

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotérios

Adinete Batista dos Santos

**A importância da finalização humanitária no teste de potência do soro
antidiftérico**

São Paulo
2023

Adinete Batista dos Santos

**A importância da finalização humanitária no teste de potência do soro
antidiftérico**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientador (a): Dra. Milene Schmidt do Amaral e Luna.

**São Paulo
2023**

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Santos, Adinete Batista dos

A importância da finalização humanitária no teste de potência no soro antidiftérico / Adinete Batista dos Santos ; orientador(a) Dra. Milene Schmidt do Amaral e Luna - São Paulo, 2023.

29 p.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Difteria 2. Soro antidiftérico. 3. Teste de potência. 4. Ponto final humanitário I. Luna, Dra. Milene Schmidt do Amaral e . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Adinete Batista dos Santos, aluna do curso de especialização do Programa de Pós-Graduação de Especialização em Biotérios, do Instituto Butantan, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____

Justifique:

São Paulo, 02 de Fevereiro de 2023.

Adinete Batista dos Santos

Aluno(a): Adinete Batista dos Santos

De acordo: *Milene Louisa*
Orientador(a): Dra. Milene Schmidt do Amaral e Luna.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus do meu viver, que fará os meus pés como das cervas, e me fará andar sobre as minhas alturas.

A toda gestão deste curso, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

A minha orientadora Dra. Milene Schmidt do Amaral e Luna, Dra. Fernanda Miriane Bruni Soliani e Dra. Renata Damiani.

Aos colegas pela agradável convivência no período do curso.

“Eu sou a favor dos direitos animais bem como dos direitos humanos.
Essa é a proposta de um ser humano integral”.

Abraham Lincoln

RESUMO

SANTOS, Adinete Batista dos. **A Importância da finalização humanitária no teste de potência do soro antidiftérico.** 2023. 29 p. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Biotério) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

A difteria é uma doença infecciosa aguda causada pelo *Corynebacterium diphtheria*, produtor da toxina diftérica. Esse trabalho tem como objetivo demonstrar a importância do estabelecimento do ponto final humanitário no teste de potência do soro antidiftérico. A capacidade protetora do soro antidiftérico é estabelecida sob o efeito letal de uma dose fixa de toxina diftérica através do teste de potência em Cobaias Albinas (*Cavia porcellus*), variedade inglesa. Rotineiramente o teste de potência é realizado no Controle de Qualidade Biológico - *In Vivo* com a finalidade de liberar lotes de soros antidiftéricos pelo Instituto Butantan. No teste de potência, algumas cobaias, apresentam sinais de adoecimento e após o início dos sintomas é impossível observar no quadro qualquer reversão nos efeitos ocasionados pela doença, portanto, com a introdução da finalização humanitária, tem-se a retirada prévia das cobaias do teste, já no segundo estágio de evolução da doença, sem prejudicar o resultado final, contudo reduzindo o sofrimento e o estresse dos animais em teste, promovendo conforto aos animais. O Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo* introduziu o ponto final humanitário no teste de potência do soro antidiftérico promovendo um refinamento do teste de potência, utilizando-se um dos pilares do 3R's agregando qualidade aos testes.

Palavras-chave: Difteria. Teste de potência. Soro antidiftérico. Cobaias. Ponto final humanitário. Bem-estar do animal.

ABSTRACT

SANTOS, Adinete Batista dos. **The Importance of humanitarian termination in the test of potency in antidiphtheria aerum.** 2023. 29 p. Monograph (Specialist in Animal Laboratory) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Diphtheria is an acute infectious disease caused by *Corynebacterium diphtheria*, producer of the diphtheric toxin. The aim of this paper is to demonstrate the importance of establishing the humanitarian end point in the potency test of antidiphtheric serum. The protective capacity of diphtheria serum is established under the lethal effect of a fixed dose of diphtheric toxin through potency testing in albino guinea pigs (*Cavia porcellus*), English strain. The potency test is routinely performed in the Biological Quality Control - In Vivo for the purpose of releasing batches of antidiphtheric sera by the Butantan Institute. In the potency test, some guinea pigs show signs of disease and after the onset of symptoms it is impossible to observe any reversal in the effects caused by the disease, therefore, with the introduction of humane endpoint, the guinea pigs are removed from the test, already in the second stage of disease progression, without harming the final result, but reducing the suffering and stress of animals being tested, promoting comfort to the animals. The Biological Quality Control - In Vivo introduced the humanitarian end point in the potency test of antidiphtheria serum, promoting a refinement of the potency test, using one of the pillars of the 3R's, adding quality to the tests.

Keywords: Diphtheria. Potency test. Antidiphtheria serum. Guinea pigs. Humanitarian endpoint. Animal welfare.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Cavia porcellus</i> - Variedade inglesa.....	15
Figura 2 – Bactéria <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	18
Figura 3 – 1º Estágio: Início do Adoecimento.....	23
Figura 4 – 2º Estágio: Evolução da doença.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formas clínicas de difteria e doses de soro antidiftérico administradas...17

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3R's	<i>Replacement</i> (Substituição); <i>Reduction</i> (Redução); <i>Refinement</i> (Refinamento).
CEUAIB	Comitê de Ética no Uso de Animais no Instituto Butantan
CEUAS	Comissões de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
IdG	Imunoglobulinas heterólogas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	História –O uso de modelos animais para pesquisa e experimentação.....	12
1.2	Finalização humanitária (<i>Human endpoint</i>)	12
1.3	Princípio dos 3R's	13
1.4	Cobaias Albinas (<i>Cavia porcellus</i>).....	14
1.5	Difteria	16
1.6	Soro Antidiftérico	18
2.	OBJETIVOS	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Animais e Inoculação	21
3.2	Aclimação	21
3.3	Padrões	21
3.4	Reagentes	21
3.5	Amostras	22
3.6	Observação das cobaias e leitura do teste	22
4.	RESULTADOS	23
5.	DISCUSSÃO	25
6.	CONCLUSÕES	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 História - O uso de modelos animais para pesquisa e experimentação

A regulamentação e legislação para proteção dos animais surgiu no período moderno com novos conceitos sobre os animais. Jeremy Bentham (1748 – 1832) levou em consideração que os animais são passíveis de sofrimentos (BENTHAM, 1989).

Em 1978, ocorreu, em Bruxelas, a Declaração Universal dos Direitos dos Animais em que foram lançados os grandes temas de discussão sobre este assunto (BRASIL, 2008).

No ano seguinte, no Brasil, a lei 6.638, de 08 de maio de 1979 estabeleceu normas para a prática didático-científica da operação feita em animal vivo com o objetivo de realizar estudo ou experimentação. Os critérios desta Lei têm como objetivo estabelecer que as pesquisas realizadas não gerem sofrimento aos animais envolvidos (BRASIL, 2008).

O CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) foi criado através da Lei Federal nº 11.794/08 e regulamentada em 08/10/2008. Intitulada de lei Arouca, a qual define critérios para o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa. O órgão regulamentador das práticas com experimentação animal encontra-se no artigo 2, juntamente com as CEUAS (Comissões de Ética no Uso de Animais). Desta maneira, contribui com o Poder Executivo e o Ministério da Ciência e Tecnologia para exercícios das leis por estes órgãos determinados (BRASIL, 2008).

Conforme descrito por Paixão (2001), a redução do uso de animais em laboratórios nos testes e experimentos, contribui para o bem-estar do animal e também evitou os custos e aumento de manifestações contra experimentação animal, direcionando cientistas a planejarem melhor seus experimentos, tendo se a considerar métodos alternativos.

1.2 Finalização humanitária (*Human endpoint*)

O Ponto final humanitário é uma conduta científica na qual utiliza os animais em um contexto humanitário, deve ser determinante para que se evite ou reduza a

dor e o sofrimento do animal antes de pensar na eutanásia, considerado, portanto, um indicador mais preditivo em um experimento animal de dor ou distresse (ARAUJO, 2015).

As maneiras de identificação e evidências de algesia e estresse, relacionados com a manipulação animal, são de suma importância, isso dará diretrizes para desenvolver estratégias para reduzir situações consideradas distressantes e de como manter o bem-estar animal, atingindo os objetivos dos projetos de pesquisa realizada.

O ponto final humanitário pode ser um mecanismo de antecipação de encerramento com a finalidade de evitar-se o mal estar do animal, como a dor e distresse proporcionando um alívio ou sua finalização com alguns procedimentos estabelecidos, tais como: I. Tratamento para diminuir a algesia, desconforto ou distresse; II. Suspensão de procedimentos dolorosos; III. Supressão do animal do estudo; IV. Finalização humanitária do animal (eutanásia).

Segundo CONCEA (2018), as ações devem ser tomadas com brevidade sem burocracias, pois o bem estar dos animais deve ser priorizado. As etapas dos métodos de observação são as seguintes: uma quando o animal é observado com distanciamento a fim de que o comportamento e aparência natural sejam avaliados, outro quando há uma aproximação e interação com o observador para se avaliar o comportamento do animal. Após essas etapas, é necessário haver um exame clínico minucioso como pesagem, aferição de temperatura, avaliação de escore corporal, desidratação entre outros. Os estágios que antecipam a morte são denominados de morte presumida, morte iminente e moribundo, e a observação destes estágios precisa ser realizada com calma, mesmo que seja demorada (PAIXÃO, 2001).

1.3 Princípio dos 3R's

O princípio dos 3 R's descrito por Russel e Burch (1959) e vem do inglês: *Replacement, Reduction and Refinement*, em português substituição, redução e refinamento cuja finalidade é proporcionar uma pesquisa humanitária para os animais.

A implementação dos 3R's são de extrema importância para uma ciência de qualidade na sociedade contemporânea. Métodos alternativos foram incorporados não somente por questão ética, mas também para reduzir custos. Com a finalidade

de uma boa reprodução a cultura de células são exemplos de métodos alternativos que têm sido utilizados com reconhecimento para a devida garantia de resultados finais. Sendo assim, obtém-se maior visibilidade na comunidade científica em reduzir o uso e aumento do bem-estar animal (CAZARI *et al*, 2004).

No princípio dos 3R's, cita-se o método da substituição ou *replacement*, no qual os animais escolhidos para um determinado experimento são substituídos. Podendo recorrer à simulação de processos fisiológicos utilizando computadores, modelos matemáticos, trabalhos com órgãos e tecidos isolados de animais, substituição de estudo em animais vertebrados vivos por invertebrados como a *Drosophila* vermes e outros (CAZARI *et al*, 2004).

Para o conceito da redução (*reduction*) consiste na planificação dos experimentos, a fim de poder compartilhar os mesmos animais. O estabelecimento de banco de dados, facilitação de acesso à literatura especializada, qualidade genética sanitária e ambiental dos animais possibilitando uma menor dispersão dos resultados, portanto a diminuição do número dos animais utilizados por experiência ou estudo (RUSSEL; BURCH, 1959).

E por fim o do refinamento (*refinement*) - neste, a dor, o sofrimento ou dano duradouro que pode ser vivenciado pelos animais nos testes são minimizados. Incluem como exemplos de refinamento o uso de anestésicos e analgésicos adequados, evitando o estresse, treino dos animais que cooperam com os procedimentos e fornecer um microambiente adequado aos animais que permite a expressão de comportamentos específicos da espécie (RUSSEL; BURCH, 1959).

1.4 Cobaia Albinas (*Cavia porcellus*)

A cobaia Albina (*Cavia porcellus*) é um animal muito utilizado em pesquisas científicas, oriundo da América do Sul, posteriormente esse roedor foi levado para a Europa e toda América. No século XVII os espanhóis os levaram para a Europa e a partir daí seu uso além de doméstico passou a ser aproveitado como animais de laboratório, conforme demonstrado na Figura 1.

A partir de 1906 estas cobaias contribuíram muito na área de pesquisa genética e reprodutiva, e, a partir de 1946, na Alemanha, conseguiram realizar sua produção livre de germes (COUTO, 2002).

O Nome científico: *Cavia porcellus*, seu peso na fase adulta pode atingir de 250g a 350g ou mais. Pertencem à classe mamífera, ordem *Rodentia*, família *Cavidae*, gênero *Cavia* e espécie *Porcellus*.

Figura 1 – *Cavia porcellus* – Variedade inglesa



Fonte: INSTITUTO BUTANTAN, 2022.

Em 1790, Lavoisier utilizou as primeiras cobaias em suas pesquisas, sendo atualmente muito comuns em diversas pesquisas por ser um animal com grande potencial reativo biológico nos testes. Os diferentes gêneros da *Cavia* se dão pela diferença dos pêlos. É um roedor cujo corpo possui forma arredondada e sem cauda. Os machos são mais corpulentos que as fêmeas. Tem dentes com crescimento constantes no total de 20 dentes permanentes. A temperatura retal em média de 38,5°C (COUTO, 2002).

Seu consumo médio diário para ração é de 40g. A deficiência de ácido ascórbico em sua alimentação pode trazer perda de peso e outros malefícios biológicos podendo findar em sua morte. Esses animais são sensíveis à desidratação e alternâncias de temperatura. Para o sistema de acasalamento utiliza-se fêmeas com 03 meses de idade (400g-500g) e machos com 04 meses (500-600g). O acasalamento se dá em média de 90 dias de idade. Antes dos 06 meses de idade deve ocorrer o primeiro parto, evitando a calcificação das articulações da pélvis (COUTO, 2002).

Os tipos de acasalamento são monogâmicos ou poligâmicos. O período que se mantém os reprodutores nas colônias é de 24 a 30 meses enquanto que o período médio gestacional é de 63 dias, o número médio de filhotes por parto é de 2, variando de 1 a 8. Cada parto deverá ter intervalo de 79 dias, devendo possuir durante seu período de vida em média de 05 partos. O período de desmame dos filhotes, em torno de 21 dias de idade, com o peso em torno de 180 g. As fêmeas gestantes e seus recém-nascidos merecem uma atenção especial em seu manejo, pois as cobaias respondem com muita sensibilidade às alterações de ambientes e situações de estresse (COUTO, 2002).

1.5 Difteria

Para que possamos ter um maior embasamento teórico acerca do tema intitulado é necessário que venhamos antemão conceituar a difteria, desde o seu surgimento afetando os humanos até os dias atuais. A difteria é uma doença infecciosa aguda causada pelo *Corynebacterium diphtheriae*, produtor da toxina diftérica e foi a principal causa de mortalidade infantil em crianças na era de pré- vacinação. Com a introdução da vacinação rotineira contra a difteria, melhorias na higiene e nos cuidados hospitalares, a incidência da doença diminuiu significativamente nas últimas décadas 80–90% da carga total (KUPFERSCHIMIDT, 2017).

Surtos recentes ocorreram em diferentes continentes, principalmente entre populações refugiadas com baixa cobertura vacinal e acesso inadequado aos serviços de saúde, tornando a difteria um problema global (KUPFERSCHIMIDT, 2017).

A manifestação clínica típica de um surto agudo é a presença de uma placa pseudomembranosa aderente, esbranquiçada, alojada na amígdala e invadindo estruturas adjacentes. Essas placas são encontradas na faringe, laringe e passagens nasais, mas raramente são encontradas em outras membranas mucosas ou na pele. A toxina diftérica tem tropismo específico para o miocárdio, sistema nervoso, rins e glândulas adrenais associadas à obstrução das vias aéreas, miocardite, polineuropatia e insuficiência renal (KUPFERSCHIMIDT, 2017).

Pode causar complicações como nefropatia a transmissão ocorre através do contato direto de um doente ou portador com indivíduo suscetível por meio de

gotículas de secreções respiratórias liberadas ao tossir, espirrar ou falar (BRASIL, 2008). O período de incubação é geralmente de 1 a 6 dias, e o contágio dura em média até 2 semanas após o início dos sintomas. O tratamento específico é administrado pela administração de soro antidiftérico para neutralizar as toxinas circulantes. Como o soro antidiftérico não afeta as toxinas que já penetraram no tecido, ele deve ser administrado por via intravenosa o mais rápido possível, se houver suspeita clínica razoável. Por ser um produto heterogêneo, sua administração deve ser feita com cautela devido a possíveis efeitos colaterais e deve ser realizada em ambiente hospitalar (KUPFERSCHIMIDT, 2017).

A dosagem do soro antidiftérico depende da gravidade e duração da doença, e o esquema de administração do soro antidiftérico é determinado de acordo com a morfologia clínica da doença (Tabela 1).

Tabela 1 – Formas clínicas de difteria e doses de soro antidiftérico administrado

FORMA CLINICA	DESCRIÇÃO	DOSAGEM
LEVE	Amigdalite faríngea (angina diftérica): a forma mais comum começa com amígdalas aumentadas, hiperemia faríngea, adesivo característico e formação de pseudomembranas invasivas, consistindo em placas esbranquiçadas ou amarelo-acinzentadas, espessadas, - com bordas definidas.	40.000 UI
	Nariz: secreção nasal serosa e sanguinolenta com lesões na borda do nariz e lábio superior.	
	Cutânea: úlceras arredondadas com exsudato fibrino purulento e margens definidas profundas, mas não atingindo o tecido subcutâneo.	
LARINGOAMIGDALIANA OU MISTA	Começa na orofaringe e continua até a laringe. Além das lesões observadas na faringe diftérica, há tosse, rouquidão, disfonia e dispnéia progressiva. À medida que as pseudomembranas progridem, a saúde geral se deteriora.	60.000 a 80.000 UI
GRAVE OU TARDIA (≥ 4 DIAS DE DOENÇA)	Difteria altamente virulenta (maligna): Perturbação do estado geral com hemato-toxicidade, placas necróticas estendem-se além dos limites das amígdalas, atingindo estruturas adjacentes. Aumento acentuado do volume dos linfonodos cervicais e edema periganglionar, levemente doloroso à palpação (pescoço taurino).	80.000 a 120.000

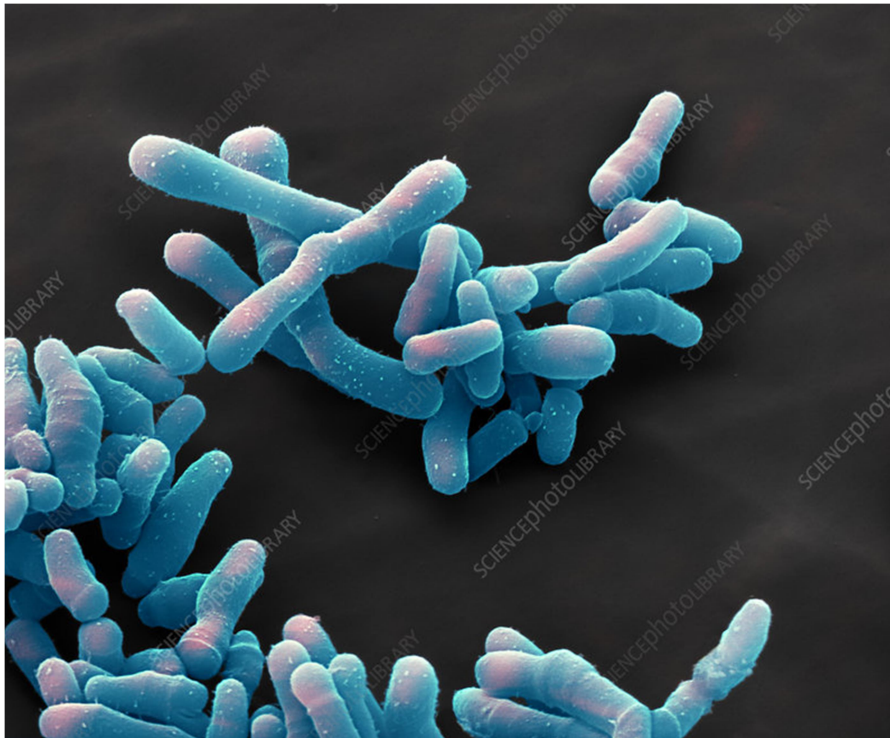
Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.

Embora o tratamento com antibióticos impeça a produção de toxinas, interromper a progressão dos danos aos órgãos-alvo, como o músculo cardíaco, causados por toxinas previamente liberadas e circulantes, requer a adição de soro antidiftérico, um ingrediente essencial no tratamento da difteria. Esta é uma doença de notificação obrigatória e qualquer suspeita deve ser relatada imediatamente para que uma investigação possa ser iniciada e as medidas de controle apropriadas sejam tomadas.

1.6 Soro Antidiftérico

Na última década do século XIX, no Brasil, surge a difteria, a qual se espalhou pelas cidades e se tornou endêmica nos meses de outono e inverno, e, por se tratar de uma doença infectocontagiosa – causada pela bactéria *Corynebacterium diphtheriae* – conforme ilustra a (Figura 2), que produz exotoxina diftérica. O soro antidiftérico e a vacina são medidas preventivas existentes contra a difteria (BUTANTAN, 2018).

Figura 2 – Bactéria *Corynebacterium diphtheriae*



Fonte: MURRAY et al., 2009.

Há mais de um século, o Instituto Butantan produz vários tipos de soros contra microrganismos, como os soros antidiftérico e antitetânico, e soros de animais peçonhentos como soros antiofídicos, entre outros. Com apresentação na forma líquida, os soros do Butantan são compostos de frações de imunoglobinas específicas (BUTANTAN, 2021).

O soro antidiftérico é uma solução indicada para o tratamento da difteria (imunoglobulinas heterólogas – IdG) que contém imunoglobulinas purificadas por digestão enzimática, não pirogênica, obtidas a partir de plasma de animais hiper imunizados (cavalos sadios) contra a toxina produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae* que interrompe a produção de toxina diftérica mas que só poderá ser realizada mediante orientação médica. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, no mínimo, 1000UI de antitoxina (BUTANTAN, 2021).

O Controle de Qualidade é o setor responsável por atividades de amostragem, especificações e a realização de testes, bem como organização, documentação e procedimentos de liberação que comprovem a eficácia e a segurança de todos os produtos do Instituto Butantan antes de serem liberados para uso.

Fazem parte do Controle de Qualidade do Instituto Butantan os laboratórios Físico-Químico, Microbiológico, Biológico-*In Vivo*, Biológico-*In Vitro*, Biotecnológico e uma área de Documentação Técnica.

O Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo* é responsável pela análise dos produtos a fim de assegurar a qualidade por meio de ensaios de segurança biológica (testes de toxicidade específica e pirogênio), identidade e potência. No Instituto Butantan, todos os colaboradores - são responsáveis por realizar suas atividades com qualidade de forma robusta - seguindo as práticas previamente definidas, garantindo a rastreabilidade das atividades e o atendimento às normas (BUTANTAN, 2021).

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é descrever a aplicação do ponto final humanitário estabelecido no teste de potência do soro antidiftérico realizado no Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para determinação da capacidade protetora do soro antidiftérico sobre o efeito letal de uma dose fixa de toxina diftérica é realizada pelo Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo* que possibilitou a observação dos procedimentos para o teste de potência do soro antidiftérico.

3.1 Animais e Inoculação

O biotério central do Instituto Butantan fornece os animais que serão utilizados nos testes do Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo*. Para cada lote de produto são utilizadas 44 cobaias no total, sendo 20 (vinte) cobaias para a antitoxina de referência e 24 (vinte e quatro) cobaias para o produto em teste.

São utilizadas cobaias Albinas (*Cavia porcellus*), variedade inglesa, ambos os sexos, com peso entre 250 e 350g.

Os animais utilizados nesta metodologia estão aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan – CEUAIB, protocolo nº 3723240820.

3.2 Aclimação

As cobaias são recebidas do biotério central e ficam em observação e aclimação por 24 horas, para avaliação do estado geral dos animais. As caixas recebidas do biotério possuem identificação da raça e sexo. Após avaliação clínica, os animais são pesados e é feita a sexagem, então as cobaias são separadas em caixas adequadas e identificadas com etiquetas.

3.3 Padrões

Para esta metodologia é utilizado a antitoxina diftérica padrão de referência nacional, liofilizada, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). E a toxina diftérica padrão de referência (padronizada) fornecida pelo Instituto Butantan.

3.4 Reagentes

É utilizada para diluição, Solução salina tamponada peptonada 1% esterilizada.

3.5 Amostras

Para cada lote de produto testado utiliza-se no mínimo 5 ml de soro antidiftérico. Sendo que para cada lote de produto os animais são divididos em: grupo referência e grupo produto em teste.

O grupo referência, utiliza a antitoxina diftérica+toxina diftérica+solução salina tamponada peptonada 1%, sendo realizadas 05 diluições na razão 1:2.

Por outro lado, o grupo produto em teste é composto pela toxina diftérica+amostra em teste+solução salina tamponada peptonada 1%. Neste grupo são realizadas 06 diluições na razão 1:2, totalizando 11 diluições com 04 animais para cada diluição.

Para cada cobaia é inoculado 1,0ml com as respectivas misturas por via subcutânea na região abdominal e é necessário fazer assepsia do local de inoculação com algodão umedecido com solução de álcool etílico 79°GL.

3.6 Observação das cobaias e leitura do teste

Os animais são observados diariamente por 96 (noventa e seis) horas com relação às condições clínicas, às alterações e evolução da doença. Os sintomas de difteria a serem observados são: piloereção, letargia, dificuldade para respirar, dificuldade para girar o corpo, enfraquecimento dos membros inferiores e muitas vezes sinais de desidratação devido à dificuldade de se hidratarem e se alimentarem.

A leitura do teste é registrada em formulário específico, no qual é registrado o número de animais mortos ou doentes pelo total de animais inoculado por diluição.,

4 RESULTADOS

Os testes de potência do soro antidiftérico foram realizados em cobaias no Controle de Qualidade Biológico - *In Vivo*, a leitura do teste foi realizada diariamente durante 96 (noventa e seis) horas e registrada no formulário específico. Inicialmente, somente as cobaias que chegavam a óbito eram retiradas do teste e as que apresentavam sintomas de intoxicação diftérica eram mantidas até o final do teste.

É notável que quando surgem os primeiros sintomas da intoxicação diftérica, a doença evolui gradativamente e não há como reverter os sintomas, portanto, a implementação do ponto final humanitário (*endpoint*) tornou-se fundamental para promover o bem-estar aos animais em teste.

Em harmonização com o Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o Instituto Butantan implementou o ponto final humanitário no teste de potência de soros antidiftéricos.

Ao observar os sintomas durante as 96 (noventa e seis) horas do teste percebe-se que o adoecimento por intoxicação diftérica em cobaias evolui e pode ser classificado em dois estágios de evolução da doença:

No 1º estágio: os animais apresentam-se apáticos, com os pelos arrepiados, levemente prostrados, o que sinaliza o início do adoecimento (Figura 3). Apesar de não serem sinais específicos de intoxicação diftérica, indicam que o bem-estar do animal está comprometido.

Figura 3 – 1º Estágio: Início do Adoecimento



Fonte: INCQS.

No 2º estágio, os animais permanecem letárgicos, com nítida dificuldade respiratória, fraqueza nos membros posteriores, intumescimento abdominal visualmente pela evolução do adolecimento e muitas vezes sinais de desidratação devido à dificuldade de se alimentarem e se hidratarem (Figura 4).

Figura 4 – 2º Estágio: Evolução da doença



Fonte: INCQS.

Com uma avaliação mais criteriosa dos animais, foi possível identificar que a maioria das cobaias, que se apresentavam no 2º estágio de evolução da doença, vinham a óbito nas próximas 24 horas. Enquanto que os animais que estavam no 1º estágio de evolução do adolecimento poderiam ou não evoluir para o estágio mais avançado da intoxicação diftérica.

Os resultados conferidos dos testes nos quais as cobaias eram mantidas em teste, até virem a óbito, em comparação com os animais que são retirados no segundo estágio de evolução da doença, não interferiram no resultado final da potência estimada. Contudo, é perceptível que os animais estavam em sofrimento.

Uma vez que esta condição não é mais aceitável, a implementação do ponto final humanitário tornou-se fundamental e imprescindível. Com isso, os animais que se encontram no 2º estágio de evolução da doença são retirados e eutanasiados de forma a evitar o sofrimento desnecessário.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi possível observar que a implementação do ponto final humanitário (*endpoint*) no teste de potência de soros antidiftéricos realizados no Controle de Qualidade Biológico – In Vivo promoveu um refinamento do teste através do uso de um dos princípios dos 3R's definido como refinamento. Nesta metodologia a dor, o sofrimento ou dano duradouro que pode ser vivenciado pelos animais nos testes foram minimizados ou evitados.

A princípio, as cobaias submetidas ao teste de potência não eram eutanasiadas antes de 96 (noventa e seis) horas, mesmo apresentando os sintomas de intoxicação diftérica, como dificuldade de se locomover para se alimentar e hidratar-se, levando a óbito. No entanto, com a evolução dos conhecimentos e da ciência, de animais de laboratório, tornou-se imprescindível o refinamento deste teste.

Com isso, a observação dos estágios da evolução da doença, foi possível verificar que a partir do momento em que as cobaias começam a apresentar sintomas classificados como segundo estágio de evolução, sendo eles: prostração, dificuldade respiratória e entumescimento abdominal, não há reversão destes sinais e sim uma evolução do quadro clínico culminando na morte do animal. Adotou-se como critério para leitura do teste, que as cobaias que apresentarem os sinais clínicos identificados como do segundo estágio de evolução da intoxicação diftérica, serão retirados do teste e eutanasiados de forma a evitar o sofrimento desnecessário dos animais.

6 CONCLUSÕES

De acordo com as observações do Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo* e da evolução da doença, fica claro que não existe a possibilidade do animal em teste, com sintomas de adoecimento se recuperar e não vir a óbito. Diante disso, a fim de zelar pelo bem-estar dos animais utilizados, o Controle de Qualidade Biológico – *In Vivo* estabeleceu que as cobaias que apresentarem sinais clínicos correspondentes ao segundo estágio de evolução da intoxicação diftérica, serão retiradas do teste e eutanasiadas, ou seja, determinou-se o ponto final humanitário para o teste de potência do soro antidiftérico de forma que não há comprometimento com o resultado final.

Desta maneira, a eutanásia humanitária visa amenizar a dor e/ou sofrimento do animal que estiver comprometido e não existam maneiras para aliviar as dores, mesmo que se utilizem sedativos, analgésicos ou outros tratamentos.

REFERÊNCIAS¹

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Produtos Biológicos**. Monografias Produtos Biológicos Farmacopeia Brasileira, 6 ed. v. II. Brasília, 2019.

ARAUJO, F. R. de C. **Ponto final humanitário na experimentação animal: um estudo da aplicação na área de vacinas***. Rio de Janeiro, 2015. 129 f. Tese (Clínica e Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2015.

BENTHAM, J. **Uma introdução aos princípios da moral e da legislação**. Editora Nova Cultural, São Paulo. 1989.

BRASIL. Lei nº 11.794/2008. **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. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil03/ato20072010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2021.

BUTANTAN. **Controle de Qualidade**. 2021b. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/qualidade/controle-da-qualidade>. Acesso em: 29 dezembro 2021.

BUTANTAN. **Soro e Vacinas**. 2021a. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/soros>. Acesso em: 29 dezembro 2021.

BUTANTAN, INSTITUTO. **Soros e vacinas do Butantan**. Org. por Luciana M. Mônaco. 1.ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2021.

BUTANTAN, INSTITUTO. **Soro Antidiftérico**. Modelo de Bula, 2018.

BUTANTAN. **Portal do Butantan**. Instituto Butantan. Governo do Estado de São Paulo, 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/>. Acesso em: 03 dez. 2022.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Rev. Bras. de Ciênc. Farm.**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais**. 2020. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia-em-animais/comunicacao/publicacoes/2020/08/03/#1>. Acesso em: 03 dez. 2022.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018 - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Resolução Normativa CONCEA nº 13, de 20.09.2013. Publicada no D.O.U. de 22.02.2018, Seção I, Pág. 5.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

COUTO, S.E.R. **Criação e Manejo de Cobaias**. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org). **Animais de Laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.

GONZÁLEZ, T. F. F.; VASCONCELOS, T. C.de.; SANTOS, I. B. dos. Eutanásia: Morte Humanitária. **PUBVET** – Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 15 No. 04, 2021.

KRELL, A. J.; LIMA, M. V. C. A vedação constitucional de práticas cruéis contra animais e a correta interpretação das normas legais sobre vivissecação pelas comissões de ética no uso de animais. **Revista Brasileira de Direito Animal**. Bioética, 2015.

KUPFERSCHIMIDT K. Life-saving diphtheria drug is running out. **Science**. 355 (6321): 118-119, 2017.

LANGFORD, D. et. al. **Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse**. Naturemethods. 7. 447-9. 10.1038/nmeth.1455, 2010.

MCTI. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológicos. **Manual dos Centros de Referência para imunobiológicos especiais**. Brasília. 2006.

MURRAY, Patrick; Rosenthal, Ken; Pfaller, Michael. **Microbiologia médica** 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 948 páginas. ISBN 9788535234466. 2009,

PAIXÃO, R. L. **Experimentação Animal**: razões e emoções para uma ética. Rio de Janeiro, 2001. 151 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen & Co. Limited, 1959.