

# Aplicação de métodos alternativos ao uso de animais no desenvolvimento e controle da qualidade de produtos imunobiológicos no Brasil

## Application of alternative methods to the use of animals in the development and quality control of immunobiological products in Brazil

### RESUMO

Rafaela Küster Gon<sup>1,\*</sup> 

José Mauro Granjeiro<sup>II</sup> 

Isabella Fernandes Delgado<sup>I</sup> 

**Introdução:** Há décadas, a necessidade, o número e o potencial preditivo do uso de animais para fins de pesquisa, produção e controle da qualidade de diversos produtos vêm sendo questionados. **Objetivo:** Mapear os testes *in vivo* utilizados nos laboratórios públicos oficiais (LPO), verificando a aplicação ou não de métodos alternativos. **Método:** Os LPO foram identificados e convidados a responder um questionário de triagem para mapear os métodos alternativos utilizados por eles seguido de uma entrevista para avaliar o interesse em desenvolver um novo método alternativo, a aplicação do princípio dos 3Rs e a percepção dos fabricantes em relação à tendência da substituição por métodos alternativos. **Resultados:** Os LPO brasileiros reportaram dificuldades para a implementação de alternativas *in vitro*, entre elas a necessidade de adequação de infraestrutura, insuficiência de pessoal e falta de capacitação dos quadros técnicos. Alguns respondentes alegam a necessidade de sistematização dos trâmites burocráticos e regulatórios aplicáveis ao conceito dos 3Rs no campo de imunobiológicos. Todos os respondentes apresentaram interesse na implementação de alternativas *in vitro*, apontando vantagens como: redução de tempo e custo das análises, maior precisão de resultados, minimização de dificuldades inerentes aos testes *in vivo* e à manipulação de animais. **Conclusões:** Promover um cenário - sob o ponto de vista político, técnico e regulatório - mais propício para validação e implementação de métodos alternativos no Brasil contribuirá para a redução de custo e o tempo na liberação de lotes de produtos imunobiológicos. Há espaço para a redução do uso de animais em alguns testes *in vivo* utilizados na LPO, porém, há necessidade de investimento em infraestrutura e pessoal qualificado em testes alternativos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Métodos Alternativos; 3Rs; Laboratórios Públicos Oficiais; Controle da Qualidade; Produtos Imunobiológicos

### ABSTRACT

**Introduction:** For decades, the need, number and predictive potential of the use of animals for research purposes, production and quality control of various products have been questioned. **Objective:** To map the *in vivo* tests used in official public laboratories (LPO), verifying the application or not of alternative methods. **Method:** LPOs were identified and invited to answer a screening questionnaire to map the alternative methods used by them, followed by an interview to assess interest in developing a new alternative method, application of the 3Rs principle, and manufacturers' perception of regarding the trend of substitution by alternative methods. **Results:** Brazilian LPOs reported difficulties in implementing *in vitro* alternatives, including the need to adapt infrastructure, insufficient personnel and lack of training of technical staff. Some respondents claim the need to systematize the bureaucratic and regulatory procedures applicable to the concept of the

<sup>I</sup> Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>II</sup> Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Duque de Caxias, RJ, Brasil

\* E-mail: rafakg@gmail.com

Recebido: 05 out 2022

Aprovado: 13 mar 2023

**Como citar:** Gon RK, Granjeiro JM, Delgado IF. Aplicação de métodos alternativos ao uso de animais no desenvolvimento e controle da qualidade de produtos imunobiológicos no Brasil. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 2023, v.11: e02126. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.02126>



3Rs in the field of immunobiologicals. All respondents showed interest in implementing *in vitro* alternatives, pointing out advantages such as: reduction of time and cost of analyses, greater accuracy of results, minimization of difficulties inherent to *in vivo* tests and animal handling. **Conclusions:** Promoting a scenario - from a political, technical and regulatory point of view - more conducive to the validation and implementation of alternative methods in Brazil will contribute to the reduction of cost and time in the release of lots of immunobiological products. There is room for reducing the use of animals in some *in vivo* tests used in LPO, however, there is a need for investment in infrastructure and qualified personnel in alternative testing.

**KEYWORDS:** Alternative Methods; 3Rs; Official Public Laboratories; Quality Control; Immunobiological Products

## INTRODUÇÃO

O uso de animais em laboratórios para fins de pesquisa e desenvolvimento, bem como para testes rotineiros de controle da qualidade, é uma prática global. Contudo, questiona-se a real necessidade do uso de animais, o número de animais utilizados e o potencial preditivo e de transferibilidade dos resultados para seres humanos<sup>1,2,3</sup>. A experimentação animal continua a gerar preocupação pública e política em todo o mundo. Poucos países coletam e publicam estatísticas de uso de animais, mas este é um primeiro e essencial passo para a responsabilização pública e um debate informado, além de ser importante para a formulação de políticas e regulamentação eficazes. Espera-se que a implementação dos 3Rs (*reduction, refinement and replacement*, em português: redução, refinamento e substituição) resulte em um declínio no uso de animais, mas sem estatísticas regulares e precisas, isso não pode ser monitorado. Apesar da disponibilidade de métodos alternativos, os animais continuam a ser usados em nível global para diferentes escopos e em diferentes campos de estudo. Os principais objetivos dos experimentos em animais vivos são: adquirir conhecimentos biológicos básicos; descobrir e desenvolver medicamentos, vacinas e dispositivos médicos; realizar testes de segurança e controle da qualidade de medicamentos, de outros produtos químicos e de produtos de consumo; e fazer pesquisa ambiental e de educação<sup>4</sup>.

Um relatório disponibilizado em 2015 indicou que 37 países, para os quais existem estatísticas disponíveis (sendo eles: 30 da Europa, três da Ásia, dois da Oceania e dois da América do Norte), relataram o uso de 41,8 milhões de animais em laboratórios (definidos de acordo com a Diretiva da União Europeia 2010/63/UE; artigo 3.1) naquele ano<sup>5,6</sup>.

Abordagens alternativas para testes em animais vêm ganhando impulso com um número crescente de métodos obtendo aceitação regulatória graças, em grande parte, aos esforços de validação destes testes, que auxiliam na garantia de novos métodos e tecnologias alternativas para testes de toxicidade e controle da qualidade, como, por exemplo, modelos *in vitro*<sup>7</sup>.

Embora o senso comum aponte que metodologias *in vitro* possam representar uma opção promissora para a pesquisa em geral, e que essas alternativas possam vir a substituir um número considerável de métodos *in vivo*, há de se considerar que o processo de desenvolvimento e validação de novos métodos é laborioso e requer grande investimento de tempo, dinheiro e pessoal capacitado<sup>8,9,10</sup>.

Via de regra, os métodos alternativos quando comparados aos testes *in vivo* oferecem vantagens como menor custo e tempo reduzido de análise<sup>11</sup>. Os métodos *in vitro* apresentam como benefício o fato de serem menos sujeitos a interferentes como o próprio metabolismo do modelo em teste e condições ambientais (ruído, temperatura, umidade, luminosidade etc.), quando comparados aos modelos animais<sup>11,12,13</sup>. Além disso, métodos *in vitro* apresentam maior facilidade de disseminação para outros laboratórios<sup>14</sup>.

O conceito dos 3Rs é cada vez mais central para o planejamento, a conduta e a regulamentação de experimentos com animais<sup>15</sup>. A substituição de animais por métodos *in vitro* validados e outros métodos não animais é um objetivo apoiado pela sociedade e por legislação em muitos países<sup>16</sup>.

A ausência de estatísticas regulares e precisas, incluindo informações sobre tendências em uso animal, é um limitante no que se refere a um diagnóstico mais preciso e de âmbito mundial sobre a substituição de modelos *in vivo*<sup>17</sup>. Outro viés se refere ao uso limitado dos métodos alternativos, ainda que o desenvolvimento destes métodos esteja associado a avaliações de segurança e controle da qualidade. Muitas vezes os modelos alternativos são usados apenas como abordagem de triagem em pesquisas científicas e, em menor escala, para fins regulatórios. Esse cenário indica a importância de se entender os obstáculos na adoção e validação de métodos alternativos<sup>18,19</sup> por parte de instalações-teste que geram dossiês para registro de produtos regulados no escopo das boas práticas de laboratório<sup>20</sup>.

Este estudo objetivou mapear os testes *in vivo* utilizados nos laboratórios públicos oficiais (LPO) brasileiros, produtores de imunobiológicos (vacinas e soros hiperimunes), para verificar a aplicação ou não de métodos alternativos.

## MÉTODO

Inicialmente, em agosto de 2016, foi realizado um levantamento dos LPO produtores de imunobiológicos (soros hiperimunes e vacinas) no Brasil e identificado o portfólio de cada laboratório.

A coleta das informações ocorreu em duas etapas. Na primeira fase, entre o mês de setembro de 2016 ao mês de dezembro de 2016, um questionário de triagem (com dados relevantes quanto ao número de animais utilizados em testes laboratoriais) foi enviado e respondido por meio eletrônico pelo LPO. Na segunda fase, realizada no período entre os meses de janeiro



e fevereiro de 2017, uma entrevista presencial foi feita (com dados mais aprofundados quanto aos testes com uso de animais e com verificação quanto ao desenvolvimento, aplicação e averiguação de métodos alternativos) no próprio LPO, com registro de áudio e com a intenção de aprofundar os dados coletados inicialmente. A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (CAAE 61167716.2.0000.5262, parecer nº 1.828.973).

O questionário de triagem foi aplicado visando obter dados estratégicos para embasar a segunda etapa da pesquisa, tendo sido respondido por profissionais responsáveis pela aquisição e utilização de animais nos diversos setores dos LPO. As questões abordaram os métodos alternativos ao uso de animais utilizados no LPO e incluíram as seguintes questões: i. quais produtos necessitavam do uso de animais? ii. os testes necessários eram aplicados no desenvolvimento de novos produtos ou em testes rotineiros de controle da qualidade? iii. quais e quantos animais eram utilizados nos testes?

Na segunda etapa, complementando o questionário, a entrevista presencial ocorreu seguindo um roteiro em formato de formulário que focou em: i. protótipo de desenvolvimento de um novo método alternativo, ii. aplicação do princípio dos 3Rs, e iii. percepção dos fabricantes em relação à tendência da substituição por métodos alternativos e demais aplicações de métodos alternativos, em consonância com as políticas da Rede Nacional Brasileira de Métodos Alternativos (RENAMA). Os representantes de cada laboratório foram entrevistados juntos, em datas e horários previamente agendados, e o formulário foi utilizado como base para as perguntas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis LPO brasileiros participaram da pesquisa e o escopo do trabalho foi restrito aos produtores de imunobiológicos: vacinas e soros hiperimunes. Por questão de confidencialidade, os LPO são identificados pelas letras A, B, C, D, E e F.

Os LPO A, B, C, D, E e F produzem juntos 38 tipos de produtos imunobiológicos, sendo que 21 deles, listados na Tabela, utilizam animais em seus testes de controle da qualidade para liberação dos lotes. Também estão indicados na Tabela a descrição destes testes, a espécie e o número de animais necessários para a liberação de um lote de cada um desses produtos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FB).

Nesta pesquisa foi possível verificar que os LPO brasileiros realizam os testes de controle da qualidade de acordo com os requisitos da FB, a qual descreve as etapas fundamentais para a execução dos métodos, bem como a quantidade de animais utilizada em cada teste. Alguns laboratórios já utilizam métodos alternativos destacados na FB e na literatura, como por exemplo, o teste *in vitro* para avaliação da potência do soro antirrábico (técnica de rápida inibição de focos fluorescentes, RFFIT)<sup>21,22,23</sup>, validado em estudo entre o Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) e o Instituto Butantan<sup>24</sup>, o teste *in vitro* para avaliação da potência do componente antitetânico (método de inibição

de ligação da toxina, ToBI)<sup>21,25,26</sup> e o teste de endotoxina bacteriana *in vitro* (teste de lisado de amebócito *Limulus*, LAL)<sup>21,27</sup>.

É possível verificar que os testes de potência, realizado em 13 dos 21 imunobiológicos, e de pirogênio (realizado em 19 de 21) são os mais realizados, sendo o de potência o que demanda o maior número de animais por teste (por lote do produto).

Os testes de pirogênio são testes de segurança realizados na rotina de produção e controle da qualidade de produtos injetáveis, conforme exigência das agências regulatórias mundiais. Atualmente, existem três possibilidades de teste disponíveis: i) Teste de Pirogênio *in vivo*, realizado em coelhos<sup>21</sup>; ii) Teste de endotoxina bacteriana, que utiliza o extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus* preparado e caracterizado como reagente LAL<sup>21</sup>; e iii) sistemas de teste que utilizam sangue total ou monócitos humanos, denominados Teste de Ativação de Monócitos (MAT), previsto na Farmacopeia Europeia<sup>28</sup> e na literatura científica<sup>27,29</sup>. Os testes de pirogênio, utilizados em todos os LPO para a liberação de lotes produzidos dos imunobiológicos listados na Tabela, podem ser substituídos pelo LAL (substituição parcial)<sup>21</sup> e pelo MAT<sup>28</sup>. Contudo, o LAL está efetivamente implantado em três LPO para 16 produtos, o MAT em dois LPO para dois produtos e o LAL+MAT em apenas um LPO para um produto, os demais ainda são avaliados pelo Teste de Pirogênio *in vivo*.

Até a presente data, não há descrição do uso do MAT na FB e apenas cinco produtos imunobiológicos (vacina febre amarela, vacina antipoliomielite 1, 2, 3 inativada, *Haemophilus influenzae* tipo b, vacina influenza e vacina meningocócica grupo C) fazem uso exclusivamente do LAL para a detecção de pirogênio, por determinação de endotoxina bacteriana<sup>21,27,29,30</sup>. Esta lacuna regulatória, citada pelos LPO no presente estudo, representa grande dificuldade para os laboratórios produtores, pois geralmente somente a FB é utilizada como referência. Nas monografias das vacinas adsorvida difteria e tétano adulto (DT); difteria, tétano e pertussis acelular (DTP) e soro antitetânico a FB já faculta a utilização de testes *in vitro*<sup>31</sup> e a Resolução Normativa nº 45, de 22 de outubro de 2019, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), que reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, afirma que o teste de endotoxina bacteriana *in vivo* deve ser descontinuado até 25 de outubro de 2024<sup>32</sup>.

O teste de potência com utilização de animais é previsto para a liberação de lote de 21 dos imunobiológicos citados, dos quais apenas para os soros antitetânico e antirrábico (produzidos por três LPO) há método alternativo previsto na literatura: ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)<sup>21</sup> ou ToBI<sup>21</sup> (antitetânico) e RFFIT (antirrábico). O ToBI está implantado em um LPO enquanto o RFFIT está operacional nos três LPO que produzem soro antirrábico<sup>33,34</sup>. O ToBI também está em uso em um LPO para liberação de lote de vacina difteria e tétano adulto e infantil, substituindo o teste de potência. Para liberação de lote da vacina contra raiva, há referência ao teste de imunofluorescência em cultura<sup>21</sup>, no entanto não implantado no LPO. Em oposição, para o soro antiloxoscélico, um LPO refere o teste de cultura de células, porém sem referência na literatura de métodos alternativos.



Tabela. Imunobiológicos produzidos pelos LPO com os respectivos testes\* que utilizam animais.

Produtos imunobiológicos (soros hiperimunes e vacinas)	Testes que utilizam animais	Animais utilizados**
1 Soro antibotrópico (pentavalente)	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
2 Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotático	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
3 Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
4 Soro antituberculínico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
5 Soro anticrotático	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
6 Soro antidiftérico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
7 Soro antielapídico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
8 Soro antiescorpiónico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
9 Soro antilaquético	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
10 Soro antilonômico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
11 Soro antiloxoscélico	Potência	50 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
	Dose Mínima Necrosante	6 coelhos
12 Soro antirrábico	Potência	120 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
13 Soro antitetânico	Potência	100 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos
14 Vacina BCG	Reatividade cutânea	6 cobaias
	Micobactérias virulentas	4 cobaias
	Pirrogênio	3-8 coelhos
15 Vacina difteria e tétano adulto (dT)	Toxicidade específica	5-10 cobaias
	Toxicidade (reversão)	4 cobaias
	Pirrogênio	3-8 coelhos
16 Vacina difteria e tétano infantil (DT)	Toxicidade específica	5-10 cobaias
	Toxicidade (reversão)	4 cobaias
	Pirrogênio	3-8 coelhos
17 Vacina difteria, tétano e pertussis (DTP)	Toxicidade específica	5-10 cobaias
	Toxicidade (reversão)	4 cobaias
	Pirrogênio	3-8 coelhos
18 Vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b	Toxicidade específica	4 cobaias
19 Vacina hepatite B	Inocuidade	10 camundongos
	Imunogenicidade	40 camundongos
20 Vacina influenza	Pirrogênio	3-8 coelhos
	Inativação viral	10 embriões de galinha
21 Vacina raiva	Inativação viral	10 embriões de galinha
	Atividade imunogênica	16-30 camundongos
	Pirrogênio	3-8 coelhos

Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

\*testes referentes ao controle da qualidade para liberação de um lote; \*\*quantidade utilizada para liberar um lote.



Para toxicidade específica, toxicidade (reversão), inocuidade, imunogenicidade, atividade imunogênica, reatividade cutânea e micobactérias virulentas, não foi relatada a aplicação de métodos alternativos por nenhum dos LPO, bem como não constam testes sem uso de animais na FB (para os produtos relacionados).

No momento da pesquisa, o teste de toxicidade inespecífica para a liberação dos lotes de produtos biológicos já estava sendo abolido pelos LPO, mediante aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O banimento deste teste dos comêndios oficiais é baseado em estudos internacionais<sup>35</sup> e acompanha a tendência mundial de banimento de testes conduzidos em animais que pouco contribuem para a avaliação de segurança e eficácia de produtos<sup>36</sup>, como por exemplo o teste de avaliação de toxicidade aguda por DL50%. Neste sentido, o INCQS, após apreciação retrospectiva de seus resultados e com mais de 25 anos de experiência na emissão de laudos analíticos para a liberação de lotes de soros hiperimunes e vacinas para o Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), encaminhou ao Concea, no ano de 2016, uma recomendação pelo banimento do teste de toxicidade inespecífica em vacinas<sup>37</sup>. Um estudo retrospectivo a respeito do teste de toxicidade inespecífica em produtos biológicos analisados entre os anos 1999 e 2012 no INCQS demonstrou que este teste utilizava um grande quantitativo de animais sem a contrapartida de demonstrar claramente a segurança dos produtos em questão, o que compromete a aplicação dos 3Rs e apoia a decisão pelo banimento deste teste no processo de controle da qualidade de produtos biológicos<sup>38</sup>.

Segundo alguns entrevistados, dados provenientes de alguns estudos brasileiros já seriam suficientes para que alguns métodos alternativos fossem aceitos e difundidos para os demais LPO, como, por exemplo, o teste de endotoxinas bacterianas *in vitro* pelo LAL (para soros hiperimunes), o teste da potência biológica de soros antidiftéricos e antitetânicos e a avaliação da potência de soros antibotrópicos, pelo método ToBI, todos propostos por um dos LPO. Os dados levantados revelam que, caso o LAL e o ToBI sejam implementados por este LPO, cerca de 1.320 animais (entre coelhos, cobaias e camundongos) deixariam de ser utilizados por semana (levando em conta o número de lotes produzidos no momento da pesquisa).

Além disso, na entrevista, foram evidenciadas algumas iniciativas pontuais de pesquisas mais básicas, tais como as propostas em desenvolvimento pelo laboratório E, ou seja, o teste de avaliação da dose mínima necrosante do veneno loxocélico em cultura de células e o teste de potência do soro antiloxocélico por ELISA e cromatografia. Ainda, os LPO B e C registraram a necessidade de investimento em equipamentos e materiais a fim de viabilizar a implementação dos métodos alternativos já preconizados na FB (como o RFFIT). Só no LPO B, por exemplo, caso o RFFIT seja implementado para a potência do soro antirrábico, o uso de aproximadamente 4.400 camundongos por ano seria cessado e, com a implementação do ToBI para o teste de potência do soro antitetânico, o uso de 3.810 camundongos por ano seria descontinuado.

Os laboratórios apontam que os trâmites necessários para validar e implementar um método alternativo em potencial não estão bem

definidos, faltando melhores orientações relacionadas ao tema e maior relacionamento entre os laboratórios, de modo a encurtar a distância entre os LPO e os órgãos regulatórios. A necessidade de maior ênfase da FB nesta área, em conjunto com os órgãos envolvidos nos trâmites burocráticos, também é citada.

Cabe ressaltar que os soros hiperimunes e as vacinas são produtos largamente utilizados pela população brasileira e são considerados produtos de grande interesse pelo MS. Além do controle da qualidade efetuado pelos LPO, o INCQS faz análises lote a lote de soros e vacinas para o PNI, antes da distribuição destes produtos. Portanto, uma vez reconhecida a aplicabilidade de potenciais métodos alternativos, o número de animais poderia ser reduzido, ratificando os conceitos éticos e reduzindo o custo e o tempo das análises.

Também é importante destacar que os imunobiológicos produzidos pelos LPO, além do interesse brasileiro, podem ser exportados e, desta forma, é importante ratificar o papel do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) em estimular a condução dos estudos de métodos alternativos em consonância às tendências mundiais, o que, em termos internacionais, refletiria a credibilidade do Brasil no processo de produção e exportação destes produtos analisados dentro de padrões éticos e de qualidade.

A substituição da experimentação animal pelas metodologias alternativas existentes realizadas pelos LPO dependerá do contexto em que estas metodologias e estes laboratórios estejam inseridos. O desenvolvimento, a difusão de métodos e abordagens alternativas e sua aplicação no controle da qualidade e aceitação pelos órgãos reguladores estão em uma fase inicial, mas é possível verificar importantes avanços.

A disponibilização mundial dos métodos validados ocorre, geralmente, por meio dos guias da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD)<sup>39</sup> e/ou de farmacopeias<sup>21</sup>. As diretrizes de testes da OECD são uma coleção de métodos de teste, internacionalmente aceitos, que se concentra para determinar a segurança dos produtos químicos e preparações químicas<sup>40</sup>, portanto para produtos biológicos, a farmacopeia deve realizar o trabalho de propor novos métodos alternativos.

Alguns LPO estão ligados à RENAMA, que tem por missão promover o desenvolvimento, a validação e a implementação de métodos alternativos ao uso de animais, e que tem estimulado a implantação de métodos alternativos ao uso de animais por meio de treinamento técnico e a implementação de metodologias validadas<sup>41</sup>.

Todo processo de produção e controle da qualidade de produtos imunobiológicos, que necessitem em alguma de suas etapas, do uso de animais para experimentação, se beneficiará de estudos voltados à validação de métodos alternativos, uma vez que estes métodos poderão representar uma maior qualidade e especificidade na determinação de diversos efeitos, bem como uma redução de custo e de número de animais próximo a 70%<sup>42</sup>, além da abertura para o mercado internacional. A discussão sobre a utilização de animais na pesquisa, a intenção de redução do seu uso e o desenvolvimento e/ou validação de novas metodologias têm sido aos poucos introduzidos na realidade brasileira. Por esta





razão, torna-se de grande importância a discussão, a interação e a compilação de dados em torno deste tema.

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no estudo realizado permite constatar que todos os LPO elencados fazem uso de animais em testes de controle da qualidade para liberação do lote produzido. Poucos laboratórios estão com produtos em fase de desenvolvimento, mas, mesmo nesta fase, animais são utilizados para controle da qualidade. Alguns testes *in vivo* utilizados pelos LPO possuem métodos alternativos, como o teste de endotoxina bacteriana *in vitro* (LAL), teste de potência do soro antirrábico (RFFIT e ELISA) e teste de potência do soro antitetânico (ToBI), porém a implementação dos métodos alternativos pelos LPO é dificultada por falta de infraestrutura, pessoal qualificado, aspectos técnicos e de tempo para a implementação dos testes, entre outras. Ainda assim, os representantes dos LPO julgam ser necessário maior investimento nesta área.

Os métodos de avaliação de dose mínima necrosante por cultura de células para soro antiloxocélico e potência por ELISA e cromatografia para o soro antiloxocélico e soro antibotrópico são referidos como métodos promissores e deveriam ser alvo de estudos mais aprofundados. E os métodos para determinação da potência de soros hiperimunes, doseamento da fração diftérica,

doseamento da fração tetânica, para potência do soro antitetânico e para potência da fração botrópica pelo método ToBI e teste de pirogênio *in vitro* para soros hiperimunes (MAT e LAL) apresentam potencial para serem incorporados à FB.

O desenvolvimento de novos métodos, a validação de outros já propostos e a viabilidade da aplicabilidade dos métodos já contidos na FB devem ser considerados e fomentados pelos órgãos responsáveis pela implementação de métodos alternativos no Brasil. Esta adequabilidade viabilizará uma relevante redução no número de animais atualmente utilizados no controle da qualidade de produtos imunobiológicos.

Os dados pautados reforçam a necessidade do investimento financeiro e suporte de dados técnico-científicos e infraestrutura de modo a acelerar a implementação de metodologias alternativas para o uso de animais em escala industrial em produtos imunobiológicos produzidos pelos LPO brasileiros.

Há espaço para a redução do uso de animais para alguns testes *in vivo* utilizados nos LPO, porém há necessidade de investimento em infraestrutura e pessoal qualificado nos testes alternativos. Promover um cenário - sob o ponto de vista político, técnico e regulatório - mais propício para validação e implementação de métodos alternativos no Brasil contribuirá para a redução de custo e o tempo na liberação de lotes de produtos imunobiológicos.

## REFERÊNCIAS

1. Bravin JS, Maciel-Magalhães M, Pinheiro YSG, Gonçalves MAB, Ferraris FK, Amendoeira FC. Importância da inserção de grupo controle em ensaios utilizando animais de laboratório. *Vigil Sanit Debate*. 2021;9(1):117-22. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01433>
2. Rodrigues RPS, Soares LLS, Albuquerque WR, Neves CA, Mendonça IL. Bem-estar animal na pesquisa científica: revisão de literatura. *J Interdiscip Biocienc*. 2021;6(1):30-4. <https://doi.org/10.26694/jibi.v6i1.8738>
3. Kolar R. How long must they suffer? Success and failure of our efforts to end the animal tragedy in laboratories. *Altern Lab Anim*. 2015;43(2):129-43. <https://doi.org/10.1177/026119291504300206>
4. Haas SE, Ribeiro ACF, Martini E, Pereira MP, Freddo RRJ. Development of alternative activities to animal use in pharmacology education. *Ensino Pesqui*. 2019;17(3):1-15.
5. Vivisection Information Network. Updated: How many animals are used? *Animal Testing and Science - The Facts*. 2022 [acesso 22 jul 2022]. Disponível em: [http://vivisectioninformation.com/index4561.html?p=1\\_76\\_UPDATED-How-many-animals-are-used](http://vivisectioninformation.com/index4561.html?p=1_76_UPDATED-How-many-animals-are-used)
6. Taylor K, Alvarez LR. An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015. *Altern Lab Anim*. 2019;47(5-6):196-213. <https://doi.org/10.1177/0261192919899853>
7. Eskes C, Whelan M. Validation of alternative methods for toxicity testing. In: Crusio WE, Dong H, Radeke HH, Rezaei N, Steinlein O, Xiao J, editors. *Advances in experimental medicine and biology*. Cham: Springer; 2016.
8. Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Rev Bras Cienc Farmac*. 2004;40(3):289-99. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300004>
9. Abreu CLC. Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3 [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2008 [acesso 22 ago 2022]; Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9270>
10. Movia D, Bruni-Favier S, Prina-Mello A. *In vitro* alternatives to acute inhalation toxicity studies in animal models: a perspective. *Front Bioeng Biotechn*. 2020;8:1-10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00549>
11. Santos EJR, Assis LS, Lima MPD, Murotori MCS, Santos NPS. Uso de animais na experimentação animal: revisão. *Pubvet*. 2021;15(9):1-8. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n09a910.1-8>
12. Victal JC, Valério LB, Oshiro MC, Baptista SC, Pinheiro F. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *Rev Intertox Toxicol Risco Amb Soc*. 2015;7(2):1-21. <https://doi.org/10.22280/revintervol7ed2.172>
13. Fontana F, Figueiredo P, Martins JP, Santos HA. Requirements for animal experiments: problems and challenges. *Small*. 2020;17(15). <https://doi.org/10.1002/sml.202004182>



14. Barrote EB, Vasconcellos EPGD. Barreiras e facilitadores à adoção de tecnologias laboratoriais que substituem animais em pesquisa. Anais do 23º Encontro Internacional sobre Gestão Empresarial e Meio Ambiente. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2021.
15. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
16. Forni M. Laboratory animal science: a resource to improve the quality of science. Vet Res Comm. 2007;31(S1):43-7. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0096-2>
17. Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. Altern Lab Anim. 2008;36(3):327-42. <https://doi.org/10.1177/026119290803600310>
18. Athira RK, Kripamol R, Anju MS, Maya B, Pai RR, Ajit S et al. 20- Alternatives to animal testing: concepts, state of art, and regulations. Mohanan PV, editor. Biomedical product and materials evaluation: standards and ethics. Amsterdam: Elsevier; 2022. p. 501-29[acesso 22 jul 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128239667000013>
19. Punt A, Bouwmeester H, Schiffelers MJWA, Peijnenburg AACM. Expert opinions on the acceptance of alternative methods in food safety evaluations: formulating recommendations to increase acceptance of non-animal methods for kinetics. Reg Toxicol Pharm. 2018;92:145-51. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.11.015>
20. Santos ER, Balottin LB, Oliveira MAL, Granjeiro JM. Panorama brasileiro do programa de boas práticas de laboratório: impacto na redução do uso de animais. Vigil Sanit Debate. 2015;3(2):1-9. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00314>
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Soro antirrábico PB031-00. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia Brasileira vol. 2. 6a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019.
22. Mehta S, Roy S, Chowdhary A. Use of rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for *in vitro* evaluation of anti-rabies activity. Virusdisease. 2017;28(2):127-32. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0371-y>
23. Rashed WM, Aboshanab KM, Aboulwafa MM. Mini review on potency evaluation of rabies vaccine preparations. Arch Pharm Sci. 2021;5(2):265-74.
24. Machado NS, Moreira WC, Freitas JFS, Almeida AECC, Moura WC. Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of reducing the number of animals per dilution: part 2. Biologicals. 2020;66:30-4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.05.001>
25. Anjos DWC, Santos KO, Lorangeira AP, Moura WC, Delgado IF. G19 Assessment of parameters for lot release of tetanus antitoxin for human use through potency assays by tobi test. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2016[acesso 22 ago 2022]. Available from: [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/28280/2/IV%20SACT%20\\_%20G19.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/28280/2/IV%20SACT%20_%20G19.pdf)
26. Quintilio W, Kapronezai J, Takata DY, Marcelino JR, Moro AM. Tetanus antitoxin potency assessment by surface plasmon resonance and ToBI test. Biologicals. 2019;62:107-10. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.005>
27. Mattos KA, Navega ECA, Silva VF, Almeida AS, Silva CC, Presgrave OAF et al. Applicability of the monocyte activation test (MAT) in the quality control of the 17DD yellow fever vaccine. Altern Labor Anim. 2018;46(1):23-37. <https://doi.org/10.1177/026119291804600107>
28. Concil Of Europe. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). 10a ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2020.
29. Silva CC, Presgrave OAF, Hartung T, Moraes AML, 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 Vitro. 2016;32:70-5. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.004>
30. Silva VF, Guedes Junior DS, Silveira IA, Almeida AS, Conte FP, Delgado IF et al. A comparison of pyrogen detection tests in the quality control of meningococcal conjugate vaccines: the applicability of the monocyte activation test. Altern Labor Anim. 2018;46(5):255-72. <https://doi.org/10.1177/026119291804600506>.
31. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira. Vol. 2. 6a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2019[acesso 10 jul 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/6a-edicao-volume-2>
32. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (BR). Resolução N° 45, de 22 de outubro de 2019. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial União. 25 out 2019.
33. Moreira WC, Freitas JFS, Machado NS, Almeida AECC, Moura WC. Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use. J Virol Methods. 2019;263:54-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.003>
34. Moreira WC, Machado NS, Freitas JFS, Almeida AECC, Moura WC. Verification of the rabies virus glycoprotein lower limit of immunogenicity by serological assay. J Virol Methods. 2019;264:31-7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.11.005>
35. Lei D, Schmidt H, Knezevic I, Zhou T, Kang H, Kopp S. Removal of the innocuity test from the international pharmacopoeia and WHO recommendations for vaccines and biological products. Biologicals. 2020;66:17-20. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.05.003>
36. Viviani L, Halder M, Gruber M, Bruckner L, Cussler K, Sanyal G et al. Global harmonization of vaccine testing requirements: making elimination of the ATT and TABST a concrete global achievement. Biologicals. 2020;63:101-5. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.10.007>



37. Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz. Relatório de gestão Fiocruz 2017. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2017[acesso 22 ago 2022]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/documento/relatorio-de-gestao-2017>
38. Serodio L, Caldeira C, Oliveira C, Jesus E, Moura W, Presgrave O. Avaliação retrospectiva dos testes de toxicidade inespecífica realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde em produtos biológicos. *Vigil Sanit Debate*. 2021;9(3):102-6. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01649>
39. 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. Paris: Organisation for Economic Co-Operation and Development; 2005[acesso 22 ago 2022]. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-gd34.pdf>
40. Campos AS, Diaz BL, Rivera EAB, Granjeiro JM, Braga LMGM, Frajblat M et al. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; 2016.
41. Rede Nacional de Método Alternativos - Renama. Soluções Renama. Brasília: Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação; 2022[acesso 22 ago 2022]. Disponível em: <http://www.renama.tec.br>
42. Melandri VCR, Faria GC, Caldeira C, Presgrave OA. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à vigilância sanitária. *Universitas*. 2010;8(2):69-95. <https://doi.org/10.5102/ucs.v8i2.1150>

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao MCTIC e à RENAMA (Projeto CNPq nº 405285/2015-9). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### Contribuição dos Autores

Gon RK - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Delgado IF - Concepção, planejamento (desenho do estudo), interpretação dos dados e redação do trabalho. Granjeiro JM - Interpretação dos dados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

#### Conflito de Interesse

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



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.