

APLICABILIDADE DO TESTE DE LAL PARA DETECÇÃO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EM SOROS HIPERIMUNES EM COMPARAÇÃO COM O TESTE DE PIROGÊNIO IN VIVO

REGINATO BARBOSA, Thaís de Fátima
thais.reginatto@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

Resumo: Atualmente tem-se visto a grande necessidade de substituição dos testes in vivo de pirogênio em coelhos no controle de qualidade por métodos in vitro, uma vez que este não faz a utilização de animais como cobaias e apresenta grandes vantagens como possibilidade de quantificação de endotoxina presente nas amostras em teste, além da redução de custos e eliminação de mão de obra especializada para manejo de animais. Diante deste cenário, os soros hiperimunes, que possuem monografia descrita na Farmacopeia Brasileira para teste de pirogênios foi observado quando a sua aplicabilidade para substituição de técnica para detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas através do método de LAL.

Palavras-chave: Endotoxina. Pirogênio. Soro hiperimune, LAL.

Abstract: Currently, there is a great need to replace in vivo pyrogen tests in rabbit methods without quality control by in vitro animals, since this does not use animals as guinea pigs and has great advantages such as the possibility of quantifying the endotoxin present in the test samples, in addition to reducing costs and handling specialized labor. Scenario of this scenario of Dianteimmune sera, which have hypergraphia described in the Brazilian Pharmacopoeia for pyrogen test was observed when its applicability to replace the technique for detection and quantification of bacterial endotoxins of the LAL method

Keywords: Endotoxin. Pyrogen. hyperimmune serum, LAL.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a detecção de pirogênios em amostras de soros hiperimunes é realizada através do teste de pirogênio in vivo, de acordo com a monografia da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, que se fundamenta na observação de aumento da temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa do produto. O ensaio tradicional, apesar de ser eficiente, simples e de baixo custo, apresenta limitações como mão de obra especializada para manejo de animais; espaço e estrutura física para armazenamentos dos animais; necessidade de quarentena, aumentando o tempo do ensaio, e resultado qualitativo, impossibilitando a quantificação de endotoxinas presentes na amostra.

Como estratégia para substituição dos testes in vivo e para contornar as deficiências apresentadas no método compendial, o presente trabalho irá comparar as técnicas de detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas através dos métodos quantitativos de LAL para o produto

biológico de soro hiperimune. A aplicação desse ensaio apresenta vantagens quando comparado ao teste compendial, como quantificação de endotoxinas bacterianas presentes no produto; alta sensibilidade de teste possibilitando baixo limite de detecção, maior especificidade e variabilidade reduzida nos resultados.

2 SOROS HIPERIMUNES

De acordo com Brasil (2006) a soroterapia consiste em uma terapia aplicada à pacientes que tenham doenças infecciosas ou doenças causadas por agentes tóxicos, como venenos, vírus e toxinas. Essa terapia constitui-se na aplicação de um soro hiperimune contendo um concentrado de anticorpos, tendo a finalidade de combater a doença em questão.

Os soros hiperimunes são produzidos no Brasil pelos laboratórios: Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Fundação Ezequiel Dias, Instituto Butantan e Instituto Vital Brazil.

Mundialmente, existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo cerca de 600 venenosas. Estas serpentes são mais frequentemente encontradas nas regiões tropical e equatorial, mas podem ser encontradas em todas as regiões do planeta com exceção da Antártida. No Brasil, foram descritas 326 espécies de serpentes, sendo 49 peçonhentas, 22 espécies da família *Elapidae* e 27 espécies da família *Viperidae*. A constituição dos soros antiofídicos adotados no Brasil são fragmentos F(ab')₂ (*Fragment Antigen Binding*) da imunoglobulina G (IgG) equina, mundialmente também são utilizadas preparações contendo fragmentos F(ab')₂ ou a molécula inteira de IgG de outros mamíferos (BRASIL, 2006).

Podemos citar no Brasil pelo menos quatro sistemas de informação que tratam do registro de acidentes por animais peçonhentos: o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (Sinitox), o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan), o Sistema de Internação Hospitalar (SIH-SUS) e o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Cada um destes sistemas possui características próprias, foram criados para atender demandas diferentes e, ao invés de se completarem, muitas vezes se contradizem (FREITAS, 2008). Dos quase 100.000 casos de intoxicação humana, animal, e de solicitação de informação registrada pelo SINITOX no ano de 2013, 25,66% (22.477 casos) ocorreram com animais peçonhentos. Estes índices são próximos aos casos envolvendo medicamentos (24.029 casos) que correspondem à principal causa de intoxicação humana (SINITOX, 2014). Ainda segundo dados do SINITOX (2014) os principais casos de acidentes foram com escorpiões, seguidos por aranhas e serpentes. Sendo que com exceção das serpentes, as principais notificações são de áreas urbanas, e talvez isso ocorra pela subnotificação das áreas rurais e não pelo número de casos (SINITOX, 2015).

Apesar dos soros antiofídicos serem os mais conhecidos, os soros produzidos para o tratamento de doenças como raiva, tétano, difteria e botulismo são importantes no contexto da saúde pública.

3 PIROGÊNIOS E ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Pirogênios abrangem um grupo quimicamente heterogêneo de compostos indutores de febre derivados de micro-organismos, podendo estar presente em produtos injetáveis, e, quando presentes e infundido ao paciente, desencadeia uma reação induzindo a febre ao indivíduo. Esse tipo de contaminação microbiana é considerado um grave problema de saúde pública, resultando em sintomas que vão desde alterações vasculares até choque e morte (DINARELLO et al., 1984; HOFFMANN et al., 2005).

De acordo com Pinto (2003), pirogênios são divididos em duas classes, sendo elas:

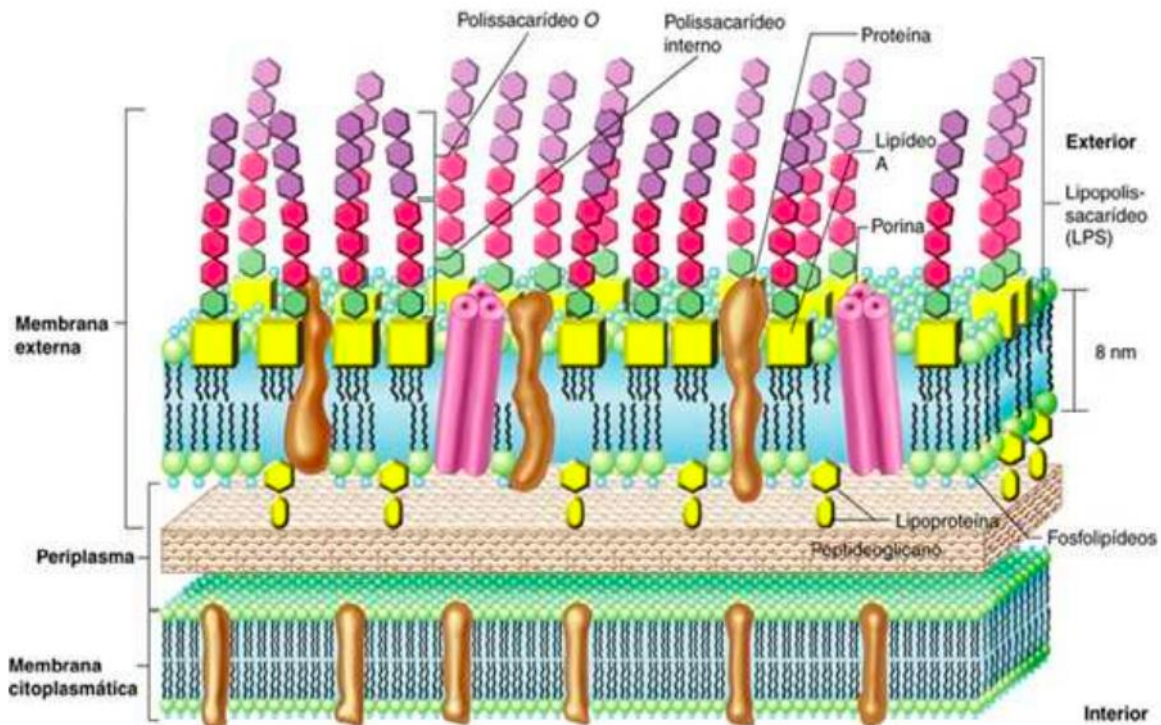
- Pirogênios exógenos, originários fora do corpo e induzem elevações térmicas quando injetados em humanos e animais. Incluem nessa classe os fungos, vírus e bactérias, além de pirogênios não microbianos, como fármacos, esteroides, frações de plasma e adjuvantes sintéticos.

- Pirogênios endógenos, que são produzidos internamente pelo hospedeiro. É uma substância sintetizada por diferentes células de hospedeiros após exposição e em resposta ao estímulo de diversos pirogênios exógenos, como a endotoxina.

Segundo Elisson (2000), a origem dos pirogênios nos injetáveis pode estar associada ao ambiente, à matéria-prima, ao material de acondicionamento, ao operador ou ao tempo total até a esterilização do produto.

Diversos micro-organismos, sendo sua maioria bactérias, produzem toxinas denominadas Endotoxinas Bacterianas, que são capazes de provocar alterações no organismo de diversas gravidades.

Figura 1. Estrutura da parede celular da bactéria Gram-negativa contendo LPS



. (Fonte: USP, 2020)

As endotoxinas bacterianas, quando purificadas são denominadas como lipopolissacarídeos (LPS). São componentes de alto peso molecular, presentes na membrana externa das bactérias gram-negativas, patogênicas ou não e se constituem como a principal fonte de pirogênios na indústria farmacêutica. Elas funcionam como marcadores para o sistema imunológico detectar e identificar invasores bacterianos.

Embora a maior parte das endotoxinas mantem-se ligadas à parede celular até a desintegração da bactéria, quantidades ínfimas de endotoxinas são liberadas, na forma

solúvel, por culturas de bactérias jovens ou também por bactérias Gram-negativas como *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* e outros agentes patogênicos, em crescimento. (Pinto, 2003)

3.1 Mecanismo da Febre

A febre é uma complexa reação patofisiológica resultante do contato do organismo com infecções ou agentes inflamatórios denominados de pirogênios exógenos levando a uma elevação da temperatura corpórea, acima do normal (DINARELLO et al, 1988; BICEGO et al, 2007).

Os LPS são constituídos por um lipídio que adere sua estrutura à parede celular e por cadeias de oligossacarídeos, que se estendem pela superfície bacteriana. A porção lipídica, é denominada como “Lipídeo A” e é a principal estrutura reconhecida pelo sistema imunológico, por meio de um complexo de duas proteínas: *Receptor Toll 4* (TLR4) e MD-2. Quando ativado, este complexo desencadeia uma cascata imunológica para combater o patógeno.

Através da fagocitose do lipídeo A é produzido pirogênio endógeno. Este atravessa a barreira hematoencefálica e altera o ponto de equilíbrio dos neurônios na concentração da prostaglandina E2 e Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP), induzindo, assim, elevação de temperatura corporal.

À unidade lipídeo A da endotoxina são atribuídas diversas atividades biológicas como: pirogenicidade, toxicidade letal, leucopenia seguida de leucocitose, fenômeno de Shwartzman, necrose da medula óssea, reabsorção do osso embrionário, ativação do complemento, queda de pressão sanguínea, agregação plaquetária, ativação do fator de Hagemen, indução do fator plasminogênio, toxicidade aumentada pelo pré-tratamento com BCG, toxicidade aumentada pela adrenalectomia, reatividade dérmica aumentada à epinefrina, indução de resistência não específica à infecção, indução de tolerância à endotoxina, indução de síntese de IgG em camundongos neonatos, indução à produção de interferon, indução à produção de fator de tumor necrótico, indução à produção de quinase-piruvato em fígado de camundongo, hipotermia em camundongos, gelificação do Lisado do Amébócito de *Limulus* (LAL) (PEARSON, 1985).

A presença de endotoxinas em produtos injetáveis torna-se indesejável devido a sua potente atividade biológica que causa efeitos fisiopatológicos no hospedeiro. Mesmo quando administrada em baixas concentrações (<1,0 UE/mL), a endotoxina pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica, levando a efeitos como elevação da temperatura corporal, coagulação intravascular disseminada, choque endotóxico, lesão tecidual e morte (ANSPACH, 2001). Porém, os LPS não agem diretamente contra as células ou órgãos, mas através da ativação do sistema imune, especialmente através de monócitos e macrófagos, com a liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-6 e IL-1) (DANESHIAN et al., 2006).

Bactérias como *Escherichia coli* são utilizadas para gerar bioprodutos a partir de DNA recombinante, tais como peptídeos e proteínas. Sendo assim, estes produtos estão contaminados com LPS. Por esta razão, biomoléculas obtidas a partir de bactérias Gram-negativas devem ser livres de LPS para não induzir nenhum tipo de efeito quando administradas em animais ou seres humanos.

4 TESTE DE PIROGÊNIO – MÉTODO IN VIVO

O teste de pirogênio baseia-se no aumento da temperatura corporal dos coelhos, após injetar intravenosamente a solução estéril que está sendo analisada (10 ml por kg de peso), não ultrapassando 10 minutos. Após receber a injeção intravenosa, observam-se os coelhos durante um período de 3 horas para ver se houve alguma alteração na temperatura (PINTO, 2003).

O teste de pirogênio *in vivo* possui critérios específicos, tais como: utilização de coelhos adultos do mesmo sexo, sadios e, com peso máximo de 1,5 kg. Além disso, condições ambientais devem ser controladas durante todo o período de teste, como a temperatura ambiente que deve estar entre 20 °C a 23 °C e ambiente livre de perturbações que possam causar estresse aos animais.

Deve-se tomar muito cuidado para não alterar a hipersensibilidade do animal durante o manuseio. No dia do teste, não se devem fornecer alimentos, mas sim, água em abundância. Cada animal, respeitando o período de descanso, deve ser pesado e colocado em contentor (BARTH et al, 2007).

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, a aferição de temperatura deve ser realizada introduzindo-se o termômetro no reto do animal em profundidade aproximada de 6 centímetros. Se for utilizado dispositivo registrador, que deva permanecer no reto durante o período do teste, conter os coelhos de maneira que fiquem em postura natural de repouso. Quando se empregar termômetro clínico, deixar transcorrer o tempo necessário

Ao analisar critérios de interpretação, a conceituação exata torna-se necessária sobre a elevação térmica individual dos coelhos. Este valor é definido como sendo a diferença entre a temperatura máxima após a injeção e a de controle, devendo ser um valor positivo, e, nos casos negativos, considere-se zero (SILVEIRA et al, 2004).

Para interpretação dos resultados, deve-se observar se algum dos animais tenham apresentado aumento da temperatura igual ou superior a 0,5 °C, comparando-se às respectivas temperaturas controle. Se algum coelho apresentar aumento da temperatura igual ou superior a 0,5 °C, repetir o teste utilizando outros cinco animais. O produto em exame cumpre os requisitos para ausência de pirogênios se no máximo três dos oito coelhos apresentarem aumentos individuais de temperatura iguais ou superiores a 0,5 °C, e se a soma dos aumentos individuais de todos os coelhos não exceder a 3,3 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 6ª edição).

5 TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA – MÉTODO IN VITRO

O teste de endotoxina bacteriana é utilizado para detectar e quantificar endotoxinas de bactérias Gram-negativas presentes em amostras em teste. Utiliza-se o extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus* preparado e caracterizado como reagente LAL (BRUM, 2009).

Segundo Morales (2004), o reagente LAL (acrônimo para *Limulus Amebocyte Lysate*), foi descoberto pelo pesquisador Frederick B. Bang após verificar a morte de um caranguejo ferradura americano (*Limulus polyphemus*) por coagulação intravascular. A partir daí, foi constatado que as endotoxinas são responsáveis pela coagulação da hemolinfa do *Limulus*. Posteriormente, foi comprovado que os elementos responsáveis pela coagulação induzida por endotoxina são de natureza enzimática, e se encontram nos amebócitos, únicos tipos de célula presente na hemolinfa do caranguejo. O reagente de LAL é um extrato aquoso de amebócitos, composto por uma cascata de enzimas serino-proteases do tipo tripsina capaz de reagir frente a pequenas quantidades de endotoxinas.

Um estudo feito em 1970 mostrou que o teste de LAL é mais sensível do que os testes realizados em coelhos, pois a intensidade com que o gel é formado é semelhante à concentração das endotoxinas (LEVIN, 1964).

O método LAL se dá através da reação entre o lisado de amebócitos, proveniente da hemolinfa do caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) e a endotoxina, ocorrendo coagulação do meio.

Existem duas técnicas compendiais, descritas na Farmacopeia Brasileira 6^a edição (2022), para detecção de endotoxinas através do teste LAL, são elas:

- Método de coagulação em gel (semi-quantitativo);
- Métodos fotométricos (quantitativos), que incluem:
 - Método cromogênico: baseado no desenvolvimento de cor, após quebra de complexo peptídeo sintético cromógeno.
 - Método turbidimétrico: baseado na turbidez, após quebra de um substrato endógeno.

Essa técnica pode ser classificada em dois tipos, de acordo com o princípio empregado, sendo: Limite turbidimétrico ou cinético turbidimétrico. O método cinético turbidimétrico, baseia-se no tempo de reação (*on set time*) necessário para o teste atingir uma absorvância pré-determinada ou na relação de desenvolvimento de turbidez.

O teste utilizando o método de LAL detecta somente endotoxinas oriundas de bactérias Gram-negativas, o que abrange grande parte da resposta e contaminação pirogênica. Desse modo, sua grande desvantagem é a ineficiência em detectar outros tipos de pirogênios que não sejam de origem Gram-negativa limitando a completa substituição do teste de pirogênio *in vivo* para produtos biológicos, como os soros hiperimunes, uma vez que o teste *in vivo* é capaz de detectar o pirogênio total. Em contrapartida, o teste em coelhos apresenta limitações como necessidade de mão de obra especializada para manejo de animais; espaço e estrutura física para armazenamentos dos animais; necessidade de quarentena aumentando o tempo do ensaio, resultado qualitativo, impossibilitando a quantificação de endotoxinas presentes na amostra e variabilidade biológica nos resultados. Além disso, questões éticas quanto ao uso de animais nos testes estão envolvidas.

Assim, observa-se que, apesar do desenvolvimento de novas tecnologias no ramo de métodos analíticos, o cenário atual não permite a total substituição do teste pirogênio *in vivo* por métodos *in vitro* de LAL.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e avanço de novas tecnologias no setor de Controle de Qualidade nos mostra que a substituição do teste para detecção de pirogênios *in vivo* por métodos *in vitro* é possível, entretanto, observa-se algumas questões que passíveis de melhor desenvolvimento para total substituição do método.

O teste utilizando o método *in vitro* de LAL apresenta vantagens grandiosas como eliminação de uso de coelhos para testes de controle de qualidade, além da redução nos custos laboratoriais. Porém, o método detecta somente endotoxinas oriundas de bactérias Gram-negativas, o que abrange grande parte da resposta e contaminação pirogênica. Desse modo, sua grande desvantagem é a ineficiência em detectar outros tipos de pirogênios que não sejam de origem Gram-negativa limitando a completa substituição do teste de pirogênio *in vivo* para produtos biológicos, como os soros hiperimunes, uma vez que o teste *in vivo* é capaz de detectar o pirogênio total.

Em contrapartida, o teste em coelhos apresenta limitações como necessidade de mão de obra especializada para manejo de animais; espaço e estrutura física para armazenamentos dos animais; necessidade de quarentena aumentando o tempo do ensaio, resultado qualitativo, impossibilitando a quantificação de endotoxinas presentes na amostra e variabilidade biológica nos resultados. Além disso, questões éticas quanto ao uso de animais nos testes estão envolvidas.

Assim, observa-se que, apesar do desenvolvimento de novas tecnologias no ramo de métodos analíticos, o cenário atual não permite a total substituição do teste pirogênio in vivo por métodos in vitro de LAL.

REFERÊNCIAS

ANSPACH, F.B. **Endotoxin removal by affinity sorbents.** Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 49, p.661-681, 2001.

ARAÚJO, H. P. **Avaliação de metodologia oficial in vivo e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade in vitro para a determinação de potência de soro antitoxigênico.** 2008. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008

BARTH, Thiago et al. **Avaliação de pirogênios em produtos de uso veterinário pelos testes da hipertermia em coelhos e do lisado de amebócitos do Limulus.** Cienc. Rural, Santa Maria , v. 37, n. 1, p. 190-194, fev. 2007

BICEGO K. C.; BARROS R. C.; BRANCO L. G. **Physiology of temperature regulation: comparative aspects.** Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.v.147, n.3, p. 616-39, 2007.

BRUM, R. **Padronização e Validação da técnica do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Semi-Quantitativa e Quantitativa para o Biofármaco Alfa-interferona 2b Humana Recombinante,** 2009.

DANESHIAN, M.; GUENTHER, A.; WENDEL, A.; THOMAS, H.; VON-AULOCK, S. **In vitro pyrogen teste for toxic or immunomodulatory drugs.** Journal of Immunological Methods, v. 131, p. 169-175, 2006.

DINARELLO, C.A.; O'CONNOR, J.V.; LOPRESTE, G; SWIFT, R.L. **Teste de pirogênio leucocitário humano para detecção de material pirogênico em hormônio de crescimento produzido por Escherichia coli recombinante.** J. Clin. Microbiol., p. 323-329, 1984

DINARELLO C. Endogenous pyrogens. Methods in Enzymology; v.163:p.495-510, 1988.

Farmacopeia Brasileira 6ª edição - 5.5.2.2 ENDOTOXINAS BACTERIANAS. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1>.

ELISSON, S. L. R. **Uncertainties in qualitative testing and analysis.** AccredQualityAssurance. v. 5, p. 346-348, 2000.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com produtos biológicos sujeitos à Vigilância Sanitária.** 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

HOFFMANN, S. et al. **Validação internacional de novos testes de pirogênios baseados em**

células monocitóides humanas. Journal Immunol. Métodos, p. 161-173, 2005

LEVIN, J.; BANG, F. B. **A description of cellular coagulation in the Limulus.**Bull. Johns Hopkins Hospital. v. 115, p. 337-345, may. 1964.

Morales RP. **Ensayo del lisado de amebócitos del Limulus (LAL).** Revista Cubana de Farmacologia, Artigos de Revisão, 2004; 38:1-8.

PINTO, T. J. A. **Peróxido de hidrogênio como agente despirogenizante de componentes para produtos médico-hospitalares.** Revista de Saúde Pública. São Paulo, v. 29, n. 1, 2003.

SILVA, C.C., PRESGRAVE, O.A.F., HARTUNG, T., MORAES, A.M.L.M., DELGADO, I.F. **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).** Toxicology in Vitro 32, 2016.

SILVEIRA, R. L. et al. **Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 35, n. 1-2, 2004.

SINITOX, Rio de Janeiro, **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 15 ago. 2014

The United States Pharmacopeia - USP 42th Edition <85> Bacterial Endotoxin Test, 2019.

THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. **Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms.** Toxicon, v. 41, p. 541-557, 2003