -	0,059	<3,9	0,0017	3,5712	87
MenCC 1:8 +	2,178	>250	0,0055	7,8039	
MenCC 1:10 -	0,369	44,04	0,0014	3,1427	58
MenCC 1:10 +	1,793	244,15	0,0009	1,5380	

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,9 pg/mL, e o limite superior é 250 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

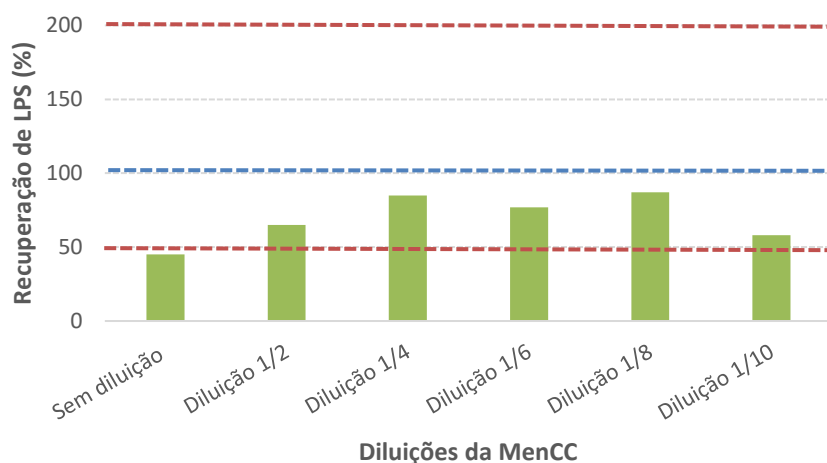


Figura 4.4: Teste de interferente da MenCC para leitura com IL-1 $\beta$ . Eixo x: diluições da MenCC; Eixo y: recuperação de LPS (%). Tracejado vermelho: limites de recuperação válida; Tracejado azul: Valor real aditado.

De acordo com ICCVAM (2008), quando a recuperação de uma amostra aditada com LPS fica entre 50 e 200 % fica demonstrado que não há interferência da substância teste no MAT. Levando em consideração os valores de recuperação das leituras com IL-1 $\beta$  e IL-6, a diluição 1:4 foi escolhida para dar continuidade aos ensaios, por ser a menor diluição da amostra a ter recuperação mais aproximada de 100 %, apesar das demais diluições estarem dentro dos parâmetros de aceitação, exceto pela vacina não diluída no ensaio com IL-1 $\beta$ , que apresentou recuperação fora da faixa de validade do teste. Desta forma fica comprovado que o produto na diluição escolhida, não interfere na detecção de LPS pela metodologia utilizada.

#### 4.5.1. Teste de interferente para o adjuvante da MenCC

O ensaio de interferência na detecção de pirogênios foi aplicado à vacina reconstituída com adjuvante e ao adjuvante puro. O adjuvante da MenCC contém em sua composição hidróxido de alumínio, que pode interferir na análise pelo método do LAL, já que o mesmo se liga à endotoxina, podendo gerar resultados falso-negativos.

Assim, como no ensaio da vacina diluída com cloreto de sódio, o ensaio da vacina reconstituída com o adjuvante próprio demonstrou que nenhuma das diluições interferem no



sistema de detecção com IL-6 (Tabela 4.11). O mesmo foi observado no ensaio realizado com o diluente puro através da leitura com IL-6 (Tabela 4.12). Na vacina reconstituída com adjuvante (Figura 4.5) e no ensaio realizado no adjuvante puro (Figura 4.6) pudemos observar a comparação das taxas de recuperação de LPS em todas as diluições, evidenciando os valores mínimo e máximo de recuperação necessários para validade do ensaio, assim como o valor real, recuperação de 100% que equivale a 0,5 UE/mL.

Tabela 4.11: Teste de Interferente da MenCC reconstituída com adjuvante.

<b>Amostras</b>	<b>D.O. (média)</b>	<b>IL-6 (pg/mL)</b>	<b>D.P.</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>MenCC -</b>	0,1620	0,162	0,0061	3,8052	50
<b>MenCC +</b>	0,3545	0,354	0,0125	3,5420	
<b>MenCC 1:2 -</b>	0,1647	0,164	0,0051	3,1098	104
<b>MenCC 1:2 +</b>	0,5635	0,563	0,0274	4,8719	
<b>MenCC 1:4 -</b>	0,1122	0,112	0,0056	5,0592	120
<b>MenCC 1:4 +</b>	0,5732	0,573	0,0503	8,7771	
<b>MenCC 1:6 -</b>	0,1130	0,113	0,0043	3,8234	162
<b>MenCC 1:6 +</b>	0,7335	0,733	0,0469	6,4028	
<b>MenCC 1:8 -</b>	0,0392	0,039	0,0043	11,0810	160
<b>MenCC 1:8 +</b>	0,6517	0,651	0,0447	6,8599	
<b>MenCC 1:10 -</b>	0,0815	0,081	0,0012	1,5840	149
<b>MenCC 1:10 +</b>	0,6527	0,652	0,0269	4,1285	

D.O.: Densidade Óptica; D.P.: Desvio Padrão; C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostras puras. Valores referentes a quatro replicatas.

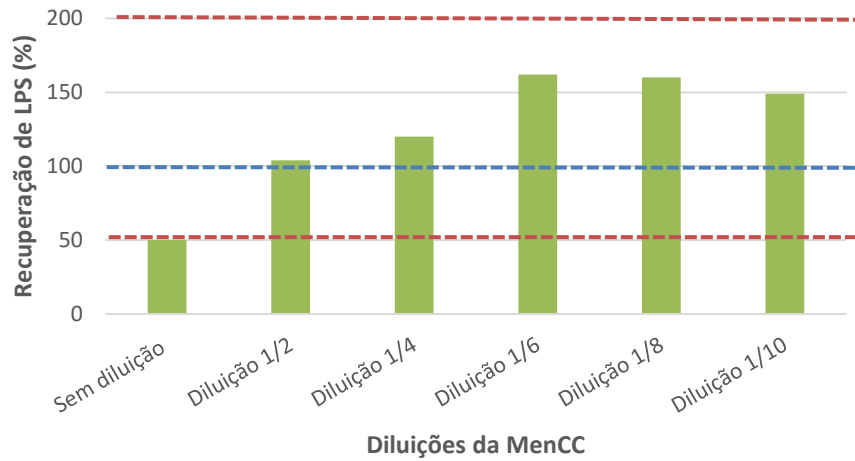


Figura 4.5: Teste de interferente da MenCC reconstituída com adjuvante para leitura com IL-6. Eixo x: diluições da MenCC; Eixo y: recuperação de LPS (%). Tracejado vermelho: limites de recuperação válida; Tracejado azul: Valor real aditado.

Tabela 4.12: Teste de Interferente no Adjuvante da Vacina.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
Adj. -	0,0155	< 3,13	0,0005	3,7248	71
Adj. +	0,4785	104,680	0,0398	8,3272	
Adj. 1:2 -	0,0667	10,666	0,0042	6,4000	78
Adj. 1:2 +	0,5780	127,390	0,0410	7,0983	
Adj. 1:4 -	0,0252	< 3,13	0,0009	3,7918	99
Adj. 1:4 +	0,6750	149,540	0,0852	12,6360	
Adj. 1:6 -	0,0490	6,6134	0,0035	7,2633	120
Adj. 1:6 +	0,8350	186,070	0,0694	8,3151	
Adj. 1:8 -	0,1222	23,338	0,0076	6,2431	50
Adj. 1:8 +	0,4512	98,454	0,0448	9,9409	
Adj. 1:10 -	0,0355	3,531	0,0012	3,6366	169
Adj. 1:10 +	1,1410	255,940	0,0398	3,4903	

D.O.: Densidade Óptica; D.P.: Desvio Padrão; C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostras puras. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

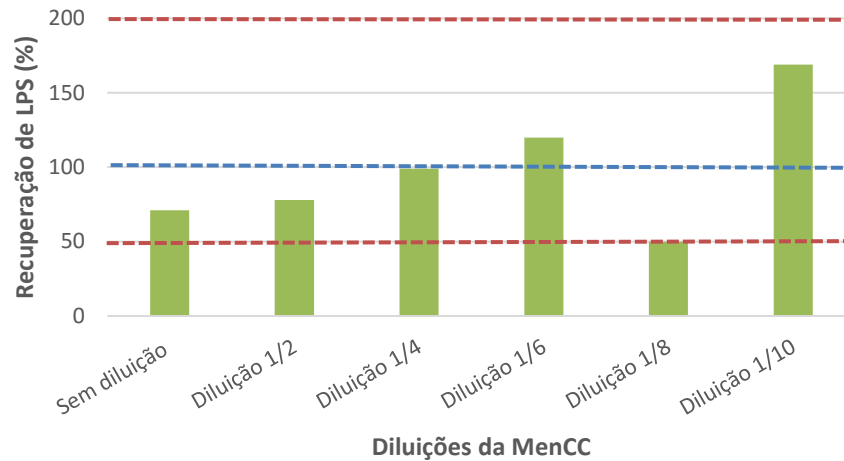


Figura 4.6: Recuperação de LPS em diferentes diluições do adjuvante, IL-6. Tracejado vermelho: limites de recuperação válida; Tracejado azul: Valor real aditado.

#### 4.5.2. Avaliação da interferência da vacina na produção da curva de LPS

Para avaliar a interferência da vacina na produção da curva dose-resposta de endotoxina, foi realizado um ensaio comparativo para análise da curva de LPS diluído em NaCl e em MenCC. Assim, foi gerada a curva de LPS, através de diluição seriada, obtendo-se as concentrações 0,25; 0,5; 1,0; e 2,5 UE/mL, em cada matriz.

O ensaio demonstrou que o produto não interfere na geração de uma dose-resposta na produção de citocinas quando monócitos provenientes do sangue são estimulados por LPS. Conforme a dosagem de citocinas realizada para IL-6 (Figura 4.7) e para IL-1 $\beta$  (Figura 4.8).

O critério de validade para o ensaio de linhas paralelas demonstrou que o p-valor para o não-parallelismo não foi significativo tanto para IL-1 $\beta$  como para IL-6 ( $p > 0,05$ ), como observado na Figura 4.7 (A) para IL-6 e 4.8 (A) para IL-1  $\beta$ . Reforçando os resultados do parallelismo o ensaio de correlação demonstrou um perfil de resposta similar na curva de LPS em MenCC *versus* NaCl, para IL-6 ( $r= 0,9608$  e  $p= 0,0076$ ) e para IL-1 $\beta$  ( $r= 0,98255$  e  $p= 0,0197$ ) como observado nas Figuras 4.7 B e 4.8 B.

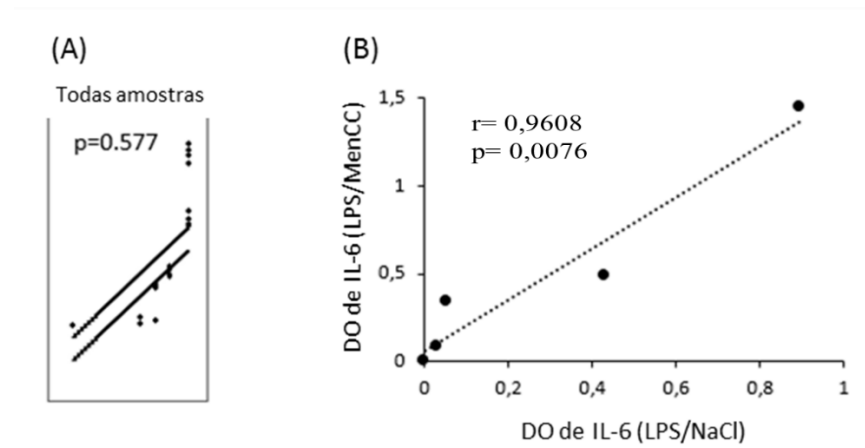


Figura 4.7: Análise da interferência de MenCC na detecção de endotoxina utilizando sangue criopreservado/IL-6. (A) paralelismo: curva de LPS de 0,25 a 2,5 UE/mL em MenCC e NaCl, (B) correlação entre NaCl e MenCC para curva de LPS.

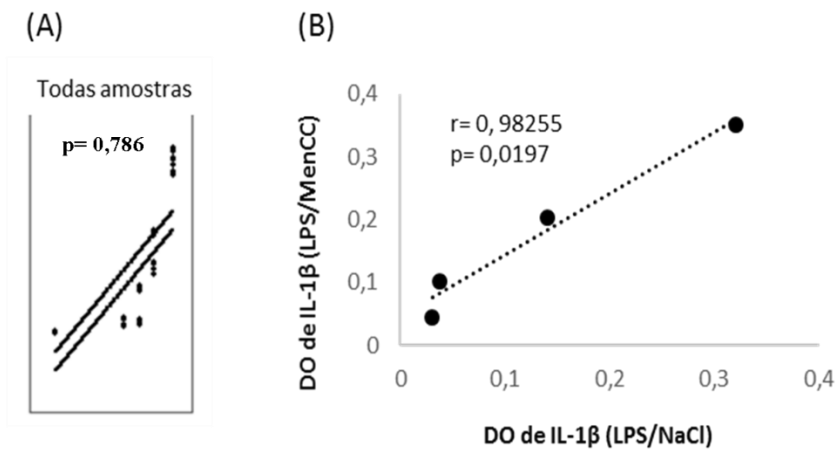


Figura 4.8 Análise da interferência de MenCC na detecção de endotoxina utilizando sangue criopreservado/IL-1β. (A) paralelismo: curva de LPS de 0,25 a 2,5 UE/mL diluída em MenCC e NaCl, (B) correlação entre as curvas de LPS diluídas em NaCl e MenCC.

### 4.5.3. Análise comparativa da curva dose-resposta de LPS em sangue total criopreservado utilizando IL-1 $\beta$ e IL-6 como parâmetros de leitura

Para determinar a correlação entre IL-1 $\beta$  e IL-6 como parâmetros de leitura, o perfil da curva de LPS foi analisado utilizando o mesmo contato para quantificar a liberação de citocinas em sangue criopreservado. Foi observada uma boa correlação entre IL-1 $\beta$  e IL-6 para a curva em salina ( $r=0,9918$  e  $p<0,0001$ ) e para a curva em MenCC ( $r=0,9702$  e  $p=0,0028$ ), como observado na figura 4.9. O sangue criopreservado demonstrou responsividade satisfatória à indução por endotoxina entre as duas citocinas, o que reafirma a aplicabilidade de IL-6 como parâmetro de leitura no sistema de MAT empregando sangue criopreservado.

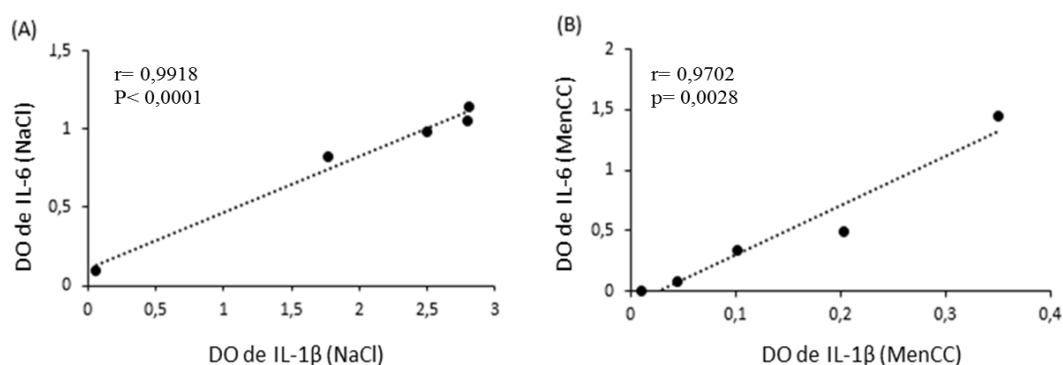


Figura 4.9: Relação entre os perfis de indução de IL-6 e IL-1 $\beta$  através da curva de endotoxina (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 UE/mL). (A) NaCl e (B) MenCC como matrizes em sangue criopreservado. A D.O. foi utilizada para demonstrar a correlação entre os perfis das citocinas.

### 4.6. Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT

Três lotes da MenCC que foram previamente avaliados quanto ao seu conteúdo pirogênico pelos métodos do LAL e RPT, foram analisados pelo método do MAT. Corroborando os resultados previamente encontrados pelos outros métodos farmacopeicos, a análise pelo MAT obteve como resultado a não identificação de altos níveis de LPS ou NEPs. Comparando-se com o teste de LAL, no MAT todas as análises obtiveram recuperações entre 50 % e 200 %, como preconizado pela FE, e todos os três lotes demonstraram quantificação de endotoxina abaixo do limite permitido para este produto, nas leituras com IL-6 e IL-1 $\beta$ , tendo

em vista que a quantificação da liberação de citocinas nos lotes da MenCC ficou abaixo do limite de detecção, o que corresponde a valor indetectável de UE. O ensaio foi realizado para IL-6 (Tabela 4.13) e para IL-1 $\beta$  (Tabela 4.14) com a vacina reconstituída com cloreto de sódio.

Tabela 4.13: Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT utilizando sangue criopreservado/IL-6.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC 01 -	0,0648	< 3,13	0,0005	3,0769	82
MenCC 01 +	1,6100	378,5160	0,0283	7,052	
MenCC 02 -	0,0760	< 3,13	0,0011	6,0774	84
MenCC 02 +	1,6608	391,0320	0,0241	5,8275	
MenCC 03 -	0,0604	< 3,13	0,0009	6,2782	109
MenCC 03 +	2,1260	505,1600	0,0285	5,3800	

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

Tabela 4.14: Avaliação pirogênica da MenCC pelo método quantitativo do MAT utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .

Amostras	D.O. (média)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC 01 -	0,122	< 3,9	0,0012	4,2328	128
MenCC 01 +	1,9348	261,1640	0,0449	9,2929	
MenCC 02 -	0,1888	< 3,9	0,0044	9,3657	126
MenCC 02 +	1,9760	267,3200	0,0250	5,0648	
MenCC 03 -	0,2780	< 3,9	0,0065	9,4352	162
MenCC 03 +	2,5648	355,7200	0,0397	6,2005	

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,9 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

O mesmo ensaio foi realizado com os lotes reconstituídos com o adjuvante da vacina, contendo hidróxido de alumínio. Apesar da indução elevada de IL-6 pelas amostras reconstituídas com o adjuvante, sem estímulo de LPS, diferente do observado nas amostras reconstituídas com NaCl, todos os lotes obtiveram recuperação dentro da faixa especificada

pela FE (Tabela 4.15). A quantificação de citocina nas amostras reconstituídas com adjuvante equivale a 260,2400 pg/mL, 312,2480 pg/mL e 206,5600 pg/mL, para os lotes 01, 02 e 03, respectivamente, o que corresponde a valor de endotoxina estimado de 2,4909 UE/mL, 2,9498 UE/mL e 2,0173 UE/mL, para cada lote respectivamente, considerado abaixo do LE permitido para este produto (25 UE/DH).

Tabela 4.15: Avaliação da MenCC reconstituída com adjuvante, sangue criopreservado/IL-6.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D..P	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC 01 -	1,3540	260,2400	0,0275	8,1245	124
MenCC 01 +	3,8580	783,2400	0,0242	2,5134	
MenCC 02 -	1,6028	312,2480	0,0268	6,6906	99
MenCC 02 +	3,6008	729,5600	0,0268	2,9866	
MenCC 03 -	1,0968	206,5600	0,0074	2,7021	141
MenCC 03 +	3,9508	895,8800	0,0685	4,7369	

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. Valores referentes a quatro replicatas.

Utilizando IL-6 como parâmetro de leitura, a avaliação destes três lotes foi também realizada utilizando-se sangue fresco, como matriz monocítica, no lugar do sangue criopreservado, com o propósito de comparar as respostas de matrizes distintas, tendo em vista que a utilização de IL-6 como parâmetro de leitura está validada apenas com a utilização de sangue fresco. Os resultados obtidos com sangue fresco corroboram os encontrados com sangue criopreservado. Todas as análises obtiveram recuperações entre 50 % e 200 %, e retificando o evidenciado nos ensaios anteriores, todos os três lotes demonstraram quantificação de endotoxina abaixo do limite permitido para este produto (Tabela 4.16). A liberação de IL-6 para o lote 01 foi de 77,568 pg/mL, para o lote 02 82,08 pg/mL e para o lote 03 21,2376 pg/mL, o que se estima corresponder a 0,3958 UE/mL, 0,4065 UE/mL e 0,1066 UE/mL, respectivamente.

Tabela 4.16: Avaliação dos três lotes da MenCC/Salina, sangue fresco/IL-6.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)	Recuperação %
MenCC 01 -	0,526	77,568	0,0030	2,2814	177
MenCC 01 +	3,946	748,8	0,0569	5,7774	
MenCC 02 -	0,5488	82,08	0,0048	3,5383	163
MenCC 02 +	3,6988	700,32	0,0329	3,5662	
MenCC 03 -	0,2388	21,236	0,0015	2,5105	185
MenCC 03 +	3,8288	725,84	0,0736	7,6929	

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com 0,5 UE/mL de LPS; -: amostra pura. Valores referentes a quatro replicatas.

Com os ensaios acima, foi realizada uma análise comparativa para avaliar a homogeneidade das respostas em diferentes sistemas do MAT. Esta análise é importante pois confronta dados de sistemas validados, como ensaio com sangue fresco/IL-6 e criopreservado/IL-1 $\beta$ , com nova metodologia proposta, sangue criopreservado/IL-6.

Foi observada homogeneidade nas respostas em diferentes sistemas do MAT (Figura 4.10). Foi possível detectar aumento nos níveis de citocinas tanto em sangue fresco como em sangue criopreservado. E foi possível observar que o método proposto, sangue criopreservado/IL-6, obteve resposta similar ao método farmacopeico, sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .



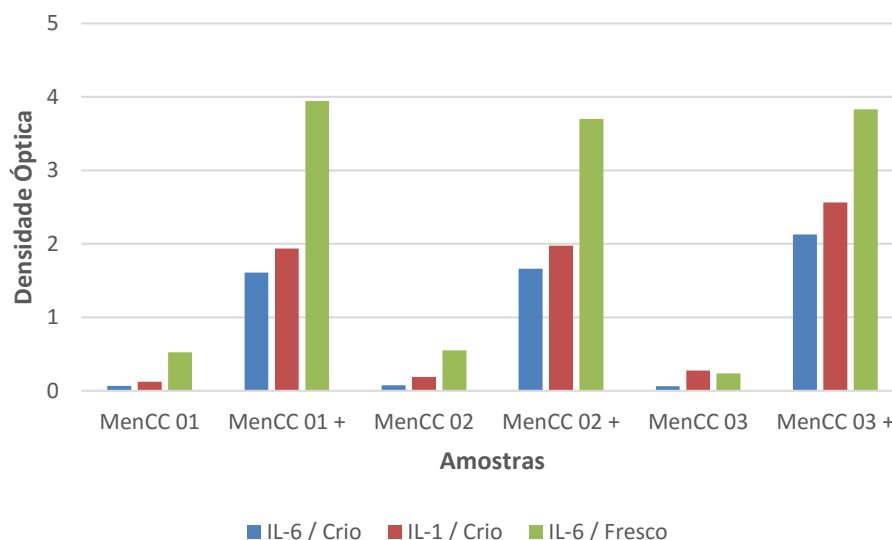


Figura 4.10: Avaliação dos lotes da MenCC por diferentes sistemas do MAT. Foram comparados três sistemas diferentes, sangue criopreservado/IL-6, sangue criopreservado/IL-1 $\beta$  e sangue fresco/IL-6. A indução das citocinas pró-inflamatórias foi estimulada com adição de LPS 0,5 UE/mL no produto.

#### 4.6.1. Variabilidade dos sistemas do MAT

De modo a avaliar a homogeneidade dos ensaios, utilizando IL-6 e IL-1 $\beta$  como parâmetros de leitura, e sangue fresco e sangue criopreservado como matrizes monocíticas, parâmetros de inter- e intra-variabilidade foram analisados em amostras de cloreto de sódio e lotes da MenCC, ambos contaminados com quantidade conhecida de padrão de LPS.

Através da análise do coeficiente de variação das amostras em quadruplicatas de cada ensaio, foi possível observar a pequena diferença na variabilidade dos sistemas empregados (Tabela 4.17). A MenCC demonstrou não interferir na variação do ensaio, uma vez que nos ensaios com sangue criopreservado o coeficiente de variação é maior em NaCl, em comparação às amostras da vacina, e no ensaio com sangue fresco, o C.V. de NaCl e amostras é próximo. Podemos apontar ainda menor variabilidade nos ensaios realizados com IL-6, o que corrobora a escolha de prosseguir com os ensaios utilizando esta citocina como parâmetro de leitura.

Tabela 4.17: Variação na resposta de IL-1 $\beta$  e IL-6 em sangue fresco e criopreservado.

Matriz monocítica	Sangue Criopreservado	Sangue Criopreservado	Sangue Fresco
Parâmetro de Leitura	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-6
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>			
<b>Adição 0,5 UE/mL</b>			
NaCl	11,8290	5,7259	2,8133
MenCC 01	9,2929	7,0520	5,7774
MenCC 02	5,0648	5,8275	3,5662
MenCC 03	6,2005	5,3800	7,6929
Média MenCC	6,8527	6,0865	5,6788
$\Sigma$ MenCC	32,3872	23,9854	19,8498

$\Sigma$ : somatório; UE: Unidade de Endotoxina; MenCC: Vacina Meningocócica C Conjugada.

#### 4.7. Detecção de NEPs pelo MAT

##### 4.7.1. Detecção de contaminação com Ácido Lipoteicóico pelo MAT

É sabido que o MAT é capaz de detectar diferentes tipos de pirogênicos, por mimetizar o processo de indução da febre que ocorre *in vivo*. Desta forma, foi avaliada a capacidade do MAT em detectar NEPs na MenCC.

Entretanto, levando em consideração que LTA adquirido comercialmente frequentemente apresenta contaminação por LPS (Hasiwa et al. 2013), o mesmo foi tratado com PMB, para evitar que tal contaminação interferisse nos resultados obtidos. Foi realizada curva de LTA em NaCl com e sem PMB, e foi avaliada a diferença das respostas dos dois ensaios através da leitura com IL-6 (Figura 4.11). Foi possível observar a diferença no padrão de indução de citocinas entre a curva de LTA tratada com PMB e a curva não tratada. Sem adição de PMB, observamos a saturação da liberação de citocinas, gerado pela contaminação por LPS,

já na curva tratada com PMB, observamos o aumento linear na liberação de citocinas, estimulado exclusivamente pelo LTA, excluindo interferência do LPS.

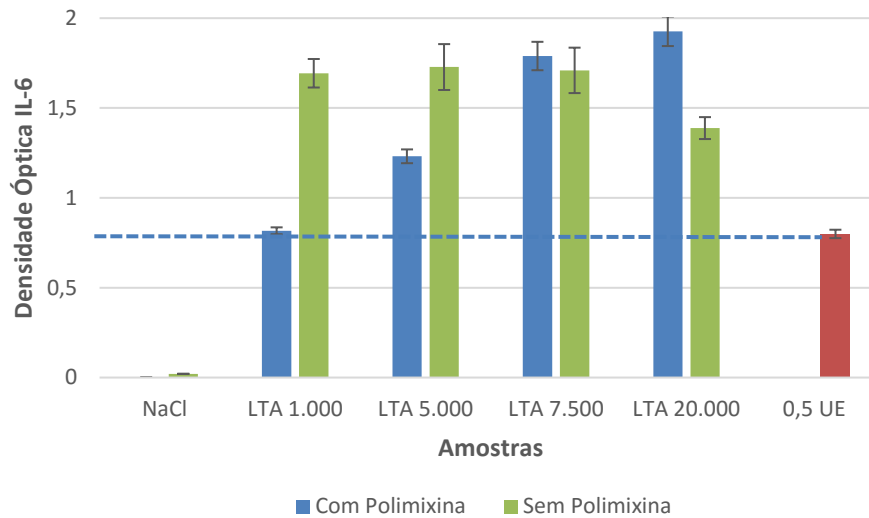


Figura 4.11: Curva de LTA gerada em NaCl e curva de LTA com PMB gerada em NaCl. NaCl como controle negativo. Quantificação da produção de IL-6 através da leitura da D.O. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

O ensaio foi realizado para avaliar a capacidade de quantificação de citocinas na MenCC, a partir de estímulos com LTA. Inicialmente foi realizado uma curva de LTA nas concentrações 1.000, 5.000, 7.500 e 20.000 nanogramas para avaliar a resposta a este pirógeno. Foi demonstrado que o MAT foi capaz de detectar a contaminação proposital realizada com LTA, tanto na leitura com IL-6 (Tabela 4.18) (Figura 4.12) como na leitura com IL-1 $\beta$  (Tabela 4.19) (Figura 4.13), e ainda exibir uma curva dose-reposta desta contaminação.

Tabela 4.18: Curva de LTA em Cloreto de Sódio, sangue criopreservado/IL-6.

Curva LTA	Concentração (ng)	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
<b>Branco</b>	-	0,0157	< 3,13	0,0012	7,9892
<b>P01</b>	1000	0,1112	18,967	0,0015	1,3483
<b>P02</b>	5000	0,3532	74,851	0,0118	3,3525
<b>P03</b>	7500	0,6720	748,46	0,0388	5,7762
<b>P04</b>	20000	0,6767	149,56	0,0568	8,3931

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

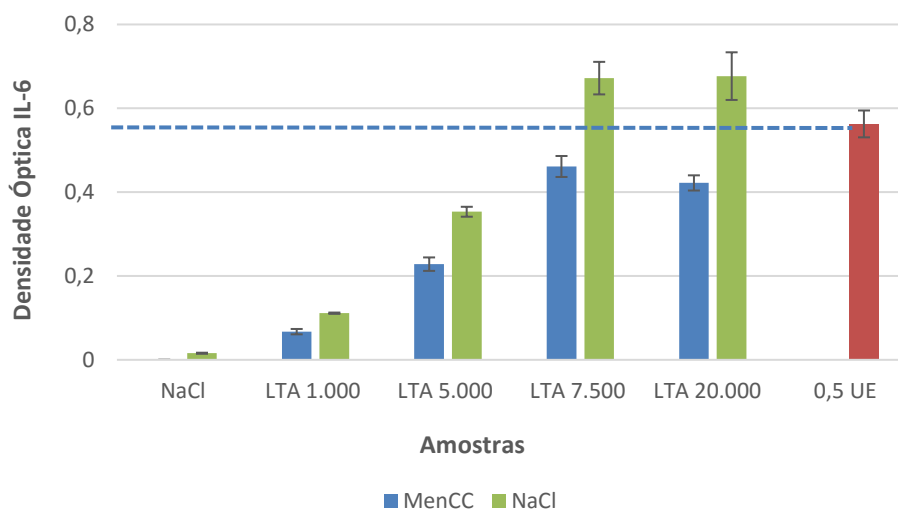


Figura 4.12: Curva de LTA com PMB gerada através de contaminação proposital em MenCC e em NaCl. NaCl como controle negativo. Quantificação da produção de IL-6 através da leitura da D.O. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

Tabela 4.19: Curva de LTA em Cloreto de Sódio, sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .

Curva LTA	Concentração (ng)	D.O. (média)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
<b>Branco</b>	-	0,03425	< 3,9	0,0025	7,2993
<b>P01</b>	1000	0,065	4,016	0,0058	9,0582
<b>P02</b>	5000	0,2295	29,003	0,0286	12,48
<b>P03</b>	7500	0,4212	58,129	0,0429	10,196
<b>P04</b>	20000	0,458	63,771	0,0502	10,979

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação.

O limite inferior de detecção do ensaio é 3,9 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

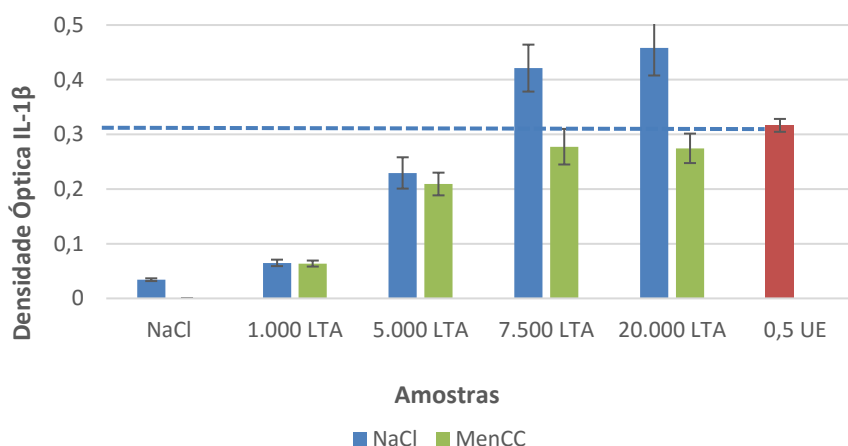


Figura 4.13: Curva de LTA com PMB gerada através de contaminação proposital em MenCC e em NaCl. NaCl como controle negativo. Quantificação da produção de IL-1 $\beta$  através da leitura da D.O. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

#### 4.7.1.1. Detecção de contaminação com Ácido Lipoteicóico pelo MAT na MenCC

Para comprovar a não interferência da vacina na avaliação da resposta da matriz monocítica ao LTA, foi realizada uma curva de LTA na MenCC, seguindo mesmo modelo utilizado em NaCl. Foi demonstrado que a vacina não interferiu na quantificação do pirógeno, utilizando IL-6 (Tabela 4.20) (Figura 4.7) e IL-1 $\beta$  (Tabela 4.21) (Figura 4.8) como parâmetros

de leitura, conseguindo detectar a contaminação proposital realizada com LTA, ainda apresentando curva dose-resposta.

Tabela 4.20: Curva de LTA em MenCC, utilizando sangue criopreservado/IL-6.

Curva LTA	Concentração (ng)	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
<b>Branco</b>	-	0,0272	< 3,13	0,0119	43,9730
<b>P01</b>	1000	0,0672	8,8063	0,0063	9,5117
<b>P02</b>	5000	0,2282	45,985	0,0160	7,0406
<b>P03</b>	7500	0,4612	99,791	0,0250	5,4226
<b>P04</b>	20000	0,4220	90,727	0,0181	4,2960

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

Tabela 4.21: Curva de LTA em MenCC, utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ .

Curva LTA	Concentração (ng)	D.O. (média)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
<b>Branco</b>	-	0,03625	< 3,9	0,0020	5,687
<b>P01</b>	1000	0,0637	< 3,9	0,0055	8,6275
<b>P02</b>	5000	0,2092	25,927	0,0207	9,9204
<b>P03</b>	7500	0,2775	36,294	0,0325	11,713
<b>P04</b>	20000	0,2745	35,838	0,0269	9,8226

P: Ponto da curva; D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,9 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

#### 4.7.1.2. Avaliação da curva de LTA no teste MAT em MenCC e NaCl.

Foi realizado um ensaio comparativo para avaliar a resposta da curva de LTA em matrizes diferentes. As matrizes avaliadas foram NaCl e a MenCC, para demonstrar a não interferência da vacina na produção de citocinas de forma dose-resposta após estímulo com LTA. A solução da MenCC foi aditada com LTA nas concentrações 1.000; 5.000; 7.500 e 20.000 ng/mL e em paralelo as mesmas doses foram analisadas na solução de NaCl.

A dosagem de citocinas foi realizada para IL-6 (Figura 4.15) e para IL-1 $\beta$  (Figura 4.16), demonstrando que o produto não interfere na curva dose-resposta de LTA, quando monócitos provenientes do sangue são estimulados.

O critério de validade para o ensaio de linhas paralelas demonstrou que o p-valor para o não-paralelismo não foi significativo para IL-6 ( $p > 0,05$ ) (Figura 4.14 A). Reforçando os resultados do paralelismo o ensaio de correlação demonstrou um perfil de resposta similar na curva de LTA em MenCC *versus* NaCl, para IL-6 ( $r = 0,9973$  and  $p = 0,0002$ ) (Figura 4.14). O ensaio realizado com IL-1 $\beta$  apontou que houve paralelismo entre as curvas ( $p = 0,358$ ) (Figura 4.15 A), porém o ensaio de correlação foi não significativo ( $r = 0,7800$  e  $p = 0,220$ ) (Figura 4.15 B).

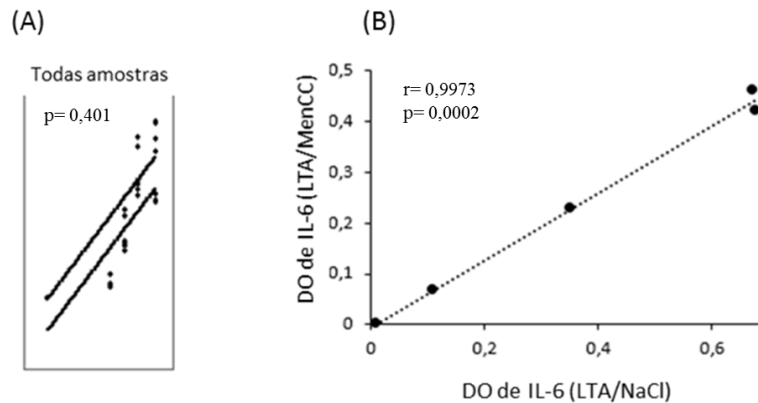


Figura 4.14: Análise da interferência de MenCC na detecção de NEPs utilizando sangue criopreservado/IL-6. Gráficos A e B correspondem a análise de paralelismo da curva padrão preparada em NaCl e MenCC. (A) Análise de paralelismo da curva de LTA de 1.000 a 20.000 pg/mL em NaCl e MenCC e (B) Análise da correlação entre NaCl e MenCC para curva de LTA.

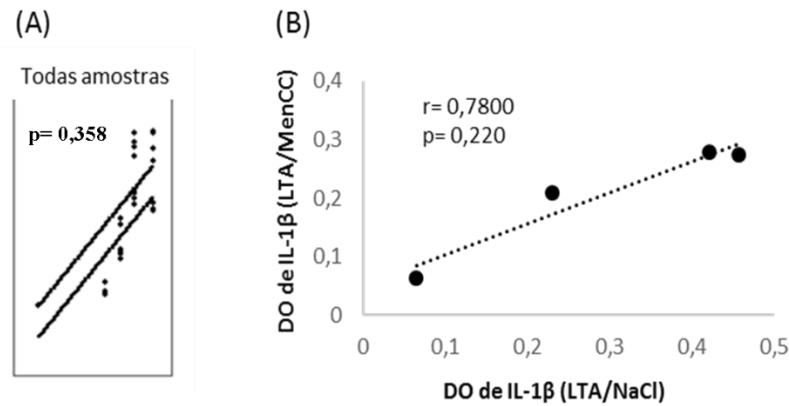


Figura 4.15: Análise da interferência de MenCC na detecção de pirogênicos utilizando sangue criopreservado/IL-1 $\beta$ . Gráficos A e B correspondem a análise de paralelismo da curva padrão preparada em NaCl e MenCC. (A) Análise de paralelismo da curva de LTA de 1.000 a 20.000 pg/mL em NaCl e MenCC e (B) Análise de correlação entre NaCl e MenCC para curva de LTA.

#### 4.7.1.3. Método A realizado com LTA

Foi verificado também a capacidade do MAT em detectar contaminação por LTA lote a lote do produto avaliado. Após contaminação proposital com quantidade conhecida de LTA (5000 ng/mL) em cada um dos três lotes da MenCC, verificou-se que o MAT foi capaz de quantificar alterações na liberação de IL-6 pela matriz monocítica quando a vacina foi estimulada pela adição do pirogênio (Tabela 4.22) (Figura 4.16). Foi calculado o conteúdo pirogênico estimado de cada lote em Unidades Equivalente de Endotoxina por mL (UEE/mL), no qual foram obtidos os valores de 3,9406 UEE/mL, 5,4773 UEE/mL e 4,1699 UEE/mL, para os lotes 01, 02 e 03, respectivamente. Sendo estes valores considerados abaixo do LE permitido para este produto (25 UE/DH).



Tabela 4.22: Detecção de LTA na MenCC, sangue criopreservado/IL-6.

Amostras	D.O. (média)	IL-6 (pg/mL)	D.P.	C.V. (%)
MenCC 01 -	1,8168	369,692	0,0422	9,2902
MenCC 01 +	4,2660	886,080	0,0843	7,9069
MenCC 02 -	2,3660	485,440	0,0106	1,7972
MenCC 02 +	3,1980	660,880	0,0702	8,7891
MenCC 03 -	1,8988	386,984	0,0130	2,7484
MenCC 03 +	4,4052	915,400	0,0397	3,6067

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra aditada com LTA; -: amostra pura. Valores referentes a quatro replicatas.

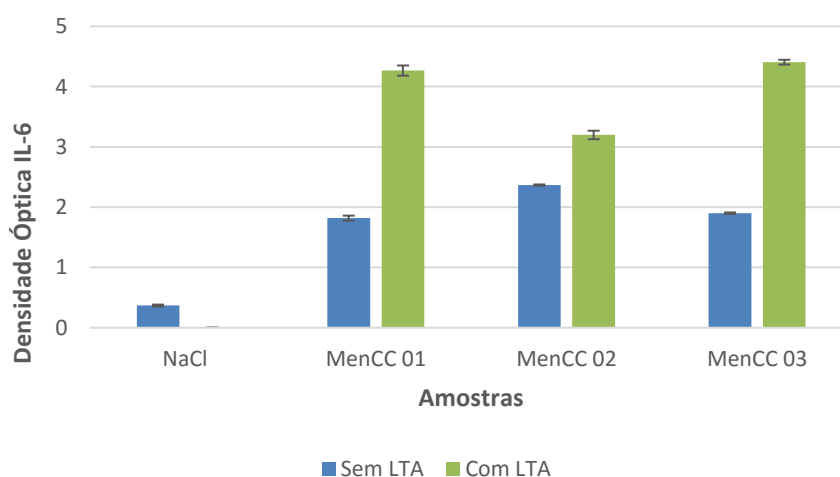


Figura 4.16: Detecção de LTA nos lotes da vacina através de leitura com IL-6. NaCl como controle negativo. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

#### 4.7.2. Detecção de contaminação com zymosan pelo MAT

Seguindo a proposta de demonstrar a capacidade do MAT de responder a outros estímulos além do LPS, o sistema foi desafiado para avaliar a contaminação por pirogênio de fungo, através da utilização do zymosan. Este, foi previamente tratado com PMB, para excluir qualquer contaminação por LPS na solução (Figura 4.17). Para demonstrar a capacidade do

teste em detectar o pirogênio em questão, foi realizada uma curva de zymosan em NaCl e verificada a indução de citocinas por cada ponto da curva (Figura 4.18).

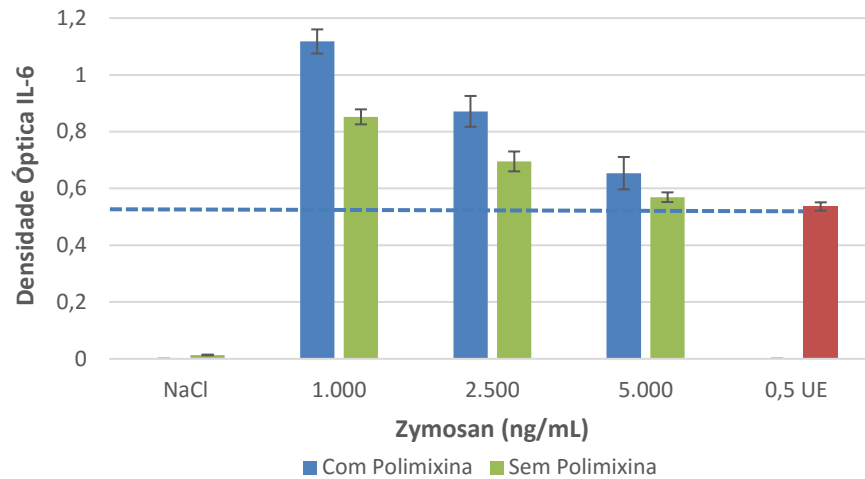


Figura 4.17: Curva de zymosan gerada em NaCl com e sem PMB. NaCl como controle. Quantificação da produção de IL-6 através da leitura da D.O. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

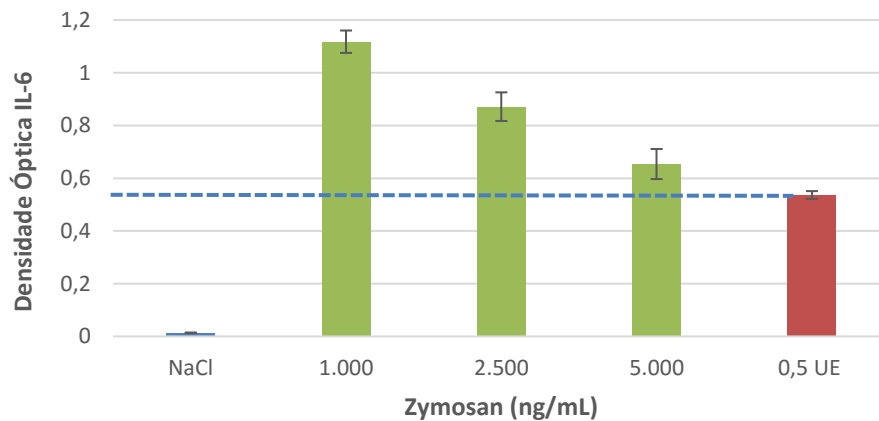


Figura 4.18: Curva de zymosan com PMB gerada em NaCl. NaCl como controle negativo. Quantificação da produção de IL-6 através da leitura da D.O. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

Para comprovar a não interferência da vacina na avaliação da resposta da matriz monocítica ao zymosan, foi realizada uma curva de zymosan na MenCC, seguindo mesmo

modelo utilizado em NaCl. Foi demonstrado que a vacina não interferiu na quantificação do pirógeno, utilizando-se IL-6 como parâmetro de leitura (Tabela 4.24).

Para avaliação lote a lote da MenCC, foi realizada contaminação proposital com zymosan na concentração de 5.000 nanogramas. Foi verificado o aumento na liberação da citocina pró inflamatória, IL-6 nos lotes da MenCC avaliados, em comparação às amostras não aditadas com zymosan (Tabela 4.23) (Figura 4.19). O ponto 0,5 UE/mL de endotoxina foi utilizado como parâmetro de comparação. A recuperação dos lotes 01, 02 e 03 foi de 122 %, 67 % e 54 %, respectivamente. A quantificação da liberação de IL-6 foi abaixo do limite de detecção do ensaio, o que nos leva a estimar que o conteúdo pirogênico destes lotes é indetectável, apresentando desta forma LE permitido para este produto (25 UE/DH).

Tabela 4.23: Detecção de zymosan na vacina através de leitura com IL-6/sangue criopreservado.

<b>Amostras</b>	<b>D.O. (média)</b>	<b>IL-6 (pg/mL)</b>	<b>D.P.</b>	<b>C.V. (%)</b>
<b>MenCC 01 -</b>	0,1520	< 3,13	0,0035	9,3659
<b>MenCC 01 +</b>	1,5708	314,8	0,0058	1,4903
<b>MenCC 02 -</b>	0,0768	< 3,13	0,0012	6,5367
<b>MenCC 02 +</b>	0,8620	160,48	0,0045	2,0925
<b>MenCC 03 -</b>	0,0560	< 3,13	0,0008	5,8321
<b>MenCC 03 +</b>	0,6920	123,52	0,0035	2,0572

D.O.: Densidade Óptica. D.P.: Desvio Padrão. C.V.: Coeficiente de Variação; +: amostra com zymosan (5.000 ng); -: amostra pura. O limite inferior de detecção do ensaio é 3,13 pg/mL. Valores referentes a quatro replicatas.

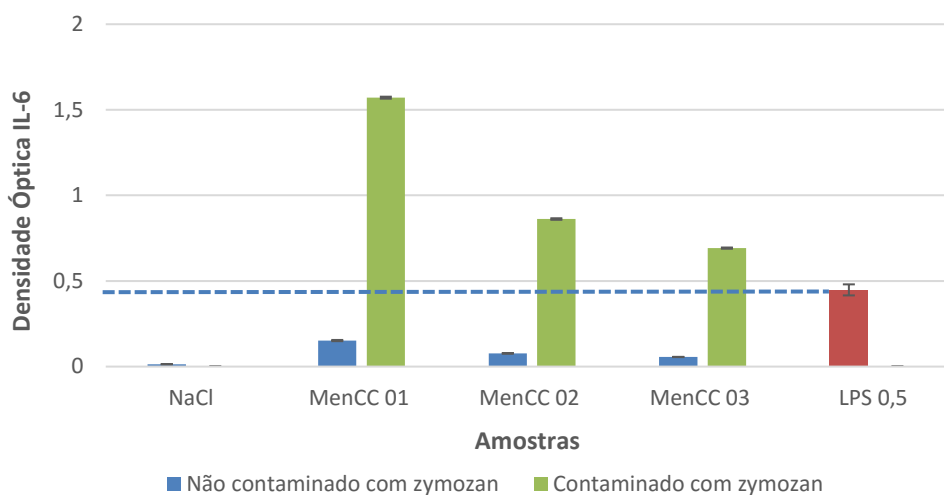


Figura 4.19: Detecção de zymozan nos lotes da vacina através de leitura com IL-6. NaCl como controle negativo. Tracejado: LPS 0,5 UE/mL, *cut-off* de aprovação/reprovação. Valores referentes às médias de quatro replicatas mais o DP.

#### 4.8. Análise comparativa do conteúdo pirogênico da MenCC por diferentes métodos farmacopeicos

De modo a comparar a avaliação do conteúdo pirogênico da MenCC por diferentes métodos farmacopeicos, foi realizado o ensaio do LAL para evidenciar a detecção de LPS e LTA. Corroborando denominação da FE, que classifica o LAL como um teste de detecção de endotoxinas, e não de NEPs, o LAL não foi capaz de detectar a presença de LTA, após contaminação proposital da amostra com este pirogênio (Figura 4.20). No ensaio do LAL, a contaminação proposital foi realizada com LPS (0,5 UE/mL), LTA (5.000 ng/mL) e LTA (5.000 ng/mL) tratado com PMB, nas matrizes, MenCC e NaCl. Nas amostras sem contaminação proposital quase não houve detecção de pirogênios, nas amostras aditadas com LPS o método foi capaz de detectar o conteúdo pirogênico de forma similar nas duas matrizes. O LAL detectou resposta pirogênica nas amostras aditadas com LTA, porém o tratamento com PMB diminuiu esta detecção, podendo esta resposta pirogênica estar relacionada à contaminação do LTA por LPS, como anteriormente sugerido.

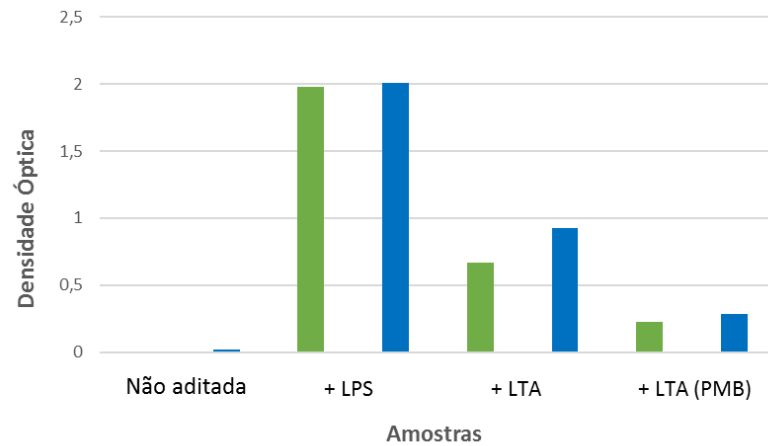


Figura 4.20: Ensaio do LAL para detecção de LPS e LTA em MenCC e NaCl.

+: Adição; LPS: Lipopolissacarídeo; LTA: Ácido Lipoteicóico; PMB: Polimixina B.

Azul: MenCC; Verde: NaCl.

Além da análise da variabilidade inerente aos diferentes sistemas do MAT que podem ser empregados, também foi realizada uma análise comparativa entre o MAT e os métodos farmacopeicos, LAL e RPT. Na tabela 4.24 foram compilados os resultados das análises dos lotes da MenCC realizados pelos três métodos. Foi observado uma correlação positiva entre os resultados de cada método, demonstrando que os variados sistemas do MAT, forneceram resultados compatíveis com aqueles encontrados nos testes atualmente empregados na rotina de liberação de lotes na indústria, RPT e LAL.

Tabela 4.24: Comparação entre os três métodos de detecção de pirogênicos.

<b>MÉTODOS</b>					
<b>ENSAIOS</b>	<b>MAT</b>			<b>RPT</b>	<b>LAL</b>
	<b>IL-6/Crio</b>	<b>IL-6 /Fresco (UEE/mL)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math>/Crio</b>		<b>UE/mL</b>
<b>Resultados</b>					
<b>Lote 01 MenCC</b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>0,395<sup>NP</sup></b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>NP</b>	<b>&lt; 0,5<sup>NP</sup></b>
<b>Lote 02 MenCC</b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>0,406<sup>NP</sup></b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>NP</b>	<b>&lt; 0,5<sup>NP</sup></b>
<b>Lote 03 MenCC</b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>0,106<sup>NP</sup></b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>NP</b>	<b>&lt; 0,5<sup>NP</sup></b>
<b>NaCl (CN)</b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>0,158<sup>NP</sup></b>	<b>&lt; LD<sup>NP</sup></b>	<b>NP</b>	<b>&lt; 0,5<sup>NP</sup></b>
<b>LPS (CP)</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>

NP: Não Pirogênico; P: Pirogênico; LPS: Lipopolissacarídeo; MenCC: Vacina Meningocócica C Conjugada; LD: Limite de Detecção; UEE: Unidade Equivalente de Endotoxina; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo.

## 5. DISCUSSÃO

Para garantir a segurança na administração de produtos parenterais se faz necessário a aplicação do teste de pirogênios (Ding & Ho 2001, Solati 2015). Em 1942, o RPT foi introduzido na USP, 1971 na FE, e em 1976 na FB, permitindo melhor controle e maior segurança na produção de parenterais (Hasiwa et al. 2013).

No entanto, como ressaltado por Vipond e colaboradores (2016), a via de administração intravenosa (IV) descrita nas farmacopeias para o RPT mimetiza a forma como drogas parenterais de grande volume, para as quais o ensaio foi inicialmente desenvolvido, são administradas. Entretanto, existem diferenças fundamentais entre a administração de drogas intravenosas e aplicação de vacinas, o que resulta numa farmacodinâmica distinta entre estes produtos. Administração IV garante rápida liberação do medicamento diretamente na circulação sanguínea, já para as vacinas, que são administradas de forma subcutânea ou intramuscular, onde interagem com células do sistema imune, a absorção ocorre de forma muito mais lenta. Portanto, a sensibilidade a pirogênios via IV é muito maior. Esta e outras limitações do RPT, tais como, implicações éticas, manejo dos animais e variabilidade biológica, estimularam o desenvolvimento de métodos alternativos.

O LAL foi o primeiro método alternativo ao RPT. Este se baseia na reação da hemolinfa do caranguejo ferradura quando em contato com LPS, identificado pela formação de um coágulo. O LAL foi introduzido na USP em 1980, na FE em 1987 e na FB em 1996. Para aplicação em vacinas, para as quais existe um LD especificado para cada produto, a utilização de um método quantitativo oferece uma vantagem considerável, além de permitir monitoramento da consistência na produção de lotes subsequentes (Vipond et al. 2016). O LAL foi muito vantajoso para a indústria, permitindo a rápida liberação de lotes e aumentando consideravelmente a segurança do consumidor. Apesar das vantagens proporcionadas pelo LAL, principalmente a redução no uso de animais de laboratório, este método *in vitro* não substituiu completamente o RPT, devido ao diferente mecanismo de detecção de pirogênios empregado no LAL, que não reflete a reação de febre em humanos (Hasiwa et al. 2013). Por

definição, o LAL é um teste de detecção de endotoxina e não um teste de pirogênio, pois é incapaz de detectar NEPs (Poole & Gaines 2001).

Devido às limitações apresentadas por ambos os métodos, para alguns produtos é exigido a realização dos dois testes para de forma complementar avaliar a pirogenicidade da amostra. Um exemplo são as vacinas baseadas em vesículas de membranas externas, destinadas a imunização contra o meningococo B, que intrinsecamente apresenta grande conteúdo de LPS, o que é parte da estratégia vacinal para aumento da imunogenicidade, e por este motivo ambos os testes são exigidos para liberação de lotes deste produto (Vipond et al. 2016). Tendo em vista esta exigência regulatória, a aplicação de um método alternativo para avaliação do conteúdo pirogênico deste produto reduziria o tempo de análise da amostra, não mais dependendo de uma dupla análise, além de gerar redução de custos e de trabalho manual.

Seguindo uma tendência mundial de melhoria na qualidade dos produtos farmacêuticos liberados para o mercado e baseando-se no princípio dos 3R's, o MAT surge como um novo método alternativo para detecção de pirogênios em parenterais (Fennrich et al. 2016). Compreendendo o mecanismo da reação febril em humanos foi possível desenvolver um sistema de teste que reflete o processo molecular que se passa no corpo humano. Isto e o desenvolvimento de tecnologias de ELISA levaram ao desenvolvimento de um teste baseado na ativação *in vitro* de monócitos humanos (Hansen & Christensen 1990, Schindler et al. 2009, Hartung et al. 2001, Hasiwa et al. 2013).

O objetivo deste estudo foi comprovar a aplicabilidade do MAT à MenCC pelo ensaio de fatores de interferentes utilizando diferentes parâmetros na matriz de sangue criopreservado, leitura com IL-1 $\beta$  e IL-6 e diferentes combinações entre vacina e diluentes. Posteriormente, foi realizada uma análise comparativa entre os diferentes sistemas do MAT, comparando sistemas validados (ICCVAM 2008) com uma proposta original, sangue criopreservado/IL-6. Avaliamos também a capacidade do MAT em detectar LPS e NEPs, afim de avaliar o quanto a MenCC interfere na detecção destes pirogênios e o quanto o sistema proposto de leitura (sangue criopreservado/IL-6) detecta estas moléculas.

O estudo buscou também confrontar os dados dos três ensaios de detecção de pirogênios, RPT, LAL e MAT, aplicados a lotes da MenCC, para demonstrar a confiabilidade do MAT frente aos testes utilizados hoje para liberação de produtos no mercado pelas indústrias farmacêuticas.



Inicialmente, os três lotes da MenCC produzidos por Bio-Manguinhos foram avaliados quanto ao seu potencial pirogênico, pelos métodos clássico de detecção de pirogênios, LAL e RPT. Levando em consideração parâmetros especificados pela FE para validade e aprovação de cada lote do produto, todos os três lotes da MenCC obtiveram resultado negativo para presença de pirogênios. Este resultado demonstra uma boa correlação entre os dois testes, com ambos chegando a mesma conclusão sobre os lotes avaliados. Porém, não se pode tomar como regra a concordância de resultados destes dois métodos tendo em vista resultados divergentes apresentados pelos mesmos em estudos anteriores (Perdomo-Morales 2011, Hasiwa et al. 2013). Divergência de resultados entre LAL e RPT pode se dar pela incapacidade do LAL em detectar NEPs ou por interferentes do método do LAL, como por exemplo, presença de hidróxido de alumínio ou glucana, que geram resultados falsos.

Posteriormente, foi avaliada a aplicabilidade do MAT frente à MenCC, seguindo requisição da FE, que afirma que para aplicação do MAT em ensaios de rotina, para liberação de lotes, é necessária uma validação produto-específica do método. Ensaios semelhantes já foram realizados em produtos bio-farmacêuticos nacionais, como estudo com a vacina de febre amarela (Navega et al. 2016) e estudo aplicado a soro hiperimune (Caldeira et al. 2015).

O primeiro passo para realização do ensaio do MAT foi a obtenção da matriz monocítica. Após análise do sangue coletado, nenhum doador de ambos os lotes apresentou algum parâmetro que impedisse que o seu sangue fosse utilizado nos experimentos. Antes da aplicação do teste à vacina foi realizado um ensaio apenas com o sangue dos doadores, o qual demonstrou que a liberação basal de citocinas dos mesmos não interfere no ensaio e que todos os doadores responderam de forma satisfatória ao estímulo de LPS. Foi observado que nas amostras aditadas com LPS, a liberação da citocina IL-6 foi visivelmente maior que nas suas amostras correspondentes não aditado com LPS, aferido pela liberação de IL-6, que apresentou curva dose-resposta com  $R^2 = 0,996$ , corroborando diversos estudos que demonstram a dosagem desta citocina após estímulo pirogênico utilizando o MAT (Taktak et al. 1991, Hartung et al. 2001, Poole 2003, Solati 2015).

Parte do sangue que não foi destinada para as análises preliminares foi utilizada para realização do ensaio com sangue fresco, ou submetida a criopreservação e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para formação de um banco de sangue para os ensaios do MAT. A utilização de sangue criopreservado na indústria veio para sanar a dificuldade na obtenção de doadores para coleta de sangue fresco (Solati 2015, Shindler 2006, Hartung 2015).

Outro aspecto avaliado, foi a citotoxicidade do produto à matriz celular. Foi observado que a MenCC, *per se*, não tem relação direta com a viabilidade celular, o que poderia estar relacionado com os níveis de citocina detectados no sistema MAT. Não foi observado aumento no número de células mortas com relação direta à presença da MenCC, ou à presença do LPS.

O cálculo da MDV da MenCC foi a diluição 1:11, tanto na leitura com IL-1 $\beta$  como na leitura com IL-6, portando o ensaio de interferente da vacina foi realizado utilizando diluições que não ultrapasassem a MDV. Todas as diluições da MenCC demonstraram não interferir na detecção de IL-6, apresentando recuperação de LPS dentro da faixa especificada de 50-200%, exceto para IL-1 $\beta$  na vacina não diluída. Na leitura de IL-6 e IL-1 $\beta$ , a diluição 1:4 foi a menor diluição da amostra a ter uma recuperação mais aproximada de 100 %, assim, os ensaios seguintes foram realizados com esta diluição.

Vale ressaltar que o ensaio de interferente foi aplicado à MenCC diluída em NaCl, em seu adjuvante e ao adjuvante puro. As diluições realizadas em NaCl e no adjuvante, tiveram como objetivo, mimetizar os ensaios realizados no RPT e no LAL, respectivamente. Nenhum dos reconstituintes interferiu na recuperação de LPS. Foi importante demonstrar este ensaio com o adjuvante tendo em vista que o hidróxido de alumínio está presente na sua composição. Sendo um limitante para o LAL (Carlin & Viitanen 2005), podendo dificultar a análise de produtos contendo este composto, entretanto nossos resultados demonstraram que no MAT o mesmo não interfere na detecção de pirogênios, sendo possível recuperar o pirogênio aditado dentro da especificação.

De maneira interessante, as diluições utilizadas no MAT são inferiores aos ensaios realizados no LAL, no qual a MenCC é testada na diluição 1:100. O MAT consegue avaliar a MenCC quanto ao seu conteúdo pirogênico em diluições expressivamente mais baixas, o que torna a análise mais fidedigna, tendo em vista que o produto testado se aproxima da diluição de inoculação na população. Assim, a utilização de altas diluições pode influenciar na representatividade da amostra. Como destacado por Vipond e colaboradores (2016), o aumento da diluição torna a relação entre o resultado do teste e a segurança do produto não diluído, administrado em humanos, muito tênue. As consequências da diluição de um produto vêm sendo reconhecidas por laboratórios nacionais de controle de qualidade e por produtores de parenterais, levando o RPT a ser considerado um teste de consistência e não de segurança, embora um teste de consistência seja difícil de medir utilizando teste *in vivo*, devido a sua variabilidade. O desenho do ensaio do RPT varia entre as farmacopeias assim como o critério de aprovação da amostra. Por estas razões, dentro deste cenário, o MAT é sugerido como um

substituto ao RPT, baseando-se na afirmação do FDA (2012), que ressalta que empresas fabricantes de produtos que requerem o teste de pirogênio, devem utilizar métodos alternativos se estes fornecerem vantagens em termos de acurácia, sensibilidade, precisão, seletividade ou adaptabilidade para automação ou redução de dados computadorizados.

Além de avaliar que o produto não interfere na detecção de LPS, é importante também verificar se a indução de citocinas se comporta de forma dose-resposta. Assim, foi realizado um ensaio comparativo para avaliar a resposta da curva de LPS diluída em NaCl e na MenCC. A análise estatística de retas paralelas demonstrou que o produto não interfere na geração de uma dose-resposta na produção de citocinas quando monócitos provenientes do sangue são estimulados por LPS. Além disso, as curvas de LPS em NaCl e na MenCC, utilizando IL-1 $\beta$  e IL-6, apresentaram uma boa correlação demonstrada pela análise do não-parallelismo e de correlação entre as duas retas.

Após avaliação de todos os parâmetros necessários para análise dos lotes da MenCC com sangue criopreservado, como qualificação de matriz monocítica, teste de interferente e escolha da melhor diluição da vacina, observação da liberação das citocinas de leitura, dentre outros, o ensaio do MAT quantitativo (método A) foi aplicado aos três lotes da MenCC avaliados previamente pelo LAL e RPT.

Corroborando os resultados previamente encontrados pelos outros métodos farmacopeicos, quando analisados pelo MAT, todos os três lotes demonstraram quantificação de endotoxina abaixo do limite permitido para este produto. O método A foi utilizado para análise comparativa de diversos parâmetros: (1) resposta em sangue criopreservado e em sangue fresco; (2) leitura com IL-1 $\beta$  e IL-6; (3) análise da vacina com e sem adjuvante.

Foram utilizados os sistemas sangue fresco/IL-6 e sangue criopreservado/IL-6 a título de comparação, visto que apenas o sistema sangue fresco/IL-6 é validado pelo ICCVAM. De acordo com nossos resultados foi possível observar consonância entre as matrizes monocíticas, sangue fresco e criopreservado, na indução de IL-6 após contaminação pirogênica, o que já foi demonstrado por Shindler (2006) e Hartung (2015). Apesar da detecção de maiores níveis de citocina no sangue fresco, a validação do método com sangue criopreservado e a determinação de um *cut-off*, torna este sistema igualmente eficiente ao sistema utilizando sangue fresco.

Em relação ao parâmetro de leitura, comparando a indução de IL-1 $\beta$  e IL-6, na mesma matriz monocítica, sangue criopreservado, pudemos observar padrões muito semelhantes de indução em todos os lotes avaliados. A quantidade de citocinas liberadas foi semelhante,

diferente do observado para sangue fresco, logo podemos atribuir o diferente padrão de indução à matriz monocítica utilizada, e não ao parâmetro de leitura escolhido. Além disto, através de análise do coeficiente de variação dos ensaios, foi possível observar menor variabilidade nos ensaios realizados com IL-6, tanto nas amostras como em NaCl, o que corroborou a escolha de prosseguir com os ensaios utilizando esta citocina como parâmetro de leitura

Com estas análises foi possível observar que o sistema proposto, mesmo não estando validado pelo ICCVAM (sangue criopreservado/IL-6), responde de forma homogênea e segura, fornecendo resultados tão confiáveis quanto aqueles fornecidos pelos sistemas validados, de acordo com análise estatística. Isto é importante pois se torna mais uma alternativa a aplicabilidade do MAT. Tendo em vista a necessidade da utilização de sangue criopreservado na indústria, ter dois parâmetros de leitura, IL-1 $\beta$  e IL-6, validados para esta matriz monocítica é interessante, pois sabemos que existe a necessidade de validação produto a produto, e cada um pode responder melhor com a leitura de uma ou outra citocina. Nos nossos estudos na MenCC, como nos estudos de Navega e colaboradores (2016) na vacina de febre amarela, e de Caldeira e colaboradores (2015), em soro hiperimune, a leitura da indução de citocinas com IL-6 se mostrou mais adequada.

Além dos diferentes sistemas utilizados, a análise da MenCC pelo método A foi realizada com e sem a presença do adjuvante da vacina. A presença do adjuvante não interferiu na validade do teste, com a recuperação de LPS nos três lotes estando na faixa recomendada. Porém, pudemos perceber que o adjuvante *per se* induziu maior liberação de citocinas através do estímulo ao monócito humano na liberação de citocinas mesmo na ausência do estímulo com LPS. Este fato induziu maior liberação de citocinas na vacina reconstituída com adjuvante, podendo esta apresentar liberação basal até 5 vezes aumentada, quando comparada com a vacina reconstituída em NaCl. Estudos de Ulanova e colaboradores (2001), demonstram a ativação de diversas citocinas pró-inflamatórias a partir de estímulo com hidróxido de alumínio, incluindo IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , o que corrobora nossos achados, tendo em vista que esta substância faz parte da composição do adjuvante da MenCC.

Foi observado que o adjuvante *per se* aumenta aproximadamente de 420% a 760% a indução de citocinas quando comparado com a indução da salina *per se*, e a MenCC reconstituída com adjuvante aumenta aproximadamente de 100% a 640% quando comparado com a MenCC reconstituída em salina. Este aumento na liberação de citocinas na presença do adjuvante não interfere na validade do ensaio, porém pode interferir no *cut off* de aprovação/reprovação de um lote, tendo em vista que a quantificação elevada destas citocinas

pode superar o valor do *cut-off* e gerar resultados falsos-positivos. Assim, uma alternativa seria utilizar uma diluição mais elevada dentro da máxima diluição válida (1:10), de forma a adequar o sistema aos interferentes do diluentes e que comparativamente avaliando, esta diluição ainda continua sendo muito inferior a diluição empregada no LAL.

Assim, demonstramos que o MAT foi eficiente na avaliação da vacina em estudo, tendo em vista que este método, e seus variados sistemas, forneceu resultados compatíveis com aqueles encontrados nos testes atualmente empregados na rotina de liberação de lotes na indústria, RPT e LAL. A MenCC não demonstrou interferir de forma alguma na detecção de pirogênios pelo MAT, assim como o adjuvante da vacina também não interferiu na validade do teste. Foi comprovado também que o sistema sangue criopreservado/IL-6 responde de forma confiável, assim como outros sistemas validados, fornecendo desta forma mais uma combinação de parâmetro de leitura e matriz monocítica do MAT, uma nova alternativa a ser empregada na avaliação de lotes pela indústria.

A próxima etapa de nossos experimentos foi reafirmar a capacidade do MAT em detectar NEPs, e demonstrar que assim como na detecção de LPS, a detecção de NEPs não é influenciada pela MenCC. Foi avaliada a capacidade do MAT em detectar contaminação por LTA, pirogênio clássico de bactérias Gram-positivas, e zymosan, pirogênio clássico de fungos.

Sabendo-se que alguns padrões comerciais frequentemente apresentam contaminação por LPS (Hasiwa et al. 2013), as amostras de zymosan e LTA foram previamente tratadas com PMB, para evitar que tal contaminação interferisse nos resultados obtidos. No LTA pudemos nitidamente observar a presença de contaminação por LPS, sem o tratamento com PMB, não sendo possível obter uma curva dose-resposta por saturação na liberação de citocinas, onde os valores de citocinas obtidos com diferentes concentrações de estímulo por LTA formavam praticamente um platô. Após o tratamento com PMB foi possível observar a formação de uma curva dose-resposta bem definida, demonstrando a eliminação da interferência do LPS no ensaio. No zymosan o tratamento com PMB não obteve tanto impacto como no LTA, as curvas com e sem PMB tiveram perfil semelhante, a presença da PMB aumentou ligeiramente a indução de citocinas, porém o padrão observado na relação entre as diferentes concentrações do estímulo com zymosan se manteve. Seria importante em ensaios posteriores analisar o impacto da utilização de PMB na determinação do *cut-off* de aprovação/reprovação do teste, entretanto, numa análise de rotina, não se deve tratar a amostra com PMB, uma vez que a intenção do ensaio é quantificar qualquer pirogênio presente, sem distinção.

Experimentos realizados com LTA demonstraram que a contaminação proposital com LTA é claramente detectada pelo MAT, o que corrobora estudos de Gimenes (2015), ainda observamos que a indução de citocinas pelo LTA funciona de forma dose-resposta, avaliando curva de LTA na MenCC e em salina. O ensaio realizado com IL-6 demonstrou através da análise de não-parallelismo e de correlação que a curva de LTA é obtida na MenCC assim como em NaCl, demonstrando a não interferência da vacina na detecção deste pirógeno. Os dados do ensaio com IL-1 $\beta$  apontam uma correlação não significativa entre a curva de LTA em MenCC *versus* NaCl. Este é mais um dado que contribui para a escolha de IL-6 como mais uma opção de parâmetro de leitura a ser empregado nos ensaios do MAT, incentivando a validação de mais um sistema do MAT a ser empregado em ensaios biológicos.

A capacidade de detecção de LTA em análise lote a lote da vacina foi avaliada pelo método A, através de contaminação proposital com quantidade conhecida de LTA e leitura por IL-6. Logo, assim como acontece com a contaminação por LPS, a contaminação por LTA pode claramente ser detectada pelo MAT (Gimenes 2015), demonstrando ser possível a avaliação do conteúdo pirogênico da MenCC através da detecção deste pirogênio. A quantificação de pirogênios em UEE ficou abaixo do limite permitido para o produto.

Quando comparamos a indução de citocinas entre LPS e LTA, observamos que LPS tem maior poder de indução, conforme descrito na literatura. Porém, como observado por Von Aulock e colaboradores (2003), LTA provenientes de diferentes bactérias Gram-positivas apresentam diferenças em sua potência, assim como LPS proveniente de diferentes bactérias Gram-negativas, logo o maior poder de indução de citocinas pelo LPS pode estar associado ao fato de que a maioria dos estudos realizados com LPS utilizam as formas mais potentes. Outro fator importante apontado por Traub e colaboradores (2006) e Holtkamp e colaboradores (2010) é o sinergismo observado entre LTA e outras estruturas da parede de bactérias Gram-positivas, como peptidoglicanas, evidenciado pelo teste do sangue total. Portanto a indução de citocinas observada pelo MAT com estímulo por LTA, pode *in vivo* ter um significado clínico muito maior pelo sinergismo que tem com estes outros componentes.

O MAT também detecta sinergismo entre LPS e LTA. Para análise e liberação de lotes de produtos farmacêuticos para o mercado isto é crítico, tendo em vista que muitos produtos são liberados após avaliação apenas pelo teste do LAL. É muito comum a detecção de LPS em lotes aprovados pelo LAL, muitas vezes o LPS está presente, porém não alcança o *cut-off* necessário para reprovação. Desta forma, se o potencial pirogênico deste LPS sofresse sinergismo com alguma outra contaminação por NEP, este *cut-off* poderia facilmente ser

superado. Porém, o LAL não é capaz de detectar isto, o MAT sim, tendo em vista que este método detecta a indução de citocinas de forma geral, levando em consideração todo tipo de contaminante presente numa determinada amostra, logo se uma amostra estiver duplamente contaminada, a matriz monocítica estará sendo duplamente estimulada, o que será refletido na quantidade de citocinas detectadas, por isso, a determinação da contaminação em UEE.

Os lotes da MenCC também foram propositalmente contaminados com quantidade conhecida de zymosan. Nos três lotes foi possível verificar a diferença na liberação de citocinas pelos lotes aditados com zymosan e não aditados, os lotes com adição de zymosan liberaram consideravelmente mais citocinas, medido pela leitura com IL-6, quando comparados com os controles sem adição desta molécula. Porém, diferente do observado para os outros estímulos pirogênicos, não foi possível verificar uma curva dose-resposta crescente, pois, quanto maior a dose de zymosan aditada menor era a indução de citocinas. Esta situação foi considerada atípica, porém corrobora estudos demonstrados por Hasiwa e colaboradores (2013). Algo que pode explicar este achado é a influência do zymosan na viabilidade das células da matriz monocítica (Hasiwa et al. 2013), são necessários estudos complementares para verificação desta possibilidade.

O método A também foi aplicado em ensaio aditando quantidade conhecida de zymosan nos lotes da MenCC, utilizando IL-6 como parâmetro de leitura. Assim como observado nos ensaios com os outros dois pirogênicos, a contaminação por zymosan pode claramente ser detectada pelo MAT (Gimenes 2015), demonstrando ser possível a avaliação do conteúdo pirogênico da MenCC através da detecção deste pirogênicos. A quantificação de pirogênicos em UEE ficou abaixo do limite permitido para o produto.

O MAT vem de forma consistente se mostrando uma alternativa para avaliação do conteúdo pirogênico em parenterais na indústria bio-farmacêutica. Aparece neste cenário como uma solução para os conflitos éticos enfrentados por este tipo de ensaio, uma vez que não depende do uso de animais ou de material derivado de animal. Além disso o MAT acaba com a necessidade de extrapolação interespécies dos resultados, uma vez que utiliza o mecanismo de indução de febre em humanos para gerar resposta.

Desta forma, este estudo reforça o emprego do MAT como um substituto ao RPT, suprimindo limitações em relação à variabilidade e conflitos éticos apresentados pelo teste *in vivo*. Funcionando como um teste de consistência qualitativo e não quantitativo, o RPT torna a comparação entre lotes limitada, indo contra o princípio dos 3R's, pois utiliza animais em experimentos que fornecem dados muitas vezes irrelevantes, como no caso de vacinas

extensamente diluídas ou de vacinas com alto teor de LPS intrínseco. Portanto, a utilização do ensaio *in vivo* para avaliação de vacinas é questionável, devendo os fabricantes e laboratórios de controle de qualidade se atentarem para qual informação adquirida através deste ensaio deve ser considerada. Observando o desenvolvimento tecnológico industrial, vacinas estão se tornando cada vez mais complexas, com múltiplos componentes e utilização de novos adjuvantes para estimular a resposta imune inata, assim sendo, é provável que o RPT não seja a melhor escolha para avaliar o potencial pirogênico destes novos produtos. Assim, o MAT é sugerido como um método alternativo ao RPT, fornecendo dados quantitativos em um sistema que avalia a resposta inflamatória em humanos. O MAT vai além da abordagem da consistência, garantindo segurança, eficácia e qualidade às vacinas, quando devidamente implementado, podendo diminuir ou até mesmo abolir o uso de animais para este escopo de testes de rotina realizados em laboratórios de controle de qualidade.

A introdução do MAT no controle de qualidade fornece uma análise mais refinada na detecção de contaminação por pirogênios, pois além de ser um método quantitativo é capaz de detectar um espectro de pirogênios maior do que o que vem sendo investigado nos dias de hoje. Muitos produtos farmacêuticos são liberados para o mercado sem a devida verificação de contaminação por NEPs, produtos testados pelo MAT apresentam maior garantia de qualidade e segurança.

Vale ressaltar que apesar de a principal proposta desta dissertação não ser a avaliação da qualidade do produto, nossos resultados reafirmam a ausência de pirogênios nos lotes da MenCC produzidos por Bio-Manguinhos, reinterando o comprometimento da instituição com o fortalecimento de imunobiológicos de qualidade para suprir demandas da saúde pública nacional.



## 6. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou a susceptibilidade da MenCC à análise pelo MAT. A vacina em desenvolvimento e seu adjuvante não interferiram na indução de citocinas provenientes do estímulo com LPS ou NEPs. Assim como a MenCC também não interferiu na formação de curva dose-resposta de LPS utilizando IL-6 e IL-1 $\beta$  como parâmetros de leitura.

A análise dos lotes da MenCC pelo método quantitativo do MAT demonstrou que o conteúdo pirogênico dos lotes está abaixo do LE permitido para o produto, estando estes resultados em concordância com os previamente obtidos pelos métodos farmacopeicos, RPT e LAL.

Foi demonstrando consonância entre os resultados encontrados em diferentes sistemas do MAT. O sistema MAT proposto, sangue criopreservado/IL-6, responde de forma homogênea e segura, apresentando menor variabilidade entre as replicatas do ensaio.

O MAT foi capaz de detectar contaminação proposital de LTA e zymosan A, através de leitura com IL-6, sendo capaz de quantificar o conteúdo pirogênico dos lotes da MenCC em UEE, após contaminação com estes NEPs.

## 7. REFERÊNCIAS

Andrade SS, Silveira RL, Schmidt CA, et al. **Comparative evaluation of the human whole blood and human peripheral blood monocyte tests for pyrogens.** Int J Pharmaceutics 2003; 265:115-24.

ANVISA. **Concea publica métodos alternativos ao uso de animais.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em 15/03/2016.

Bastos RC, et al. **Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies.** Vaccine 2015; 33.35:4281-87.

Bennett IL, Beeson PB. **The properties and biologic effects of bacterial pyrogens.** Medicine 1950; 29:365-400.

Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. **Mode of Action of Endotoxin: Role of Free Radicals and Antioxidants.** Curr. Med. Chem. 2004; 11:359-68.

Bosis S, Mayer A, Esposito S. **Meningococcal disease in childhood: epidemiology, clinical features and prevention.** Journal of preventive medicine and hygiene 2015; 56.3:121-4.

BRASIL. **Lei nº 10.742, de 06 de outubro de 2003.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília 2003; 12647.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 210.** Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA), 2003.

Carlin G and Viitanen E. **In vitro pyrogenicity of the diphtheria, tetanus and acellular pertussis components of a trivalent vaccine.** Vaccine 2005; 23:3709-15.

Centro de vigilância epidemiológica. **Informe técnico vacina conjugada contra o meningococo C.** São Paulo, 2010.

Clough PW. **Pyrogens.** Ann Intern Med 1951; 34:816-9.

Cohn A, Macneil J. **The Changing Epidemiology of Meningococcal Disease.** Infectious disease clinics of North America 2015; 29.4:667-77.

Dehus O, Hartung T, Hermann C. **Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus ameocyte lysate assay.** J Endotoxin Res 2006; 12:71-80.

Dinarello CA, O'Connor JV, LoPreste G, et al. **Human leukocytic pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant Escherichia coli.** J Clin Microbiol 1984; 20:323-9.

Dinarello CA. **Thermoregulation and the pathogenesis of fever.** Infect Dis Clin North Am 1996; 10:433-49.

Ding JL and Ho B. **A new era in pyrogen testing**. Trends Biotechnol 2001; 19: 277-81.

Dwilow R, Fanella S. **Invasive Meningococcal Disease in the 21st Century—An Update for the Clinician**. Current neurology and neuroscience reports 2015; 15.3:1-9.

Eperon S, Jungi TW. **The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin**. Journal of Immunological Methods 1996; 194.2:121-9.

European Center for Disease Prevention and Control. **Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/invasive-bacterial-diseases-surveillance-2011.pdf>. Acessado em: 09/12/2016.

European Pharmacopoeia. **Monocyte Activation Test**. In Ph. Eur. 7th Edition, Chapter 2.6.30. 2010.

Farmacopeia Brasileira. **Pirogênios**. In: Farmacopeia Brasileira 2010, Quinta edição, vol. 1. ANVISA, Brasília, 229-30.

Fennrich S, Fischer M, Hartung T, et al. **Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood**. Dev Biol Stand 1999; 101:131-9.

Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. **More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives**. Alternatives to laboratory animals 2016; 44.3:239-53.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, et al. (2003). **Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2**. J Exp Med 2003; 197: 1107-17.

Gimenes I, et al. **Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test**. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2015; 73.1:356-60.

Gustmann T, Schromm A, Brandenburg K. **The Physicochemistry of Endotoxins in Relation to Bioactivity**. Int. J. Med. Microbiol. 2007; 297:341-52.

Hansen EW, Christensen JD. **Comparison of cultured human mononuclear cells, Limulus ameobocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens**. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 1990; 15.6:425-33.

Hartung T and Wendel A. **Die erfassung von pyrogenen in einem humanen vollblutmodell**. ALTEX 1995; 12.2:70-5.

Hartung T, Aaberge I, Berthold S, et al. **Novel pyrogen tests based on the human fever reaction**. Altern Lab Anim 2001; 29:99-123.

Hartung T. **Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC – a t4 report**. ALTEX 2010; 27:285-303.

Hartung T. **The human whole blood pyrogen test – lessons learned in twenty years**. ALTEX 2015; 32.2:79-100.

Hasiwa M, Kullmann K, von Aulock S, et al. **An in vitro pyrogen safety test for immune-stimulating components on surfaces**. Biomaterials 2007; 28:1367-75.

- Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S, et al. (2013). **Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test.** *Alternatives to animal experimentation: ALTEX* 2013; 30.2:169-208.
- Hedari CP, Khinkarly RW, Dbaibo GS. **Meningococcal serogroups a, c, w-135, and tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease.** *Infect Drug Resist* 2014; 7:85–99.
- Hochstein HD, Munson TE, Outschoorn AS. 1990. **Comparison of rabbit responses of two E. coli endotoxin preparations in the USP rabbit pyrogen test.** *Pharmacop. Forum* 1990; 346-51.
- Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. **International validation of novel pyrogen tests based on the human fever reaction.** *J Immunol Meth* 2005a; 298:161-73.
- Hoffmann S, Luderitz-Puchel U, Montag-Lessing T, Hartung T. (2005b). **Optimisation of pyrogen testing in parenterals according to different pharmacopoeias by probabilistic modelling.** *J Endotoxin Res* 2005b; 11: 25-31.
- Holtkamp B, Schmitz G, Hartung T. **In vitro- Pyrogentest – Nachweis eines breiten Pyrogenspektrums im Monozyten-Aktivierungstest.** *Biospektrum* 2010; 16:779-81.
- ICCVAM. **Introduction and Rationale For The Proposed Use Of In Vitro Pyrogen Test Methods.** ICCVAM In Vitro Pyrogenicity BRD: Section 1 2008.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). **ICCVAM Test Method Evaluation Report: Validation Status of Five in Vitro Test Methods Proposed for Assessing Potential Pirogenicity of Pharmaceuticals and Other Products.** NIH Publication 2008; 08-6392.
- Koryakina A, Frey E, Bruegger P. **Cryopreservation of human monocytes for pharmacopoeial monocyte activation test.** *Journal of Immunological Methods* 2014; 405:181–91.
- Lindblad EB. **Aluminium compounds for use in vaccines.** *Immunology and cell biology* 2004; 82.55:497-505.
- Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** Série A. normas e manuais técnicos. 7ª edição, Brasília DF, 2009.
- Montag T, et al. **Safety Testing of Cell-Based Medicinal Products: Opportunities for the Monocyte Activation Test for Pyrogens.** *ALTEX* 2007; 24:81-89.
- Moraes C. **Perfil Epidemiológico da Meningite Brasil & Mundo.** Ministério da Saúde. Porto Alegre RS, 2015.
- Morath S, Geyer A, Hartung T. **Structure e function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus.** *J. Exp. Med.* 2001; 193:393-7.
- Morath S, et al. **Synthetic lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus of cytokine release.** *J. Exp. Med.* 2002; 195:1635-40.
- Morrison DC and Jacobs DM. **Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides.** *Immunochemistry* 1976; 13.10:813-18.

Navega ECA, da Silva CC, Presgrave OF, Almeida AS, Delgado IF, de Mattos KA. **Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos biológicos.** Archives of Veterinary Science 2015; 20.4.

Navega ECA. **Estudo da aplicabilidade do teste de ativação de monócitos na detecção de pirogênios na vacina contra febre amarela.** Rio de Janeiro; 2016. Mestrado [Dissertação em vigilância sanitária] – Instituto Nacional em Controle de Qualidade e Saúde/Fundação Oswaldo Cruz.

Nordgren IK. **Leukoreduction System Chambers Provide a Valuable Source of Functional Monocytes for the Monocyte Activation Test by Comparison with International Validated Methods.** Journal of immunological methods 2015; 428:42-9.

Ochiai M, Yamamoto A, Kataoka M, et al. **Interfering effect of diphtheria et na use acellular pertussis combined (DTaP).** Vaccines on the bacterial endotoxin test. Biologicals 2001; 29.1:55-8.

Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero-Alejo V, Perdomo-Morales R. **Soluble  $\beta$ -(1, 3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: implications for pyrogenicity tests.** European Journal of Pharmaceutical Sciences 2016; 81:18-26.

Pellegrino P, Falvella FS, Cheli S, Perrotta C, Clementi E, Radice S. **The role of Toll-like receptor 4 polymorphisms in vaccine immune response.** The pharmacogenomics journal 2016; 16.1:96-101.

Pelton SI. **The global evolution of meningococcal epidemiology following the introduction of meningococcal vaccines.** Journal of Adolescent Health 2016; 59.2:3-11.

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 2011; 28.3:227-35.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** Atheneu, 2003.

Poole S, Thorpe R, Meager A, et al. **Detection of pyrogen by cytokine release.** Lancet 1988; 331.8577:130.

Poole S, Gaines Das RE. **Towards a 'human pyrogen test'.** European Journal of Parenteral Sciences 2001; 6:63-4.

Poole S, Mistry Y, Ball C, et al. **A rapid 'one-plate' in vitro test for pyrogens.** J Immunol Methods 2003; 274: 209-20.

Porto V. **Polissacarídeos da parede celular fúngica.** Rio de Janeiro; 2014 [acesso 02/03/2017]. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/VivianePorto1/polissacardeos-da-parede-celular-fngica>.

Rietschel ET. **Handbook of Endotoxin: Chemistry of Endotoxin vol 1.** Elsevier 1984, Amsterdam.

Roberts KJ. **The Pyrogen Test.** In Williams, Kevin L, editors. **Endotoxins – Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation.** CRC Press 2007; 261-71.

Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, Hartung T. **Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood.** ALTEX 2009; 26:4:265-77.

Schindler S, von Aulock S, Daneshian M, Hartung T. **Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood.** ALTEX 2009; 26:293-305.

Schindler S, Bristow A, Cartmell T, et al. **Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli.** ALTEX 2003; 20:59-63

Schindler S, Asmus S, von Aulock S, et al. **Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing.** J Immunol Meth 2004; 294:89-100.

Shindler S, et al. **Development, Validation and applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens based on Human Whole Blood.** ALTEX 2009; 26:265-77.

Silva C, Cruz M, Freitas J, et al. **Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênicos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Visa em Debate 2015.

Silveira IAFB, et al. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** Vaccine 2007; 25:41:7261-70.

Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D. **An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells.** Innate immunity 2015; 21:7:677-84.

Stewart RK, Dangi A, Huang C, et al. **A Novel Mouse Model of Depletion of Stellate Cells Clarifies Their Role in Ischemia/Reperfusion and Endotoxin-Induced Acute Liver Injury.** J. Hepatol. 2014; 60:298–305.

Su W, Ding X. **Methods of Endotoxin Detection.** Journal of laboratory automation 2015; 20:4:354-64.

Taktak YS, Selkirk S, Bristow AF, et al. **Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines.** J Pharm Pharmacol 1991; 43:578-82.

Traub S, von Aulock S, Hartung T, Hermann C. (2006). **MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system.** J Endotoxin Res 2006; 12:69-85.

Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LÅ. **The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism.** Infection and immunity 2001; 69:2:1151-59.

United States Pharmacopeia. **Pyrogen test.** In: USP 37/NF 32 2014; 135-7, Rockville.

Vipond C, Findlay L, Feavers I, Care R. **Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines.** Altex 2016; 33.1:47-53.

von Aulock S, Morath S, Hareng L, Knapp S, van Kessel KP, van Strijp JA, Hartung T. **Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus for neutrophil recruitment.** Immunobiology 2003; 208:413-22.

Werner-Felmayer G, Baier-Bitterlich G, Fuchs, et al. **Detection of bacterial pyrogens on the basis of their effects on gamma interferon-mediated formation of neopterin or nitrite**

**incultured monocyte cell lines.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1995; 2.3:307-13.

Williams LK. (Ed). **Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation.** Marcel Dekker 2001, New York.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO Technical Report, Series No. 924.** Geneva, Switzerland, 2004.

Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. **Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT).** BMC Pharmacology and Toxicology 2014; 15.1:50.

## **ANEXO I**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil

Tel.: (0xx21) 3865 5151 - Fax: (0xx21) 2290-0915

incqs@incqs.fiocruz.br - www.incqs.fiocruz.br

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

De acordo com as Normas da resolução nº 196, do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996.

**Título do Projeto:** “Validação do ensaio de liberação de citocinas “in vitro” para controle da qualidade de produtos injetáveis humanos – uso de sangue criopreservado na metodologia de liberação de citocinas em sangue total humano como indicador de contaminação pirogênica.”

#### **Instituições participantes:**

- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil
- Universidade de Konstanz, Konstanz, Alemanha

**Coordenador do projeto:** Octavio Augusto França Presgrave, M.Sc.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), é o laboratório de referência do Ministério da Saúde para as questões de Vigilância Sanitária, tendo como uma de suas competências o “estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde”.

Como voluntário, o(a) Sr(a) está sendo solicitado(a) a participar de um projeto científico patrocinado pelo CNPq/MCT/DAAD/BMbf. O estudo compreende a participação de adultos



sadios como doadores de sangue para o desenvolvimento de uma nova metodologia utilizada no controle da qualidade de produtos injetáveis.

Este termo fornece informações sobre o projeto de pesquisa, os exames, benefícios e inconvenientes que poderão ocorrer durante o projeto. O(a) Sr(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou mesmo dela se afastar a qualquer tempo, sem que este fato venha lhe causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte das instituições participantes ou patrocinadoras.

Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante desse estudo, assim como poderão interromper a participação do(a) Sr(a) a qualquer tempo. Neste caso, os investigadores se comprometem a dar todas as explicações e orientações necessárias. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. O(A) Sr(a) receberá todos os cuidados adequados para o controle de efeitos adversos que possam ocorrer em consequência de sua participação nesta pesquisa. Os resultados da análise do seu sangue somente serão divulgados para o(a) Sr(a), sendo garantido o sigilo das avaliações.

**Antes de assinar este termo, o(a) Sr(a) deve informar-se plenamente sobre o mesmo, fazendo todas as perguntas que achar necessário. É importante conhecer as informações a seguir.**

O presente projeto tem como objetivo implantar um método alternativo ao uso de animais na determinação de contaminação pirogênica em produtos injetáveis, através do uso de sangue humano criopreservado (congelado).

Para tal, o sangue será coletado através de punção venosa, no braço, com uso de material descartável, quando será retirado um volume de aproximadamente 10 (dez) mL. Um ligeiro desconforto poderá ocorrer na coleta do sangue (semelhante à picada de um inseto), podendo sentir uma pequena ardência no local da coleta. Um pequeno hematoma poderá ser notado neste local, e que deverá desaparecer em 24 horas. Não existem riscos conhecidos com relação à coleta desse material.

Uma parte do sangue será utilizada para a realização de um hemograma completo, uma vez que alterações hematológicas são causas excludentes para uso no experimento. Antes da coleta do sangue o voluntário responderá a um pequeno questionário, em anexo, para ratificar a possibilidade de participação no estudo.

Este estudo não implica, em nenhum momento, na administração de qualquer substância, isolada ou em mistura, sendo o sangue coletado, única e exclusivamente, utilizado para verificar a liberação de citocinas *in vitro*, não sendo objeto de quaisquer outros estudos nas áreas de genética, clonagem, terapêutica etc. Da mesma forma, o presente estudo não visa atribuir benefícios aos participantes do mesmo.

Todas as alíquotas não utilizadas serão descartadas, seguindo as normas de biossegurança vigentes na FIOCRUZ.

O presente projeto não prevê quaisquer formas de ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa ou indenização de danos decorrentes da pesquisa, uma vez que estes não são esperados.

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço e Telefone: \_\_\_\_\_

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## QUESTIONÁRIO

**Título do Projeto:** “Validação do ensaio de liberação de citocinas “in vitro” para controle da qualidade de produtos injetáveis humanos – uso de sangue criopreservado na metodologia de liberação de citocinas em sangue total humano como indicador de contaminação pirogênica.”

1 – Nome:

\_\_\_\_\_

2 – Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

3 – Endereço:

\_\_\_\_\_

4 – Telefone:

\_\_\_\_\_

5 – E-mail:

\_\_\_\_\_

6 – Sexo: \_\_\_\_M \_\_\_\_F

7 – Estado civil: solteiro(a)\_\_\_\_ casado(a) \_\_\_\_ divorciado(a) \_\_\_\_ viúvo(a)\_\_\_\_

8 – Possui doença infecto- contagiosa? \_\_\_\_\_ Sim \_\_\_\_\_ Não

Qual? \_\_\_\_\_

9 – Faz uso de analgésico e/ou anti-inflamatórios? \_\_\_\_\_ Sim \_\_\_\_\_ Não

Qual(is)? \_\_\_\_\_

Qual frequência? \_\_\_\_\_

10 – Fez uso de analgésico e/ou anti-inflamatório nos últimos 7 dias? \_\_\_\_\_ Sim \_\_\_\_\_ Não

11 – Está fazendo uso de anti-concepcional hormonal? \_\_\_\_\_ Sim \_\_\_\_\_ Não

12 – Está grávida? \_\_\_\_\_ Sim \_\_\_\_\_ Não

Observações:

---

---

---

Rio de Janeiro, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_