

Aplicabilidade do Teste de Ativação de Monócitos (MAT) no Brasil: importância da sua utilização como teste para detecção de pirogênicos no controle da qualidade de produtos injetáveis

Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) in Brazil: the importance of its use as a test for the detection of pyrogens in the quality control of injectable products

Cristiane Caldeira da Silva^{1,*}

Mayara Cruz¹

João Carlos Freitas¹

Octavio Presgrave¹

Aurea Moraes¹

Isabella Fernandes Delgado¹

RESUMO

O MAT (sigla do inglês *Monocyte Activation Test*) é considerado um potencial substituto do Teste de Pirogênicos, entretanto: *i.* não foi avaliado para um número suficiente de produtos; *ii.* faltam dados que possam garantir sua capacidade em detectar pirogênicos não endotoxinas; e *iii.* deve ser realizada a validação do método para cada classe de produtos. O objetivo foi identificar as monografias que requerem testes de pirogenicidade e propor os produtos que têm por base somente o teste de pirogênicos como um ponto de partida para futuros estudos. As monografias específicas nas Farmacopeias Americana, Europeia e Brasileira que recomendam o Teste de Pirogênicos ou Teste de Endotoxina Bacteriana ou LAL (sigla do inglês *Limulus Amebocyte Lysate*) foram: Teste de Pirogênicos: 20 monografias na Americana, 37 na Europeia e 28 na Brasileira. LAL: 619 monografias na Americana, 157 na Europeia e 41 na Brasileira. Somente quatro produtos requerem testes de pirogenicidade nas três farmacopeias analisadas. O Teste de Pirogênicos e LAL são recomendados em seis monografias na Brasileira e 15 na Europeia. Na Brasileira, a maior parte dessas monografias é referente a produtos biológicos, sugerindo, assim, que estes devam ser os primeiros a ser testados, uma vez que são ensaiados em animais.

PALAVRAS-CHAVE: Teste da Ativação de Monócitos; Teste de Pirogênicos; Farmacopeias; Produtos Biológicos

ABSTRACT

Monocyte Activation Test (MAT) is thought to be a good replacement for rabbit pyrogen test (RPT); however, MAT remains controversial. MAT was not adequately evaluated in a sufficient number of products, and there is no sufficient data that support the ability of MAT to detect non-endotoxin pyrogens. Furthermore, MAT was used subject to validation for each specific product. The aim of this study was to identify in main pharmacopoeias, whose monographs require pyrogenicity tests, and propose those products for which only the rabbit pyrogen test is required to be used as a kick-off study for future studies. Products' monographs in pharmacopoeias in the United States, Europe, and Brazil that are recommended for RPT or Bacterial Endotoxins Test (BET) are as follows. RPT: 20 in American, 37 in European, and 28 in Brazilian pharmacopoeias. BET: 619 in American, 157 in European, and 41 in Brazilian pharmacopoeias. Four products require pyrogenicity testing in three pharmacopoeias. Both RPT and BET are recommended by six monographs in Brazilian pharmacopoeias and 15 in European pharmacopoeias. In Brazilian pharmacopoeias most are biological. These products should be the first to be tested for their applicability to MAT because they are currently tested mainly by RPT.

KEYWORDS: Monocyte Activation Test; Rabbit Pyrogen Test; Pharmacopoeias; Biological products

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/BraCVAM /Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil

¹¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil

¹¹¹ Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

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

Recebido: 01 jan 2015

Aprovado: 29 abr 2015



INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser livres de pirogênicos, 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 pirogênicos são ensaios de segurança toxicológicos imprescindíveis tanto nas etapas de produção quanto no controle da qualidade de produtos injetáveis, garantindo a segurança do seu uso e evitando efeitos adversos à saúde^{1,2}. Existem três métodos utilizados para detectar a presença de pirogênicos: o Teste de Pirogênicos realizado em coelhos, o Teste de Endotoxina Bacteriana, também conhecido como LAL (sigla do inglês, *Limulus Amebocyte Lysate*) e o Teste de Ativação de Monócitos (MAT, sigla do inglês *Monocyte Activation Test*)².

O Teste de Pirogênicos foi primeiramente descrito por Hort e Penfold em 1911 e foi introduzido na Farmacopeia dos Estados Unidos da América (FA) como método oficial em 1942³. Este teste fundamenta-se na observação da resposta febril em coelhos, após injeção intravenosa da solução em análise, na qual se mede a temperatura retal dos animais a intervalos de 30 minutos, por um período de 3 horas. Cabe ressaltar, que a relação dose-resposta é similar entre o homem e coelho, onde 1 ng/kg (5 UE/kg) é a dose mínima que causa febre em ambas as espécies^{2,4}. O Teste de Pirogênicos, apesar de ser um ensaio seguro por detectar um amplo espectro de substâncias e ser aplicável a um grande número de produtos, não pode ser utilizado para algumas classes de medicamentos, como qualquer um que interfira na resposta imune e no mecanismo da febre, como, por exemplo, medicamentos analgésicos, antitérmicos e anti-inflamatórios. Além disso, os coelhos são susceptíveis à interferência de fatores relacionados ao ambiente externo como temperatura, ruídos, umidade e ventilação. Fatores relacionados ao animal como diferenças de resposta entre raças, sexo e a variabilidade biológica também contribuem para possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos^{2,5}.

A partir de 1959, com a publicação do livro "The principles of humane experimental technique" foi introduzido no meio científico o conceito dos 3Rs (do inglês *Reduction, Refinement and Replacement*), que consiste na redução do número de animais, refinamento das técnicas experimentais, minimizando o sofrimento do animal e melhorando o seu bem-estar e, quando possível, a substituição dos testes realizados *in vivo* por testes *in vitro*². Desde então, um grande esforço vem sendo realizado na busca por métodos alternativos ao Teste de Pirogênicos. Em 1964, Levin e Bang descreveram a reação de coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*) após contato com a endotoxina. Durante a década de 1970, muitos estudos foram realizados com a proposta de utilizar a formação do gel como uma forma de controle para parenterais e o LAL foi incluído como monografia oficial da FA em 1980^{2,5}.

O LAL durante muito tempo foi considerado como um potencial método substitutivo para o Teste de Pirogênicos, além de ser muito utilizado no controle da produção de água de hemodiálise e diluentes de vacinas. Entretanto, grande parte dos produtos biológicos

não pode ser testada neste modelo *in vitro* devido à capacidade da endotoxina de se ligar a proteínas plasmáticas - como, por exemplo, no caso de produtos biológicos - e não ser detectada já que o LAL quantifica endotoxina livre, podendo, assim, levar a resultados falsos negativos. Além disso, o LAL não pode ser considerado um substituto completo do Teste em Pirogênicos por ser um método somente para endotoxina, não sendo capaz de detectar outros pirogênicos^{6,7}. Segundo Schindler et al. (2009), em contrapartida ao fato da endotoxina ter sido muito investigada nos últimos 50 anos e o LAL amplamente utilizado, as contaminações por Gram-positivas e fungos foram negligenciadas, apesar destas compreenderem a maioria dos formadores de esporos, o que representa um diferencial na contaminação pirogênica⁷.

Em 2005, cinco métodos baseados na liberação de citocinas pró-inflamatórias por monócitos humanos foram validados internacionalmente para medicamentos injetáveis^{8,9,10}, sendo introduzidos como monografia oficial na Farmacopeia Europeia¹¹ com o nome de Teste de Ativação de Monócitos. Estes métodos são: (a) sangue total humano/Interleucina (IL) 1B; (b) sangue total humano/IL-1B com aplicação do sangue criopreservado, (c) sangue total humano/IL-6, (d) células mononucleares do sangue periférico/IL-6 e (e) linhagem celular Mono Mac 6 (MM6)/IL-6. O uso do MAT foi validado para os seguintes produtos: Cloreto de Sódio 0,9%, Glicose 5%, Etanol 13%, Ocitocina, Metoclopramida, Ampicilina, Maleato de Dimetindeno, Ranitidina e Tartarato de Metoprolol¹⁰.

Devido à recomendação do Comitê Organizador Interagências para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, sigla do inglês *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) sobre a inconsistência de dados em relação à resposta do MAT para pirogênicos não endotoxinas e a necessidade de validação caso a caso, para cada classe de produtos, tais como biológicos e artigos de saúde, a monografia do MAT preconiza seu uso apenas como um terceiro teste para detecção de pirogênio¹⁰. Portanto, atualmente, as Farmacopeias Americana e Brasileira preconizam o Teste de Pirogênicos e o LAL e a Farmacopeia Europeia recomenda além destes o MAT. Uma complexa revisão sobre o MAT e sua capacidade em detectar pirogênicos não endotoxinas foi recentemente apresentada¹². Apesar dos avanços, fica evidente a necessidade de se demonstrar a aplicabilidade do MAT para qualquer produto que não foi objeto do estudo de validação. Cabe ressaltar que a legislação brasileira sobre Métodos alternativos, a Lei nº 9.605/1998 contra crimes ambientais e a Lei nº 11.794/2008, que regulamenta o uso de animais na experimentação e no ensino no Brasil, partilham entre si o reconhecimento de que, quando existe método alternativo, não é permitido usar animais^{13,14}. Portanto, o Teste de Pirogênicos se contrapõe à tendência mundial da substituição do uso de animais por métodos alternativos.

Apesar de todos os esforços pela busca de alternativas ao uso de animais na experimentação e devido à falta de informação sobre a plena aplicabilidade da MAT, o Teste de Pirogênicos ainda é amplamente utilizado e preconizado para a maioria dos produtos



biológicos². Portanto, frente ao grande número de monografias que requerem testes de pirogenidade e o número restrito de produtos validados para o MAT, houve a necessidade de se ter um diagnóstico dos principais produtos de interesse nacional, principalmente os produtos preconizados exclusivamente pelo Teste de Pirogênicos. Com o intuito de incentivar o reconhecimento do MAT como método substitutivo, o objetivo deste estudo foi identificar nas monografias das farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia os produtos injetáveis que requerem o Teste de Pirogênicos e/ou o LAL e assim propor os produtos que têm por base somente o teste em coelhos como um ponto de partida para estudos que irão avaliar a aplicabilidade do MAT.

METODOLOGIA

Foi realizado levantamento de todas as monografias de produtos injetáveis da Farmacopeia Europeia (FE) de 2010 (7ª edição)¹¹, Farmacopeia Americana (FA) de 2009 (32/NF27)¹⁵ e Farmacopeia Brasileira (FB) de 2010 (5ª edição)¹⁶ que requerem os Testes de Pirogênicos e LAL. Foi construída uma planilha no *software* MS-Excel® com todos os produtos e substâncias classificados pelo tipo de teste preconizado (Teste de Pirogênicos e/ou LAL) para cada farmacopeia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do MAT como método substitutivo possui a vantagem de associar a detecção do amplo espectro de pirogênicos do teste *in vivo* com a sensibilidade do LAL, podendo também ser utilizado para amostras ambientais como ar e poeira¹⁷. Além disso, é baseado no mesmo princípio do Teste de Pirogênicos, ou seja, no mecanismo da febre, só que usando substrato de origem humana, facilitando possíveis correlações *in vivo* e *in vitro*⁸.

A avaliação das monografias dos produtos injetáveis que atualmente usam obrigatoriamente o LAL e principalmente o Teste de Pirogênicos torna-se importante para estimular e nortear estudos sobre a aplicabilidade do MAT para produtos não contemplados no processo de validação, contribuindo para suprir a lacuna de dados na literatura, apontada pelo ICCVAM como um dos problemas para a não aceitação imediata do MAT como substituto do teste em coelhos.

Os resultados indicaram que somente quatro produtos são preconizados nas três farmacopeias simultaneamente quanto à exigência de se testar a contaminação pirogênica (Tabela 1). Cabe ressaltar que, destes, apenas a Ampicilina Sódica foi um dos produtos validados no MAT.

Quando o total de monografias dos produtos injetáveis foi contabilizado por farmacopeia, observou-se que os testes de Pirogênicos e LAL são preconizados para 639 produtos na FA, 194 na FE e 69 na FB. Quando as monografias são separadas por testes, pode ser observado que o LAL é mais utilizado do que o Teste de Pirogênicos, sendo o primeiro preconizado em 619 monografias da FA, 157 da FE e 41 na FB. Apesar de menos utilizado do que o LAL, o Teste de Pirogênicos é preconizado em todas as farmacopeias,

sendo 20 monografias na FA, 37 na FE e 28 na FB (Figura). A grande diferença no quantitativo de monografias entre Estados Unidos e demais países deve-se - em grande parte - aos medicamentos que, no caso do Brasil e da Europa, passam unicamente por teste de esterilidade. Cabe ressaltar que cada país tem sua legislação e necessidades específicas, portanto, nem todos os produtos figuram nas três farmacopeias, o que leva, também, a uma diferença no número de testes preconizados.

Buscando identificar as principais classes de produtos que passam exclusivamente pelo Teste de Pirogênicos e que sejam de interesse nacional, os resultados também foram avaliados em relação às classes de produtos preconizados nas monografias para cada teste descrito na FB. Foi observado que, dos 69 produtos injetáveis que passam por testes de pirogenicidade, 41 fazem exclusivamente o LAL e 28, o Teste de Pirogênicos. No primeiro caso, dos 41 produtos injetáveis, 39 são medicamentos e apenas dois são produtos biológicos (vacinas febre amarela e anti-poliomielite 1, 2, 3 inativada). Isso demonstra que o LAL, no caso da FB, é preconizado apenas para 5% dos produtos biológicos. No caso das 28 monografias preconizadas para o Teste de Pirogênicos, nove são medicamentos, sendo que destes somente três fazem exclusivamente o Teste de Pirogênicos, representando 33% destes produtos (Arteméter, Cloridrato de Metoclopramida e Flunitrazepam). Os 21 restantes são produtos biológicos (hemoderivados, vacinas e soros hiperimunes)

Tabela 1. Monografias que possuem testes para a detecção de pirogênicos nas três farmacopeias.

Produto	FB		FA		FE	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Água - Injetáveis	-	LAL	-	LAL	-	LAL
Ampicilina Sódica	P	LAL	-	LAL	-	LAL/MAT
Cefoxitina Sódica	-	LAL	-	LAL	-	LAL
Heparina Sódica	-	LAL	-	LAL	-	LAL

Farmacopeia Brasileira (FB), 2010 (5ª ed.), Farmacopeia Americana (FA), 2009 (32/NF27), e Farmacopeia Europeia (FE), 2010 (7ª ed.).

P (Teste de Pirogênicos), LAL (Lisado de Amébócitos do *Limulus*) e MAT (Teste de Ativação de Monócitos).

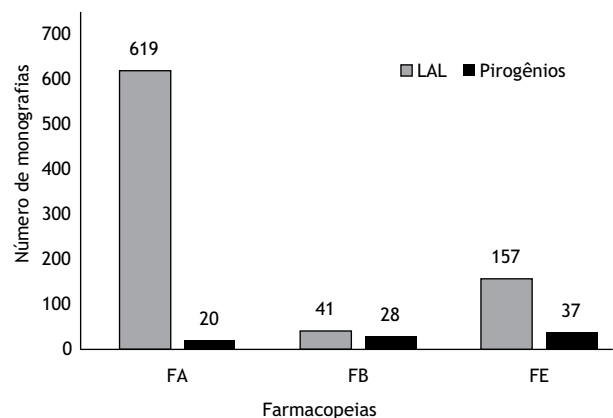


Figura. Número de monografias de produtos injetáveis na Farmacopeia Brasileira (FB), 2010 (5ª ed), Farmacopeia Americana (FA), 2009 (32/NF27), e Farmacopeia Europeia (FE), 2010 (7ª ed.), que requerem o Teste de Pirogênicos e LAL.



sendo que, destes, 19 passam exclusivamente pelo Teste de Pirogênios, representando 90,4% destes produtos (Tabela 2). Destes 19 produtos biológicos, os soros hiperimunes, representam 68%, um valor extremamente significativo.

Cabe ressaltar que os soros hiperimunes são produtos largamente utilizados no tratamento de acidentes com animais peçonhentos, assim como no tratamento de infecções bacterianas e virais, sendo considerados de grande interesse pelo Ministério da Saúde (MS). Um dos pontos a ser destacado é que o Brasil possui o Programa Nacional de Imunizações (PNI) para o qual o INCQS faz análises lote a lote de soros e vacinas, antes da distribuição dos mesmos para as Secretárias Estaduais e Municipais. Estas análises correspondem a cerca de 90% dos produtos analisados no Teste de Pirogênios pelo INCQS. Portanto, uma vez reconhecida a aplicabilidade do MAT para soros e vacinas, o número de coelhos pode ser drasticamente reduzido com a substituição do uso desses animais, ratificando os conceitos éticos e reduzindo o custo das análises.

Tabela 2. Monografias da Farmacopeia Brasileira: produtos injetáveis que requerem o Teste de Pirogênios e LAL.

Produtos	Classificação	In vivo	In vitro
Ampicilina	Medicamento		
Ampicilina Sódica	Medicamento		
Ampicilina Sódica (Pó)	Medicamento		
Ampicilina Tri-Hidratada	Medicamento		
Arteméter	Medicamento		
Cloridrato de Metoclopramida	Medicamento		
Flunitrazepam	Medicamento		
Glicose	Medicamento		
Sulfato de Morfina	Medicamento		
Fator VII humano	Biológico		
Fator VIII humano	Biológico		
Fator IX humano	Biológico		
Fibrinogênio humano	Biológico		
Plasma humano	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico laquéutico	Biológico		
Soro Anti-botrópico crotálico	Biológico		
Soro Anti-botrópico laquéutico	Biológico		
Soro Anti-botrópico	Biológico		
Soro Anti-botulínico	Biológico		
Soro Anti-crotálico	Biológico		
Soro Anti-diftérico	Biológico		
Soro Anti-elapídico	Biológico		
Soro Anti-escorpiônico	Biológico		
Soro Anti-lonômico	Biológico		
Soro Anti-loxoscélico	Biológico		
Soro Anti-rábico	Biológico		
Soro Anti-tetânico	Biológico		
Vacina Anti-rábica inativada	Biológico		
Vacina Anti-poliomielite 1,2,3 inativada	Biológico		
Vacina Febre amarela	Biológico		
Vacina Febre amarela	Biológico		

Portanto, este estudo também indica a necessidade da avaliação em paralelo *in vivo* e *in vitro* para cada produto específico de forma a contemplar a recomendação do ICCVAM em relação ao MAT na detecção de pirogênios em diferentes produtos destinados à saúde. Cabe ressaltar que os produtos biológicos, além do interesse nacional, também podem ser exportados e, desta forma, é importante ratificar o papel do Centro Brasileiro de Métodos Alternativos (BraCVAM) em estimular a condução destes estudos, pois, em termos internacionais, refletirá a credibilidade do país no processo de produção e exportação destes produtos biológicos analisados dentro de padrões éticos e de qualidade.

Apesar das vantagens e do reconhecimento do MAT como um potencial substituto do Teste de Pirogênios, alguns estudos publicados recentemente apontaram possíveis restrições a sua aplicação quando se necessita de uma grande quantidade de sangue por ensaio, assim como o procedimento de coleta do sangue que pode ser considerado invasivo e causar desconforto aos doadores^{21,22,23}. A limitação do uso de grandes quantidades de sangue fresco foi contornada com o processo de criopreservação do sangue total desenvolvido por Schindler et al. (2004), sendo seu uso validado posteriormente em 2006. A utilização do sangue criopreservado de pelo menos quatro doadores é uma alternativa viável, tanto economicamente como experimentalmente, quando comparada ao sangue fresco, principalmente quando o uso do sangue é necessário em maiores quantidades^{9,24}.

Recentemente, alguns estudos apresentaram a utilização de outras fontes de células mononucleares^{21,22,23} para contornar a necessidade de se obter maiores quantidades de sangue quando necessário. O primeiro foi um estudo conduzido por Wunderlich et al. (2014), o qual sugere a utilização do sangue bovino no lugar do sangue humano para o MAT. Segundo os autores, o uso do sangue bovino evitaria possíveis contaminações e a influência de fatores relacionados à genética e ao estilo de vida dos doadores humanos, já que os animais poderiam ser livres de patógenos e mantidos em ambientes apropriados. Entretanto, os resultados encontrados demonstraram que o sangue bovino foi menos reativo e menos sensível do que o sangue humano, principalmente para pirogênios não endotoxinas (ácido lipoteicóico e peptidoglicano)²¹. Cabe ressaltar que o uso do sangue do bovino, por mais próximo que seja ao do homem, pode retornar ao problema de extrapolação de dados entre espécies, que é um dos alvos de críticas do Teste de Pirogênios que é realizado em coelhos.

A outra opção foi proposta por Koryakina et al. (2014) sobre o desenvolvimento de um processo de criopreservação de células mononucleares do sangue periférico originadas de filtros leucocitários que podem aumentar a disponibilidade deste tipo celular para ensaios em escala industrial, além de evitar o desconforto da coleta do sangue (flebotomia). Ainda, segundo os autores, à utilização destes filtros, normalmente tratados como bio-resíduos em hospitais e centros de doação de sangue, é uma forma de se evitar a manipulação de sangue humano fresco nos laboratórios de nível de biossegurança 2²³.



Também é importante destacar que vários trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade do MAT para produtos biológicos, o que representa uma grande vantagem sobre o LAL mesmo no caso onde este pode ser aplicado, como no caso da avaliação de segurança de vacinas. Para a produção da vacina de diferentes cepas de *Neisseria meningitidis* do grupo B, foi utilizada a liberação de IL-6 e TNF- α do sangue total humano e de células mononucleares do sangue periférico durante todo o processo, demonstrando que o MAT foi altamente sensível na detecção de pirogênicos¹⁹. Outro estudo realizado por Perdomo-Morales et al²⁰. (2011) concluiu que seus resultados associados a estudos anteriores suportam a substituição do Teste de Pirogênio pelo MAT para Albumina Sérica Humana e para outros hemoderivados que contenham proteínas de uso terapêutico. Além disso, os autores indicam que, no caso da Albumina sérica humana, apesar do LAL ser o método preconizado este apresentou problemas no percentual de recuperação da endotoxina nas condições experimentais avaliadas²⁰.

É importante destacar que alguns estudos também apresentam bons resultados com relação à aplicabilidade do MAT na avaliação da contaminação de células utilizadas na terapia celular, como as células tronco, assim como na biocompatibilidade de próteses, além de demonstrar alta sensibilidade para soluções de diálise¹⁸.

Portanto, com base nos resultados do levantamento das monografias dos produtos que passam pelo Teste de Pirogênios e na importância do controle da qualidade destes no Brasil, fica evidente a necessidade de se estabelecer os produtos biológicos como ponto de partida para estudos de aplicabilidade do MAT e, conseqüentemente, o seu reconhecimento como método alternativo ao uso de animais na detecção de pirogênios. Estes resultados não significam que outros produtos não devam ser analisados, apenas sugerem uma priorização daqueles em que a substituição do uso de animais poderá se dar de forma imediata.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os produtos biológicos são a principal classe de medicamentos injetáveis que requerem testes de pirogenicidade, principalmente o Teste de Pirogênios. Este dado reflete na avaliação do controle da qualidade destes produtos que representam mais de 90% dos Testes de Pirogênios realizados no INCQS. Portanto, devido à importância desta classe de produtos no contexto epidemiológico sanitário brasileiro, principalmente em relação aos soros hiperimunes, estes devem ser os primeiros a ser testados para demonstrar aplicabilidade do MAT.

REFERÊNCIAS

1. Poole S, Das REG. Towards a 'human pyrogen test'. Eur J Parenteral Sciences 2001;6(2):63-4.
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 Ciênc Saúde. 2010;8(2):69-95. <http://10.5102/ucs.v8i2.1150>
3. Spreitzer I, Fischer M, Hartzsch K, Liideritz-Püchel U, Montag T. Comparative study of rabbit pyrogen test and human whole blood assay on human serum albumin. ALTEX. 2002;19(Suppl 1/02):73-5.
4. Hochstein HD, Munson TE, Outschoorn AS. Comparison of rabbit responses of two E. coli endotoxin preparations in the USP rabbit pyrogen test. Pharmacop Forum. 1990;4:346-51.
5. Pearson FC. Pyrogens: endotoxins, LAL testing, and de pyrogenation. New York: Marcel Dekker; 1985.
6. 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.
7. Schindler S, 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.
8. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.010>
9. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>
10. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM. ICCVAM background review document: Validation status of five *in vitro* test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products. Research Triangle Park: National Toxicology Program; 2008. (NIH Publication No. 08-6391)
11. Monocyte activation test. In: Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia Suppl (6.7). 7th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 2010.
12. 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. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>
13. Brasil. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial União. 13 fev. 1998.
14. 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.



15. Pyrogen test. In: U. S. Pharmacopeia. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2009. 32/NF 27.
16. Pirogênios, In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia brasileira. 5a ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010. p. 229-30.
17. Kindinger I, Daneshian M, Baur H, Gabrio T, Hofmann A, Fennrich S et al. A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):143-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2005.01.006>
18. Daneshian M, Aulock S, Hartung T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. *Nat Protoc*. 2009;4:1709-21. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>.
19. Stoddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W. Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(1):98-107. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00342-09>
20. 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. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.2011.3.227>
21. 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):50-7. <http://dx.doi.org/10.1186/2050-6511-15-50>
22. 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):196-98. <http://dx.doi.org/10.1111/jvp.12148>
23. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods*. 2014;405:181-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.005>
24. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.019>

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz ressaltando que este trabalho foi parte da tese de doutorado de Cristiane Caldeira e ao Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde (PAPES/Fiocruz) e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA, MCTI/CNPq 4025522011-3) pelo apoio financeiro recebido. Isabella Delgado é bolsista de produtividade do CNPq.



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.