



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

RENATA MENDES BATISTA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA HUMANA: NOVA APLICAÇÃO
TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA DENGUE**

Dissertação de Mestrado

Recife, PE
2012

Renata Mendes Batista de Oliveira

PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA HUMANA: NOVA APLICAÇÃO
TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DA DENGUE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra Ana Cristina Lima Leite

Recife, PE
2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Renata Mendes Batista de

Produção de imunoglobulina humana: nova aplicação terapêutica para o tratamento da dengue / Renata Mendes Batista de Oliveira- Recife: O Autor, 2012.

61 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui referências

1. Dengue 2. Imunoglobulinas 3. Epidemiologia I. Leite, Ana Cristina Lima (orientadora) II. Título

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-283

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Reitor

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências Biológicas

Profa. Ângela Maria Isidro Farias

Vice-Diretor do Centro de Ciências Biológicas

Profa. Silvia Regina Arruda de Moraes

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Prof.^a Suely Lins Galdino

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Prof.^a Ana Cristina de Almeida Fernandes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 02 de maio de 2012

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA** em 02 de maio de 2012, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Marli Tenório Cordeiro (Departamento de Virologia – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Primeiramente a minha família em especial aos meus pais, Luiz e Alacoque, por todo o ensinamento, dedicação, amor e confiança depositados em mim, e que mesmo distantes estão presentes em cada momento de conquista, alegria e momentos difíceis da minha vida...

Ao meu querido e amado Fred pelo carinho, amor, companheirismo e incentivo dedicados ao longo destes dois anos de caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a minha fonte de fé, força e serenidade para enfrentar todos os caminhos a serem seguidos.

À orientadora e amiga prof^a. Ana Cristina Lima Leite pela oportunidade concedida, e a confiança depositada para realização do trabalho.

Ao grupo de pesquisa do INCT- Dengue, sob a coordenação do Prof. Mauro Martins Teixeira, em especial aos do Departamento de CCB da UFMG, Laboratório de Imunologia, pela realização dos ensaios biológicos com a IGIV.

À prof^a. Marli Tenório, da FIOCRUZ, pela boa vontade, interesse e tranquilidade dedicados a realização dos testes de PRNT.

Aos amigos dos laboratórios da Fundação Hemope: Fátima, Rosas, Cardoso, Francisco, Vado, Carlos, Queiroga, Dorian, “Rubro-negro”, Avanir, Geralda, Chico, Alegigton, Virgínia e todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste projeto.

Ao amigo Diogo Rodrigo pela amizade, grande apoio e incentivo para meu ingresso nesta nova etapa da minha carreira profissional.

Aos meus amigos e amigas por sempre contribuírem com bastante alegria e amizade na minha vida.

A minha querida Tânia, por sua dedicação e paciência comigo durante toda a minha vida aqui em Recife e também durante esta empreitada.

Aos meus irmãos: Manoela, Gabriela, Roberta e Luiz Eduardo, por fazerem sempre parte da minha vida. Pelas brigas, que nos fortalece a amizade, pelo amor compartilhado e dedicado a mim por tantos anos.

Aos meus lindos sobrinhos Luiz Fernando e Maria Júlia por ser a alegria nas nossas vidas.

A todos os professores que fazem parte do programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Novamente aos meus pais, minha fortaleza, meus maiores exemplos na vida; que me ensinaram não ser necessário ter tudo na vida, mas sim ser feliz e viver em paz.

Ao meu amado Fred, que além de companheiro de trabalho é companheiro de vida, momentos de alegrias, angústias e vitórias. E por toda sua paciência para me ensinar a ser pesquisadora.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem, constituindo um sério problema de saúde pública. O vírus causador pertence à família *Flaviviridae*, e são conhecidos quatro sorotipos (DENV 1-4), não oferecendo proteção cruzada entre si. As manifestações clínicas decorrentes da infecção por qualquer um dos sorotipos virais vão desde um quadro assintomático a um quadro mais grave da doença, denominado febre hemorrágica da dengue (FHD). Atualmente, quase metade da população mundial vive em áreas de risco da doença e, apesar de sua extensão e gravidade, vacinas ou tratamentos específicos ainda não estão disponíveis. A neutralização do vírus da dengue por um anticorpo específico consiste em uma importante ferramenta terapêutica. No presente trabalho, descrevemos, pela primeira vez, a produção de uma solução de imunoglobulina específica para o vírus da dengue (IgG anti-DENV), produzida a partir do plasma de doadores brasileiros. Esta preparação foi bioquimicamente caracterizada e os sorotipos de DENV quantificados por testes de neutralização. Também foram realizados ensaios pré-clínico, frente a animais infectados com o sorotipo DENV-3. Os resultados iniciais revelaram exacerbação da resposta à infecção, aumento da letalidade e aumento da carga viral, nos animais tratados com IGIV específica. Entretanto estes são resultados preliminares os quais serão investigados a hipótese de sua ocorrência, e a realização de novos testes com outros parâmetros terapêuticos, utilizando IgG anti-DENV em outras concentrações.

Palavras-chaves: Dengue, Hemoderivados, Imunoglobulinas Específicas, Infecção Viral, Fracionamento de Plasma.

ABSTRACT

Dengue is the most important arbovirus that infects human beings, and represents an important health problem. Dengue belongs to the *Flaviviridae* family, having four virus serotypes known (DENV 1-4), which there is no crossed protection to each other virus serotype. Clinical signs of Dengue infection due to any of these virus serotypes can result to asymptomatic disease until the most severe infection, which is Dengue hemorrhagic fever (DHF). Despite the importance of Dengue infection to the health care, nowadays there are no vaccines or specific treatments. Virus neutralization by specific human antibody constitutes a reliable therapy. In light of this, we described here, for the first time, the production of human immunoglobulins specific in neutralizing Dengue virus (IgG anti-DENV), purified from Brazilian blood-donations. These IgG were biochemically and biophysically characterized and the overall ratio of IgG serotypes (DENV) were estimated using a neutralizing virus screening in vitro. Once these IgG were characterized, we tested this material in mice infected by DENV-3 serotype. Although preliminary, the administration of IgG anti-DENV impaired mouse immune response, resulting in high virus titles and decreasing animal survival. However these are preliminary results which will investigate the possibility of its occurrence, and further testing with other therapeutic parameters, using anti-DENV IgG in other concentrations.

Keywords: Dengue, blood derivatives, specific Immunoglobulins, viral infection; plasma fractionating.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de Risco da dengue- 2011	8
Figura 2 - Aspectos clínicos da dengue clássica e hemorrágica	11
Figura 3 -Perspectiva do consumo de IGIV	13
Figura 4 - Estrutura da Imunoglobulina G	16
Figura 5 - Estratégia experimental	36
Figura 6 - Taxa de letalidade induzida pela infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino, após transferência passiva de IVIG com altos títulos de anticorpos anti-dengue	40
Figura 7 - Alterações hematológicas e hepáticas após a infecção com o DENV-3 e tratamento com IVIG/HEMOPE e IVIG/USA.....	41

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

ADE	Fenmeno de imunoamplificao da infeco dependente de anticorpos pré-existentes (<i>antibody dependent enhancement</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CETEA	Comit de tica em Experimentao Animal
DENV	Vírus dengue
DMEM	Modificao do Meio Basal Eagle (BME)
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
ELISA	Teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
GPH	Gerência de Produo de Hemoderivados
HBsAg	Antígeno de Superfície da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
i.c.	Intracerebral
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IGIV	Imunoglobulina G Intravenosa
IFN	Interferon
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitnial
kDa	QuiloDalton
LACEN/PE	Laboratório Central do Estado de Pernambuco
LLC	Leucemia Linfóide Crnica
MEM	Minimum Essencial Medium
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO₄	Fosfato de sódio
NI	No infectados

OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde
PAF	Fator de ativação das plaquetas
PBS	Solução tampão de fosfato padrão
PFU	Unidade formadora de placa
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
PTI	Púrpura Trombocitopênica Idiopática
p/v	Parte por volume
rpm	Rotação por minuto
SFB/FCS	Soro fetal bovino
TNBP	Tri-n-butil-fosfato
TGO	Aminotransferase glutâmico-oxalacética
TGP	Aminotransferase glutâmico-pirúvica
TNF	Fator de necrose tumoral
TTO	Tratamento
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v/v	Volume por volume
WT	Tipo selvagem (wild type)
WNV	Vírus do Nilo Ocidental (West Nile Virus)

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 DENGUE	17
2.1.1 <i>Histórico</i>	17
2.1.2 <i>Epidemiologia</i>	18
2.1.3 <i>Aspectos Clínicos</i>	21
2.2 HEMODERIVADOS	24
2.2.1 <i>Imunoglobulinas</i>	26
3.0 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVOS GERAIS	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.0 ARTIGO	32
5.0 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	46
5.1 METODOLOGIA	46
5.1.1 <i>Adaptação da amostra clínica do DENV-3 humano ao hospedeiro murino</i>	46
5.1.2 <i>Animais e protocolo experimental</i>	47
5.1.3 <i>Titulação do vírus dengue</i>	49
5.1.4 <i>Quantificações dos níveis de plaquetas circulantes</i>	50
5.1.5 <i>Análises do índice de hematócrito</i>	50
5.1.6 <i>Análise Histopatológica</i>	50
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
7.0 PERSPECTIVAS	55
8.0 REFERÊNCIAS.....	57

1.0 INTRODUÇÃO

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, com transmissão através da picada do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, que é predominantemente urbano e encontrado em todo o território nacional (MIAGOSTOVICH et. al., 2006). São conhecidos quatro sorotipos do vírus dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4; estes não oferecem proteção cruzada entre si. As manifestações clínicas decorrentes da infecção por qualquer um dos sorotipos virais pode ser assintomática, ou levar ao estado conhecido como dengue clássica ou até mesmo ocasionar a forma mais grave da doença, denominado febre hemorrágica da dengue (FHD) (HALSTEAD, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue é classificada como uma doença classe I, ou seja, doença emergente ou descontrolada sem nenhum tratamento eficaz aprovado e para os quais o foco deve ser a aquisição de novos conhecimentos e novas ferramentas, com o objetivo de controle dessa enfermidade.

A OMS estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença. Estima-se também que, ocorrem atualmente cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão (GUZMAN et. al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009)

Atualmente, não há vacina disponível ou tratamento eficaz e novas terapias são, portanto, uma necessidade urgente. Apesar de esforços significativos realizados na área de química medicinal, nenhum composto orgânico promissor, dotado de atividade inibitória sobre o vírus foi desenvolvido (YIN et. al., 2009).

Por outro lado, infecções por dengue e vírus do Nilo Ocidental (WNV) são imunologicamente e com sintomas similares. WNV, assim como o vírus dengue, pertence à família dos *Flavivirus* e imunoglobulina G intravenosa (IGIV) tem ajudado na recuperação de pacientes. IGIV hoje é rotineiramente usada para tratar infecção por WNV (WADEI et. al., 2004; HALEY et. al., 2003).

De fato, “pool” extremamente purificado de IgGs policlonais, IGIV e anticorpos específicos (IGIV específica) são terapias padrões para um grande número de doenças. Por exemplo, preparações de IGIV específicas combatem uma série de doenças infecciosas e

patológicas, como o citomegalovírus, tétano e hepatite B (LORIES et. al. 2000; DALAKAS et. al. 1993; OHLSSON et. al. 2001). IGIV também diminui as complicações durante os transplantes de medula óssea e órgãos sólidos, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (PDIC), asma grave, HIV pediátrico, dermatomiosite e esclerose múltipla (WERDAN, 2001; BRENNAN, 2001; ACHIRON et. al., 2000).

Baseado nessas premissas, a utilização de IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue poderia reduzir as complicações associadas à infecção da dengue, assim como seu grau de mortalidade.

Este trabalho apresenta-se inicialmente com a Revisão da literatura, sendo esta dividida em Dengue, aspectos clínicos e epidemiológicos e Hemoderivados e Imunoglobulinas-conceito e utilização; Objetivos; Artigo submetido: Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors; Metodologia dos ensaios pré-clínicos; Resultados e discussões dos ensaios pré-clínicos; Perspectivas e Referências.

REVISÃO DA LITERATURA

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dengue

A dengue é uma doença febril, exantemática aguda e considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Constitui-se de uma doença de grande relevância em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo e tem demandando grandes esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMÁN et. al., 2010).

2.1.1 Histórico

A palavra dengue foi adotada mundialmente, tanto para designar a doença, como os vírus que a causam. Entretanto, a doença recebeu no passado diferentes denominações nos países onde foi identificada. A expressão dengue é de origem hispano-caribenha e tem sido usada, desde 1827, para identificar síndromes febris epidêmicas (GUBLER, 1997).

A problemática da dengue não é recente, existindo descrição de epidemias e relatos clínicos, semelhantes ao da dengue, em enciclopédias chinesas datadas do século 610 D.C. Existem outros relatos de uma doença também com sintomatologia semelhante à da Dengue datando de 1779-1780, quando ocorreu uma epidemia no Cairo, na Indonésia e na Philadelphia (GUBLER, 1997).

O isolamento do vírus dengue foi realizado originalmente por Albert Sabin, no ano de 1945, o qual identificou os dois primeiros sorotipos, DENV tipo 1 e 2. Os outros dois sorotipos DENV tipo 3 e 4, foram isolados por Hammon em 1960, em pacientes com febre hemorrágica da dengue (ROSEN; GUBLER, 1974; HALSTEAD, 1992).

Nos últimos séculos, há registro de ocorrência de casos da doença, tanto epidemias e pandemias, em diversos continentes como Américas, África, Ásia, Europa e Austrália, sendo um problema de saúde pública (TEIXEIRA et. al., 1999). Nas Américas, as epidemias de dengue foram relatadas desde o século XIX, coincidindo com a intensificação do transporte comercial entre os portos da região do Caribe e do sul dos Estados Unidos com outras partes do mundo (MONATH, 1994). No Brasil, as primeiras referências sobre a dengue datam de

1846, em São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador e outras cidades, sendo conhecida como “polca” e “patuléia” (BRASIL, 1996a).

Entre os anos de 1981 e 1982 foi registrada a primeira epidemia de dengue no Brasil, que ocorreu na cidade da Boa Vista-RR, onde os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados (SIQUEIRA et. al., 2004; NOGUEIRA et. al., 2007). Devido aos esforços para a eliminação da febre amarela urbana durante a primeira metade do século 20, as áreas urbanas do Brasil se mantiveram livres do *Aedes aegypti* até o ano de 1976. Porém, com o crescimento desorganizado e rápido das cidades, e a falta de manutenção do programa de combate à febre amarela, ocorreu a reintrodução e o estabelecimento do *Aedes aegypti* (também transmissor da febre amarela urbana), em áreas urbanas de vários estados brasileiros, facilitando também assim a disseminação do vírus da dengue (SIQUEIRA Jr. et. al., 2005).

Porém a propagação viral para o resto do país ocorreu em 1986, a partir do município de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA et. al., 2000; SIQUEIRA et. al., 2004). No ano de 1990, com a introdução do DENV-2 no Rio de Janeiro, ocorreu a notificação dos primeiros casos de Febre hemorrágica da dengue (FHD) (NOGUEIRA et. al., 2002). Já em 1998, ocorreu, no estado de São Paulo, a notificação e isolamento do DENV tipo 3, sendo este o mesmo sorotipo responsável pela maior e mais grave epidemia ocorrida no Brasil no ano de 2002 (NOGUEIRA et. al., 2001; ROCCO et. al., 2001; DA SILVA et. al., 2002; PAHO, 2003).

Em 2008, existia o risco da reintrodução do sorotipo 4 no Brasil, devido ao aumento de casos da doença provocados por este sorotipo, em países da América do Sul, como Venezuela e Colômbia (GUZMÁN; KOURI, 2002). No ano de 2010, foi identificada a recirculação do sorotipo do DENV-4 em alguns pacientes no estado de Roraima. Atualmente o Brasil possui circulantes os quatro sorotipos do vírus dengue (BRASIL, 2011e).

2.1.2 Epidemiologia

A incidência global da dengue tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, 2/5 da população mundial está correndo risco de contrair a doença, em diversos continentes como nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, sendo estes dois últimos os mais afetados. Estima-se que a cada ano, podem

ocorrer 50 milhões de novos casos de dengue no mundo (GUZMAN et. al. 2010, OMS, 2009).

O Brasil concentra mais de 70% dos casos de dengue registrados no seu continente e 60% dos casos registrados mundialmente (TEIXEIRA et. al., 2009). Segundo o Ministério da Saúde, até julho de 2011, foram registrados um total de 715.666 casos notificados da dengue. A Região Sudeste tem o maior número de casos notificados (338.307 casos; 47%), seguida da Região Nordeste (157.297 casos; 22%), Norte (110.711 casos; 15%), Sul (56.930 casos; 8%) e Centro-Oeste (52.421 casos; 7%) (BRASIL, 2011 e). O mapa de risco da doença no ano de 2011 pode ser verificado na figura 1.

No mesmo ano de 2011, aproximadamente 75% (537.431) dos casos do país concentram-se em oito estados, no ano de 2011: Rio de Janeiro (19%), São Paulo (15%), Amazonas (8%), Ceará (8%), Paraná (8%), Minas Gerais (7%), Espírito Santo (6%) e Bahia (4%). Na Região Norte os Estados de Rondônia, Acre e Roraima apresentaram redução de casos em relação ao mesmo período de 2010; ocorrendo o mesmo na Região Nordeste com os Estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia. Também na região Sudeste e Sul houve uma redução do número de casos relacionados nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Apesar desta redução do número de casos em quase todas as regiões do país, a região Sul teve aumento nestes números no Paraná e Santa Catarina (BRASIL, 2011 e).

Até o final de novembro de 2011, foram notificados 742.364 casos suspeitos de dengue em todo o país. Em comparação com o mesmo período do ano passado, houve uma redução de 25%. De janeiro a novembro de 2010, foram registrados 985.720 casos suspeitos da doença. As Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste também registraram diminuição nos casos de dengue. A maior redução (77%) foi registrada na Região Centro-Oeste, com o número de 211.695 casos, em 2010, contra 48.524, em 2011 (BRASIL, 2011 f).

Figura 1- Mapa de Risco da dengue- 2011



Fonte: Ministério da Saúde/ Brasil.

Em relação ao número de óbitos notificados em 2011, estes somaram um total de 1.102 como suspeitos da doença. As Regiões Sudeste e Nordeste são detentoras de 70% do total dos óbitos confirmados, destacando-se os Estados do Ceará, Amazonas, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2011e). Estudos confirmam que o *Aedes aegypti* já foi erradicado duas vezes do território urbano brasileiro: em 1957, sendo reintroduzido em 1967 e novamente eliminado em 1973 e finalmente reintroduzido em 1976, vindo a reocupar o seu antigo habitat (TAUIL, 2002; PENNA, 2003).

Quanto ao sorotipo viral, houve o isolamento dos quatro sorotipos em todas as Regiões, merecendo destaque a recirculação do DENV tipo 4, que há mais de 20 anos não tinha casos notificados. Segundo os dados da vigilância virológica, pode se inferir que houve o segundo ano de recirculação do sorotipo DENV-1, como tendência principal no país, porém com importante circulação do DENV-2 e DENV-4, alertando as autoridades e a população para a possibilidade de persistência de transmissão em níveis mais elevados no verão de 2012 (BRASIL, 2011e).

2.1.3 Aspectos Clínicos

A dengue é considerada a mais importante arbovirose, em termos de morbidade e mortalidade, em todo o mundo e tem demandado progressivos esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMÁN et. al., 2010). O termo arbovírus, deriva da expressão “arthropod-borne viruses”, e significa vírus transmitidos por artrópodes (FORATTINI, 1965). A perpetuação desse grupo na natureza se dá graças à capacidade de se replicarem, tanto em células de artrópodes quanto em células de vertebrados (CAUSEY; MAROJA, 1957; BROOKS et. al., 2000).

A maior incidência da doença ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente em períodos quentes e chuvosos (OMS, 1999; BLAIR et. al., 2000). Especificamente, o vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, do latim “*flavus*” = amarelo e é tradicionalmente classificado em 4 sorotipos, distinguíveis por suas características antigênicas (LEITMEYER et. al., 1999; NOGUEIRA et. al., 2000; MIAGOSTOVICH et. al., 2000). Os quatro sorotipos virais são antigenicamente similares, mas imunologicamente diferentes, não apresentando, portanto, proteção cruzada entre si (GUBLER, 2002).

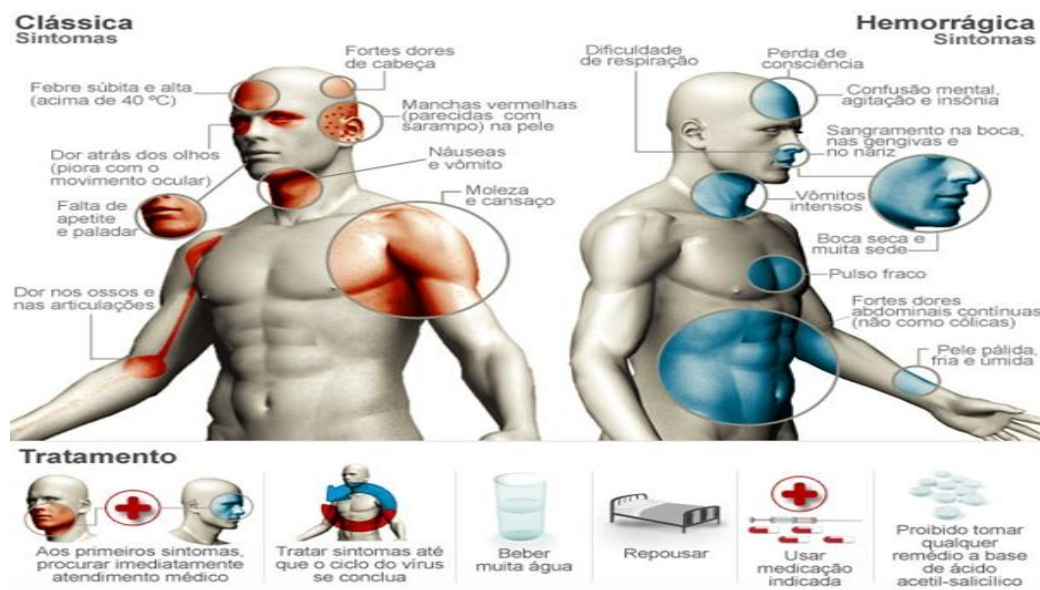
Após sua inoculação através da picada do mosquito, o vírus dengue realiza sua primeira replicação nas células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, assim como em linfonodos locais (FIGUEIREDO, 1998; GUZMAN; KOURI, 2003). Depois da multiplicação, inicia-se a fase de viremia, a qual o vírus se dissemina por todo o organismo, podendo circular livremente no plasma ou no interior de macrófagos/monócitos (HALSTEAD et. al., 2005). Os sintomas gerais da dengue coincidem com a fase de viremia e está relacionada aos elevados níveis séricos de citocinas liberadas pela interação dos macrófagos com os linfócitos T auxiliares CD4+ ativados (HOMBACH et. al., 2005). Observam-se altos níveis séricos de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, de CD4 solúvel, interferon- γ (IFN- γ), interferon- α (IFN- α), que se mantém elevado até a convalescença, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF). A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam nesses casos, também, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas (KURANE et. al., 2001; MONATH; HEINZ, 1996).

Os pacientes com dengue produzem uma resposta humoral muito vigorosa, produzindo anticorpos, oriundos da ativação de linfócitos B. A partir do quarto dia após o início da sintomatologia, os anticorpos IgM específicos são detectáveis, atingindo níveis mais elevados por volta do oitavo dia de infecção, e passando a ser indetectável após alguns meses depois da cura da doença. As imunoglobulinas G (IgG) específicas, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente, tendo altos valores em duas semanas. Estas IgGs são detectáveis por diversos anos e conferem, ao indivíduo, imunidade permanente contra o sorotipo infectante (KURANE; ENNIS, 1992; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente inaparentes (Dengue Clássica) até quadros graves de manifestações hemorrágicas e choque (FHD), podendo evoluir para o óbito (LIGON, 2004). As primeiras manifestações da dengue clássica são febre alta, geralmente em torno de 39°C-40°C, de início repentino, sendo esta associada à cefaleia, prostração, mialgia, artralgia, dor retro orbitária, podendo ser observados episódios de náusea, vômitos e diarreia. Ao final do período febril, podem ocorrer manifestações hemorrágicas como petéquias, gengivorragias, metrorragia dentre outros (BRASIL, 2005c). A figura 2 mostra a diferenciação dos sintomas da dengue clássica e hemorrágica, demonstrando também o tratamento adequado para ambos os casos.

A dengue hemorrágica inicia-se com os mesmos sintomas descritos na fase clássica, até que ocorra febre alta entre o terceiro e sétimo dia, fenômenos hemorrágicos mais intensos, inclusive extravasamento plasmático, plaquetopenia (menor que 70.000/mm³), elevação do hematócrito e algumas vezes falência do sistema circulatório (OMS, 2011). Dano hepático é uma complicação frequente na infecção pelos vírus dengue, e a determinação dos níveis das aminotransferases constitui um importante marcador de avaliação da gravidade de casos. (LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007, SOUZA et. al., 2007).

Figura 2: Aspectos clínicos da dengue clássica e hemorrágica



Fonte: Ministério da saúde

Os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da febre hemorrágica de dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) ainda não foram completamente elucidados. Observa-se que, nos casos de infecção sequencial por dengue apresentando FHD ou SCD, os anticorpos preexistentes, obtidos quando da infecção prévia por outro tipo viral, não neutralizam o segundo vírus infectante de tipo diferente e amplificam a infecção, facilitando ao novo tipo infectante a penetração em macrófagos. Os vírus utilizam a porção Fc dos anticorpos ligados ao envelope viral para a ligação com os receptores de membrana Fcγ, presentes na membrana celular macrofágica. Trata-se do fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes (*antibody dependent enhancement*- ADE), resultando em uma maior liberação de citocinas na circulação, ocasionando dano vascular, choque e hemorragia, especialmente no trato gastrointestinal e na pele (HALSTEAD, 1970; ROTHMAN; ENNIS, 1999; MONGKOLSAPAYA et. al., 2003).

É importante distinguir as formas benignas da dengue daquelas de maior gravidade, que requerem tratamento diferenciado. O diagnóstico precoce e o pronto atendimento são essenciais para a redução do índice de mortalidade por febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (LIGON, 2004; ROTHMAN, 2004). Casos fatais de pacientes

com síndrome do choque de dengue podem ocorrer em mais de 10% dos casos (RIGAU-PÉREZ et. al., 2002).

Para a diferenciação das formas da dengue, faz-se necessário a realização de um diagnóstico laboratorial preciso e eficiente da infecção pelo DENV, sendo este realizado através de dados clínicos do paciente e testes sorológicos e moleculares para detecção do vírus, de antígeno ou RNA viral e anticorpos específicos (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

Atualmente, não há vacina ou tratamento eficaz disponível para combater a infecção por dengue. Apesar de esforços significativos realizados na área de química medicinal, nenhum composto orgânico promissor, dotado de atividade inibitória sobre o vírus, foi desenvolvido. Portanto, novas terapias para o combate da doença são uma necessidade urgente (THOMAS et. al., 2003; GUZMÁN; KOURI, 2003).

2.2 Hemoderivados

O sangue é um tecido extraordinariamente complexo, composto essencialmente por células e proteínas, os quais constituem elementos de extrema importância na terapia transfusional, sendo também instrumento auxiliar no tratamento de pacientes de diversas patologias (CAIRUTAS, 2001).

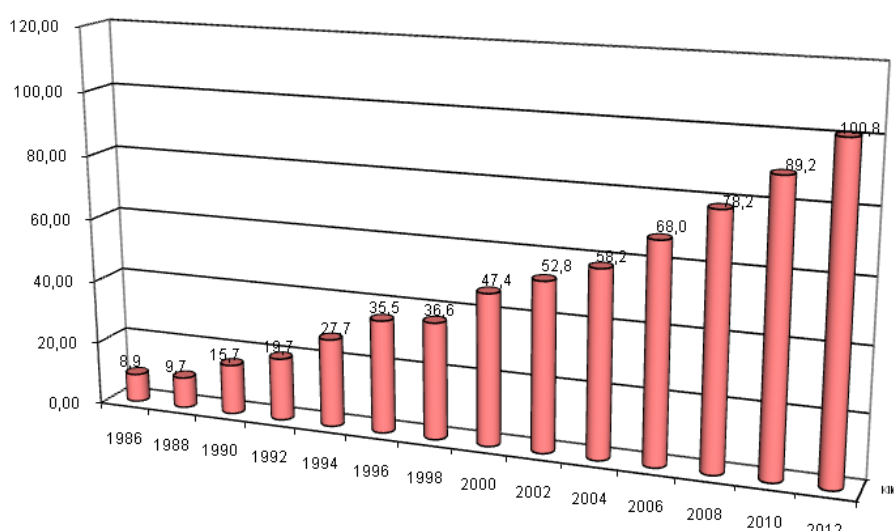
O fracionamento do sangue total traz como vantagens o uso otimizado em relação ao aproveitamento e eficácia, aumento do tempo de validade de todos os componentes sanguíneos, além de diminuir, consideravelmente, o risco de reação transfusional (BRASIL, 2002b).

Os concentrados de hemácias, plaquetas e leucócitos e a parte líquida do sangue (plasma) são chamados de hemocomponentes. Já as proteínas extraídas do plasma são os hemoderivados. Assim podemos definir hemoderivados como medicamentos biológicos obtidos a partir do plasma sanguíneo, submetidos a processos industriais e normatizações, a fim de garantir qualidade, estabilidade, especificidade e atividade do produto (CAIRUTAS, 2001; BRASIL, 2011 d).

Os hemoderivados mais conhecidos são os fatores de coagulação (VIII e IX), albumina, complexo protrombínico, crioprecipitado e imunoglobulinas, sendo a preparação, indicação e aplicação desses produtos utilizados na área conhecida como Hemoterapia

(CAIRUTAS, 2001). Dentre estes se destacam as imunoglobulinas, especialmente os concentrados de imunoglobulina G para uso endovenoso, as quais na última década obtiveram uma enorme demanda mundial, ocasionada principalmente por novas utilizações terapêuticas (BERGER, 2008). Podemos observar na figura 3 a demanda mundial de consumo da IGIV polivalente, entre os anos 1986 e 2012.

Figura 3: Demanda mundial de Imunoglobulina G polivalente intravenosa, em toneladas (1986-2012).



Fonte: Robert, 2006.

2.2.1 Imunoglobulinas

O sistema imunológico consiste de moléculas bem diversificadas que possuem a função de reconhecer e responder de uma maneira complexa à invasão de agentes infecciosos, evitando a penetração e disseminação destes. Esta resposta é realizada pela atividade dos linfócitos e imunoglobulinas (HUGHES et. al., 1997).

Os linfócitos consistem de células tipo T e B, as quais têm como papel principal a regulação da resposta imunológica. Os linfócitos T desenvolvem-se em células efectoras com o papel de eliminar as células infectadas, ativar os macrófagos como também os plasmócitos (célula de diferenciação dos linfócitos B). Por sua vez, estes secretam anticorpos, também chamados de imunoglobulinas, que são glicoproteínas que conferem atividade humoral ao

indivíduo, tendo a capacidade de fixação nas células ou às proteínas especializadas do sistema imunológico (JEFFERI, 1986).

Denomina-se IGIV polivalente ou normal, as preparações as quais o plasma utilizado é obtido a partir de doadores com níveis elevados de anticorpos não identificados para determinada doença; quando se fala de IGIV específica ou hiperimune, refere-se àquelas produzidas com plasma de doadores com altos níveis de anticorpos clinicamente importantes para uma doença específica, como por exemplo, doações de plasma contendo anti-HBs, anti-tétano, anti-citomegalovírus, ou anti-rábica (OMS, 2005).

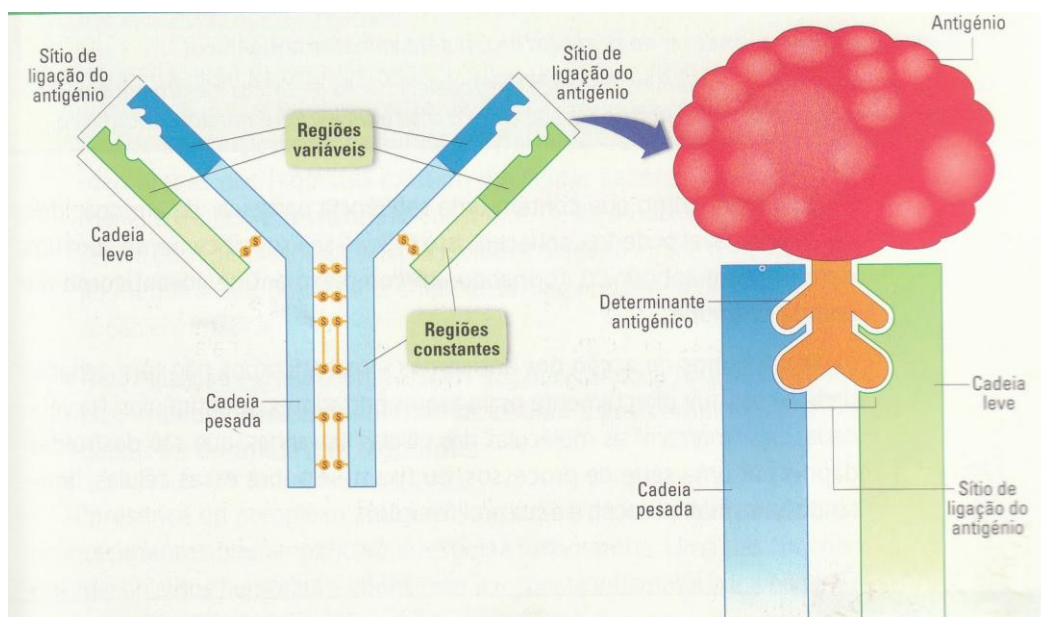
Imunoglobulinas Polivalentes Intravenosas (IGIV) já substituem a albumina e fatores de coagulação como os principais produtos da indústria de fracionamento do plasma humano e representam uma classe importante de anticorpos terapêuticos (BURNOUNF, 2007). Elas são moléculas formadas por quatro cadeias polipeptídicas, classificadas fisicamente com base em sua solubilidade nas soluções de sais fortes, carga eletrostática, peso molecular e estruturas antigênicas. Assim estão subdivididas em cinco classes: IgM, IgA, IgE, IgD e IgG, tendo suas características citadas na tabela 1 e sendo a IgG o nosso instrumento de estudo (BERZOFISKY 1984, ABBAS et. al., 2010).

Tabela 1: Características das Imunoglobulinas

Classe	Estrutura	Propriedades
IgA	Dimérica	Encontrada em mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital.
	Monomérica	Previne colonização por patógenos. Presente também na saliva, lágrimas e leite.
IgD	Monomérica	Presente nas membranas. Faz parte do receptor de membrana de linfócitos B virgens.
IgE	Monomérica	Envolvida em processos alérgicos e parasitários. Sua interação com basófilos e mastócitos causa liberação de histamina.
IgG	Monomérica	Principal imunoglobulina da imunidade adquirida. Tem capacidade de atravessar a barreira placentária.
IgM	Monomérica	Faz parte do receptor de membrana de linfócitos B virgens.
	Pentamérica	Forma encontrada no soro, secretada precocemente na resposta imune adquirida.

As Imunoglobulinas G humanas são constituídas por glicoproteínas com peso molecular de aproximadamente 150kDa; estão presentes no plasma em uma concentração média de 7 a 12 g / L, dependendo de variações individuais e nível da exposição ambiental aos antígenos. São compostas por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves também idênticas, ligadas por pontes dissulfeto intercadeia e por interações não covalentes. Tanto as cadeias leves como as pesadas possuem regiões, são elas V_L e C_L (cadeias leves) e V_H e C_H (cadeias pesadas) (ABBAS et. al., 2010). As regiões variáveis amino-terminais V_H e V_L são responsáveis pela ligação do anticorpo ao antígeno, formando o domínio Fab, em contraste com as regiões constantes, C_L e C_H , que formam a porção Fc da molécula responsável pela ativação do complemento e interação com o receptor $Fc\gamma$ em macrófagos e neutrófilos. Outro constituinte da molécula de IgG é a região da dobradiça, responsável pela forma em Y do anticorpo, como mostra a figura 4 (PUMPHREY, 1986; BURNOUF, 2009) .

Figura 4: Estrutura da Imunoglobulina G



Fonte: adaptada pelo autor

Fonte: [http://www. antivirussoperativohumano.blogspot.com/2010_05_01_archive.html](http://www.antivirussoperativohumano.blogspot.com/2010_05_01_archive.html), acessado em 21 de abril de 2012

A IGIV polivalente é produzida a partir de “pools” de plasmas coletados a partir de múltiplos doadores (tipicamente 10.000-40.000) e contém milhões de diferentes moléculas de imunoglobulina G, o que reflete a exposição cumulativa da população de doadores com o meio ambiente (OMS, 2005).

As IGIVs estão entre os produtos do plasma mais complexos em seus mecanismos de ação. Seu uso clínico engloba terapia de reposição de deficiências imunológicas primárias ou genéticas, por exemplo, agamaglobulinemia ligada ao X, hipogamaglobulinemia e em imunodeficiências secundárias ou adquiridas, como por exemplo AIDS pediátrica, Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) (LEMIEUX et. al., 2005). Nos últimos 15 anos houve uma expansão gradual da utilização de IGIVs em tratamentos de diversas doenças inflamatórias e doenças auto-imunes (BURNOUNF, 2009).

A indústria de hemoderivados teve início na década de 1940 com a metodologia desenvolvida pelo pesquisador americano E. J. Cohn para a purificação de albumina na II Guerra Mundial. Esta técnica, com discretas modificações, ainda é empregada por um grande número de empresas. Consiste no isolamento, em larga escala, de IgG usando etanol a frio (COHN et. al. 1946; ONCLEY et. al., 1949).

O design de métodos de produção, envolvendo purificação, reduções dos organismos patogênicos e de controle de qualidade devem ser consideradas padrões de qualidade da IGIV. Também é importante assegurar a farmacocinética e farmacodinâmica normais, bem como a eficácia funcional da IGIV, preservando a estrutura nativa molecular dos domínios Fab e Fc. Para isso, novas metodologias estão evoluindo ao longo dos anos, a fim de garantir boa tolerância, eficácia, minimizar os efeitos colaterais e em especial, evitar a transmissão de agentes infecciosos através da formulação (BURNOUNF, 2009).

OBJETIVOS

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Produzir um concentrado de imunoglobulina humana com altos títulos de anticorpos anti-dengue, a partir do pool de plasma de doadores voluntários do Estado de Pernambuco, utilizando o método de Cohn-Oncley;
- Avaliar a eficácia pré-clínica do uso das IGIV para o tratamento da dengue.

3.2 Objetivos Específicos

- Produção, através de metodologia clássica de Cohn-Oncley, de lote piloto de IGIV anti-dengue;
- Caracterização do produto acabado, segundo o que preconiza a Farmacopéia Européia, última edição;
- Identificação da ação neutralizante da IGIV produzida frente à diferentes sorotipos de DENV;
- Investigação da eficácia e segurança pré-clínica do uso de IGIV específicos para tratamento da infecção por dengue.

4.0 ARTIGO

**Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors
(Submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)**

Carta de submissão:

Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors

Frederico Leite Gouveia^{1/+}, Renata Mendes Batista de Oliveira¹, Antônio Edson de Souza Lucena², Marli Tenório Cordeiro³, Ana Cristina Lima Leite^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Av Prof Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil ²Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia, Recife, PE, Brasil ³Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil ⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁺Corresponding author: fred.gouveia@hotmail.com

Summary: *Dengue is an important health problem in Brazil, and therefore the identification of vaccine or therapeutic is highly needed. The neutralization of dengue virus by specific antibody has a potential application on therapy. We describe here, for the first time, the preparation of immunoglobulin specific for dengue virus (anti-DENV IgG), collected from Brazilian blood-donations. These IgGs were biochemically and biophysically characterized and neutralize different virus serotypes (DENV-1, DENV-2, and DENV-3). Overall, this anti-DENV IgG is an important step to study the therapeutic potential of specific antibody neutralizing dengue virus.*

Key words: Immunoglobulins - Viral infections – Dengue - Specific immunoglobulins - Plasma fractionation - Ion exchange chromatography

Sponsorships: FACEPE (programa PPSUS, grant number APQ-1380-4.00/08) and Instituto Nacional de Pesquisas em Dengue (INCT em Dengue, CNPq, grant number 573876/2008-8).

INTRODUCTION

Blood products are medicines produced by fractionation of human plasma. Because of the therapeutic importance, intravenous immunoglobulins (IVIG) have received special attention. It can be seen through the worldwide demand of 100 tons which is expected for 2012 (Robert 2006).

For a polyvalent (*i.e.*, normal) IVIG, we have broadly and wild-type immunoglobulins G (IgG) involving approximately 1,000 to 10,000 of blood-donations that are collected from healthy volunteers. The first usage of polyvalent IgG was in antibody replacement therapy (Orange et al. 2006). However, a large number of other clinical benefits have been recommended for IGIV. We can cite its use during bone marrow and organ transplantation, to treat chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, to ameliorate severe asthma, pediatric HIV, dermatomyositis, idiopathic thrombocytopenic purpura and multiple sclerosis (Achiron et al. 1998, Achiron et al. 2000, Brennan 2001, Dalakas et al. 1993, Hann et al. 1996, Lories et al. 2000, Ohlsson & Lacy 2001).

For a specific IVIG (*i.e.*, hyper-immune), intact IgG are collected from the plasma of blood-donors previously identified to have high levels of a specific antibody or at least a population of similar antibodies. The plasma for specific IVIG comes from patients clinically diagnosed with an infection or from immunized patients for hepatitis B (HB), tetanus, cytomegalovirus, or rabies (Atkins et al. 2000, Gelfand 2001). Classical examples of specific IVIG are the anti-D IgG (Rho) and anti-hepatitis B IgG.

The knowledge gathered over the years suggests that specific IVIG are useful for viral neutralization. This is the case in hepatitis B and in the arbovirus West Nile virus (WNV). It was reported that specific IgG reduces virus titles in severely-infected patients (Saquib et al. 2008, Wadei et al. 2004, Haley et al. 2003). More specifically, anti-WNV IgG neutralizes WNV in cell culture and substantially reduces the mortality in WNV-infected mice. However, these benefits are not observed when a polyvalent IgG is administrated (Ben-Nathan et al. 2003). Comparing WNV and dengue, we have the facts that both infections are immunologically and pathogenically similar to each other. In view of these evidences, the benefit of a specific human anti-dengue IgG for treating the infection sounds reasonable.

To date, a human anti-dengue IgG have never been produced, and thus its efficacy for dengue infection is unknown. Here, we described in details the plasma screening, fractionation and biochemical validation of anti-dengue IgG. The production of this anti-dengue IgG was performed in HEMOPE GPH branch, using the classic Cohn–Oncley process with minor modifications (Cohn et al. 1946, Oncley et al. 1949, Peters 1996).

MATERIALS AND METHODS

Plasma selection - A pool plasma from blood-donations in Brazil (Northwest region), which is monthly received by HEMOPE (PE, Brazil), was collected and the plasma bags considered free of contaminations were further selected. Once the plasma bags free of contaminations were selected, the plasma rich of anti-dengue IgG were separated off. To this end, a commercial ELISA kit (E-DEN01G panbio diagnostics, Cheshire, UK) was used for the indirect measurement of anti-dengue antibodies. This ELISA kit has dengue antigens adsorbed in the plate and the ELISA is revealed with a horse peroxidase conjugated with anti-human IgG. This ELISA kit was also used in plasma free of anti-dengue IgG (negative control). From the pool plasma supplied by HEMOPE, we identified 200 plasma bags containing specific anti-dengue IgG.

Immunoglobulin fractionation - The IgG was precipitated out from the crude plasma using the Cohn–Oncley process (cold ethanol precipitation) with minor modifications. The general process is depicted in **Fig. 1**. The process of cold ethanol precipitation is based on tuning the protein solubility by adjusting pH, temperature, salt concentration, and ethanol (Cohn et al. 1946). Briefly, the frozen plasma was thawed until reach 4 °C, where at this temperature fibrinogen and clotting factor VIII are insoluble and precipitates. The cryo-precipitate is then removed by centrifugation and the cryo-free plasma is treated following method 6 of Cohn et al. (1946). Fibrinogen was precipitated in fraction I and immunoglobulin was separated off from albumin by II + III precipitation. The precipitates were separated from supernatants by centrifugation.

In accordance Oncley et al. method 9 (1949), fraction II + III was suspended and fraction III was separated off. The supernatant was clarified by depth filtration with the aid of a filter. From this filtrate, a IgG paste is obtained and collected by centrifugation. IgG paste

was then dissolved in sterile water for injection and clarified by depth filtration with the aid of a filter.

To reduce the ionic force, the solution was filtered in ultrafiltration membranes (diafiltration) with sterile water for injection, followed by protein concentration adjustment to 5% (w/v). We used a 30 kD Millipore Pellicon System to performed diafiltration and protein level adjustment. Virus inactivation was performed by solvent (tri-*n*-butyl phosphate; TNBP) and detergent (Tween 80) treatment (Horowitz et al. 1985). To remove solvent and detergent, a cation-exchange chromatography in CM Sepharose FF stationary phase was performed. To remove IgA and other components, an anion-exchanged chromatography in DEAE Sepharose FF was also done. The flow-through was concentrated by ultrafiltration (10 KD Millipore Pellicon System) and diafiltered for 0.25 mol/L glycine using the same system. The protein level was adjusted to 5% (w/v) and pH to 4.25. Sterilizing filtration was performed and the final solution is packaged aseptically. To inactive virus particle, the final product is incubated at 23-27°C for 21 days before storage at 2-8°C.

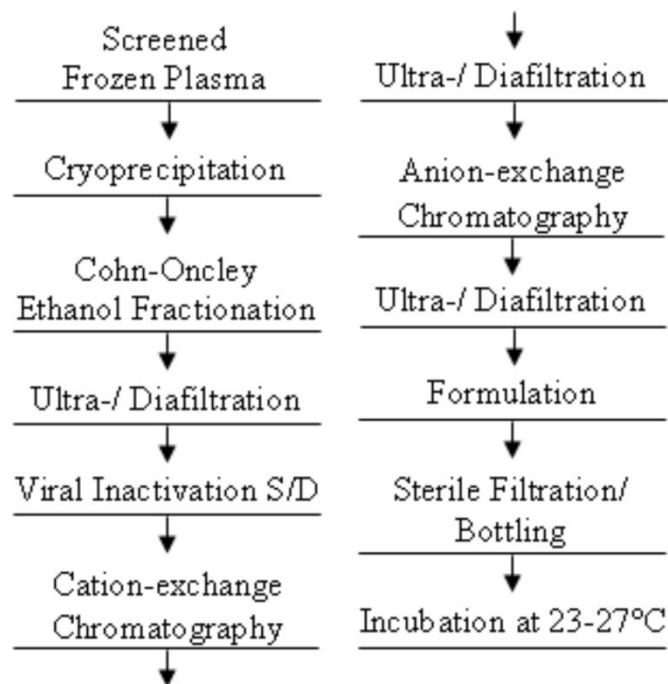


Fig. 1: Purification process of anti-dengue specific immunoglobulin.

Biochemical validation - To check the functional property of the product in process and final preparation, we performed the protocols established by European Pharmacopoeia. ELISA test was used to check the absence of antibodies screened for blood donation, such as HIV₁, HIV₂, hepatitis B surface antigens, Hepatitis C, HTLV, Chagas disease and syphilis.

Identification of anti-dengue serotypes - To ascertain the broad neutralizing property of the anti-dengue IgG described here, we measure the neutralizing action of IgG for different isolated serotypes. Isolated serotypes DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), and DENV-3 (PE/02-95016) were supplied by LACEN (PE, Brazil). In this experiment, we used a commercial polyvalent IVIG (Kiovig/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA) as a negative control. The measure of anti-dengue antibody serotypes was determined by Plaque-Reduction Neutralization Test (PRNT) (Morens et al. 1985).

First, a two-fold serial dilution of IgG (1/20 to 1/2.560) in MEM medium was placed onto 96-well microtiter plates to a final volume of 100 µL. Then, 100 µL of a viral suspension (30 plaque forming units/mL) of DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), and DENV-3 (PE/02-95016) was aliquoted into the respective wells. The plate was incubated for 1h at 37 °C in 5% CO₂. Then, 50 µL of the mix IgG/virus was collected from each dilution and transferred into a 24 well-plate containing Vero cells previously seeded at the density of 3x10⁶ cells/mL, in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO).

After virus attachment (incubation for 1h at 37 °C in 5% CO₂), each well was covered with 500 µL of MEM 10X medium, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 3% carboxymethylcellulose. The plate was then incubated during 7 days at 37°C in 5% CO₂. To inactivate the viral particles, the medium was removed out and the monolayer cells were covered with formalin (solution at 3.5 M, 2mL per well) and incubated for 1h. The formalin solution was washed out and the cells were stained with crystal violet (1:50 v/v, 0.5 mL per well). The number of infected cells (plaques) was counted and compared to the virus particle received only polyvalent IVIG or non-treated virus particle.

RESULTS

During the plasma screening, we were able to identify an adequate number of plasma bags positive to anti-dengue IgG, which is expected because Brazil is an endemic area for dengue. Once the plasma was selected, the IgG were separated out from other protein contents using the Cohn–Oncley process of cold ethanol precipitation. Anion-exchanged chromatography in DEAE Sepharose FF was then used to divide IgG from other immunoglobulin classes. In **Table I**, we summarize the biochemical and biophysical properties of the purified anti-dengue IgG. The reference values (standard conditions according to the European Pharmacopoeia) are also given there.

TABLE I
Biochemical and biophysical functional activity for the anti-dengue IgG

Test	Reference values	Results
pH	4,0 – 7,4	4,27
Total protein	45 – 55 mg/mL	51 mg/ mL
Protein composition	Minimum of 95% gammaglobulin	98%
Distribution of molecular size	Minimum of 90% monomer and dimer Maximum of 3% polymers and aggregates	98,1% 1,1%
IgA	-	0,16 mg/mL
IgM	-	0,10 mg/mL
Anticomplementary activity (%)	≤ 50	39
Thermo stability (57 °C/4h)	No gelification	No gelification
Antibody to hepatitis B surface antigen	Minimum 0,5 IU/g	1,74 IU/g
Pyrogens	Absence	Absence

Gel electrophoreses was ran to ascertain the composition of IgG and we found consistent ratio of IgG. Inactivation of virus particle, which was based on solvent/detergent

treatment and incubation at 23-27°C for 21 days, worked satisfactorily in all the benches that were prepared. The functional property of this anti-dengue IgG was confirmed in the basis of virus neutralizing property for dengue virus (**Table II**).

We also investigated the purity of this material. The product is non-reactive for hepatitis B surface antigens, and free for hepatitis C virus antibodies, human immunodeficiency virus, Chagas disease, and syphilis. This is an important biochemical characterization to ensure that this IgG is suitable for intravenous administration.

Regarding the biophysical properties, this IgG solution has adequate isotonicity (0,25 mol/L glycine) and the total amount of aggregates falls in the acceptable range. The solution was maintained in low pH, which minimizes aggregate and fragment formation, while is well known that pH higher than 4.7 enhances dimerization (Kroez et al. 2003). We analyzed the overall stability of this IgG preparation in different times by thermo-stability and biophysical solution assays and we compared these data with a trademark IgG (polyvalent). Finally, we measure the amount of glycoproteins (complement system activation), and the value we found is in agreement with the total amount accepted for a standard formulation.

Once the anti-dengue IgG was characterized biophysically and biochemically, we quantified the ability of anti-dengue IgG in neutralizing different virus serotypes: DENV-1, DENV-2, and DENV-3. In **Table II**, we depict these data. We first validated the neutralizing test using a commercial IgG (prepared from American blood donations, brand Kiovig/Baxter). In this case, only non-specific neutralization was observed to DENV-1 and DENV-2, while no neutralization was observed for serotype DENV-3. We tested samples containing entire plasma (same plasma used during the IgG production). On this time, we observed broadly neutralizing property over virus serotypes. This effect was similar to observed when we used the human dengue IgG. Neutralizing reaction towards DENV-2 seems more prone. This may be because the prevalence of this serotype in Northeast of Brazil.

TABLE II
Dengue antibody titers on the specific immunoglobulin preparation by plaque reduction

Sample*	DENV-1	DENV-2	DENV-3
plasma	1:160	1:640	1:40
anti-dengue IgG	1:160	1:1280	1:160
polyvalent IgG (trademark, Kiovig)	1:40	1:40	< 1:20 (negative)

* Experiments were repeated at least three times in independent times. Data here are the mean of one single experiment.

DISCUSSION

Specific human IgG are useful for neutralizing virus infection. Hepatitis B and WNV are the cases where the therapeutic benefits of IVIG treatment are more understood. Although dengue is an important health problem in Brazil, we still do not know whether the treatment of dengue infection with specific IgG have benefits or not. The potential of treating dengue infection with specific IgG relies on the excellent clinical outcomes reported for WNV infection.

In light of these finding, we described here a detailed protocol of plasma screening, purification and biophysical / biochemical validation of a human anti-dengue IVIG. This is the first time that a specific IgG purified from Brazilian plasma donations is performed. The functional activity of this IgG as specific human anti-dengue was confirmed using a simple and reliable virus neutralizing test (Plaque-Reduction Neutralization Test, PRNT), which is same used for serological determinations. As expected for an endemic area, this anti-dengue IgG showed broadly neutralizing property for the three tested virus serotypes. This material is important for investigate the effect of anti-dengue IVIG during infection.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors deeply thank all the employees and researchers of HEMOPE for the help during the development of this work. R.M.B.O. is receiving a scholarship from INCT, while F.L.G. is receiving a FACEPE scholarship for doctoral studies. A.C.L.L. is holding a senior scholarship awarded by CNPq (programa de bolsas de produtividade em pesquisas).

REFERENCES

- Achiron A, Gabbay U, Gilad R, Hassin-Baer S, Barak Y, Gornish M, Elizur A, Goldhammer Y, Sarova-Pinhas I 1998. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis: Effect on relapses. *Neurology* 50: 398-402.
- Achiron A, Mor F, Margalit R, Cohen IR, Lider, O, Miron S 2000. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenously administered polyclonal immunoglobulins. *J Autoimmun* 15: 323-330.
- Atkins JT, Karimi F, Morris EH, Mc David G, Shim S 2000. Prophylaxis for respiratory syncytial virus with respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous among preterm infants of thirty-two weeks gestation and less: reduction in incidence, severity of illness and cost. *Pediatr Infect Dis J* 19: 138-143.
- Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinzon S, Segal S, Rager-Zisman B 2003. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile Virus infection in mice. *J Infect Dis* 188: 5-12.
- Brennan DC 2001. Polyclonal antibodies in immunosuppression. *Transplant Proc* 33: 1002-1004.
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WLJR, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 68: 459-475.
- Cordeiro TM, Silva MA, Brito AAC, Nascimento MJE, Magalhães FCM, Guimarães FG, Silva LN, Carvalho FME, Marques ATE 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1128-1134.
- Dalakas MC, Illn I, Dambrosia JM, Soueidan SA, Stein DP, Otero C 1993. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 27: 1993-2000.

Gelfand MDJ 2001. Antibody-directed therapy: Past, present, and future. *Allergy Clin Immunol* 108: S111-S116.

Gubler DJ 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480–496.

Haley M, Retter AS, Fowler D, Gea-Banacloche J, O’Grady NP 2003. The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. *Clin Infect Dis* 37: 88–90.

Hann AF, Bolton CF, Zochodne D, Feasby TE 1996. Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled study. *Brain* 119: 1067-1077.

Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH 1985. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combinations. *Transfusion* 25: 516-522.

Kroez M, Kanzy EJ, Gronski P, Dickneite G 2003. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals* 31: 277–286.

Lories RJ, Maertens JA, Ceuppens JL, Peetermans WE 2000. The use of polyclonal intravenous immunoglobulins in the prevention and treatment of infectious diseases. *Acta Clin Belg* 55: 163-169.

Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N 1985. Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for dengue viruses by semimicro Methods in BHK-21 cells: comparison of BHK suspension test with standard Plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 22: 250-254.

Ohlsson A, Lacy JB 2001. Cochrane Database Syst. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD000361.

Oncley JL, Melin M, Richert DA, Cameron JW, Gross PM 1949. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and betalipoprotein into subfractions of human plasma. *J Am Chem Soc* 71: 541-550.

Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, Ballow M, Berger M, Bonilla FA, Buckley R, Chinen J, El-Gamal Y, Mazer BD, Nelson RP, Patel DD, Secord E, Sorensen RU, Wasserman RL, Cunningham-Rundles C 2006. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 117: 525-553.

Peters JrT 1996. Historical perspective. In JrT Peters, *Academic Press* 116: 1– 8.

Roberts P 2006. Global demand for plasma products. In International Plasma Protein Congress, Prague, Proceedings. Zeist: The Netherland. Medical Forum International B.V 39-68.

Saqui R, Randall H, Chandrakantan A, Spak CW, Barri YM 2008. West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient: the role of intravenous immunoglobulin. *Am J Kidney Dis* 52: 19-21.

Wadei H, Alangaden GJ, Sillix DH, El-Amm JM, Gruber AS, West MS, Granger DK, Garnick J, Chandrasekar P, Migdal SD, Haririan A, Granger DK, Garnick J, Chandrasekar P, Migdal SD, Haririan A 2004. West Nile virus encephalitis: an emerging disease in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 18: 753–758.

Werdan K 2001. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. *Curr Opin Crit Care* 7: 354-361.

ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.0 ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.1 Metodologia

Foi realizado um ensaio preliminar com o objetivo de observar o efeito da IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue frente a infecção do vírus dengue, mais especificamente o DENV-3.

Os ensaios foram realizados através de colaboração com o laboratório de Interação Microrganismo/Hospedeiro do Departamento de Microbiologia da UFMG, que também é integrante do Instituto Nacional de Pesquisa em Dengue.

Neste trabalho foi utilizado o sorotipo 3 do vírus dengue (DENV-3), gentilmente cedida pela professora Erna Geissen Kroon do Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia da UFMG. O vírus foi adaptado ao hospedeiro murino pelo Dr. George Ignatyev, pesquisador colaborador do Vector Institute (Rússia).

5.1.1 Adaptação da amostra clínica do DENV-3 humano ao hospedeiro murino

Para a adaptação do vírus e aumento da virulência do isolado no hospedeiro murino, o mesmo foi inicialmente injetado por via intracerebral (i.c) em camundongos neonatos (com no máximo 2 dias de vida - linhagem BALB/c). No quinto dia após a infecção, os cérebros destes animais foram retirados e um homogenato dos cérebros, realizado em uma solução de 10% p/v em PBS, centrifugado a 6.000 rpm, 4 °C por 1 minuto. O sobrenadante coletado foi novamente injetada (i.c) em novos animais. Várias passagens (em média 8) foram realizadas como descrito anteriormente por Atrasheuskaya et al. (2003).

Após a última passagem (i.c), animais com 2 semanas de vida foram infectados por via intraperitoneal (i.p). O aparecimento dos sinais clínicos da doença foi verificado (ex: redução da exploração do ambiente, arqueamento do dorso, paralisia dos membros posteriores). Ao aparecimento desses sinais, os animais moribundos foram sacrificados e os cérebros retirados para a realização de novo homogenato (a 10%) e este utilizado para nova passagem em novos animais. O mesmo procedimento foi realizado com animais de 3 e 4 semanas de vida para infecções intraperitoneal com o DENV-3. A última passagem do DENV-3 obtida dos animais BALB/c com 4 semanas foi utilizada para novas 5 passagens sequenciais no cérebro de

animais neonatos e posteriormente coletadas para produção dos estoques. Esses estoques foram armazenados em freezer -70°C. Para a confirmação da adaptação do vírus em camundongos, animais BALB/c machos com 4 semanas de idade (n = 8 animais por grupo) foram infectados com diluições seriadas de suspensão do cérebro, provenientes do estoque viral por via i.p. e a taxa de letalidade dos animais avaliada. Além disso, células LLC-MK2, da linhagem kidney, Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) e células da linhagem C636 de mosquito *Aedes albopictus*, também foram infectadas e os efeitos citopáticos do vírus avaliados.

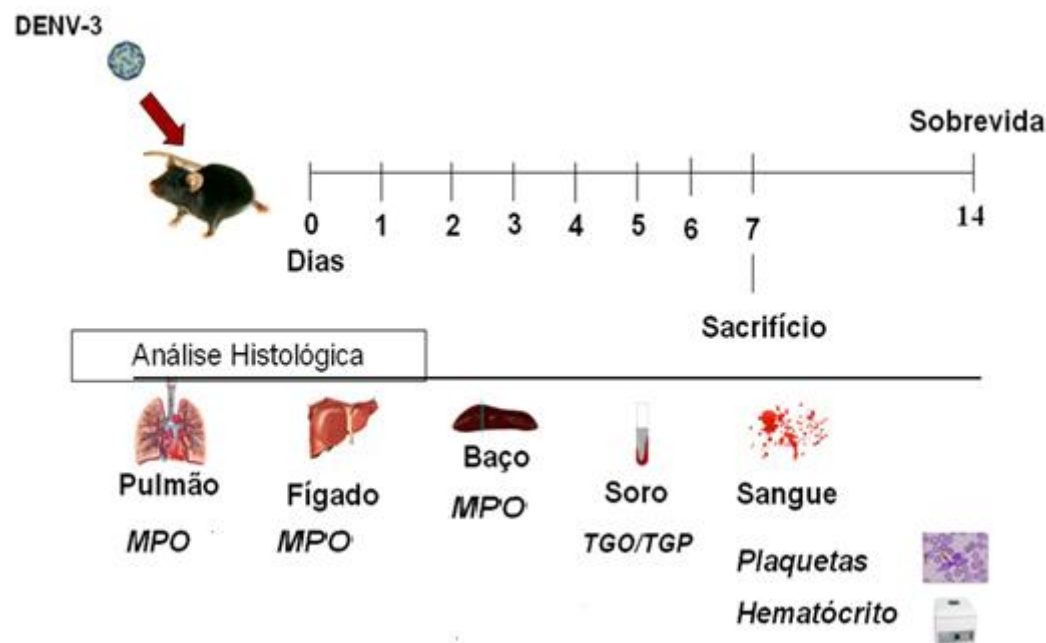
5.1.2 Animais e protocolo experimental

Para a avaliação do papel das IVIG humana no modelo experimental de infecção pelo DENV-3 foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6j.

Os animais utilizados foram machos ou fêmeas com 8 semanas de idade (n= 5 animais por grupo), infectados com 100 PFU de vírus DENV-3 por via intraperitoneal (i.p.) , adaptado ao hospedeiro murino. Estes animais foram mantidos em micro-isoladores com livre acesso à água e ração. Os animais tratados ou não com as IGIV foram monitorados em intervalos de tempo indicados para a obtenção das curvas de letalidade ou então, sacrificados no 7^o dia após a infecção para a análise dos parâmetros inflamatórios, histológicos e da carga viral. Um experimento piloto (Letalidade) foi realizado a fim de se determinar a melhor cinética (dias e frequência de tratamento), utilizando IGIV/HEMOPE na dose de 10mg/Kg, por via intraperitoneal (i.p.), segundo Bem-Nathan (2003), e posteriormente as doses de tratamento com um novo experimento. Os melhores achados foram utilizados posteriormente nos experimentos da resposta inflamatória e carga viral.

Figura 5: Estratégia experimental

Dose: 10mg/Kg do animal.



Legenda:

WT: wild type; TTO: tratamento; IGIV: Imunoglobulina G intravenosa; MPO: mieloperoxidase; TGO: aminotransferase glutâmico-oxalacética; TGP: aminotransferase glutâmico-pirúvica.

Experimento de letalidade/IGIV

- 30 animais (n=5 cada grupo). Total de 6 grupos:
- **Grupo A: WT (n=5);**
- **Grupo B: IGIV TTO dia 0 (apenas 4hs antes da infecção) (n=5);**
- **Grupo C: IGIV TTO dia 0 (4hs antes da infecção), dia 1 (24hs após a infecção) e dia 3 (72hs após a infecção) (n=5);**
- **Grupo D: IGIV TTO dia 1 (4 horas após a infecção) (n=5);**
- **Grupo E: IGIV TTO dia 1 (24 horas após a infecção) (n=5);**
- **Grupo F: IGIV TTO dia 1 (24 horas após a infecção), dia 2, dia 3, dia 4 e dia 5 após a infecção (n=5).**

Fonte: arquivo- ICB/UFMG.

5.1.3 Titulação do vírus dengue

Células LLC-MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5 a 6% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona (2ug/mL), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50ug/mL). Em seguida foram tripsinizadas, homogeneizadas e incubadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por cerca de 24 horas, até a formação de uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de fígado e baço foram pesadas, maceradas com “cadinho” e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente em meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de sangue foram inicialmente diluídas em PBS e posteriormente diluídas serialmente em DMEM. A cada poço de uma placa foi adicionado 400 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não-inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB.

As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C (período de adsorção), sendo gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“*phosphate-buffered saline* – PBS”) (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO_4). Em seguida, adicionou-se meio 199 contendo 1.5% de carboximetilcelulose, antibióticos e 3% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias ou até que aparecessem os efeitos citopáticos observados ao microscópio invertido. As mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, os quais sendo expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

5.1.4 Quantificações dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício, 10 µL do sangue de animais não infectados e infectados nos dias 3, 5 e 7 foi retirado pela veia cava inferior, coletado e colocado em tubos heparinizados. Diluiu-se este volume na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1%, sendo o volume incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 10 µL colocados na câmara de Neubauer Bright-Line. Após nova incubação de 15 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido utilizando a objetiva de 40X.

5.1.5 Análises do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado, para determinação de micro-hematócrito, e centrifugado em centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

$$\begin{array}{ccc} \text{Branco + Vermelho} & \text{—————} & 100\% \\ \\ \text{Vermelho} & \text{—————} & X \end{array}$$

Estes resultados foram expressos em percentagem e quanto maior o valor obtido, maior a concentração de hemácias no sangue, indicativo de aumento do extravasamento plasmático.

5.1.6 Análise Histopatológica

Em dias pré-determinados após a infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (fígado e pulmões) coletados. Estes foram imersos em formol tamponado a 10% em PBS por 18 horas e em seguida, colocados em solução de álcool 70% até o processamento das amostras. Para o processamento, submeteu-se os tecidos a subseqüentes passagens em etanol

em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 minutos cada) e em parafina líquida.

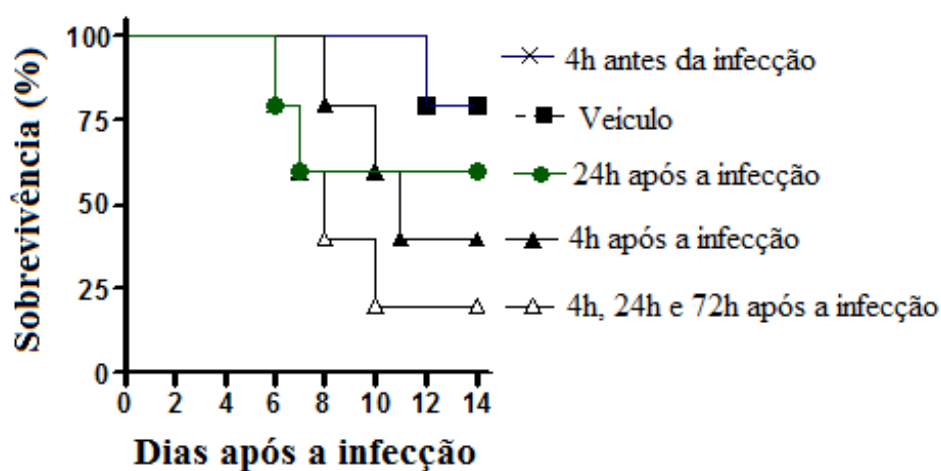
Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina tendo os cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura dispostos em lâminas de microscopia. Após essa fase, foram desparafinizados (xilol 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% - 5 imersões; água). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos) (HE). Em seguida, desidratadas (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O primeiro experimento teve por objetivo determinar o melhor esquema de tratamento através da realização de transferência passiva de imunoglobulina na dose de 10 mg/Kg. Os resultados estão dispostos na **figura 6**.

Os resultados demonstram o aumento da letalidade dos animais infectados pelo DENV-3, após a transferência passiva de imunoglobulina.

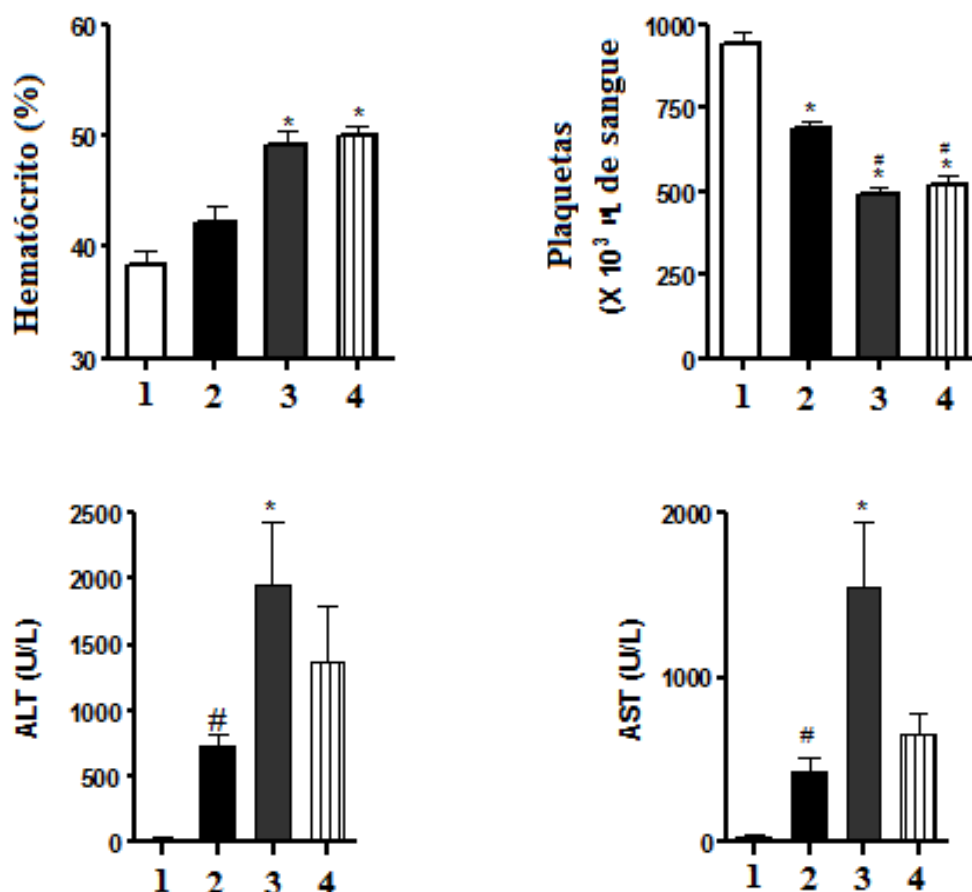
Figura 6. Taxa de letalidade induzida pela infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino, após transferência passiva de IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue.



Fonte: arquivo ICB/UFMG.

O passo seguinte consistiu na avaliação do efeito da administração passiva de imunoglobulina, na resposta inflamatória e na carga viral dos animais infectados com DENV-3, no sétimo dia após a infecção (pico da doença). Além da IGIV produzida no HEMOPE (a partir do plasma de pacientes proveniente de área endêmica para Dengue), também utilizamos uma preparação comercial de imunoglobulina (Kiovig/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA). Os dados preliminares abaixo demonstram que ambos os tratamentos (IGIV/HEMOPE e IGIV/USA) foram capazes de gerar uma doença mais grave nos animais infectados pelo DENV-3, demonstrado pela ocorrência de maior hemoconcentração e trombocitopenia (figura 7).

Figura 7. Alterações hematológicas e hepáticas após a infecção com o DENV-3 e tratamento com IGIV/HEMOPE e IGIV/USA.



*Legenda: 1 = Não Infectado, 2 = Veículo, 3 = IGIV/HEMOPE, 4 = Kiovig.

Fonte: arquivo ICB/UFGM.

Esses achados sugerem que o tratamento com as IGIVs em baixa terapia (dose de 10mg/kg) resultou em agravamento da doença. A administração de imunoglobulinas induziu a exacerbação da resposta à infecção, aumento da letalidade e aumento da carga viral.

Por um lado, a dose de IGIV pode não ter sido eficaz para a neutralização do vírus. Por outro lado, é bem descrito que sorotipos do vírus dengue 1-4 (DENV 1, 2, 3, 4) estão intimamente relacionados, mas não antigenicamente, sendo assim, o Fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes (ADE) pode ter ocorrido, resultando na morte dos animais infectados, após o tratamento com imunoglobulinas específicas.

Apesar destes resultados demonstrarem aumento da letalidade e agravamento da doença nos animais infectados, este experimento está na fase inicial de testes. A partir de estudos posteriores, novos esquemas terapêuticos poderão ser testados, assim como diferentes doses e vias de administração da IGIV.

PERSPECTIVAS

7.0 PERSPECTIVAS

- Avaliar a eficácia pré-clínica do uso de IGIV específica, em doses mais elevadas, a fim de obter neutralização do vírus da dengue;
- Produção de IGIV ausente de anticorpos anti-dengue, a partir da triagem e seleção de plasmas negativos para estes anticorpos;
- Preparação de um concentrado de imunoglobulina anti-dengue fragmentada da porção Fc, visando eliminar a possibilidade de ocorrência do fenômeno ADE.

REFERÊNCIAS

8.0 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K . ; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Revinter : Rio de Janeiro, 2010.

ARONSON D. L., FINLAYSON J. S. **Historical and future therapeutic plasma derivatives (Epilogue)**, v 6, p. 1231, Semin Thromb Hemost , 1980.

ATRASHEUSKAYA, A.; PETZELBAUER, P.; FREDEKING, T. M.; IGNATYEV G. **Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection**. Immunology and Medical Microbiology, v 35, n. 1, p. 33-42, 2003.

BERGER, M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.28, p.413-437, 2008.

BERZOFSKY, J. A.; BERKOWER, I. J. Antigen-antibody interaction In: Fundamental immunology. **Raven Press**, NewYork : ed. W.E. Paul, 1984.

BEN-NATHAN, D. et. al. Prophylatic and Therapeutic Efficacy of Human Intravenous Immunoglobulin in Treating West Nile Virus Infection in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 1, p. 5-12, julho, 2003.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. E. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BRASIL, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Dengue – Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente**. 2 ed. Brasília, 1996a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no. 343, de 13 de dezembro de 2002. Anexo 1- Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia**. Brasília, 2002 b.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. Diretoria Técnica de Gestão. – 2. ed. – Brasília, 2005 c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-rdc nº 153, de 14 de junho de 2004 - Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 08 de dezembro de 2011 d.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue-Semana Epidemiológica julho 2011.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2011 e.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue-Semana Epidemiológica novembro 2011.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2011 f.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S.; Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. **Microbiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRUTON O. C. Agammaglobulinemia. **Pediatrics**, v. 9, n. 7, p. 722.

BURNOUF T. Modern plasma fractionation. **Transfusion Medicine Review** , França, v. 21, n. 2, p. 101–117, 2007.

BURNOUF T. et al. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. **Vox Sanguinis**, França, v. 98, p 1-17, junho 2009.

CAIRUTAS, C. M. Breve resgate da evolução da hemoterapia. **O que corre em nossas veias-Fragmento de sua história.** Rio de Janeiro: EBGE, 2001.

CAUSEY, O. R., MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human agent. III. Investigation of an endemic of acute febrile illness on the River Guamá in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as a causative agent. **American Journal of Tropical. Medicine and Hygiene, Baltimore**, v. 6, p. 1017-1023, novembro.1957.

COHN, E. J. et. al. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of American Chemical Society**, Inglaterra, v.68, n 3 p. 459-475, 1946.

DA SILVA J.R. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** São Paulo, v. 23, p. 1-7, 2002.

FIGUEIREDO L.T.M.; FONSECA B.A.L. Dengue. **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Livraria Atheneu, 1996.

FIGUEIREDO L.T.M. Patogenia das infecções pelos vírus dengue. **Virologia Médica, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 15-20, jan- março 1998.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. São Paulo: **USP**, v. 3, p.416 1965.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem New York: **CAB International**, 1997.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 100-103, fevereiro. 2002.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 4, p. 33-42, abril. 2002

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v.27,n. 1, p. 1-3, maio. 2003.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, London, v. 370, p.1644-1652, novembro. 2007.

JEFFERIS, R. Polyclonal and MAb reagents specific for IgG subclasses. **Monogr. Allergy** v.19, 71-85, 1986.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Texas, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, junho. 1999.

LEMIEUX, R.; BAZIN, R.; NERON, S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. **Molecular Immunology**, Canadá; v. 42, n. 7, p. 839–848, maio. 2005.

LING, L. M.; WILDER-SMITH, A.; LEO, Y. S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 265-268, março. 2007.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, n.1, p.60-65, 2004.

LOUIE, R.E. et al. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin. **Biologicals**, Califórnia, v. 22, n. 1, p. 13-19, março. 1994.

LUNDBLAD, J. L.; SENG, R. L. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate. **Vox Sanguinis**, Califórnia, v. 60, n. 2, p.75-81, 1991.

KURANE I.; ENNIS F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin. Immunology**. Massachusetts, v. 4, n. 2, p. 121-127, abril 1992.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever : challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, Tóquio, v. 11, p. 301-311, abril 2001.

MARTHA, M.; EIBL, M.D. History of Immunoglobulin Replacement. **Immunology Allergy Clinic North America**, Viena, v 28, n. 4, p.737-764, novembro. 2008.

MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p.2395-2400. 1994.

MONATH T. P., HEINZ F.X. Flaviviruses. In: FIELDS BN., KINPE DM., HOWLEY PM (eds). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-raven publishes, 1996. p. 961-1034.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Califórnia, v. 38, n. 3, p. 1286-1289, março. 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 307-313, maio. 2006.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 921-927, julho. 2003.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, janeiro-março. 2000.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n. 7, p. 925-926, outubro. 2001.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus infection of the Central nervous system (CNS) a case report from Brazil. **The Southeast Asian Journal of Tropical Public Health, Bangkok**, v. 33, n. 1, p. 68-71, março. 2002.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Pan American Journal of Public Health, Washington**, v. 22, n. 5, p. 358-363, novembro. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guidelines for Treatment of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals**, New Dehli:Regional Office for South-East Asia, p. 1-28, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Dengue**. Disponível em: <[http:// www.who.int/tdr/diseases/default.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm) >. Acesso em: 10 nov. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation**. Disponível em: <<http://www.who.int/bloodproducts>>. Acessado em: 20 de julho de 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet, n. 117.**

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

ONCLEY, J. L. et al. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-lipoprotein into subfractions of human plasma. **Journal of the American Chemical Society**, v.71, p.541-550, 1949.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (PAHO) - **Number of cases dengue,2003.** Disponível em <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>>. Acesso em: dezembro de 2007.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 305-309, janeiro- fevereiro. 2003.

PUMPHREY, R. Computer models of the human Igs: Shape and segmental flexibility. **Immunology Today**, v. 7, p. 174, 1986.

RAMOS, C.; GARCIA, H.; VILLASECA, J. M. Fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue. **Salud Publica de Mexico**, México, v. 35, n. 1, 1993.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue- 1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 355-362, outubro. 2002.

ROBERT, P. Global demand for plasma products. **International plasma protein congress, Prague, 2006 Proceedings.** Zeist The Netherland. Medical Forum International B.V p.39-68, 2006.

ROCCO I. M.; KAVAKAMA B. B.; SANTOS C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-57, janeiro-fevereiro 2001.

ROSEN, L.; GUBLER, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 6, p. 1153-1160, novembro. 1974.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, Massachusetts, v. 257, n. 7, p. 1-6, abril. 1999.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, Massachusetts, v. 113, n.7 p. 946-951, abril. 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **The American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 71, p. 646–651, abril. 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, janeiro. 2005.

SOUZA, L. J. et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferases levels. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 4, p. 407-410, 2007.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, maio- junho. 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. e GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, Bahia, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, supl. 1, p. 7-18, 2009.

THOMAS, S. J.; STRICKAMN, D.; VAUGHN, D.W. Dengue Epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. **Advances in Virus Research**, Bangkok, vol. 61, p. 235-289, 2003.

YIN, Z.; CHEN, Y. L.; SCHUL, W.; WANG, Q. Y.; GU, F.; DURAIWAMY, J.; KONDREDDI, R. R.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LAKSHMINARAYANA, S. B.; GOH, A.; XU, H. Y.; LIU, W.; LIU, B.; LIM, J. Y.; NG, C. Y.; QING, M.; LIM, C. C.; YIP, A.; WANG, G.; CHAN, W. L.; TAN, H. P.; LIN, K.; ZHANG, B.; ZOU, G.; BERNARD, K. A.; GARRETT, C.; BELTZ, K.; DONG, M.; WEAVER, M.; HE, H.; PICHOTA, A.; DARTOIS, V.; KELLER, T. H.; SHI, P. Y. **An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, New York, v. 106, n. 48, p. 20435-20439, 2009.

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 DENGUE	17
2.1.1 <i>Histórico</i>	17
2.1.2 <i>Epidemiologia</i>	18
2.1.3 <i>Aspectos Clínicos</i>	21
2.2 HEMODERIVADOS	24
2.2.1 <i>Imunoglobulinas</i>	26
3.0 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.0 ARTIGO	32
5.0 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	46
5.1 METODOLOGIA	46
5.1.1 <i>Adaptação da amostra clínica do DENV-3 humano ao hospedeiro murino</i>	46
5.1.2 <i>Animais e protocolo experimental</i>	47
5.1.3 <i>Titulação do vírus dengue</i>	49
5.1.4 <i>Quantificações dos níveis de plaquetas circulantes</i>	50
5.1.5 <i>Análises do índice de hematócrito</i>	50
5.1.6 <i>Análise Histopatológica</i>	50
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
7.0 PERSPECTIVAS.....	55
8.0 REFERÊNCIAS	57

1.0 INTRODUÇÃO

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, com transmissão através da picada do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, que é predominantemente urbano e encontrado em todo o território nacional (MIAGOSTOVICH et. al., 2006). São conhecidos quatro sorotipos do vírus dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4; estes não oferecem proteção cruzada entre si. As manifestações clínicas decorrentes da infecção por qualquer um dos sorotipos virais pode ser assintomática, ou levar ao estado conhecido como dengue clássica ou até mesmo ocasionar a forma mais grave da doença, denominado febre hemorrágica da dengue (FHD) (HALSTEAD, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue é classificada como uma doença classe I, ou seja, doença emergente ou descontrolada sem nenhum tratamento eficaz aprovado e para os quais o foco deve ser a aquisição de novos conhecimentos e novas ferramentas, com o objetivo de controle dessa enfermidade.

A OMS estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença. Estima-se também que, ocorrem atualmente cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão (GUZMAN et. al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009)

Atualmente, não há vacina disponível ou tratamento eficaz e novas terapias são, portanto, uma necessidade urgente. Apesar de esforços significativos realizados na área de química medicinal, nenhum composto orgânico promissor, dotado de atividade inibitória sobre o vírus foi desenvolvido (YIN et. al., 2009).

Por outro lado, infecções por dengue e vírus do Nilo Ocidental (WNV) são imunologicamente e com sintomas similares. WNV, assim como o vírus dengue, pertence à família dos *Flavivirus* e imunoglobulina G intravenosa (IGIV) tem ajudado na recuperação de pacientes. IGIV hoje é rotineiramente usada para tratar infecção por WNV (WADEI et. al., 2004; HALEY et. al., 2003).

De fato, “pool” extremamente purificado de IgGs policlonais, IGIV e anticorpos específicos (IGIV específica) são terapias padrões para um grande número de doenças. Por exemplo, preparações de IGIV específicas combatem uma série de doenças infecciosas e

patológicas, como o citomegalovírus, tétano e hepatite B (LORIES et. al. 2000; DALAKAS et. al. 1993; OHLSSON et. al. 2001). IGIV também diminui as complicações durante os transplantes de medula óssea e órgãos sólidos, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (PDIC), asma grave, HIV pediátrico, dermatomiosite e esclerose múltipla (WERDAN, 2001; BRENNAN, 2001; ACHIRON et. al., 2000).

Baseado nessas premissas, a utilização de IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue poderia reduzir as complicações associadas à infecção da dengue, assim como seu grau de mortalidade.

Este trabalho apresenta-se inicialmente com a Revisão da literatura, sendo esta dividida em Dengue, aspectos clínicos e epidemiológicos e Hemoderivados e Imunoglobulinas-conceito e utilização; Objetivos; Artigo submetido: Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors; Metodologia dos ensaios pré-clínicos; Resultados e discussões dos ensaios pré-clínicos; Perspectivas e Referências.

REVISÃO DA LITERATURA

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dengue

A dengue é uma doença febril, exantemática aguda e considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Constitui-se de uma doença de grande relevância em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo e tem demandando grandes esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMÁN et. al., 2010).

2.1.1 Histórico

A palavra dengue foi adotada mundialmente, tanto para designar a doença, como os vírus que a causam. Entretanto, a doença recebeu no passado diferentes denominações nos países onde foi identificada. A expressão dengue é de origem hispano-caribenha e tem sido usada, desde 1827, para identificar síndromes febris epidêmicas (GUBLER, 1997).

A problemática da dengue não é recente, existindo descrição de epidemias e relatos clínicos, semelhantes ao da dengue, em enciclopédias chinesas datadas do século 610 D.C. Existem outros relatos de uma doença também com sintomatologia semelhante à da Dengue datando de 1779-1780, quando ocorreu uma epidemia no Cairo, na Indonésia e na Philadelphia (GUBLER, 1997).

O isolamento do vírus dengue foi realizado originalmente por Albert Sabin, no ano de 1945, o qual identificou os dois primeiros sorotipos, DENV tipo 1 e 2. Os outros dois sorotipos DENV tipo 3 e 4, foram isolados por Hammon em 1960, em pacientes com febre hemorrágica da dengue (ROSEN; GUBLER, 1974; HALSTEAD, 1992).

Nos últimos séculos, há registro de ocorrência de casos da doença, tanto epidemias e pandemias, em diversos continentes como Américas, África, Ásia, Europa e Austrália, sendo um problema de saúde pública (TEIXEIRA et. al., 1999). Nas Américas, as epidemias de dengue foram relatadas desde o século XIX, coincidindo com a intensificação do transporte comercial entre os portos da região do Caribe e do sul dos Estados Unidos com outras partes do mundo (MONATH, 1994). No Brasil, as primeiras referências sobre a dengue datam de

1846, em São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador e outras cidades, sendo conhecida como “polca” e “patuléia” (BRASIL, 1996a).

Entre os anos de 1981 e 1982 foi registrada a primeira epidemia de dengue no Brasil, que ocorreu na cidade da Boa Vista-RR, onde os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados (SIQUEIRA et. al., 2004; NOGUEIRA et. al., 2007). Devido aos esforços para a eliminação da febre amarela urbana durante a primeira metade do século 20, as áreas urbanas do Brasil se mantiveram livres do *Aedes aegypti* até o ano de 1976. Porém, com o crescimento desorganizado e rápido das cidades, e a falta de manutenção do programa de combate à febre amarela, ocorreu a reintrodução e o estabelecimento do *Aedes aegypti* (também transmissor da febre amarela urbana), em áreas urbanas de vários estados brasileiros, facilitando também assim a disseminação do vírus da dengue (SIQUEIRA Jr. et. al., 2005).

Porém a propagação viral para o resto do país ocorreu em 1986, a partir do município de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA et. al., 2000; SIQUEIRA et. al., 2004). No ano de 1990, com a introdução do DENV-2 no Rio de Janeiro, ocorreu a notificação dos primeiros casos de Febre hemorrágica da dengue (FHD) (NOGUEIRA et. al., 2002). Já em 1998, ocorreu, no estado de São Paulo, a notificação e isolamento do DENV tipo 3, sendo este o mesmo sorotipo responsável pela maior e mais grave epidemia ocorrida no Brasil no ano de 2002 (NOGUEIRA et. al., 2001; ROCCO et. al., 2001; DA SILVA et. al., 2002; PAHO, 2003).

Em 2008, existia o risco da reintrodução do sorotipo 4 no Brasil, devido ao aumento de casos da doença provocados por este sorotipo, em países da América do Sul, como Venezuela e Colômbia (GUZMÁN; KOURI, 2002). No ano de 2010, foi identificada a recirculação do sorotipo do DENV-4 em alguns pacientes no estado de Roraima. Atualmente o Brasil possui circulantes os quatro sorotipos do vírus dengue (BRASIL, 2011e).

2.1.2 Epidemiologia

A incidência global da dengue tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, 2/5 da população mundial está correndo risco de contrair a doença, em diversos continentes como nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, sendo estes dois últimos os mais afetados. Estima-se que a cada ano, podem

ocorrer 50 milhões de novos casos de dengue no mundo (GUZMAN et. al. 2010, OMS, 2009).

O Brasil concentra mais de 70% dos casos de dengue registrados no seu continente e 60% dos casos registrados mundialmente (TEIXEIRA et. al., 2009). Segundo o Ministério da Saúde, até julho de 2011, foram registrados um total de 715.666 casos notificados da dengue. A Região Sudeste tem o maior número de casos notificados (338.307 casos; 47%), seguida da Região Nordeste (157.297 casos; 22%), Norte (110.711 casos; 15%), Sul (56.930 casos; 8%) e Centro-Oeste (52.421 casos; 7%) (BRASIL, 2011 e). O mapa de risco da doença no ano de 2011 pode ser verificado na figura 1.

No mesmo ano de 2011, aproximadamente 75% (537.431) dos casos do país concentram-se em oito estados, no ano de 2011: Rio de Janeiro (19%), São Paulo (15%), Amazonas (8%), Ceará (8%), Paraná (8%), Minas Gerais (7%), Espírito Santo (6%) e Bahia (4%). Na Região Norte os Estados de Rondônia, Acre e Roraima apresentaram redução de casos em relação ao mesmo período de 2010; ocorrendo o mesmo na Região Nordeste com os Estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia. Também na região Sudeste e Sul houve uma redução do número de casos relacionados nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Apesar desta redução do número de casos em quase todas as regiões do país, a região Sul teve aumento nestes números no Paraná e Santa Catarina (BRASIL, 2011 e).

Até o final de novembro de 2011, foram notificados 742.364 casos suspeitos de dengue em todo o país. Em comparação com o mesmo período do ano passado, houve uma redução de 25%. De janeiro a novembro de 2010, foram registrados 985.720 casos suspeitos da doença. As Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste também registraram diminuição nos casos de dengue. A maior redução (77%) foi registrada na Região Centro-Oeste, com o número de 211.695 casos, em 2010, contra 48.524, em 2011 (BRASIL, 2011 f).

Figura 1- Mapa de Risco da dengue- 2011



Fonte: Ministério da Saúde/ Brasil.

Em relação ao número de óbitos notificados em 2011, estes somaram um total de 1.102 como suspeitos da doença. As Regiões Sudeste e Nordeste são detentoras de 70% do total dos óbitos confirmados, destacando-se os Estados do Ceará, Amazonas, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2011e). Estudos confirmam que o *Aedes aegypti* já foi erradicado duas vezes do território urbano brasileiro: em 1957, sendo reintroduzido em 1967 e novamente eliminado em 1973 e finalmente reintroduzido em 1976, vindo a reocupar o seu antigo habitat (TAUIL, 2002; PENNA, 2003).

Quanto ao sorotipo viral, houve o isolamento dos quatro sorotipos em todas as Regiões, merecendo destaque a recirculação do DENV tipo 4, que há mais de 20 anos não tinha casos notificados. Segundo os dados da vigilância virológica, pode se inferir que houve o segundo ano de recirculação do sorotipo DENV-1, como tendência principal no país, porém com importante circulação do DENV-2 e DENV-4, alertando as autoridades e a população para a possibilidade de persistência de transmissão em níveis mais elevados no verão de 2012 (BRASIL, 2011e).

2.1.3 Aspectos Clínicos

A dengue é considerada a mais importante arbovirose, em termos de morbidade e mortalidade, em todo o mundo e tem demandado progressivos esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMÁN et. al., 2010). O termo arbovírus, deriva da expressão “arthropod-borne viruses”, e significa vírus transmitidos por artrópodes (FORATTINI, 1965). A perpetuação desse grupo na natureza se dá graças à capacidade de se replicarem, tanto em células de artrópodes quanto em células de vertebrados (CAUSEY; MAROJA, 1957; BROOKS et. al., 2000).

A maior incidência da doença ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente em períodos quentes e chuvosos (OMS, 1999; BLAIR et. al., 2000). Especificamente, o vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, do latim “*flavus*” = amarelo e é tradicionalmente classificado em 4 sorotipos, distinguíveis por suas características antigênicas (LEITMEYER et. al., 1999; NOGUEIRA et. al., 2000; MIAGOSTOVICH et. al., 2000). Os quatro sorotipos virais são antigenicamente similares, mas imunologicamente diferentes, não apresentando, portanto, proteção cruzada entre si (GUBLER, 2002).

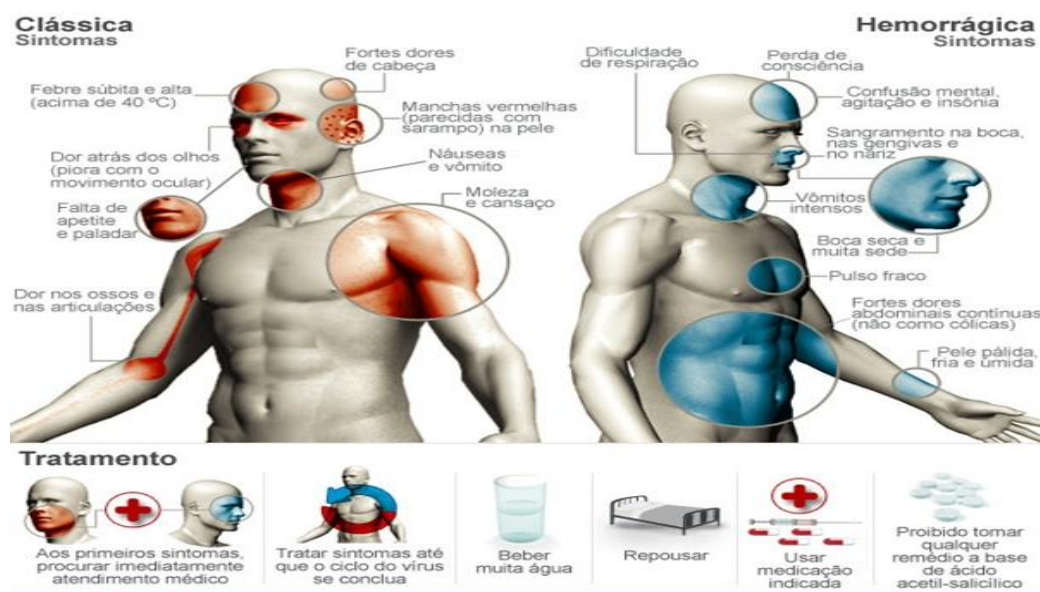
Após sua inoculação através da picada do mosquito, o vírus dengue realiza sua primeira replicação nas células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, assim como em linfonodos locais (FIGUEIREDO, 1998; GUZMAN; KOURI, 2003). Depois da multiplicação, inicia-se a fase de viremia, a qual o vírus se dissemina por todo o organismo, podendo circular livremente no plasma ou no interior de macrófagos/monócitos (HALSTEAD et. al., 2005). Os sintomas gerais da dengue coincidem com a fase de viremia e está relacionada aos elevados níveis séricos de citocinas liberadas pela interação dos macrófagos com os linfócitos T auxiliares CD4+ ativados (HOMBACH et. al., 2005). Observam-se altos níveis séricos de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, de CD4 solúvel, interferon- γ (IFN- γ), interferon- α (IFN- α), que se mantém elevado até a convalescença, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF). A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam nesses casos, também, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas (KURANE et. al., 2001; MONATH; HEINZ, 1996).

Os pacientes com dengue produzem uma resposta humoral muito vigorosa, produzindo anticorpos, oriundos da ativação de linfócitos B. A partir do quarto dia após o início da sintomatologia, os anticorpos IgM específicos são detectáveis, atingindo níveis mais elevados por volta do oitavo dia de infecção, e passando a ser indetectável após alguns meses depois da cura da doença. As imunoglobulinas G (IgG) específicas, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente, tendo altos valores em duas semanas. Estas IgGs são detectáveis por diversos anos e conferem, ao indivíduo, imunidade permanente contra o sorotipo infectante (KURANE; ENNIS, 1992; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente inaparentes (Dengue Clássica) até quadros graves de manifestações hemorrágicas e choque (FHD), podendo evoluir para o óbito (LIGON, 2004). As primeiras manifestações da dengue clássica são febre alta, geralmente em torno de 39°C-40°C, de início repentino, sendo esta associada à cefaleia, prostração, mialgia, artralgia, dor retro orbitária, podendo ser observados episódios de náusea, vômitos e diarreia. Ao final do período febril, podem ocorrer manifestações hemorrágicas como petéquias, gengivorragias, metrorragia dentre outros (BRASIL, 2005c). A figura 2 mostra a diferenciação dos sintomas da dengue clássica e hemorrágica, demonstrando também o tratamento adequado para ambos os casos.

A dengue hemorrágica inicia-se com os mesmos sintomas descritos na fase clássica, até que ocorra febre alta entre o terceiro e sétimo dia, fenômenos hemorrágicos mais intensos, inclusive extravasamento plasmático, plaquetopenia (menor que 70.000/mm³), elevação do hematócrito e algumas vezes falência do sistema circulatório (OMS, 2011). Dano hepático é uma complicação frequente na infecção pelos vírus dengue, e a determinação dos níveis das aminotransferases constitui um importante marcador de avaliação da gravidade de casos. (LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007, SOUZA et. al., 2007).

Figura 2: Aspectos clínicos da dengue clássica e hemorrágica



Fonte: Ministério da saúde

Os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da febre hemorrágica de dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) ainda não foram completamente elucidados. Observa-se que, nos casos de infecção sequencial por dengue apresentando FHD ou SCD, os anticorpos preexistentes, obtidos quando da infecção prévia por outro tipo viral, não neutralizam o segundo vírus infectante de tipo diferente e amplificam a infecção, facilitando ao novo tipo infectante a penetração em macrófagos. Os vírus utilizam a porção Fc dos anticorpos ligados ao envelope viral para a ligação com os receptores de membrana Fcγ, presentes na membrana celular macrófagica. Trata-se do fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes (*antibody dependent enhancement- ADE*), resultando em uma maior liberação de citocinas na circulação, ocasionando dano vascular, choque e hemorragia, especialmente no trato gastrointestinal e na pele (HALSTEAD, 1970; ROTHMAN; ENNIS, 1999; MONGKOLSAPAYA et. al., 2003).

É importante distinguir as formas benignas da dengue daquelas de maior gravidade, que requerem tratamento diferenciado. O diagnóstico precoce e o pronto atendimento são essenciais para a redução do índice de mortalidade por febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (LIGON, 2004; ROTHMAN, 2004). Casos fatais de pacientes

com síndrome do choque de dengue podem ocorrer em mais de 10% dos casos (RIGAU-PÉREZ et. al., 2002).

Para a diferenciação das formas da dengue, faz-se necessário a realização de um diagnóstico laboratorial preciso e eficiente da infecção pelo DENV, sendo este realizado através de dados clínicos do paciente e testes sorológicos e moleculares para detecção do vírus, de antígeno ou RNA viral e anticorpos específicos (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

Atualmente, não há vacina ou tratamento eficaz disponível para combater a infecção por dengue. Apesar de esforços significativos realizados na área de química medicinal, nenhum composto orgânico promissor, dotado de atividade inibitória sobre o vírus, foi desenvolvido. Portanto, novas terapias para o combate da doença são uma necessidade urgente (THOMAS et. al., 2003; GUZMÁN; KOURI, 2003).

2.2 Hemoderivados

O sangue é um tecido extraordinariamente complexo, composto essencialmente por células e proteínas, os quais constituem elementos de extrema importância na terapia transfusional, sendo também instrumento auxiliar no tratamento de pacientes de diversas patologias (CAIRUTAS, 2001).

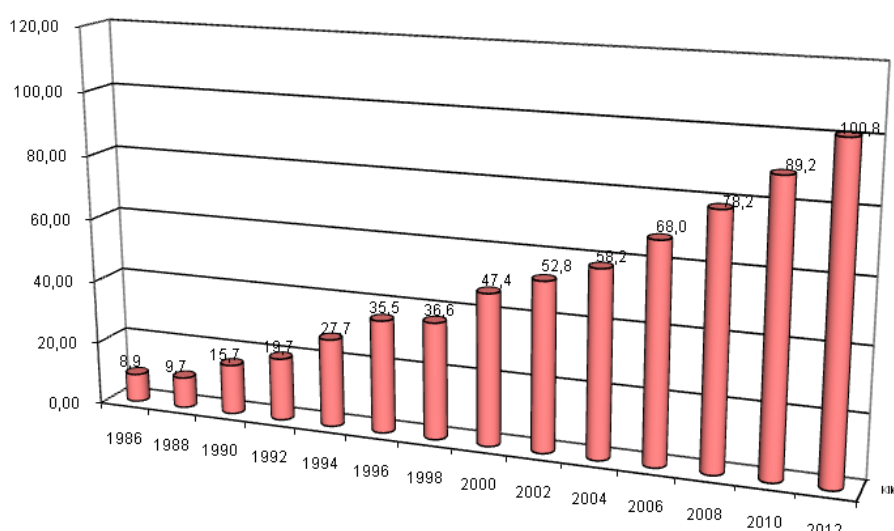
O fracionamento do sangue total traz como vantagens o uso otimizado em relação ao aproveitamento e eficácia, aumento do tempo de validade de todos os componentes sanguíneos, além de diminuir, consideravelmente, o risco de reação transfusional (BRASIL, 2002b).

Os concentrados de hemácias, plaquetas e leucócitos e a parte líquida do sangue (plasma) são chamados de hemocomponentes. Já as proteínas extraídas do plasma são os hemoderivados. Assim podemos definir hemoderivados como medicamentos biológicos obtidos a partir do plasma sanguíneo, submetidos a processos industriais e normatizações, a fim de garantir qualidade, estabilidade, especificidade e atividade do produto (CAIRUTAS, 2001; BRASIL, 2011 d).

Os hemoderivados mais conhecidos são os fatores de coagulação (VIII e IX), albumina, complexo protrombínico, crioprecipitado e imunoglobulinas, sendo a preparação, indicação e aplicação desses produtos utilizados na área conhecida como Hemoterapia

(CAIRUTAS, 2001). Dentre estes se destacam as imunoglobulinas, especialmente os concentrados de imunoglobulina G para uso endovenoso, as quais na última década obtiveram uma enorme demanda mundial, ocasionada principalmente por novas utilizações terapêuticas (BERGER, 2008). Podemos observar na figura 3 a demanda mundial de consumo da IGIV polivalente, entre os anos 1986 e 2012.

Figura 3: Demanda mundial de Imunoglobulina G polivalente intravenosa, em toneladas (1986-2012).



Fonte: Robert, 2006.

2.2.1 Imunoglobulinas

O sistema imunológico consiste de moléculas bem diversificadas que possuem a função de reconhecer e responder de uma maneira complexa à invasão de agentes infecciosos, evitando a penetração e disseminação destes. Esta resposta é realizada pela atividade dos linfócitos e imunoglobulinas (HUGHES et. al., 1997).

Os linfócitos consistem de células tipo T e B, as quais têm como papel principal a regulação da resposta imunológica. Os linfócitos T desenvolvem-se em células efectoras com o papel de eliminar as células infectadas, ativar os macrófagos como também os plasmócitos (célula de diferenciação dos linfócitos B). Por sua vez, estes secretam anticorpos, também chamados de imunoglobulinas, que são glicoproteínas que conferem atividade humoral ao

indivíduo, tendo a capacidade de fixação nas células ou às proteínas especializadas do sistema imunológico (JEFFERI, 1986).

Denomina-se IGIV polivalente ou normal, as preparações as quais o plasma utilizado é obtido a partir de doadores com níveis elevados de anticorpos não identificados para determinada doença; quando se fala de IGIV específica ou hiperimune, refere-se àquelas produzidas com plasma de doadores com altos níveis de anticorpos clinicamente importantes para uma doença específica, como por exemplo, doações de plasma contendo anti-HBs, anti-tétano, anti-citomegalovírus, ou anti-rábica (OMS, 2005).

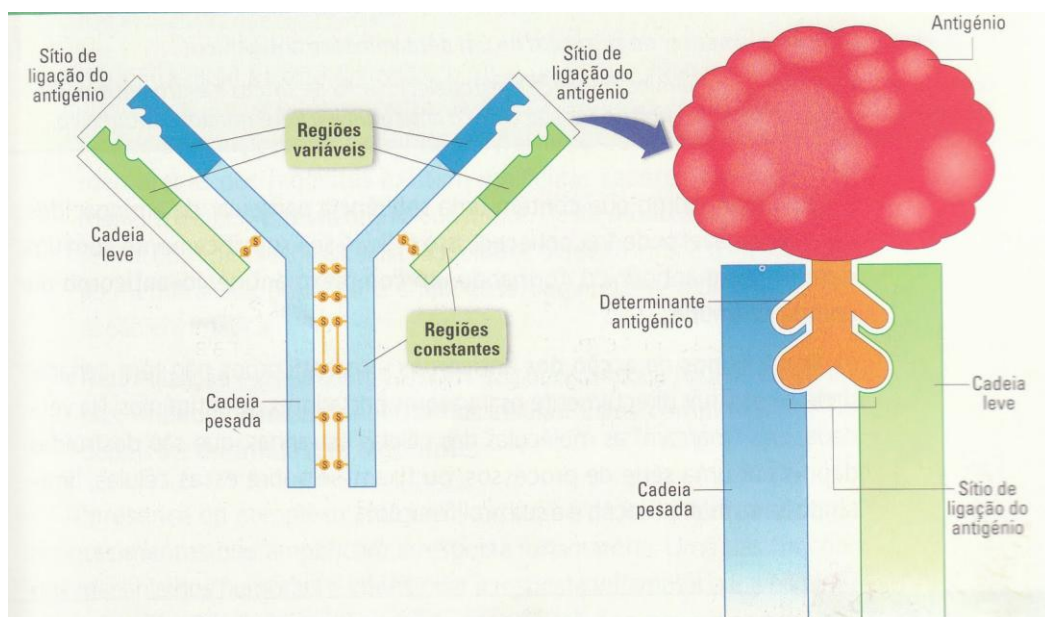
Imunoglobulinas Polivalentes Intravenosas (IGIV) já substituem a albumina e fatores de coagulação como os principais produtos da indústria de fracionamento do plasma humano e representam uma classe importante de anticorpos terapêuticos (BURNOUNF, 2007). Elas são moléculas formadas por quatro cadeias polipeptídicas, classificadas fisicamente com base em sua solubilidade nas soluções de sais fortes, carga eletrostática, peso molecular e estruturas antigênicas. Assim estão subdivididas em cinco classes: IgM, IgA, IgE, IgD e IgG, tendo suas características citadas na tabela 1 e sendo a IgG o nosso instrumento de estudo (BERZOFISKY 1984, ABBAS et. al., 2010).

Tabela 1: Características das Imunoglobulinas

Classe	Estrutura	Propriedades
IgA	Dimérica	Encontrada em mucosas do trato gastrointestinal, respiratório e urogenital.
	Monomérica	Previne colonização por patógenos. Presente também na saliva, lágrimas e leite.
IgD	Monomérica	Presente nas membranas. Faz parte do receptor de membrana de linfócitos B virgens.
IgE	Monomérica	Envolvida em processos alérgicos e parasitários. Sua interação com basófilos e mastócitos causa liberação de histamina.
IgG	Monomérica	Principal imunoglobulina da imunidade adquirida. Tem capacidade de atravessar a barreira placentária.
IgM	Monomérica	Faz parte do receptor de membrana de linfócitos B virgens.
	Pentamérica	Forma encontrada no soro, secretada precocemente na resposta imune adquirida.

As Imunoglobulinas G humanas são constituídas por glicoproteínas com peso molecular de aproximadamente 150kDa; estão presentes no plasma em uma concentração média de 7 a 12 g / L, dependendo de variações individuais e nível da exposição ambiental aos antígenos. São compostas por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves também idênticas, ligadas por pontes dissulfeto intercadeia e por interações não covalentes. Tanto as cadeias leves como as pesadas possuem regiões, são elas V_L e C_L (cadeias leves) e V_H e C_H (cadeias pesadas) (ABBAS et. al., 2010). As regiões variáveis amino-terminais V_H e V_L são responsáveis pela ligação do anticorpo ao antígeno, formando o domínio Fab, em contraste com as regiões constantes, C_L e C_H , que formam a porção Fc da molécula responsável pela ativação do complemento e interação com o receptor $Fc\gamma$ em macrófagos e neutrófilos. Outro constituinte da molécula de IgG é a região da dobradiça, responsável pela forma em Y do anticorpo, como mostra a figura 4 (PUMPHREY, 1986; BURNOUF, 2009) .

Figura 4: Estrutura da Imunoglobulina G



Fonte: adaptada pelo autor

Fonte: [http://www. antivirussoperativohumano.blogspot.com/2010_05_01_archive.html](http://www.antivirussoperativohumano.blogspot.com/2010_05_01_archive.html), acessado em 21 de abril de 2012

A IGIV polivalente é produzida a partir de “pools” de plasmas coletados a partir de múltiplos doadores (tipicamente 10.000-40.000) e contém milhões de diferentes moléculas de imunoglobulina G, o que reflete a exposição cumulativa da população de doadores com o meio ambiente (OMS, 2005).

As IGIVs estão entre os produtos do plasma mais complexos em seus mecanismos de ação. Seu uso clínico engloba terapia de reposição de deficiências imunológicas primárias ou genéticas, por exemplo, agamaglobulinemia ligada ao X, hipogamaglobulinemia e em imunodeficiências secundárias ou adquiridas, como por exemplo AIDS pediátrica, Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI) (LEMIEUX et. al., 2005). Nos últimos 15 anos houve uma expansão gradual da utilização de IGIVs em tratamentos de diversas doenças inflamatórias e doenças auto-imunes (BURNOUNF, 2009).

A indústria de hemoderivados teve início na década de 1940 com a metodologia desenvolvida pelo pesquisador americano E. J. Cohn para a purificação de albumina na II Guerra Mundial. Esta técnica, com discretas modificações, ainda é empregada por um grande número de empresas. Consiste no isolamento, em larga escala, de IgG usando etanol a frio (COHN et. al. 1946; ONCLEY et. al., 1949).

O design de métodos de produção, envolvendo purificação, reduções dos organismos patogênicos e de controle de qualidade devem ser consideradas padrões de qualidade da IGIV. Também é importante assegurar a farmacocinética e farmacodinâmica normais, bem como a eficácia funcional da IGIV, preservando a estrutura nativa molecular dos domínios Fab e Fc. Para isso, novas metodologias estão evoluindo ao longo dos anos, a fim de garantir boa tolerância, eficácia, minimizar os efeitos colaterais e em especial, evitar a transmissão de agentes infecciosos através da formulação (BURNOUNF, 2009).

OBJETIVOS

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Produzir um concentrado de imunoglobulina humana com altos títulos de anticorpos anti-dengue, a partir do pool de plasma de doadores voluntários do Estado de Pernambuco, utilizando o método de Cohn-Oncley;
- Avaliar a eficácia pré-clínica do uso das IGIV para o tratamento da dengue.

3.2 Objetivos Específicos

- Produção, através de metodologia clássica de Cohn-Oncley, de lote piloto de IGIV anti-dengue;
- Caracterização do produto acabado, segundo o que preconiza a Farmacopéia Européia, última edição;
- Identificação da ação neutralizante da IGIV produzida frente à diferentes sorotipos de DENV;
- Investigação da eficácia e segurança pré-clínica do uso de IGIV específicos para tratamento da infecção por dengue.

4.0 ARTIGO

**Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors
(Submetido ao periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)**

Carta de submissão:

Production of human dengue intravenous immunoglobulin from Brazilian donors

Frederico Leite Gouveia^{1/+}, Renata Mendes Batista de Oliveira¹, Antônio Edson de Souza Lucena², Marli Tenório Cordeiro³, Ana Cristina Lima Leite^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Av Prof Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil ²Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia, Recife, PE, Brasil ³Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil ⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁺Corresponding author: fred.gouveia@hotmail.com

Summary: *Dengue is an important health problem in Brazil, and therefore the identification of vaccine or therapeutic is highly needed. The neutralization of dengue virus by specific antibody has a potential application on therapy. We describe here, for the first time, the preparation of immunoglobulin specific for dengue virus (anti-DENV IgG), collected from Brazilian blood-donations. These IgGs were biochemically and biophysically characterized and neutralize different virus serotypes (DENV-1, DENV-2, and DENV-3). Overall, this anti-DENV IgG is an important step to study the therapeutic potential of specific antibody neutralizing dengue virus.*

Key words: Immunoglobulins - Viral infections – Dengue - Specific immunoglobulins - Plasma fractionation - Ion exchange chromatography

Sponsorships: FACEPE (programa PPSUS, grant number APQ-1380-4.00/08) and Instituto Nacional de Pesquisas em Dengue (INCT em Dengue, CNPq, grant number 573876/2008-8).

INTRODUCTION

Blood products are medicines produced by fractionation of human plasma. Because of the therapeutic importance, intravenous immunoglobulins (IVIG) have received special attention. It can be seen through the worldwide demand of 100 tons which is expected for 2012 (Robert 2006).

For a polyvalent (*i.e.*, normal) IVIG, we have broadly and wild-type immunoglobulins G (IgG) involving approximately 1,000 to 10,000 of blood-donations that are collected from healthy volunteers. The first usage of polyvalent IgG was in antibody replacement therapy (Orange et al. 2006). However, a large number of other clinical benefits have been recommended for IGIV. We can cite its use during bone marrow and organ transplantation, to treat chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, to ameliorate severe asthma, pediatric HIV, dermatomyositis, idiopathic thrombocytopenic purpura and multiple sclerosis (Achiron et al. 1998, Achiron et al. 2000, Brennan 2001, Dalakas et al. 1993, Hann et al. 1996, Lories et al. 2000, Ohlsson & Lacy 2001).

For a specific IVIG (*i.e.*, hyper-immune), intact IgG are collected from the plasma of blood-donors previously identified to have high levels of a specific antibody or at least a population of similar antibodies. The plasma for specific IVIG comes from patients clinically diagnosed with an infection or from immunized patients for hepatitis B (HB), tetanus, cytomegalovirus, or rabies (Atkins et al. 2000, Gelfand 2001). Classical examples of specific IVIG are the anti-D IgG (Rho) and anti-hepatitis B IgG.

The knowledge gathered over the years suggests that specific IVIG are useful for viral neutralization. This is the case in hepatitis B and in the arbovirus West Nile virus (WNV). It was reported that specific IgG reduces virus titles in severely-infected patients (Saquib et al. 2008, Wadei et al. 2004, Haley et al. 2003). More specifically, anti-WNV IgG neutralizes WNV in cell culture and substantially reduces the mortality in WNV-infected mice. However, these benefits are not observed when a polyvalent IgG is administrated (Ben-Nathan et al. 2003). Comparing WNV and dengue, we have the facts that both infections are immunologically and pathogenically similar to each other. In view of these evidences, the benefit of a specific human anti-dengue IgG for treating the infection sounds reasonable.

To date, a human anti-dengue IgG have never been produced, and thus its efficacy for dengue infection is unknown. Here, we described in details the plasma screening, fractionation and biochemical validation of anti-dengue IgG. The production of this anti-dengue IgG was performed in HEMOPE GPH branch, using the classic Cohn–Oncley process with minor modifications (Cohn et al. 1946, Oncley et al. 1949, Peters 1996).

MATERIALS AND METHODS

Plasma selection - A pool plasma from blood-donations in Brazil (Northwest region), which is monthly received by HEMOPE (PE, Brazil), was collected and the plasma bags considered free of contaminations were further selected. Once the plasma bags free of contaminations were selected, the plasma rich of anti-dengue IgG were separated off. To this end, a commercial ELISA kit (E-DEN01G panbio diagnostics, Cheshire, UK) was used for the indirect measurement of anti-dengue antibodies. This ELISA kit has dengue antigens adsorbed in the plate and the ELISA is revealed with a horse peroxidase conjugated with anti-human IgG. This ELISA kit was also used in plasma free of anti-dengue IgG (negative control). From the pool plasma supplied by HEMOPE, we identified 200 plasma bags containing specific anti-dengue IgG.

Immunoglobulin fractionation - The IgG was precipitated out from the crude plasma using the Cohn–Oncley process (cold ethanol precipitation) with minor modifications. The general process is depicted in **Fig. 1**. The process of cold ethanol precipitation is based on tuning the protein solubility by adjusting pH, temperature, salt concentration, and ethanol (Cohn et al. 1946). Briefly, the frozen plasma was thawed until reach 4 °C, where at this temperature fibrinogen and clotting factor VIII are insoluble and precipitates. The cryo-precipitate is then removed by centrifugation and the cryo-free plasma is treated following method 6 of Cohn et al. (1946). Fibrinogen was precipitated in fraction I and immunoglobulin was separated off from albumin by II + III precipitation. The precipitates were separated from supernatants by centrifugation.

In accordance Oncley et al. method 9 (1949), fraction II + III was suspended and fraction III was separated off. The supernatant was clarified by depth filtration with the aid of a filter. From this filtrate, a IgG paste is obtained and collected by centrifugation. IgG paste

To reduce the ionic force, the solution was filtered in ultrafiltration membranes (diafiltration) with sterile water for injection, followed by protein concentration adjustment to 5% (w/v). We used a 30 kD Millipore Pellicon System to performed diafiltration and protein level adjustment. Virus inactivation was performed by solvent (tri-*n*-butyl phosphate; TNBP) and detergent (Tween 80) treatment (Horowitz et al. 1985). To remove solvent and detergent, a cation-exchange chromatography in CM Sepharose FF stationary phase was performed. To remove IgA and other components, an anion-exchanged chromatography in DEAE Sepharose FF was also done. The flow-through was concentrated by ultrafiltration (10 KD Millipore Pellicon System) and diafiltered for 0.25 mol/L glycine using the same system. The protein level was adjusted to 5% (w/v) and pH to 4.25. Sterilizing filtration was performed and the final solution is packaged aseptically. To inactive virus particle, the final product is incubated at 23-27°C for 21 days before storage at 2-8°C.

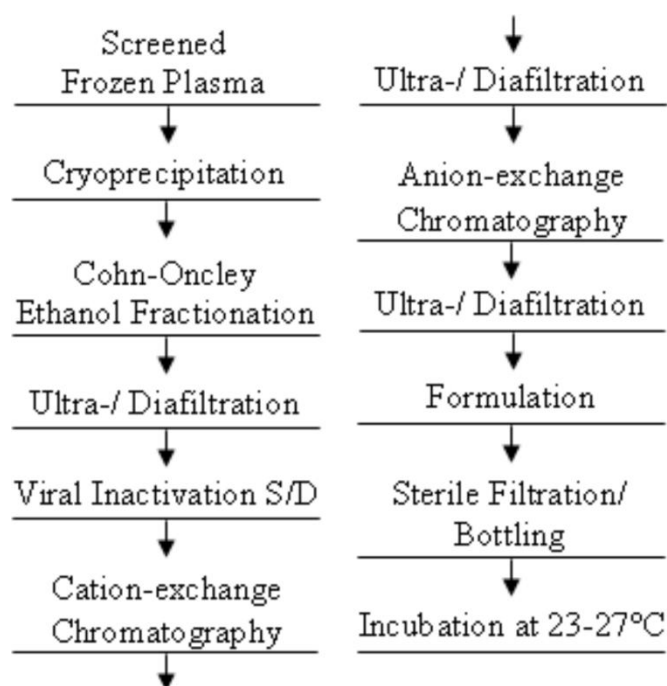


Fig. 1: Purification process of anti-dengue specific immunoglobulin.

Biochemical validation - To check the functional property of the product in process and final preparation, we performed the protocols established by European Pharmacopoeia. ELISA test was used to check the absence of antibodies screened for blood donation, such as HIV₁, HIV₂, hepatitis B surface antigens, Hepatitis C, HTLV, Chagas disease and syphilis.

Identification of anti-dengue serotypes - To ascertain the broad neutralizing property of the anti-dengue IgG described here, we measure the neutralizing action of IgG for different isolated serotypes. Isolated serotypes DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), and DENV-3 (PE/02-95016) were supplied by LACEN (PE, Brazil). In this experiment, we used a commercial polyvalent IVIG (Kiovig/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA) as a negative control. The measure of anti-dengue antibody serotypes was determined by Plaque-Reduction Neutralization Test (PRNT) (Morens et al. 1985).

First, a two-fold serial dilution of IgG (1/20 to 1/2.560) in MEM medium was placed onto 96-well microtiter plates to a final volume of 100 μ L. Then, 100 μ L of a viral suspension (30 plaque forming units/mL) of DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), and DENV-3 (PE/02-95016) was aliquoted into the respective wells. The plate was incubated for 1h at 37 °C in 5% CO₂. Then, 50 μ L of the mix IgG/virus was collected from each dilution and transferred into a 24 well-plate containing Vero cells previously seeded at the density of 3x10⁶ cells/mL, in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO).

After virus attachment (incubation for 1h at 37 °C in 5% CO₂), each well was covered with 500 μ L of MEM 10X medium, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 3% carboxymethylcellulose. The plate was then incubated during 7 days at 37°C in 5% CO₂. To inactivate the viral particles, the medium was removed out and the monolayer cells were covered with formalin (solution at 3.5 M, 2mL per well) and incubated for 1h. The formalin solution was washed out and the cells were stained with crystal violet (1:50 v/v, 0.5 mL per well). The number of infected cells (plaques) was counted and compared to the virus particle received only polyvalent IVIG or non-treated virus particle.

RESULTS

During the plasma screening, we were able to identify an adequate number of plasma bags positive to anti-dengue IgG, which is expected because Brazil is an endemic area for dengue. Once the plasma was selected, the IgG were separated out from other protein contents using the Cohn–Oncley process of cold ethanol precipitation. Anion-exchanged chromatography in DEAE Sepharose FF was then used to divide IgG from other immunoglobulin classes. In **Table I**, we summarize the biochemical and biophysical properties of the purified anti-dengue IgG. The reference values (standard conditions according to the European Pharmacopoeia) are also given there.

TABLE I
Biochemical and biophysical functional activity for the anti-dengue IgG

Test	Reference values	Results
pH	4,0 – 7,4	4,27
Total protein	45 – 55 mg/mL	51 mg/ mL
Protein composition	Minimum of 95% gammaglobulin	98%
Distribution of molecular size	Minimum of 90% monomer and dimer Maximum of 3% polymers and aggregates	98,1% 1,1%
IgA	-	0,16 mg/mL
IgM	-	0,10 mg/mL
Anticomplementary activity (%)	≤ 50	39
Thermo stability (57 °C/4h)	No gelification	No gelification
Antibody to hepatitis B surface antigen	Minimum 0,5 IU/g	1,74 IU/g
Pyrogens	Absence	Absence

Gel electrophoreses was ran to ascertain the composition of IgG and we found consistent ratio of IgG. Inactivation of virus particle, which was based on solvent/detergent

treatment and incubation at 23-27°C for 21 days, worked satisfactorily in all the benches that were prepared. The functional property of this anti-dengue IgG was confirmed in the basis of virus neutralizing property for dengue virus (**Table II**).

We also investigated the purity of this material. The product is non-reactive for hepatitis B surface antigens, and free for hepatitis C virus antibodies, human immunodeficiency virus, Chagas disease, and syphilis. This is an important biochemical characterization to ensure that this IgG is suitable for intravenous administration.

Regarding the biophysical properties, this IgG solution has adequate isotonicity (0,25 mol/L glycine) and the total amount of aggregates falls in the acceptable range. The solution was maintained in low pH, which minimizes aggregate and fragment formation, while is well known that pH higher than 4.7 enhances dimerization (Kroez et al. 2003). We analyzed the overall stability of this IgG preparation in different times by thermo-stability and biophysical solution assays and we compared these data with a trademark IgG (polyvalent). Finally, we measure the amount of glycoproteins (complement system activation), and the value we found is in agreement with the total amount accepted for a standard formulation.

Once the anti-dengue IgG was characterized biophysically and biochemically, we quantified the ability of anti-dengue IgG in neutralizing different virus serotypes: DENV-1, DENV-2, and DENV-3. In **Table II**, we depict these data. We first validated the neutralizing test using a commercial IgG (prepared from American blood donations, brand Kiovig/Baxter). In this case, only non-specific neutralization was observed to DENV-1 and DENV-2, while no neutralization was observed for serotype DENV-3. We tested samples containing entire plasma (same plasma used during the IgG production). On this time, we observed broadly neutralizing property over virus serotypes. This effect was similar to observed when we used the human dengue IgG. Neutralizing reaction towards DENV-2 seems more prone. This may be because the prevalence of this serotype in Northeast of Brazil.

TABLE II
Dengue antibody titers on the specific immunoglobulin preparation by plaque reduction

Sample*	DENV-1	DENV-2	DENV-3
plasma	1:160	1:640	1:40
anti-dengue IgG	1:160	1:1280	1:160
polyvalent IgG (trademark, Kiovig)	1:40	1:40	< 1:20 (negative)

* Experiments were repeated at least three times in independent times. Data here are the mean of one single experiment.

DISCUSSION

Specific human IgG are useful for neutralizing virus infection. Hepatitis B and WNV are the cases where the therapeutic benefits of IVIG treatment are more understood. Although dengue is an important health problem in Brazil, we still do not know whether the treatment of dengue infection with specific IgG have benefits or not. The potential of treating dengue infection with specific IgG relies on the excellent clinical outcomes reported for WNV infection.

In light of these finding, we described here a detailed protocol of plasma screening, purification and biophysical / biochemical validation of a human anti-dengue IVIG. This is the first time that a specific IgG purified from Brazilian plasma donations is performed. The functional activity of this IgG as specific human anti-dengue was confirmed using a simple and reliable virus neutralizing test (Plaque-Reduction Neutralization Test, PRNT), which is same used for serological determinations. As expected for an endemic area, this anti-dengue IgG showed broadly neutralizing property for the three tested virus serotypes. This material is important for investigate the effect of anti-dengue IVIG during infection.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors deeply thank all the employees and researchers of HEMOPE for the help during the development of this work. R.M.B.O. is receiving a scholarship from INCT, while F.L.G. is receiving a FACEPE scholarship for doctoral studies. A.C.L.L. is holding a senior scholarship awarded by CNPq (programa de bolsas de produtividade em pesquisas).

REFERENCES

- Achiron A, Gabbay U, Gilad R, Hassin-Baer S, Barak Y, Gornish M, Elizur A, Goldhammer Y, Sarova-Pinhas I 1998. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis: Effect on relapses. *Neurology* 50: 398-402.
- Achiron A, Mor F, Margalit R, Cohen IR, Lider, O, Miron S 2000. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenously administered polyclonal immunoglobulins. *J Autoimmun* 15: 323-330.
- Atkins JT, Karimi F, Morris EH, Mc David G, Shim S 2000. Prophylaxis for respiratory syncytial virus with respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous among preterm infants of thirty-two weeks gestation and less: reduction in incidence, severity of illness and cost. *Pediatr Infect Dis J* 19: 138-143.
- Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinzon S, Segal S, Rager-Zisman B 2003. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile Virus infection in mice. *J Infect Dis* 188: 5-12.
- Brennan DC 2001. Polyclonal antibodies in immunosuppression. *Transplant Proc* 33: 1002-1004.
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WLJR, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 68: 459-475.
- Cordeiro TM, Silva MA, Brito AAC, Nascimento MJE, Magalhães FCM, Guimarães FG, Silva LN, Carvalho FME, Marques ATE 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 77: 1128-1134.
- Dalakas MC, Illn I, Dambrosia JM, Soueidan SA, Stein DP, Otero C 1993. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 27: 1993-2000.

Gelfand MDJ 2001. Antibody-directed therapy: Past, present, and future. *Allergy Clin Immunol* 108: S111-S116.

Gubler DJ 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480–496.

Haley M, Retter AS, Fowler D, Gea-Banacloche J, O'Grady NP 2003. The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. *Clin Infect Dis* 37: 88–90.

Hann AF, Bolton CF, Zochodne D, Feasby TE 1996. Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled study. *Brain* 119: 1067-1077.

Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH 1985. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combinations. *Transfusion* 25: 516-522.

Kroez M, Kanzy EJ, Gronski P, Dickneite G 2003. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals* 31: 277–286.

Lories RJ, Maertens JA, Ceuppens JL, Peetermans WE 2000. The use of polyclonal intravenous immunoglobulins in the prevention and treatment of infectious diseases. *Acta Clin Belg* 55: 163-169.

Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N 1985. Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for dengue viruses by semimicro Methods in BHK-21 cells: comparison of BHK suspension test with standard Plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 22: 250-254.

Ohlsson A, Lacy JB 2001. Cochrane Database Syst. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD000361.

Oncley JL, Melin M, Richert DA, Cameron JW, Gross PM 1949. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and betalipoprotein into subfractions of human plasma. *J Am Chem Soc* 71: 541-550.

Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, Ballow M, Berger M, Bonilla FA, Buckley R, Chinen J, El-Gamal Y, Mazer BD, Nelson RP, Patel DD, Secord E, Sorensen RU, Wasserman RL, Cunningham-Rundles C 2006. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 117: 525-553.

Peters JrT 1996. Historical perspective. In JrT Peters, *Academic Press* 116: 1– 8.

Roberts P 2006. Global demand for plasma products. In International Plasma Protein Congress, Prague, Proceedings. Zeist: The Netherland. Medical Forum International B.V 39-68.

Saqui R, Randall H, Chandrakantan A, Spak CW, Barri YM 2008. West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient: the role of intravenous immunoglobulin. *Am J Kidney Dis* 52: 19-21.

Wadei H, Alangaden GJ, Sillix DH, El-Amm JM, Gruber AS, West MS, Granger DK, Garnick J, Chandrasekar P, Migdal SD, Haririan A, Granger DK, Garnick J, Chandrasekar P, Migdal SD, Haririan A 2004. West Nile virus encephalitis: an emerging disease in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 18: 753–758.

Werdan K 2001. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. *Curr Opin Crit Care* 7: 354-361.

ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.0 ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.1 Metodologia

Foi realizado um ensaio preliminar com o objetivo de observar o efeito da IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue frente a infecção do vírus dengue, mais especificamente o DENV-3.

Os ensaios foram realizados através de colaboração com o laboratório de Interação Microrganismo/Hospedeiro do Departamento de Microbiologia da UFMG, que também é integrante do Instituto Nacional de Pesquisa em Dengue.

Neste trabalho foi utilizado o sorotipo 3 do vírus dengue (DENV-3), gentilmente cedida pela professora Erna Geissen Kroon do Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia da UFMG. O vírus foi adaptado ao hospedeiro murino pelo Dr. George Ignatyev, pesquisador colaborador do Vector Institute (Rússia).

5.1.1 Adaptação da amostra clínica do DENV-3 humano ao hospedeiro murino

Para a adaptação do vírus e aumento da virulência do isolado no hospedeiro murino, o mesmo foi inicialmente injetado por via intracerebral (i.c) em camundongos neonatos (com no máximo 2 dias de vida - linhagem BALB/c). No quinto dia após a infecção, os cérebros destes animais foram retirados e um homogenato dos cérebros, realizado em uma solução de 10% p/v em PBS, centrifugado a 6.000 rpm, 4 °C por 1 minuto. O sobrenadante coletado foi novamente injetada (i.c) em novos animais. Várias passagens (em média 8) foram realizadas como descrito anteriormente por Atrasheuskaya et al. (2003).

Após a última passagem (i.c), animais com 2 semanas de vida foram infectados por via intraperitoneal (i.p). O aparecimento dos sinais clínicos da doença foi verificado (ex: redução da exploração do ambiente, arqueamento do dorso, paralisia dos membros posteriores). Ao aparecimento desses sinais, os animais moribundos foram sacrificados e os cérebros retirados para a realização de novo homogenato (a 10%) e este utilizado para nova passagem em novos animais. O mesmo procedimento foi realizado com animais de 3 e 4 semanas de vida para infecções intraperitoneal com o DENV-3. A última passagem do DENV-3 obtida dos animais BALB/c com 4 semanas foi utilizada para novas 5 passagens sequenciais no cérebro de

animais neonatos e posteriormente coletadas para produção dos estoques. Esses estoques foram armazenados em freezer -70°C. Para a confirmação da adaptação do vírus em camundongos, animais BALB/c machos com 4 semanas de idade (n = 8 animais por grupo) foram infectados com diluições seriadas de suspensão do cérebro, provenientes do estoque viral por via i.p. e a taxa de letalidade dos animais avaliada. Além disso, células LLC-MK2, da linhagem kidney, Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) e células da linhagem C636 de mosquito *Aedes albopictus*, também foram infectadas e os efeitos citopáticos do vírus avaliados.

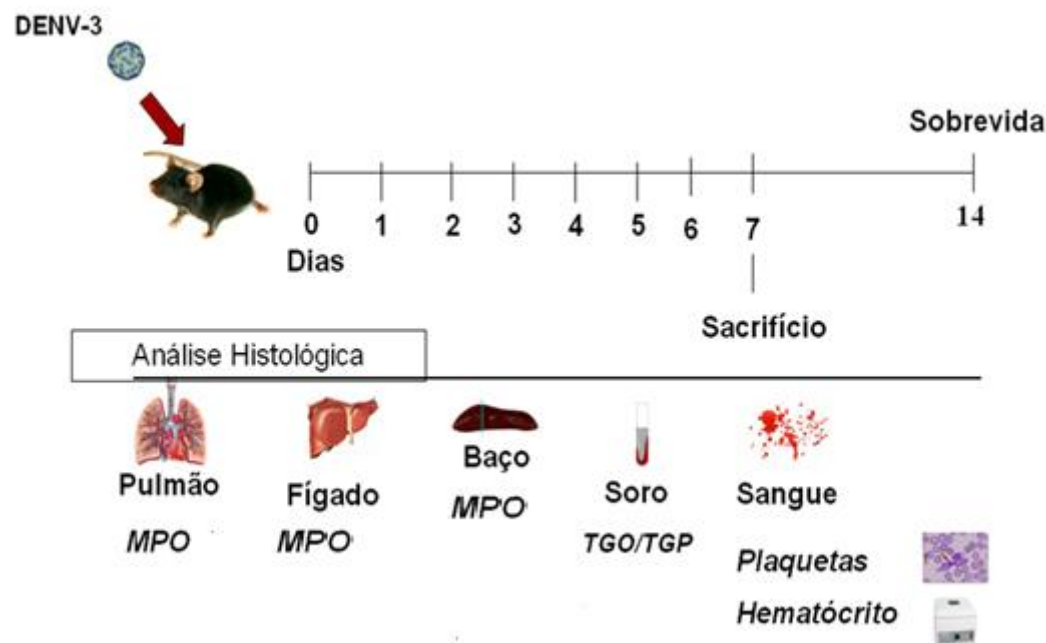
5.1.2 Animais e protocolo experimental

Para a avaliação do papel das IVIG humana no modelo experimental de infecção pelo DENV-3 foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6j.

Os animais utilizados foram machos ou fêmeas com 8 semanas de idade (n= 5 animais por grupo), infectados com 100 PFU de vírus DENV-3 por via intraperitoneal (i.p.) , adaptado ao hospedeiro murino. Estes animais foram mantidos em micro-isoladores com livre acesso à água e ração. Os animais tratados ou não com as IGIV foram monitorados em intervalos de tempo indicados para a obtenção das curvas de letalidade ou então, sacrificados no 7^o dia após a infecção para a análise dos parâmetros inflamatórios, histológicos e da carga viral. Um experimento piloto (Letalidade) foi realizado a fim de se determinar a melhor cinética (dias e frequência de tratamento), utilizando IGIV/HEMOPE na dose de 10mg/Kg, por via intraperitoneal (i.p.), segundo Bem-Nathan (2003), e posteriormente as doses de tratamento com um novo experimento. Os melhores achados foram utilizados posteriormente nos experimentos da resposta inflamatória e carga viral.

Figura 5: Estratégia experimental

Dose: 10mg/Kg do animal.



Legenda:

WT: wild type; TTO: tratamento; IGIV: Imunoglobulina G intravenosa; MPO: mieloperoxidase; TGO: aminotransferase glutâmico-oxalacética; TGP: aminotransferase glutâmico-pirúvica.

Experimento de letalidade/IGIV

- 30 animais (n=5 cada grupo). Total de 6 grupos:
- **Grupo A: WT (n=5);**
- **Grupo B: IGIV TTO dia 0 (apenas 4hs antes da infecção) (n=5);**
- **Grupo C: IGIV TTO dia 0 (4hs antes da infecção), dia 1 (24hs após a infecção) e dia 3 (72hs após a infecção) (n=5);**
- **Grupo D: IGIV TTO dia 1 (4 horas após a infecção) (n=5);**
- **Grupo E: IGIV TTO dia 1 (24 horas após a infecção) (n=5);**
- **Grupo F: IGIV TTO dia 1 (24 horas após a infecção), dia 2, dia 3, dia 4 e dia 5 após a infecção (n=5).**

Fonte: arquivo- ICB/UFMG.

5.1.3 Titulação do vírus dengue

Células LLC-MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5 a 6% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona (2ug/mL), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50ug/mL). Em seguida foram tripsinizadas, homogeneizadas e incubadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por cerca de 24 horas, até a formação de uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de fígado e baço foram pesadas, maceradas com “cadinho” e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente em meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de sangue foram inicialmente diluídas em PBS e posteriormente diluídas serialmente em DMEM. A cada poço de uma placa foi adicionado 400 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não-inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB.

As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C (período de adsorção), sendo gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“*phosphate-buffered saline* – PBS”) (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO_4). Em seguida, adicionou-se meio 199 contendo 1.5% de carboximetilcelulose, antibióticos e 3% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias ou até que aparecessem os efeitos citopáticos observados ao microscópio invertido. As mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, os quais sendo expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

5.1.4 Quantificações dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício, 10 µL do sangue de animais não infectados e infectados nos dias 3, 5 e 7 foi retirado pela veia cava inferior, coletado e colocado em tubos heparinizados. Diluiu-se este volume na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1%, sendo o volume incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 10 µL colocados na câmara de Neubauer Bright-Line. Após nova incubação de 15 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido utilizando a objetiva de 40X.

5.1.5 Análises do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado, para determinação de micro-hematócrito, e centrifugado em centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

$$\begin{array}{ccc} \text{Branco + Vermelho} & \text{—————} & 100\% \\ \\ \text{Vermelho} & \text{—————} & X \end{array}$$

Estes resultados foram expressos em percentagem e quanto maior o valor obtido, maior a concentração de hemácias no sangue, indicativo de aumento do extravasamento plasmático.

5.1.6 Análise Histopatológica

Em dias pré-determinados após a infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (fígado e pulmões) coletados. Estes foram imersos em formol tamponado a 10% em PBS por 18 horas e em seguida, colocados em solução de álcool 70% até o processamento das amostras. Para o processamento, submeteu-se os tecidos a subseqüentes passagens em etanol

em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 minutos cada) e em parafina líquida.

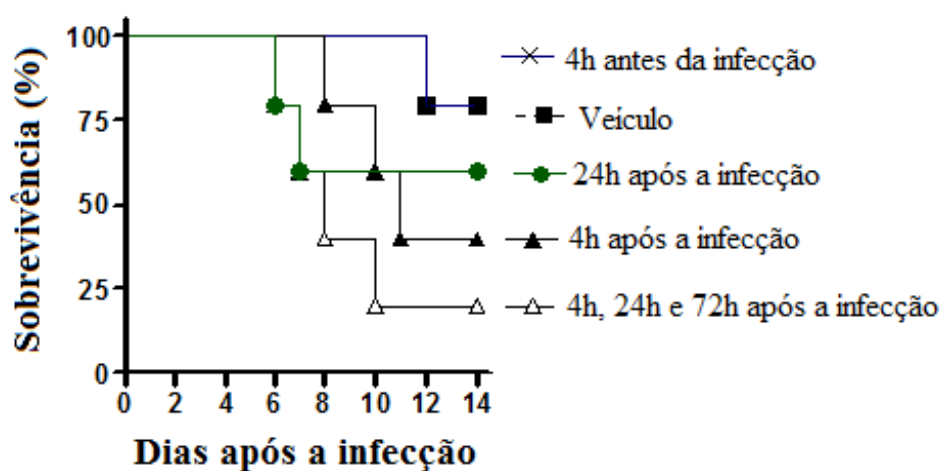
Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina tendo os cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura dispostos em lâminas de microscopia. Após essa fase, foram desparafinizados (xilol 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% - 5 imersões; água). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos) (HE). Em seguida, desidratadas (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e montadas com Bálsamo do Canadá sintético.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O primeiro experimento teve por objetivo determinar o melhor esquema de tratamento através da realização de transferência passiva de imunoglobulina na dose de 10 mg/Kg. Os resultados estão dispostos na **figura 6**.

Os resultados demonstram o aumento da letalidade dos animais infectados pelo DENV-3, após a transferência passiva de imunoglobulina.

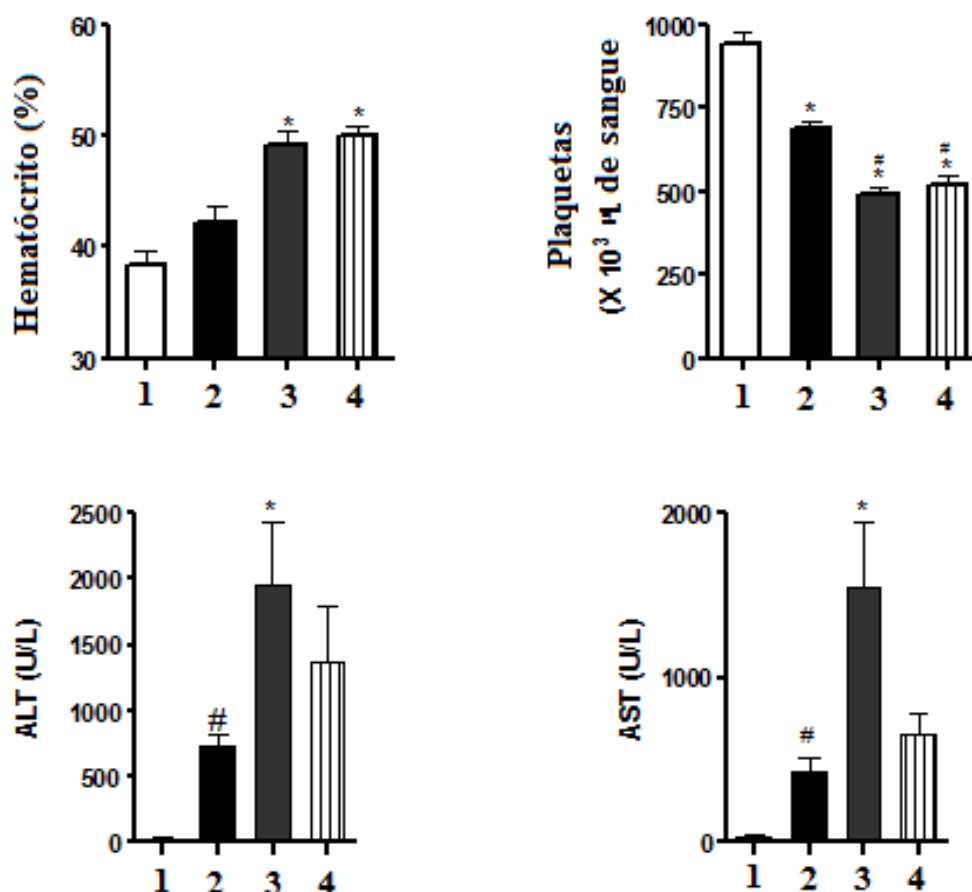
Figura 6. Taxa de letalidade induzida pela infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino, após transferência passiva de IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue.



Fonte: arquivo ICB/UFMG.

O passo seguinte consistiu na avaliação do efeito da administração passiva de imunoglobulina, na resposta inflamatória e na carga viral dos animais infectados com DENV-3, no sétimo dia após a infecção (pico da doença). Além da IGIV produzida no HEMOPE (a partir do plasma de pacientes proveniente de área endêmica para Dengue), também utilizamos uma preparação comercial de imunoglobulina (Kiovig/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA). Os dados preliminares abaixo demonstram que ambos os tratamentos (IGIV/HEMOPE e IGIV/USA) foram capazes de gerar uma doença mais grave nos animais infectados pelo DENV-3, demonstrado pela ocorrência de maior hemoconcentração e trombocitopenia (figura 7).

Figura 7. Alterações hematológicas e hepáticas após a infecção com o DENV-3 e tratamento com IGIV/HEMOPE e IGIV/USA.



*Legenda: 1 = Não Infectado, 2 = Veículo, 3 = IGIV/HEMOPE, 4 = Kiovig.

Fonte: arquivo ICB/UFGM.

Esses achados sugerem que o tratamento com as IGIVs em baixa terapia (dose de 10mg/kg) resultou em agravamento da doença. A administração de imunoglobulinas induziu a exacerbação da resposta à infecção, aumento da letalidade e aumento da carga viral.

Por um lado, a dose de IGIV pode não ter sido eficaz para a neutralização do vírus. Por outro lado, é bem descrito que sorotipos do vírus dengue 1-4 (DENV 1, 2, 3, 4) estão intimamente relacionados, mas não antigenicamente, sendo assim, o Fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes (ADE) pode ter ocorrido, resultando na morte dos animais infectados, após o tratamento com imunoglobulinas específicas.

Apesar destes resultados demonstrarem aumento da letalidade e agravamento da doença nos animais infectados, este experimento está na fase inicial de testes. A partir de estudos posteriores, novos esquemas terapêuticos poderão ser testados, assim como diferentes doses e vias de administração da IGIV.

PERSPECTIVAS

7.0 PERSPECTIVAS

- Avaliar a eficácia pré-clínica do uso de IGIV específica, em doses mais elevadas, a fim de obter neutralização do vírus da dengue;
- Produção de IGIV ausente de anticorpos anti-dengue, a partir da triagem e seleção de plasmas negativos para estes anticorpos;
- Preparação de um concentrado de imunoglobulina anti-dengue fragmentada da porção Fc, visando eliminar a possibilidade de ocorrência do fenômeno ADE.

REFERÊNCIAS

8.0 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K . ; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Revinter : Rio de Janeiro, 2010.

ARONSON D. L., FINLAYSON J. S. **Historical and future therapeutic plasma derivatives (Epilogue)**, v 6, p. 1231, Semin Thromb Hemost , 1980.

ATRASHEUSKAYA, A.; PETZELBAUER, P.; FREDEKING, T. M.; IGNATYEV G. **Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection**. Immunology and Medical Microbiology, v 35, n. 1, p. 33-42, 2003.

BERGER, M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.28, p.413-437, 2008.

BERZOFKY, J. A.; BERKOWER, I. J. Antigen-antibody interaction In: Fundamental immunology. **Raven Press**, NewYork : ed. W.E. Paul, 1984.

BEN-NATHAN, D. et. al. Prophylatic and Therapeutic Efficacy of Human Intravenous Immunoglobulin in Treating West Nile Virus Infection in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 1, p. 5-12, julho, 2003.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. E. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BRASIL, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Dengue – Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente**. 2 ed. Brasília, 1996a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no. 343, de 13 de dezembro de 2002. Anexo 1- Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia**. Brasília, 2002 b.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. Diretoria Técnica de Gestão. – 2. ed. – Brasília, 2005 c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-rdc nº 153, de 14 de junho de 2004 - Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 08 de dezembro de 2011 d.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue-Semana Epidemiológica julho 2011.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2011 e.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue-Semana Epidemiológica novembro 2011.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2011 f.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S.; Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. **Microbiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRUTON O. C. Agammaglobulinemia. **Pediatrics**, v. 9, n. 7, p. 722.

BURNOUF T. Modern plasma fractionation. **Transfusion Medicine Review** , França, v. 21, n. 2, p. 101–117, 2007.

BURNOUF T. et al. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. **Vox Sanguinis**, França, v. 98, p 1-17, junho 2009.

CAIRUTAS, C. M. Breve resgate da evolução da hemoterapia. **O que corre em nossas veias-Fragmento de sua história.** Rio de Janeiro: EBGE, 2001.

CAUSEY, O. R., MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human agent. III. Investigation of an endemic of acute febrile illness on the River Guamá in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as a causative agent. **American Journal of Tropical. Medicine and Hygiene, Baltimore**, v. 6, p. 1017-1023, novembro.1957.

COHN, E. J. et. al. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of American Chemical Society**, Inglaterra, v.68, n 3 p. 459-475, 1946.

DA SILVA J.R. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** São Paulo, v. 23, p. 1-7, 2002.

FIGUEIREDO L.T.M.; FONSECA B.A.L. Dengue. **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Livraria Atheneu, 1996.

FIGUEIREDO L.T.M. Patogenia das infecções pelos vírus dengue. **Virologia Médica, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 15-20, jan- março 1998.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. São Paulo: **USP**, v. 3, p.416 1965.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem New York: **CAB International**, 1997.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 100-103, fevereiro. 2002.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 4, p. 33-42, abril. 2002

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v.27,n. 1, p. 1-3, maio. 2003.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, London, v. 370, p.1644-1652, novembro. 2007.

JEFFERIS, R. Polyclonal and MAb reagents specific for IgG subclasses. **Monogr. Allergy** v.19, 71-85, 1986.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Texas, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, junho. 1999.

LEMIEUX, R.; BAZIN, R.; NERON, S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. **Molecular Immunology**, Canadá; v. 42, n. 7, p. 839–848, maio. 2005.

LING, L. M.; WILDER-SMITH, A.; LEO, Y. S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 265-268, março. 2007.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, n.1, p.60-65, 2004.

LOUIE, R.E. et al. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin. **Biologicals**, Califórnia, v. 22, n. 1, p. 13-19, março. 1994.

LUNDBLAD, J. L.; SENG, R. L. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate. **Vox Sanguinis**, Califórnia, v. 60, n. 2, p.75-81, 1991.

KURANE I.; ENNIS F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin. Immunology**. Massachusetts, v. 4, n. 2, p. 121-127, abril 1992.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever : challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, Tóquio, v. 11, p. 301-311, abril 2001.

MARTHA, M.; EIBL, M.D. History of Immunoglobulin Replacement. **Immunology Allergy Clinic North America**, Viena, v 28, n. 4, p.737-764, novembro. 2008.

MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 7, p.2395-2400. 1994.

MONATH T. P., HEINZ F.X. Flaviviruses. In: FIELDS BN., KINPE DM., HOWLEY PM (eds). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-raven publishes, 1996. p. 961-1034.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Califórnia, v. 38, n. 3, p. 1286-1289, março. 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 307-313, maio. 2006.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 921-927, julho. 2003.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, janeiro-março. 2000.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n. 7, p. 925-926, outubro. 2001.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus infection of the Central nervous system (CNS) a case report from Brazil. **The Southeast Asian Journal of Tropical Public Health, Bangkok**, v. 33, n. 1, p. 68-71, março. 2002.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Pan American Journal of Public Health, Washington**, v. 22, n. 5, p. 358-363, novembro. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guidelines for Treatment of Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals**, New Dehli:Regional Office for South-East Asia, p. 1-28, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Dengue**. Disponível em: <[http:// www.who.int/tdr/diseases/default.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm) >. Acesso em: 10 nov. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation**. Disponível em: <<http://www.who.int/bloodproducts>>. Acessado em: 20 de julho de 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet, n. 117.**

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 08 dez. 2010.

ONCLEY, J. L. et al. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-lipoprotein into subfractions of human plasma. **Journal of the American Chemical Society**, v.71, p.541-550, 1949.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (PAHO) - **Number of cases dengue,2003.** Disponível em <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>>. Acesso em: dezembro de 2007.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 305-309, janeiro- fevereiro. 2003.

PUMPHREY, R. Computer models of the human Igs: Shape and segmental flexibility. **Immunology Today**, v. 7, p. 174, 1986.

RAMOS, C.; GARCIA, H.; VILLASECA, J. M. Fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue. **Salud Publica de Mexico**, México, v. 35, n. 1, 1993.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue- 1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 355-362, outubro. 2002.

ROBERT, P. Global demand for plasma products. **International plasma protein congress, Prague, 2006 Proceedings.** Zeist The Netherland. Medical Forum International B.V p.39-68, 2006.

ROCCO I. M.; KAVAKAMA B. B.; SANTOS C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-57, janeiro-fevereiro 2001.

ROSEN, L.; GUBLER, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 6, p. 1153-1160, novembro. 1974.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, Massachusetts, v. 257, n. 7, p. 1-6, abril. 1999.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, Massachusetts, v. 113, n.7 p. 946-951, abril. 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. **The American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 71, p. 646–651, abril. 2004.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, janeiro. 2005.

SOUZA, L. J. et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferases levels. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 4, p. 407-410, 2007.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, maio- junho. 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. e GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, Bahia, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, supl. 1, p. 7-18, 2009.

THOMAS, S. J.; STRICKAMN, D.; VAUGHN, D.W. Dengue Epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. **Advances in Virus Research**, Bangkok, vol. 61, p. 235-289, 2003.

YIN, Z.; CHEN, Y. L.; SCHUL, W.; WANG, Q. Y.; GU, F.; DURAIWAMY, J.; KONDREDDI, R. R.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LAKSHMINARAYANA, S. B.; GOH, A.; XU, H. Y.; LIU, W.; LIU, B.; LIM, J. Y.; NG, C. Y.; QING, M.; LIM, C. C.; YIP, A.; WANG, G.; CHAN, W. L.; TAN, H. P.; LIN, K.; ZHANG, B.; ZOU, G.; BERNARD, K. A.; GARRETT, C.; BELTZ, K.; DONG, M.; WEAVER, M.; HE, H.; PICHOTA, A.; DARTOIS, V.; KELLER, T. H.; SHI, P. Y. **An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, New York, v. 106, n. 48, p. 20435-20439, 2009.