

Métodos alternativos para a detecção de pirogênios em produtos e ambientes sujeitos a Vigilância Sanitária: avanços e perspectivas no Brasil a partir do reconhecimento internacional do Teste de Ativação de Monócitos

Alternative methods for the detection of pyrogens in products and environment subject to public health surveillance: advances and perspectives in Brazil based on the international recognition of the Monocyte Activation Test

Cristiane Caldeira da Silva^{I,II,*}
Carolina Barbara Nogueira de Oliveira^I
Patrícia dos Santos Carneiro^{III}
Eliana Blini Marengo^{III}
Katherine Antunes de Mattos^{IV}
Ricardo Sergio Couto de Almeida^V
Janaína Spoladore^{VI}
Gutemberg Gomes Alves^{VI}
Octavio Augusto França Presgrave^{II}
Isabella Fernandes Delgado^{VII}

^I Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Laboratório de Desenvolvimento Analítico e Estabilidade, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

^{IV} Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^V Universidade Estadual de Londrina, Paraná, PR, Brasil

^{VI} Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{VII} Vice Presidência de Educação, Informação e Comunicação, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br

Recebido: 31 out 2017

Aprovado: 08 jan 2018

RESUMO

Introdução: A detecção de pirogênios é imprescindível no controle da qualidade de produtos injetáveis. O Teste de Pirogênio em coelhos ainda tem larga aplicação, apesar da existência de métodos alternativos como o Teste de Ativação de Monócitos (MAT). **Objetivo:** Revisar o uso dos métodos alternativos no teste de pirogênio, apontando avanços e perspectivas a partir do reconhecimento do MAT pela Farmacopeia Europeia e sua aceitação para fins regulatórios no Brasil. **Método:** Uma busca foi realizada nas bases PubMed e BVS, com posterior classificação, categorização por assuntos e análise crítica dos resultados. **Resultados:** Foram identificados 24 trabalhos, abordando temas como as aplicações do MAT, sua validação e comparação com testes *in vivo*. O MAT apresentou melhores resultados quando comparado a outros testes, tanto na avaliação de produtos biológicos como na detecção de pirogênios não-endotoxinas. Limitações para sua difusão incluem a dificuldade de obtenção de sangue total humano como fonte de monócitos, para o qual diversas alternativas têm sido propostas. **Conclusões:** O MAT se mostra um método promissor, com aplicação na avaliação da segurança de novas tecnologias. Sua aplicação no Brasil depende de uma política nacional de implantação, que inclua maior Integração entre BraCVAM, Concea e RENAMA na busca por seu reconhecimento para fins regulatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Métodos Alternativos; Pirogênio; Teste de Ativação de Monócitos; Técnicas *in vitro*; Controle da Qualidade; Legislação

ABSTRACT

Introduction: The detection of pyrogens is essential for the quality control of injectable products. The Rabbit Pyrogen Test remains widely used, despite the existence of alternative methods such as the Monocyte Activation Test (MAT). **Objective:** To review the use of alternative methods for pyrogen testing, pointing out advances and perspectives from the recognition of MAT by the European pharmacopoeia and its acceptance for regulatory purposes in Brazil. **Method:** A search was performed on the PubMed and BVS databases, with further classification, categorization by topic and critical analysis of the results. **Results:** Twenty-four papers were identified, addressing topics such as applications of MAT, its validation and comparisons with *in vivo* tests. MAT presented better results when compared to other tests, both in the evaluation of biological products and in the detection of non-endotoxin pyrogens. Limitations to diffusion include difficulties in obtaining whole human blood as a source of monocytes, for which several alternatives have been proposed. **Conclusions:** MAT is a promising method, with application in safety evaluation of new technologies. Its application in Brazil depends on a national implementation policy, which might include greater integration between BraCVAM, Concea and RENAMA in search for its recognition for regulatory purposes.

KEYWORDS: Alternative Methods; Pyrogen; Monocyte Activation Test; *In vitro* Techniques, Quality Control; Legislation



INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis que se encontram no mercado devem ser livres de pirogênio, uma vez que este tipo de contaminação pode ser considerado um grave problema de saúde pública podendo causar desde alterações vasculares até um quadro de choque e morte. Portanto, os testes para a detecção de pirogênio são ensaios de segurança toxicológicos imprescindíveis tanto nas etapas de produção quanto no controle da qualidade de produtos injetáveis, garantindo a segurança do uso desses produtos e evitando efeitos adversos à saúde^{1,2,3}. Existem três testes farmacopeicos: (i) o Teste de Pirogênio em coelhos, (ii) o Teste de Endotoxina Bacteriana ou Lisado de Amébocito do *Limulus* (LAL) e (iii) o Teste de Ativação de Monócitos (MAT)⁴. A Farmacopeia Brasileira, assim como a Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopoeia* - USP) só possuem monografia para o Teste de Pirogênio *in vivo* e o LAL, sendo que a Farmacopeia Europeia reconheceu o MAT, em 2010, como um terceiro teste^{5,6,7}. Recentemente, após uma revisão técnica da Farmacopeia Europeia, o MAT passou a ser reconhecido como método substitutivo do teste de pirogênio *in vivo* para endotoxinas após validação específica para produto sob análise⁸.

O Teste de Pirogênio *in vivo* foi primeiramente descrito por Hort e Penfold⁹ em 1911 e foi introduzido na USP como método oficial em 1942. Este teste fundamenta-se na observação da resposta febril em coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, baseado na dose-resposta similar entre o homem e coelho, onde 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre. O Teste de Pirogênio *in vivo*, apesar de ser um ensaio seguro por detectar um amplo espectro de produtos, inclusive os biológicos, não pode ser utilizado para algumas classes de medicamentos, como analgésicos, antitérmicos e anti-inflamatórios. Fatores relacionados ao animal como diferenças de resposta entre raças, sexo e a variabilidade biológica também contribuem para possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos¹.

A partir de 1959, com a publicação do livro *The principles of humane experimental technique*¹⁰, foi introduzido no meio científico o conceito dos 3Rs (do inglês, *Reduction, Refinement & Replacement*) e desde então, um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao Teste de Pirogênio em coelhos. Em 1964, Levin e Bang¹¹ descreveram a reação de coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) após contato com a endotoxina, sendo que o que o LAL ou teste de endotoxina ou teste de Endotoxina só foi reconhecido na Farmacopeia dos Estados Unidos em 1980¹², pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 1987, e na Farmacopeia Brasileira em 1996¹³. O Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea), Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016, art. 2º, reconheceu o LAL como um teste para avaliar a contaminação pirogênica em produtos injetáveis¹⁴. O LAL é considerado um método rápido, fácil e sensível para a detecção de endotoxinas, entretanto, a adoção do LAL como substituto do Teste de Pirogênio *in vivo* não torna possível a detecção de bactérias Gram-positivas e fungos, que compreendem a maioria dos formadores de esporos, e representam um

diferencial na contaminação pirogênica. Portanto, o uso unicamente do LAL negligenciaria possíveis contaminações, causando riscos à saúde da população^{4,15,16,17,18,19}. Além disso, pelo fato do LAL detectar somente endotoxina livre, seu uso é restrito para parte dos produtos biológicos devido à sua ligação a proteínas plasmáticas, o que pode gerar resultados falso-negativos^{18,19}.

Foi somente no final da década de 1980 que um novo método para a detecção de pirogênios com potencial para substituir o teste em coelhos foi descrito. A primeira demonstração da aplicação do teste de liberação de citocinas *in vitro* foi através do “teste do monócito”, em comparação com os ensaios em coelho e o LAL. Nesse método, uma linhagem celular monocítica humana denominada Monomac-6 (MM6) foi submetida à presença de endotoxinas de diversas origens e algumas citocinas como a Interleucina 1 Beta (IL-1B) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) foram dosadas demonstrando uma boa relação dose-resposta²⁰. Durante a década de 1990, vários estudos sobre a detecção *in vitro* de pirogênios foram publicados^{21,22,23,24}. Em 2001, Hartung et al.¹⁶ publicaram no relatório final de um *workshop* patrocinado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (EURL ECVAM), a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos para enfrentar as limitações do Teste Pirogênio *in vivo*, destacando a necessidade de novas abordagens. O processo de validação internacional do teste de liberação de citocinas foi publicado em 2005, inicialmente para nove medicamentos, utilizando sangue total humano fresco¹⁷ e criopreservado^{25,26}. A partir desta publicação, o EURL ECVAM apresentou ao Comitê Organizador Interagências para Validação de Métodos Alternativos o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), a avaliação do *status* de validação de cinco métodos alternativos *in vitro* baseados na liberação de citocinas pró-inflamatórias^{18,27}. Os métodos avaliados foram: (i) Sangue total humano (WB, sigla do inglês *Whole Blood*)/Interleucina (IL)-1B; (ii) Sangue total humano WB/IL-1B: com aplicação do sangue criopreservado, (iii) Sangue total humano WB/IL-6, (iv) Células Mononucleares do sangue periférico (PBMC, sigla do inglês *peripheral blood mononuclear cells*)/IL-6 e (v) teste com a linhagem celular Monomac-6 (MM6)/IL-6. Entretanto, naquele momento, o ICCVAM considerou insuficiente o estudo de validação internacional, apontando três limitações principais: i) os dados não incluíram produtos biológicos ou dispositivos médicos, além de terem sido avaliados apenas para um número restrito de produtos farmacêuticos, ii) os dados *in vivo* não foram gerados com as mesmas amostras utilizadas no teste *in vitro*, já que foram coletados de banco de dados anteriores ao estudo, e iii) a necessidade de novos estudos comparando os dados *in vivo* com dados *in vitro*, de forma que comparações pudessem ser realizadas para endotoxina e outros agentes pirogênicos, assim ampliando o número de produtos avaliados. Desta forma, o ICCVAM recomendou que, embora nenhuma das cinco variantes do MAT pudesse ser considerada como um substituto completo para o teste *in vivo*, esse método alternativo poderia ser utilizado para detectar endotoxinas^{18,27}.



Em 2010, o MAT foi reconhecido pela Farmacopeia Europeia dentro destas recomendações⁷.

No Brasil, a primeira lei voltada exclusivamente para a regulamentação e a utilização de animais na experimentação e ensino foi a Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008²⁸, também conhecida como Lei Arouca, que criou o Concea. Este marco facilitou a formação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos ou BraCVAM (do inglês, *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*) em 2012 (Diário Oficial da União de 18 de janeiro de 2012)²⁹ e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012, que instituiu a RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC)³⁰. No entanto, mesmo com a criação de uma legislação e de órgãos fortemente direcionados ao conceito dos 3Rs, o MAT, apesar de ser um teste validado internacionalmente^{17,25,26}, de fazer parte da Farmacopeia Europeia e de ser considerado no meio científico como um potencial substituto do Teste de Pirogênio em coelhos, ainda não foi implantado no Brasil de forma eficiente. Portanto, o objetivo desta revisão foi avaliar, utilizando como marco temporal o reconhecimento do MAT pela Farmacopeia Europeia, o uso de métodos alternativos ao Teste de Pirogênio *in vivo*, apontando os seus avanços e perspectivas e, desta forma, buscando contribuir para que o MAT possa ser reconhecido e aceito para fins regulatórios no Brasil.

MÉTODO

Foi realizada uma revisão da literatura, na qual foi formulada a seguinte questão norteadora (hipótese): o que tem sido investigado no meio científico sobre os métodos alternativos para avaliação da contaminação pirogênica após o MAT ter sido preconizado pela Farmacopeia Europeia?

Seleção dos estudos

Foram selecionados artigos científicos através de uma busca nos bancos de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS - <http://brasil.bvs.br/>), no período entre setembro e outubro de 2017, utilizando as terminologias cadastradas como descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e *Medical Subject Headings* (MeSH) da U.S. *National Library of Medicine*. Os descritores utilizados foram (i) Pyrogens, (ii) Alternative Methods, e (iii) Validation.

Critérios de inclusão e exclusão

Os descritores foram cruzados e, após a leitura dos resumos, os artigos foram selecionados a partir do critério de inclusão “estar relacionado ao uso de métodos alternativos ao teste de pirogênio”. Os fatores de exclusão foram: i) artigos anteriores a 2010, isto é, os publicados entre janeiro de 2010 e outubro de 2017; ii) abordando exclusivamente o teste do LAL por ser este considerado um teste para endotoxina; iii) assuntos não relacionados (doenças específicas não relacionadas à detecção pirogênica, incluindo aspectos epidemiológicos, mecanismo de ação e tratamentos específicos, assim como, estudos relacionados ao meio ambiente - presença de pirogênios em água e solo,

iv) idioma (outros que não em inglês, espanhol e português), e v) artigos repetidos entre os cruzamentos dos descritores na mesma base de dados e entre as bases de dados.

Caracterização dos estudos

Após os cruzamentos dos descritores, os artigos selecionados foram separados por assuntos, buscando-se, desta forma, contemplar o maior número de informações. Os artigos selecionados foram categorizados da seguinte forma: (i) Aplicabilidade do MAT (ii) Comparação *in vivo* e *in vitro* (iii) Validação e, (iv) Artigos de revisão.

Avaliação crítica dos resultados

Foram separados os principais desfechos e recomendações de cada artigo, no qual buscou-se compreender, após uma confrontação dos dados, os principais fatores relacionados à limitação do uso do MAT, identificando as vantagens e desvantagens encontradas, assim como os produtos mais utilizados e os novos campos de aplicação dos métodos dentro da Biotecnologia.

RESULTADOS

Seleção dos Artigos

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 21 artigos pela busca na base de dados da BVS e 21 pelo PubMed, totalizando 42 artigos publicados a partir do ano de 2010. Após avaliação dos artigos repetidos entre as bases foram selecionados no total 24 artigos (Figura).

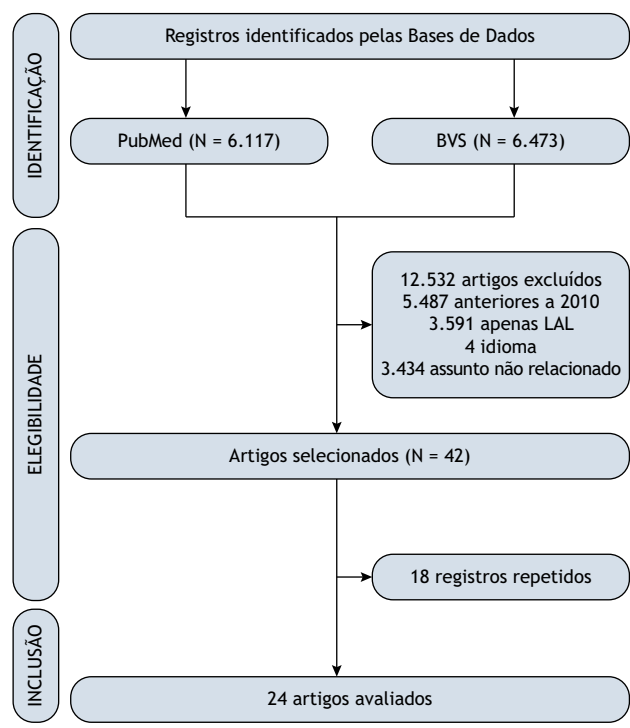


Figura. Fluxograma da busca e seleção de artigos, de acordo com o PRISMA Statement para revisões sistemáticas³¹.



Os artigos selecionados receberam códigos de identificação de A1 a A24 de acordo com o ano de publicação, período e país (Tabela 1). O período de publicação dos artigos foi de 2011 a 2017. As publicações ocorreram em vários países, sendo Alemanha e Brasil os com maior participação no número de publicações.

Caracterização dos estudos

Os artigos selecionados (A1 a A24) foram classificados por assunto, considerando-se, portanto, os principais pontos abordados (Tabela 1). A maior parte dos artigos científicos foi relacionada ao uso do MAT e desafios para sua ampla difusão (N = 8), seguidos dos artigos que fizeram uma avaliação em paralelo do MAT em relação ao Teste de Pirogênio *in vivo* (N = 7), alguns estudos sobre o processo de validação (N = 5) e estudos de revisão (N = 5) (Tabela 2).

Uso do MAT e desafios para sua ampla difusão

Foram selecionados oito artigos que versavam sobre a utilização do MAT, sendo a maior parte destes relacionados ao uso de novas fontes de monócitos, tais como as células monocíticas do sangue periférico, PBMC recém-obtidas, criopreservadas^{32,33,34,35,36} (A2, A8, A15, A20, A23) ou sangue total bovino^{37,38} (A10 e A11).

Stang et al.³⁹ (A9) apresentaram uma combinação do MAT utilizando sangue total humano com um sistema de incubação dinâmica na superfície de dispositivos médicos que proporcionou resultados altamente sensíveis para a detecção de lipopolissárido (LPS) e ácido lipoteicoico (ALT). Com o uso do novo sistema, foi possível detectar a contaminação no próprio dispositivo e não no seu eluído, como realizado nos testes de Pirogênio *in vivo* e LAL, além da redução do tempo de execução do MAT.

Os demais artigos foram relacionados ao uso de outras fontes de monócitos além do sangue total humano devido à dificuldade de obtenção do sangue de doadores, risco de flebotomia e possíveis alterações na liberação de citocinas no *pool* de doadores quando utilizado sangue total humano. Lekshmi et al.³² (A2) avaliaram o uso de PBMC criopreservadas em comparação ao uso do sangue humano, testando diferentes grupos sanguíneos, tanto para LPS (5UE) quanto para ALT (1µL). Os autores não encontraram diferenças significativas na liberação de IL-18 para PBMC em diferentes grupos sanguíneos. Além disso, IL-18 foi dependente da concentração de linfócitos. Desta forma, foi concluído que o sistema de linfócitos isolados pode ser utilizado como alternativa ao ensaio de pirogênios *in vivo*. Koryakina et al.³³ (A8), também propuseram a utilização de PBMC a partir de filtros leucocitários que são utilizados para a separação de sangue em centros de doação de sangue, e que acabam sendo considerados como resíduos biológicos. Foram utilizados diferentes tipos de pirogênios (endotoxina de referência da USP; LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; Peptidoglicana - *S. aureus*; um ligante sintético PAM-3CSK4 e Flagelina de *Bacillus subtilis*), avaliando a ligação deles aos diferentes receptores semelhantes a Toll (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) e seus respectivos mecanismos de ação. A metodologia foi validada de forma intralaboratorial, assim como exemplos da aplicação prática do uso de PBMC criopreservadas

para o MAT com amostras de drogas e vacinas. Solati et al.³⁴ (A15) avaliaram a liberação de IL-6 como resposta, após contaminar artificialmente um *pool* de PBMC criopreservadas com LPS e pirogênios não endotoxinas. O estudo demonstrou que diferentes *pools* de PBMC, frescos e criopreservados, tinham sensibilidade comparável, sendo altamente sensível, específico e reprodutível para quantificar contaminações pirogênicas em produtos farmacêuticos parenterais. Nordgren et al.³⁵ (A20) demonstraram o uso de PBMC criopreservadas e isoladas a partir das câmaras do sistema de leucoredução (LRSCs), um subproduto prontamente disponível da aferese plaquetária, como fonte de monócitos para o MAT. A validação intralaboratorial foi realizada por comparação direta com as duas fontes de monócitos primários mais comumente empregadas: WB e PBMC de sangue fresco, avaliando sua capacidade de detectar diferentes pirogênios (LPS, Pam3CSK4, ALT, Peptidoglicana, Poly (I:C) e Flagelina), semelhantes aos utilizados por Koryakina et al.³³. Foi avaliada a ligação das substâncias pirogênicas a diferentes TLRs, através da dosagem de IL-18 e IL-6. Todas as três fontes de células foram capazes de detectar os pirogênios incluídos no estudo com sensibilidades comparáveis, com exceção do Poly (I:C) para TLR3. O teste de WB produziu níveis de citocinas quantificáveis, porém significativamente mais baixos, com cada pirogênio testado do que qualquer das fontes de PBMC utilizadas. O último artigo selecionado foi Stoppelkamp et al.³⁶ (A23), o qual avaliou diferentes fontes de células monocíticas (PBMC de culturas primárias frente a culturas de linhagens celulares monocíticas) e demonstrou um aperfeiçoamento do método, através da aceleração do tempo de ensaio com o uso de propanol ou um aumento da produção de citocinas pelo aumento de temperatura de incubação. Este estudo apontou que, apesar de todos os monócitos serem capazes de detectar pirogênios, as células primárias eram mais sensíveis do que a linhagem celular monocítica, e que, o aumento da temperatura de incubação pode, finalmente, aumentar em até 13 vezes não apenas as respostas aos LPS, mas também a outros pirogênios.

Foram selecionados dois artigos^{37,38} (A10 e A11) que propuseram o uso do sangue bovino como fonte de monócitos como opção ao sangue total humano. Wunderlich et al.³⁷ utilizaram a detecção de IL-18, entretanto, os resultados apontaram que o sangue humano apresentou maior sensibilidade do que o bovino nos parâmetros avaliados. Em um segundo artigo, Wunderlich et al.³⁸ (2015) também avaliaram a detecção da prostaglandina E2 (PGE2) de sangue total bovino para testar a contaminação por endotoxina. Neste estudo, após incubação do sangue total bovino com LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (1,56 a 12,5 pg/mL), foi encontrado um aumento significativo da produção de PGE2 para as menores concentrações de LPS. Também foi testada a possibilidade de armazenar o sangue a 4 °C antes do uso o que produziu resultados positivos, pois a menor concentração de 1,56 pg/mL aumentou significativamente a produção de PGE2.

Comparação dos métodos *in vitro* e *in vivo*: avaliação em paralelo determinada pela Farmacopeia Europeia

Perdomo-Morales et al.¹⁹ (A1) compararam o Teste de Pirogênio *in vivo*, o MAT e o LAL paralelamente para 16 lotes de albumina



Tabela 1. Classificação dos artigos selecionados.

Classificação	Ano	Autor	Periódico	País
A1 Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin	2011	Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T.	ALTEX	Cuba
A2 Detection of interleukin -1β from isolated human lymphocyte in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid	2012	Lekshmi, Niveditha; Geetha, Chandrika S; Mohanan, Parayanthala V.	Indian J Pharmacol	India
A3 Validation and quality control of replacement alternatives - current status and future challenges	2012	Marcel Leist, Nina Hasiwa, Mardas Daneshian and Thomas Hartung.	Toxicology Research	Alemanha
A4 Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test	2013	Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al.	ALTEX	Alemanha
A5 Implementing the in vitro pyrogen test: one more step toward replacing animal experimentation	2013	Hennig, Ulrike.	Altern Lab Anim	Alemanha
A6 Alternative methods in toxicity testing: the current approach	2014	Araújo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM et al.	Braz J Pharm Sci	Brasil
A7 Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation	2014	Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Grossman JH, McNeil SE.	Nanomedicine	Estados Unidos
A8 Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test	2014	Koryakina, Anna; Frey, Esther; Bruegger, Peter.	J Immunol Methods	Suíça
A9 Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test	2014	Stang K, Fennrich S, Krajewski S, Stoppelkamp S, Burgener IA, Wendel HP, Post M.	J Mater Sci Mater Med	Alemanha
A10 Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT)	2014	Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M.	BMC Pharmacol Toxicol	Alemanha
A11 Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay	2015	Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M.	J Vet Pharmacol Ther	Alemanha
A12 Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test	2015	Gimenes, Izabela; Caldeira, Cristiane; Presgrave, Octavio Augusto França; de Moura, Wlamir Correa; Villas Boas, Maria Helena Simões.	Regul Toxicol Pharmacol	Brasil
A13 Soluble B-(1,3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: Implications for pyrogenicity tests	2015	Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero-Alejo V, Perdomo-Morales R.	Eur J Pharm Sci	Cuba
A14 Participation of Brazil in the World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: an increase in commitment to the Three Rs	2015	Presgrave, Octavio; Caldeira, Cristiane; Moura, Wlamir; Cruz, Mayara; Méier, Gisele; Dos Santos, Elisabete; Boas, Maria H V.	Altern Lab Anim	Brasil
A15 An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells	2015	Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D.	Innate Immun	Holanda
A16 The human whole blood pyrogen test - lessons learned in twenty years	2015	Hartung, Thomas.	ALTEX	Alemanha
A17 Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT)	2016	da Silva CC, Presgrave OA, Hartung T, de Moraes AM, Delgado IF.	Toxicol In Vitro	Brasil Estados Unidos e Alemanha
A18 International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods	2016	Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S et al.	Exp Med Biol	Itália Brasil China Japão Coreia do Sul Estados Unidos Reino Unido Canada
A19 More than 70 years of pyrogen detection: Current state and future perspectives	2016	Fennrich, Stefan; Hennig, Ulrike; Toliashvili, Leila; Schlensak, Christian; Wendel, Hans Peter; Stoppelkamp, Sandra.	Altern Lab Anim	Alemanha
A20 Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods	2016	Nordgren, Ida Karin.	J Immunol Methods	Reino Unido
A21 Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil	2016	Presgrave, Octavio; Moura, Wlamir; Caldeira, Cristiane; Pereira, Elisabete; Bôas, Maria H Villas; Eskes, Chantra.	Altern Lab Anim	Brasil Suíça
A22 Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines	2016	Vipond, Caroline; Findlay, Lucy; Feavers, Ian; Care, Rory.	ALTEX	Reino Unido
A23 Speeding up pyrogenicity testing: Identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT)	2017	Stoppelkamp S, Würschum N, Stang K, Löder J, Avci-Adali M, Toliashvili L et al.	Drug Test Anal	Alemanha
A24 Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay	2017	Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK.	Med Microbiol	Reino Unido



Tabela 2. Classificação dos artigos por assunto e os principais aspectos abordados.

Tema/Assunto	Classificação	Aspectos abordados
O uso do MAT e desafios para sua ampla difusão	A2, A8, A9, A10, A11, A15, A20, A23	Estudos que apontam o MAT como um potencial teste substitutivo, com o uso de diferentes fontes de monócitos e redução do tempo de execução.
Comparação <i>in vivo</i> vs. <i>in vitro</i>	A1, A7, A9, A12, A13, A17, A24 A3,A6	Regulamentação/legislação.
Validação	A14, A18, A21	Estes estudos seguiram a recomendação da Farmacopeia estudando a aplicabilidade do MAT em relação ao Teste <i>in vivo</i> para diferentes tipos de produtos injetáveis e pirogênicos não <i>in vitro</i> . Estes estudos avaliaram os processos de validação no Brasil e no mundo, assim como os aspectos regulatórios, legislação e participação em eventos.
Revisão	A4, A5, A16, A19, A22	Artigos que buscam avaliar os testes existentes, seus mecanismos de ação e sua aplicabilidade para o controle da qualidade de produtos biológicos, tais como vacinas. Também abordam o uso do MAT em áreas da Biotecnologia como as tecnologias celulares e avaliação da qualidade do ar.

sérica humana. Verificou-se que todos os lotes de albumina estavam contaminados com (1,3)- β -glucanas, que interferem com o LAL. A adição de polimixina B ao MAT demonstrou que os lotes pirogênicos foram principalmente contaminados com endotoxinas. No entanto, o LAL falhou ao detectar um deles. As concentrações equivalentes de endotoxina obtidas utilizando a leitura de IL-6 foram geralmente superiores àquelas que utilizam IL-1 β , provavelmente devido à indução direta de liberação de IL-6 de monócitos por (1,3)- β -glucanas. Também foi encontrada uma boa correlação entre o Teste de Pirogênio *in vivo* e o LAL. Um outro estudo, conduzido por da Silva et al.³ (A17), avaliou a aplicabilidade do MAT para 43 lotes de soros hiperimunes anteriormente testados no teste de pirogênicos. Os resultados mostraram que MAT apresentou 100% de sensibilidade (nenhum falso-negativo) e aproximadamente 85% de especificidade (15% falso-positivos). Os autores ressaltaram que estes resultados discordantes ocorreram nos casos de repetição do Teste de Pirogênio *in vivo* com resultado final negativo, onde o MAT apresentou resultado positivo. Os dados de Silva et al.³ apontaram que, devido à variabilidade biológica, os animais podem não detectar contaminações na dose limite, demonstrando, portanto, a maior sensibilidade do MAT nestes casos.

Dobrovolskaia et al.⁴⁰ (A7) avaliaram o desempenho do LAL cromogênico turbidimétrico e LAL gelificação na detecção de endotoxinas em nanoformulações de grau clínico. A interferência de nanopartículas com o teste LAL foi relatada para coloides metálicos, poliméricos nanopartículas, nanocristais e lipossomas. Portanto, os bioensaios, como o MAT, são úteis para verificar dados discrepantes no LAL, no entanto, a aplicabilidade desses testes é limitado a nanoformulações que não contêm agentes citotóxicos, uma vez que estes inibem a detecção de endotoxina.

A avaliação de pirogênicos não endotoxina, usando a avaliação em paralelo *in vivo* e *in vitro*, foi apresentada por Gimenes et al.⁴¹ (A12), e Pardo-Ruiz et al.⁴² (A13). O primeiro artigo avaliou as respostas pirogênicas induzidas por ALT (de *S. aureus* do Teste de Pirogênio *in vivo* e o MAT induzidas por ALT de *S. aureus*. Diferentes concentrações de ALT foram testadas pelo MAT em paralelo ao teste de pirogênio demonstrado que o MAT foi mais sensível do que o Teste de Pirogênio na detecção do ALT⁴¹. Pardo-Ruiz et al.⁴² determinaram a influência de (1,3)- β -glucanas na resposta de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS no MAT e no teste

de pirogênicos, avaliando assim, o efeito resultante no resultado de cada teste. Verificou-se que as (1,3)- β -glucanas provocaram a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , mas não o suficiente para classificá-las como pirogênicas de acordo com o MAT. As mesmas amostras de (1,3)- β -glucanas não foram consideradas pirogênicas no Teste de Pirogênio *in vivo*, mas, aumentaram significativamente a resposta de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS no MAT, de tal forma que as amostras que contêm concentrações não pirogênicas de LPS tornaram-se pirogênicas. Por outro lado, as (1,3)- β -glucanas não tiveram efeito sobre as doses de LPS sub-pirogênicas no teste *in vivo*, mas surpreendentemente, inibiram a resposta febril induzida por LPS. Portanto, enquanto as (1,3)- β -glucanas podem mascarar a atividade pirogênica do LPS nos coelhos, elas exercem uma superestimulação de citocinas pró-inflamatórias no MAT. Assim, o MAT proporciona maior segurança, pois evidencia uma resposta biológica indesejada, que não é completamente controlada e é negligenciada no teste em animais.

Por fim, Abate et al.⁴³ (A24) compararam MAT, LAL e rFC (Fator recombinante C sintético), propondo o rFC (PyroGene[®]) como um novo sistema de detecção de LPS simples, específico e sensível. O rFC detectou a maioria das estruturas de LPS em quantidades de picogramas e a potência do LPS não foi diferente da medida pelo LAL. No entanto, as reatividades de *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Bordetella pertussis* e *P. aeruginosa* diferiram significativamente entre estes ensaios. A análise de correlação em pares revelou que apenas o teste de PyroGene[®] produziu uma correlação positiva significativa com a liberação de IL-6 com o MAT.

Processo de validação dos métodos alternativos

De 2010 até hoje, foram selecionados quatro artigos^{44,45,46,47} (A3, A14, A18, A21) relacionados ao processo de validação de métodos alternativos para detecção de contaminação pirogênica. Leist et al.⁴⁴ (A3) abordaram a importância da validação de um novo método, na qual o pré-requisito de todos os esforços deve ser a padronização e a documentação do teste. Isso inclui também a aplicação de medidas de garantia de qualidade, como as Boas Práticas de Cultivo Celular (GCCP, do inglês *Good Cell Culture Practice*) e de Boas Práticas de Laboratório (GLP, do inglês *Good Laboratory Practice*). Os três principais requisitos básicos



a serem cumpridos também foram descritos: (a) reprodutibilidade: deve ser repetitiva por qualquer pessoa especialista na técnica e em qualquer local; (b) relevância científica: a razão para a validação deve ser clara e, o mais importante, deve ser incorporado em um contexto biológico plausível, (c) hipótese, definição clara do que se deseja obter para se ter uma predição do modelo aplicado. Assim como, as quatro etapas para a validação de um modelo substitutivo animal: (aa) sistema biológico; (bb) esquema de exposição, (cc) ponto final do ensaio; (dd) procedimento de análise de dados/modelo de previsão. Este é um passo importante, já que o procedimento de análise de dados ou modelo de previsão de um método alternativo deve ser formalizado como um modelo de previsão, com capacidade para produzir resultados que se correlacionam bem com a realidade. Este estudo também demonstra, entre outros testes substitutivos, a importância de substituição do Teste de Pirogênio *in vivo* pelas cinco variantes do MAT, afirmando sua capacidade para detectar pirogênios, e podendo levar a uma substituição completa do teste de coelho no futuro próximo.

Barroso et al.⁴⁶ (A18) avaliaram o desenvolvimento e a validação de alternativas científicas para testes em animais, não somente a partir de uma perspectiva ética (implementação de 3Rs), mas também na tomada de decisão de avaliação de segurança com o uso de informações mecanísticas de maior relevância para seres humanos. Para ser eficaz nesses esforços, foi ressaltada a importância de uma boa interação entre dos centros de validação mundiais, a indústria, os órgãos reguladores, a academia e outras partes interessadas que assegurem uma forte cooperação internacional, colaboração intersetorial e intensa comunicação no projeto, execução e revisão por pares de estudos de validação. Essa abordagem pode acelerar a aceitação internacional de métodos pelas autoridades reguladoras e sua implementação e uso pelas partes interessadas. Também permite alcançar maior eficiência e eficácia, evitando a duplicação de esforços e alavancando recursos limitados. Os autores também ressaltam a criação em 2009 da Cooperação Internacional em Métodos de Teste Alternativos (ICATM), composta por centros de validação da Europa, EUA, Canadá e Japão. Vale ressaltar que o ICATM foi mais tarde acompanhado pela Coreia do Sul, em 2011, e atualmente conta também com o Brasil e a China como observadores.

No Brasil, Presgrave et al.⁴⁵ (A14) publicaram um levantamento dos grupos de pesquisa que estão atuando na área de métodos alternativos. Os autores apontam que a maioria destes grupos já trabalha no tema há algumas décadas, mas de forma isolada. Apesar dos problemas, desde o Terceiro Congresso Mundial sobre Alternativas e Uso Animal nas Ciências da Vida (WCs), os pesquisadores brasileiros têm participado fortemente não só na apresentação de pôsteres, mas também por apresentações orais e até mesmo no Comitê de WCs. O Brasil foi o único país sul-americano que participou do Painel de Avaliação do Programa no WC7 (25 especialistas da Europa, 15 da América do Norte, três da Ásia, um da Oceania e um da América do Sul). No WC9, o Brasil alcançou uma de suas maiores participações apresentando 41 resumos e nove apresentações orais. O estudo deixa claro o aumento da participação em eventos internacionais mostrando

que o Brasil é um parceiro poderoso para colaborações internacionais no campo de métodos alternativos. Em outro artigo, Presgrave et al.⁴⁷ (A21) demonstraram a importância do estabelecimento de regras definidas do processo de validação, propondo um modelo seguindo o guia 34 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*)⁴⁸ e aos moldes dos outros centros de validação. Dentro deste processo, o BraCVAM possui papel central, identificando e/ou recebendo solicitações de partes interessadas em enviar os testes para validação, e coordenando ou organizando os estudos de validação dos ensaios selecionados. Um grupo gestor supervisiona o estudo de validação, e os resultados obtidos devem ser revisados por um Comitê de Revisão Científica *ad hoc*, organizado sob a supervisão do BraCVAM. Com base no resultado da revisão pelos pares, o BraCVAM prepara as recomendações sobre o método validado, que será enviado ao Concea, que finaliza o processo sendo o responsável pela adoção regulatória de todos os métodos de teste validados no Brasil, após uma consulta pública aberta. Desta forma, os autores concluem que o trabalho em conjunto entre o Concea, o BraCVAM e a RENAMA contribuem significativamente para o desenvolvimento dos métodos alternativos no Brasil.

Araujo et al.⁴⁹ (A6) abordaram a validação e o controle da qualidade dos métodos alternativos no Brasil e no mundo. A revisão foi baseada principalmente no processo de validação, destacando o papel dos principais órgãos regulatórios e centros de validação, considerando iniciativas governamentais, estudos baseados na filosofia dos 3Rs, as iniciativas para o avanço de métodos alternativos, e uma descrição dos principais métodos alternativos utilizados. Os autores ressaltaram a importância do BraCVAM na incorporação de novas metodologias, principalmente na validação por captura, e assim, o desenvolvimento de novos métodos para avaliação da segurança das substâncias. O estudo ressalta que os animais ainda são necessários em algumas áreas e que nem todos os testes *in vitro* conseguem prever de forma confiável a toxicidade *in vivo*. Portanto, tanto a padronização quanto a validação e a implementação de métodos alternativos exigem o envolvimento de várias agências reguladoras, que devem assumir a responsabilidade para orientar o processo de desenvolvimento de novas metodologias.

Artigos de revisão: comparação entre os métodos e necessidade de novos campos de aplicação

Hasiwa et al.⁴ (A4) apontaram que o MAT foi capaz de cobrir a totalidade dos possíveis pirogênios relevantes para os seres humanos e que não foram incluídos nas validações sobre o MAT da última década. Nesta revisão, foram agrupadas evidências da literatura publicada, dados não publicados e os resultados do estudo de validação internacional mostrando evidências científicas que o sangue total detecta de forma confiável os pirogênios não endotoxinas, sendo desnecessários novos estudos de validação. Os autores destacaram que, apesar do LAL ter sido um avanço significativo, substituindo o teste de coelho que era caro e propenso a erros, o LAL não reflete a reação da febre humana, devido a um mecanismo subjacente completamente diferente,



que é o principal indicador da resposta humana em relação a substâncias pirogênicas. Aponta que não há correlação da atividade LAL com a expressão de citocinas em células mononucleares. Outra desvantagem levantada pelos autores, diz respeito ao fato do LAL ser utilizado para amostras líquidas, criando dificuldades para as análises de materiais sólidos, como os dispositivos médicos, dos quais apenas as soluções de rinsagem podem ser testadas. Da mesma forma, o ensaio tem problemas com fluidos de diálise, lipossomas, nanopartículas e tecnologias celulares. As drogas que interferem com o sistema de coagulação, isto é, através da inibição ou aumento (alto teor de proteínas, proteases), não podem ser testadas pelo LAL. A cascata de reações do LAL também é desencadeada pelas (1,3)- β -glucanas e outros polissacarídeos, por exemplo, a partir de materiais filtrantes de celulose, o que pode resultar em falso-positivos. Vale ressaltar a análise aprofundada dos mecanismos de interação dos diferentes tipos de pirogênios aos TLRs da superfície dos monócitos e os vários relatos de reações clínicas adversas de febre em pacientes, por exemplo, pela administração de albumina sérica humana e produtos de diálise, com resultados anteriores satisfatórios (“sem pirogênio”) pelo LAL e/ou o Teste de pirogênio *in vivo*, porém insatisfatórios pelo MAT (“com pirogênio”). Portanto, segundo os autores, tendo em vista o conhecimento acumulado, o MAT pode ser utilizado na avaliação do controle da qualidade de forma segura e confiável não havendo para isso a necessidade de novos estudos de validação.

Henning⁵⁰ (A5) abordou um novo aspecto sobre o uso do MAT no que diz respeito ao regulamento mais importante para a indústria farmacêutica as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e as Boas Práticas de Fabricação. O estudo destaca a importância do MAT para avaliação dos dispositivos médicos como alternativa ao uso de animais, já que estes podem ser regulados separadamente por diretrizes ISO, onde são aplicadas a BPL. Desta forma, pode-se detectar todos os pirogênios antes restritos a endotoxinas, possibilitando a disponibilidade de dados mais relevantes para calcular os riscos relacionados à saúde. Hartung⁵¹ (A16) publicou um estudo retrospectivo sobre os últimos vinte anos do MAT desde que este foi descrito pela primeira vez. O artigo analisa seu processo de desenvolvimento, o *status* do teste, bem como os desafios e oportunidades perdidas, como sua implementação em tecnologias celulares, incluindo transfusões de sangue e dispositivos médicos, e sua relevante contribuição na avaliação de pirogênios no ar, e assim na prevenção de doenças pulmonares obstrutivas crônicas e asma infantil. Outro ponto importante foi o aumento do número de animais utilizados para o teste de pirogênios, que aumentou em cerca de 10.000 para 170.000 na União Europeia desde a aceitação do MAT em 2010. Isso foi devido ao fato da Farmacopeia Europeia ter introduzido o teste para parenterais de pequenos volumes (até 25 mL), no qual muitos destes produtos são lipofílicos e não podem ser testados em LAL e, portanto, são testados no teste de pirogênio. Segundo o autor, até agora não foi encontrado nenhum produto que não pudesse ser testado por, pelo menos, uma das variantes do MAT, que não podem ser testados nos coelhos ou no LAL, tais como tecnologias celulares, materiais sólidos ou substâncias citotóxicas. E ainda, segundo o autor, não há razão para o sangue humano ser

considerado um fator limitante para utilização do MAT em larga escala, dado que a doação de sangue de 500 mL é suficiente para mais de 50.000 testes.

No ano seguinte, Fennrich et al.¹⁵ (A19) apresentaram uma complexa revisão sobre os últimos setenta anos do teste de pirogênio, destacando a importância do seu uso no controle da qualidade de produtos injetáveis. Ressaltou seu uso para a detecção de endotoxinas e não endotoxinas que não são eliminados nos processos de esterilização tradicionais e que podem causar efeitos adversos no homem. Fez uma comparação histórica sobre o Teste de Pirogênio *in vivo*, o LAL (gelificação/cromogênio e turbidimétrico) e o MAT, ressaltando a importância do MAT e o seu potencial de método substitutivo principalmente para dispositivos médicos e a contaminação do ar, nos quais o LAL e o teste de pirogênios não podem ser aplicados ou limitados (uso do eluente no caso dos dispositivos médicos, por exemplo). Ressaltou que o MAT pode ser usado em contato direto com o artigo de saúde e estudos desta natureza devem ser estimulados, de forma que possam ser revistos valores de referência levando em consideração o tipo de artigo em saúde e sua aplicação. Ressaltou também a importância do MAT para a detecção de pirogênios em produtos biológicos, principalmente em lotes de vacinas como a vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B onde normalmente os resultados do LAL são inconsistentes devido a presença de não endotoxinas como os toxoides (*Clostridium diphtheriae* e *Clostridium tetani*). Um outro aspecto importante são os aprimoramentos para o teste de endotoxina através do uso do rFC. Existe atualmente uma grande preocupação com a utilização do *L. polyphemus*, já que a extração da hemolinfa causa uma taxa de mortalidade de 10% a 30% assim como um aumento da taxa de morbidade em até seis meses após a extração da hemolinfa. Além disso, o uso do rFC com detecção por fluorescência (PyroGene[®]) diminui a taxa de falso-positivos, já que não é induzido por outros pirogênios não endotoxinas, os quais ativam outra via semelhante (fator G) no LAL. Estudos são ainda escassos, uma vez que o rFC ainda não pode ser usado para misturas complexas (heterogêneas) por ser susceptível a interferentes. Um outro *kit* de rFC (EndoLISA[®]) tem sido usado com bons resultados para misturas heterogêneas, entretanto ainda apresenta alguns resultados falso-positivos.

O artigo mais recente foi publicado por Vipond et al.⁵² (A22), buscando a avaliação das limitações de utilização do teste de pirogênio para vacinas contendo vesículas de membrana externa. Segundo os autores, o uso de animais não é adequado como teste de segurança para esses produtos devido aos altos níveis de endotoxina presentes na vacina que geram uma resposta pirogênica em coelhos quando administrados sem diluição por via intravenosa. Se o Teste de Pirogênio *in vivo* for usado para medir o conteúdo de pirogênios de uma vacina contendo vesículas de membrana externa (OMVs, sigla do inglês, *Outer Membrane Vesicles*), a dose de desafio ($\mu\text{g}/\text{kg}$) utilizada deve ser a dose máxima não pirogênica obtida para lotes considerados seguros (não reativos ou aceitáveis) em testes clínicos. O raciocínio dessa abordagem é que o teste deve discriminar um lote que é mais pirogênico do que aqueles usados em ensaios clínicos. O seu uso como teste de consistência também é ambíguo, uma



vez que o teste é qualitativo e não quantitativo, além da variabilidade do modelo animal. Além disso, há evidências de que a medição do aumento de temperatura dos animais ao longo de três horas não captura a resposta máxima de febre. Finalmente, o artigo considera o uso do MAT como um método alternativo, que fornece dados quantitativos em um sistema que mede respostas inflamatórias humanas e, portanto, poderia ser utilizado na lógica da análise de consistência para garantir a segurança, eficácia e qualidade de vacinas.

DISCUSSÃO

Apesar de a legislação europeia (Diretiva da EU 2010/63/EU)⁵³ e a legislação brasileira^{28,54} (Lei no 11.794/2008²⁹ e Lei no 9.605/1998²⁸) estarem firmemente baseadas no princípio dos 3Rs, o MAT ainda tem sido pouco utilizado como teste de pirogênio. Cabe ressaltar que a Resolução nº 37, de 6 de julho de 2009, da Anvisa⁵⁵ no seu art. 1º, explicita que na ausência de monografia oficial de métodos gerais inscritos na Farmacopeia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial da última edição de compêndios internacionais como a Farmacopeia Europeia, e desta forma, o MAT, poderia ser utilizado como método oficial no Brasil. Entretanto, o fato do MAT não ter sido inserido na Resolução Normativa nº 31/2016 do Concea¹⁴ pode ter contribuído para o seu uso atualmente limitado.

Apesar das vantagens do ponto de vista ético e de segurança na liberação de lotes de produtos injetáveis, ainda não há uma política de aceitação regulatória principalmente no Brasil como revisado por da Silva et al.⁵⁶ e Navega et al.⁵⁷, que reavaliaram o impacto do uso de animais e eficácia do Teste de Pirogênio *in vivo* nesta área. O aspecto econômico também pode ser um diferencial do MAT em relação ao Teste de Pirogênio *in vivo*, no qual os custos de manutenção de biotérios são bem elevados. A monografia da Farmacopeia Europeia não exige kits de imunodeteção de marcas específicas, sendo aceito o uso de qualquer kit preparado no próprio laboratório, com os componentes adquiridos separadamente, o que pode reduzir os custos do MAT. Apesar do livre uso, desde 1996 vários licenciadores se interessaram na produção e comercialização de kits de imunodeteção *in vitro* específicos para a dosagem de citocinas no MAT como por exemplo, *Pyrocheck* 1996-2000; *In-vitro Pyrogen Test*, IPT 2001-2008; *PyroDetect* 2009-2011 e, *PyroDetect* Merck a partir de 2012. Estes kits eram praticamente idênticos, pois cada um continha o mesmo Elisa, materiais de referência de endotoxina que foram calibrados em relação ao padrão internacional e o LTA⁵¹. O LAL tem sido mais utilizado nas últimas décadas pelos reguladores e a indústria devido ao fato de ser mais rápido e apresentar menor custo.

No entanto, as variações na sensibilidade e especificidade do LAL para endotoxina e a preocupação com uso da hemolinfa do *L. poliphemus* estão representando desafios crescentes para a indústria de Biotecnologia. Isso exigiu a inovação usando a tecnologia recombinante de um teste alternativo para endotoxina, o rFC. Apesar de ter sido reconhecido na RN nº 31/2016 pelo Concea como um teste para avaliar a contaminação pirogênica,

o LAL pode ser apenas considerado como um substituto parcial do teste de Pirogênio *in vivo*, já que não detecta outros pirogênios¹⁴. A própria resolução define as aplicações específicas de cada um dos métodos, bem como a determinação de se destinarem à substituição total, à substituição parcial ou à redução. A necessidade de reconhecimento por parte do Concea de um teste que possa ser considerado como um substituto total, como o MAT, faria com que centenas de coelhos deixassem de ser utilizados tanto nas etapas de produção como no controle da qualidade de medicamentos, produtos biológicos e artigos de saúde^{51,56}. Apesar da Farmacopeia Europeia só recentemente ter reconhecido o MAT como substitutivo para a detecção de endotoxina⁸, os estudos selecionados demonstraram o potencial do MAT como o melhor método alternativo para detectar tanto a endotoxina como outras classes de pirogênios em medicamentos, vacinas e soros hiperimunes. Contudo, um dos principais obstáculos e a principal razão para a aplicação limitada do MAT estão relacionados à obtenção do sangue total humano. A metodologia para a criopreservação de PBMC pode contornar este problema podendo fornecer bancos de células para cada doador a partir dos filtros ou câmaras leucocitárias utilizadas como resíduos biológicos de banco de sangue. Outra opção seria o uso do sangue total bovino, embora neste caso haja a extrapolação de espécies e a perpetuação do uso de animais. O sangue total humano também pode ser obtido através de parcerias com bancos de sangue, já que a quantidade utilizada por teste é muito pequena (50 µL/poço = 4 poços 1 teste). Uma outra limitação pode ser o tempo de execução do MAT, que são de dois dias, o que tem sido contornado através de um aperfeiçoamento do método proporcionando aceleração do tempo de ensaio³⁵. Deve ser enfatizado que a Farmacopeia Europeia preconiza que para cada novo produto deve ser submetido uma validação específica em paralelo ao ensaio em coelho.

O ICCVAM²⁷, em 2008, quando recomendou o uso do MAT apenas como terceiro teste para endotoxinas apontou a falta de estudos para produtos biológicos e dispositivos médicos, além da detecção de pirogênios não endotoxinas. Pode ser observado que vários estudos experimentais foram realizados para soros hiperimunes, albuminas e dispositivos médicos, sendo que estes últimos demonstraram a superioridade do MAT por tornar possível o contato direto com o material e não do eluente, como no caso do LAL e do Teste de Pirogênio *in vivo*. No caso dos dispositivos médicos, o uso do MAT antes da aplicação clínica tem o potencial de reduzir significativamente as complicações associadas ao seu uso.

Os estudos de comparação também deixam claro que, no caso de produtos biológicos, o MAT possui resultados melhores quando comparados ao teste em coelhos e ao LAL, mesmo quando estes são preconizados por farmacopeias. Também o MAT demonstrou alta sensibilidade e especificidade na detecção de pirogênios não endotoxina como o ALT e β-glucanas, sendo este último interferente no teste LAL. Dependendo das propriedades do produto, deve ser considerado no resultado a possibilidade destes interferentes no produto ou mesmo a presença de vários contaminantes diferentes em variáveis proporções, sendo o MAT mais seguro nestas situações.



Novos campos de aplicação

A falta de reconhecimento do MAT por parte da área regulatória também impede o seu uso em várias áreas da Biotecnologia, nas quais a detecção de pirogênios é imprescindível e, muitas vezes nem o LAL e nem o Teste de Pirogênio *in vivo* são aplicáveis. Estes campos incluem nanoformulações de uso clínico, que podem ter suas propriedades alteradas pela presença de endotoxinas. O MAT também poderia ser utilizado para avaliar a contaminação em tecnologias celulares que incluem uma grande variedade de células, como condrócitos, células-tronco (hematopoiéticas), células de medula óssea e células sanguíneas, como linfócitos ativadas, e os produtos tradicionais de bolsas de eritrócitos e plaquetas. O risco de contaminação em transfusões e outros procedimentos poderia também ser reduzido com a implantação do MAT antes dos procedimentos. O uso do MAT para avaliação em próteses, implantes e luvas também evitariam grandes riscos a população. Um outro campo seria a utilização do MAT na avaliação da contaminação do ar estabelecendo novos parâmetros e uma abordagem da carga biológica contida no ar.

Avanços e perspectivas no Brasil

O MAT tem sido utilizado no Brasil para pesquisa, principalmente no campo de métodos alternativos. Entretanto, as dificuldades encontradas por grupos que trabalham de forma isolada têm dificultado a ampla implantação do método. A iniciativa da RENAMA/MCTIC, através de projetos via editais do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), possibilitou a criação de um consórcio, voltado para o “estudo da aplicabilidade, aprimoramento e disseminação nacional de métodos alternativos para a detecção da contaminação pirogênica em produtos para a saúde” (Projeto CNPq nº 442870/2016-7). Essa iniciativa, que envolve pesquisadores do setor regulatório, da academia e dos laboratórios produtores, demonstra avanço no âmbito nacional e a possibilidade de gerar dados e consensos relacionados à aplicabilidade de métodos *in vitro* para a avaliação da contaminação pirogênica em produtos biológicos, próteses dentárias, entre outros, assim como a formação de um banco de células monocíticas, que poderão ser utilizados por várias instituições. Os resultados do consórcio, portanto, poderão servir de base a solução de limitações e promoção da ampla utilização do MAT. Uma possível proposta a ser avaliada é a de que o LAL e o MAT sejam usados

em bateria, de forma que resultados negativos no LAL possam ser investigados no MAT, não só na pesquisa, mas sobretudo no controle da qualidade e liberação de lotes de produtos para a saúde. Espera-se, ainda, com as iniciativas apoiadas pela RENAMA/MCTIC: (i) a formação de recursos humanos especializados e com alta qualificação para o atendimento de demandas das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia, na realização de ensaios validados e padronizados; (ii) a transferência de tecnologia ao setor produtivo brasileiro, contribuindo para uma indústria mais competitiva, e capaz de transpor potenciais barreiras comerciais impostas por uma legislação internacional cada vez mais sensível a questões éticas no uso de animais em testes de insumos biológicos e, por fim, (iii) a ampliação da interatividade de grupos de pesquisa brasileiros, a partir de cooperações de diferentes instituições científicas, concatenadas e comprometidas na prática de uma ciência mais cooperativa, interdisciplinar e translacional.

Uma vez que a nossa legislação não permite usar um teste *in vivo*, uma vez que exista uma alternativa, é imprescindível a harmonização de procedimentos para que, como no caso do teste de pirogênio, métodos alternativos possam efetivamente ser utilizados para fins regulatórios.

CONCLUSÕES

A Resolução nº 37/2009 da Anvisa⁵⁵ permite que o MAT possa ser utilizado como monografia oficial, já que faz parte da Farmacopeia Europeia como método substitutivo para endotoxina. Tal reconhecimento auxiliaria para o avanço científico e bem-estar animal e contribuiria para a implantação do MAT como método alternativo dentro dos testes de segurança toxicológicos utilizados no controle da qualidade de produtos. Os artigos selecionados evidenciam que o MAT pode ser utilizado para uma variedade de produtos para saúde e com aplicação potencial para novas tecnologias, incluindo as tecnologias celulares, nas quais muitas vezes o LAL não pode ser usado. A utilização de métodos mais sensíveis, robustos e validados como alternativas ao uso de animais contribui para uma ciência mais ética, e implica na redução imediata do uso de animais, assim como nos custos e no tempo de liberação de laudos analíticos para o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e lotes de produtos para exportação ou uso em Programas governamentais, como por exemplo, o Programa Nacional de Imunizações (PNI-MS).

REFERÊNCIAS

1. Williams LK. Endotoxins: pirogens, LAL testing and depyrogenation. 2.ed. New York: Marcel Dekker; 2007.
2. Melandri V, Faria G, Caldeira C, Presgrave O. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. *Universitas Cienc Saúde*. 2010;8(2):69-95. <https://doi.org/10.5102/ucs.v8i2.1150>
3. Silva CC, Presgrave OA, Hartung T, Moraes AM, Delgado IF. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicol In Vitro*. 2016;32:70-5. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.004>
4. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEx*. 2013;30(2):169-208. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>



5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Pirogênios. In: Farmacopeia brasileira. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa, 2010. Pirogênios, Vol. 1, p. 229-30.
6. U. S. Pharmacopeia. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2009. Pyrogen test, .32/NF 27.
7. Council of Europe. European Pharmacopoeia Commission. Monocyte activation test: general method 2.6.30. 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2010.
8. Council of Europe. European Pharmacopoeia Commission. Monocyte activation test: general method 2.6.30. 9th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017.
9. Hort EC, Penfold WJ. The dangers of saline injections. *BMJ*. 1911;2(2659):1589-91. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2659.1589>
10. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Baltimore: Johns Hopkins University; 1959.
11. Levin J, Bang FB. A. Description of cellular coagulation in the limulus. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1964;115:337-45.
12. United States Pharmacopeia, National Formulary. United States pharmacopeia. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 1980.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira. 4a ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 1996.
14. Brasil. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece o uso no país de métodos alternativos validados, que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. *Diário Oficial União*. 18 ago 2016.
15. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendel HP, Stoppelkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: current state and future perspectives. *Altern Lab Anim*. 2016;44(3):239-53.
16. Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction: the report and recommendations of ECVAM Workshop 43. *Altern Lab Anim*. 2001;29(2):99-123.
17. Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, Fennrich S, Poole S, Mistry Y et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):161-73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.010>
18. 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. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.4.265>
19. 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. <https://doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>
20. Poole S, Thorpe R, Meager A, Hubbard AR, Gearing AJ. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet*. 1988;1(8577):130. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90338-8)
21. Taktak YS, Selkirk S, Bristow AF, Carpenter A, Ball C, Rafferty B et al. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(8):578-82. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1991.tb03540.x>
22. Hartung T, Wendel A. Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol*. 1996;9(4):353-9.
23. Eperon S, Jungi TW. The use of human monocytoid lines as indicators of endotoxin. *J Immunol Methods*. 1996;194(2):121-9. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00073-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00073-7)
24. Eperon S, De Groot D, Werner-Felmayer G, Jungi TW. Human monocytoid cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus amoebocyte* lysate assay. *J Immunol Methods*. 1997;207(2):135-45. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00112-9)
25. Schindler S, Asmus S, Aulock S, Wendel A, Hartung T, Fennrich S. Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):89-100. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.019>
26. Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, Hoffmann S, Hennes K, Halder M et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. *J Immunol Methods*. 2006;316(1-2):42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>
27. 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 pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. Reserch Triangle Park: National Institute of Environmental Health Sciences; 2008 [acesso 01 de out 2017]. (NIH Publication, Vol. 8-6391) Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/pyrogen/TMER/PyroTMER2008.pdf>
28. Brasil. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 9 out 2008.
29. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz. Criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos: extrato de acordo de cooperação técnica. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012.
30. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. *Diário Oficial União*. 5 jul 2012.
31. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for



- systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med.* 2009;151(4):264-9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>
32. Lekshmi N, Geetha CS, Mohanan PV. Detection of interleukin -1B from isolated human lymphocyte in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(6):726-31. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.103269>
33. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods.* 2014;405:181-91. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.005>
34. Solati S, Aarden L, Zeerleder S, Wouters D. An improved monocyte activation test using cryopreserved pooled human mononuclear cells. *Innate Immun.* 2015; 21(7):677-84. <https://doi.org/10.1177/1753425915583365>
35. Nordgren IK. Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods. *J Immunol Methods.* 2016;428:42-9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.12.001>
36. Stoppelkamp S, Würschum N, Stang K, Löder J, Avci-Adali M, Toliashvili L et al. Speeding up pyrogenicity testing: identification of suitable cell components and readout parameters for an accelerated monocyte activation test (MAT). *Drug Test Anal.* 2017;9(2):260-73. <https://doi.org/10.1002/dta.1973>
37. Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. Pyrogen detection methods: comparison of bovine whole blood assay (bWBA) and monocyte activation test (MAT). *BMC Pharmacol Toxicol.* 2014;15(1):50. <https://doi.org/10.1186/2050-6511-15-50>
38. Wunderlich C, Schumacher S, Kietzmann M. Prostaglandin E2 as a read out for endotoxin detection in a bovine whole blood assay. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38(2):196-8. <https://doi.org/10.1111/jvp.12148>
39. Stang K, Fennrich S, Krajewski S, et al. Highly sensitive pyrogen detection on medical devices by the monocyte activation test. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Apr;25(4):1065-75. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5136-6>.
40. Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD, Grossman JH, McNeil SE. Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(12):1847-56. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.157>
41. Gimenes I, Caldeira C, Presgrave OA, de Moura WC, Villas Boas MH. Assessment of pyrogenic response of lipoteichoic acid by the monocyte activation test and the rabbit pyrogen test. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;73(1):356-60. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.07.025>
42. Pardo-Ruiz Z, Menéndez-Sardiñas DE, Pacios-Michelena A, Gabilondo-Ramírez T, Montero-Alejo V, Perdomo-Morales R. Soluble β -(1,3)-glucans enhance LPS-induced response in the monocyte activation test, but inhibit LPS-mediated febrile response in rabbits: implications for pyrogenicity tests. *Eur J Pharm Sci.* 2016;81:18-26. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.018>
43. Abate W, Sattar AA, Liu J, Conway ME, Jackson SK. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* ameobocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. *J Med Microbiol.* 2017;66(7):888-97. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000510>
44. Leist M, Hasiwa N, Daneshian M, Hartung T. Validation and quality control of replacement alternatives: current status and future challenges. *Toxicol Res.* 2012;1(1):8-22. <https://doi.org/10.1039/c2tx20011b>
45. Presgrave O, Caldeira C, Moura W, Cruz M, Méier G, Santos E et al. Participation of Brazil in the World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: an increase in commitment to the Three Rs. *Altern Lab Anim.* 2015;43(1):69-72.
46. Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S et al. International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods. *Adv Exp Med Biol.* 2016;856:343-86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33826-2_14
47. Presgrave OA, Moura W, Caldeira C et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation 838 in Brazil. *Altern Lab Anim.* 2016;44(1):85-90.
48. Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, 2005. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2005. (OECD. Series on testing and assessment, Vol. 34).
49. Araújo GL, Campos MAA, Valente MAS, Silva SCT, França FD, Chaves MM et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J Pharm Sci.* 2014;50(1):55-62. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
50. Hennig, Ulrike. Implementing the in vitro pyrogen test: one more step toward replacing animal experimentation. *Altern Lab Anim.* 2013;41(5):58-60.
51. Hartung T. The human whole blood pyrogen test: lessons learned in twenty years. *ALTEX.* 2015; 32(2):79-100. <https://doi.org/10.14573/altex.1503241>
52. Vipond C, Findlay L, Feavers I, et al. Limitations of the rabbit pyrogen test 853 for assessing meningococcal OMV based vaccines. *ALTEX;* 33(1): 47-53, 2016.
53. European Union. Directive 2010/63/Eu. On the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal. 22 sep 2010.
54. Brasil. Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções 760 penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial União. 13 fev 1998.
55. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 37, de 6 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. Diário Oficial União. 8 jul 2009.



56. Silva CC, Cruz M, Freitas JC, Presgrave O, Moraes A, Delgado IF. Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênios no controle da qualidade de produtos injetáveis. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):41-6. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00519>

57. Navega ECA, Silva CC, Presgrave OAF, Almeida AS, Delgado IF, Mattos KA. Métodos alternativos ao uso de animais para a detecção de pirogênio: oportunidades e desafios no controle da qualidade de produtos. *Arch Veter Sci*. 2015;20(4):71-9. <https://doi.org/10.5380/avs.v20i4.43739>

Agradecimentos

Projeto CNPq nº 442870/2016-7 - Consórcio para o estudo da aplicabilidade, aprimoramento e disseminação nacional de métodos alternativos para a detecção da contaminação pirogênica em produtos para a saúde. Bolsa CNPq: Processo: 380135/2017-5 - Chamada MCTIC/CNPq Nº 19/2016 - Apoio às Atividades da Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.