



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

FREDERICO LEITE GOUVEIA

**Produção de Imunoglobulinas Humana e Estudos Visando Novas
Aplicações Terapêuticas**

**Recife
2013**

FREDERICO LEITE GOUVEIA⁺

**Produção de Imunoglobulinas Humana e Estudos Visando
Novas Aplicações Terapêuticas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

⁺ Bolsista FACEPE

Recife
2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Gouveia, Frederico Leite

Produção de imunoglobulinas humana e estudos visando novas aplicações terapêuticas / Frederico Leite Gouveia. – Recife: O Autor, 2013.

178 f.: il.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui referências e apêndices

1. Terapêutica 2. Imunoglobulinas 3. Dengue 4. Chagas, doença de I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Título.

615.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-257

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



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

Recife, 30 de agosto de 2013.

Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de agosto de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Valéria Rego Alves Pereira (Departamento de Imunologia – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães)

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior (Universidade Estadual da Paraíba)

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Marli Tenório Cordeiro (Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco)

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco)

DEDICATÓRIAS

Primeiramente à minha família em especial aos meus pais, Lúcia e Ubiratan, por todo esforço em me dar as oportunidades e incentivos para que eu chegasse até aqui e pela compreensão nos momentos alegres e difíceis de minha vida...

À minha esposa Renata pelo carinho e companheirismo ao longo destes quatro 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 Ana Cristina Lima Leite pela oportunidade concedida, confiança, amizade e liberdade para conduzir o projeto.

Ao grupo de pesquisa do INCT - Dengue, sob a coordenação do Prof. Mauro Martins Teixeira, em especial ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da UFMG, pela realização dos ensaios biológicos anti-dengue.

Ao grupo de pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da FIOCRUZ, sob a coordenação da Profa. Milena Soares, em especial ao Laboratório de Imunofarmacologia e Engenharia Tecidual (LETI), pela realização dos ensaios de cardiomiopatia.

À profa. Marli Tenório, da FIOCRUZ, pela boa vontade e interesse dedicados à realização dos testes de PRNT.

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

Ao amigo Diogo Rodrigo pela amizade, grande apoio e disposição para ajudar a resolver vários problemas durante o doutorado.

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

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

Ao FACEPE pelo suporte financeiro.

Novamente aos meus pais, que são o que eu tenho de mais precioso e confiável nesta vida e por tudo que me ensinaram e ensinam.

A minha namorada Renata pelo seu apoio, companheirismo, ternura e participação efetiva neste trabalho.

Ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Trata-se de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer.

(Rocky Balboa)

RESUMO

Imunoglobulinas intravenosas (IGIVs) têm um grande número de aplicações clínicas. O uso de imunoglobulinas é útil em reduzir infecções por alguns *Flavivirus* e aparece como um tratamento atualmente disponível para infecção viral, capaz de proporcionar um estado de imunidade passiva. A dengue representa um importante problema de saúde no Brasil, pois atualmente não há vacina ou tratamento eficaz disponível comercialmente para combater a infecção. Sendo assim, podemos supor que a terapia com IGIV específica desponta como uma estratégia promissora. Porém, apesar de atraente, a segurança desta estratégia, deve ser considerada, devido à possibilidade de ocorrência do fenômeno de facilitação por anticorpos da penetração viral em macrófagos (antibody dependent enhancement - ADE). Mediante o objetivo de realizar estudos referentes às novas aplicações das IGIVs, no presente trabalho descrevemos a preparação de IGIV polivalente e pela primeira vez, a preparação de imunoglobulina específica para o vírus dengue, além da produção dos seus fragmentos F(ab')₂ específicos. A produção foi realizada utilizando o método clássico de Cohn-Oncley. As IGIVs foram bioquimicamente e biofisicamente caracterizadas e os resultados foram condizentes com os protocolos definidos pela Farmacopeia Europeia e pela Agência Regulatória Nacional. Após o tratamento com IGIV anti-dengue (Dose de 10 mg/Kg administrada 4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção pelo DENV-3) os camundongos infectados apresentaram exacerbação de todos os parâmetros clínicos, bioquímicos e virológicos investigados. Esses resultados sugerem, portanto, que a penetração viral em macrófagos foi facilitada pelo tratamento com IVIG específica. Imunoglobulinas intravenosas também são utilizadas na insuficiência cardíaca crônica. A doença de Chagas afeta cerca de 16 à 18 milhões de pessoas, nos quais cerca de 30% dos pacientes evoluem para uma cardiomiopatia chagásica. Considerando que a cardiomiopatia chagásica é do tipo dilatada, a hipótese de que a terapia com IGIV poderia diminuir a cardiomiopatia chagásica também foi estudada. O tratamento com IGIV polivalente (Dose de 1mg/Kg/dia durante 5 dias) em camundongos com cardiomiopatia chagásica não demonstrou melhora da função cardiovascular. Deste modo, concluímos que, nas condições utilizadas, a terapia com imunoglobulina humana não possui eficácia na cardiomiopatia chagásica em camundongos.

Palavras-chave: Hemoderivados. Imunoglobulinas. Dengue. Doença de Chagas.

ABSTRACT

Intravenous immunoglobulins (IVIG) have a large number of clinical applications. Immunoglobulin-based treatment is the only useful way for inhibiting some *Flavivirus* infections capable of providing a state of passive immunity. Dengue represents an important health problem in Brazil, because of there is no either vaccines or treatments to control this infection. Thus, we can assume that the specific IVIG therapy has emerged as a promising strategy. Although attractive, the safety of this strategy should be considered because the possibility of occurrence of the phenomenon of facilitating by antibodies of viral penetration into macrophages (antibody dependent enhancement - ADE). The present work describes the preparation of IVIG polyvalent from plasma of volunteer donors and, for the first time, the preparation of immunoglobulins specific for dengue virus, besides of the production of its specific fragments $F(ab')_2$. The production was performed by using the classical Cohn-Oncley method. The preparations were biochemically and biophysically characterized and the results were consistent with the protocols defined by the European Pharmacopoeia and described by the National Regulatory Agency. Treatment with intact anti-Dengue immunoglobulins in DEN-3 infected mice led to increase of virus titer load and enhancement of symptoms, therefore suggesting that enhancement of virus infection was mediated by immunoglobulin-based treatment. The effects of an immunoglobulin only containing the $F(ab')_2$ in DEN-3 infected mice is under experimental investigation. Intravenous immunoglobulins are useful therapy for chronic heart failure. Chagas disease affects 16 to 18 million people, to which 30% of patients advance to a chronic stage characterized by dilated cardiomyopathy. Since Chagasic cardiomyopathy has heart dilatation, we sought to evaluate whether immunoglobulin-based treatment restores heart function in infected mice exhibiting hallmarks of dilated cardiomyopathy. However, treatment with immunoglobulins did not lead to improvement of heart function in chronically infected mice. Thereby, we concluded that a therapy based on human immunoglobulins does not ameliorate cardiomyopathy in this experimental model of Chagas disease.

Keywords: Blood derivatives. Intravenous immunoglobulins. Dengue virus. Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica do anticorpo	23
Figura 2. Cartaz oficial do programa de doação de sangue das forças armadas americanas, 1951	26
Figura 3. Transporte marítimo do plasma	26
Figura 4. Carregamento de caminhão com plasma líquido da marinha americana	26
Figura 5. Esquema de fracionamento de plasma Através do método de Cohn	27
Figura 6. Aspectos clínicos da dengue clássica e hemorrágica	34
Figura 7. Modelo para o fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE), causado pelo vírus dengue	35
Figura 8. Tratamento proteolítico de Imunoglobulina	38
Figura 9. Ciclo evolutivo do <i>Trypanossoma cruzi</i>	39
Figura 10. Isolamento de IgG do plasma humano	50
Figura 11. Processo geral de produção de imunoglobulina intravenosa Humana	51
Figura 12. Eletroforetogramas de soluções de imunoglobulina polivalente e anti-dengue	58
Figura 13. Estratégia experimental do estudo	64
Figura 14. Efeito do tratamento com IVIG anti-dengue sobre a letalidade após a infecção primária com o DENV-3	70
Figura 15. Efeito do tratamento com IVIG anti-dengue (DV) após a infecção primária com DENV-3 (100 PFU/100µL)	72
Figura 16. Análise histológica do tecido hepático após tratamento com a IVIG anti-dengue (DV) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100µL)	73

Figura 17. Concentração das citocinas após tratamento com IVIG anti-dengue (DV) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100µL)	74
Figura 18. Carga viral no baço e sangue após tratamento com IVIG anti-dengue (DV) ou KIOVIG (IVIG CT) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100µL)	75
Figura 19. Desenho do estudo experimental	80
Figura 20. Avaliação da infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i> Através da análise da parasitemia	86
Figura 21. Avaliação da frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos	87
Figura 22. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos	87
Figura 23. Traçados eletrocardiográficos	88
Figura 24. Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos	88
Figura 25. Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção)	89
Figura 26. Avaliação dos dados respirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos	90
Figura 27. Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos	91
Figura 28. Sobrevida dos animais não-infectados e chagásicos crônicos do grupo albumina e do grupo imunoglobulina	92
Figura 29. Avaliação da frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	92
Figura 30. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	93
Figura 31. Traçados eletrocardiográficos de animais chagásicos crônicos	94

Figura 32. Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas diferentes fases do tratamento	95
Figura 33. Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	96
Figura 34. Avaliação de VO_2 e VCO_2 em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	97
Figura 35. Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	98
Figura 36. Avaliação da fração de ejeção mensurada pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	99
Figura 37. Avaliação dos diâmetros sistólico e diastólico final do VE mensurados pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	99
Figura 38. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina	101
Figura 39. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina	102
Figura 40. Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	103
Figura 41. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina e imunoglobulina	105
Figura 42. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina	106
Figura 43. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina	107

Figura 44. Histologia de secções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina	108
Figura 45. Imunofluorescência de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina	109
Figura 46. Imunofluorescência de secções de corações de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina	110
Figura 47. Concentrações séricas de IL-1 α (A), IL-1 β (B) IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-9 (G) e IL-10 (H)	112
Figura 48. Concentrações séricas de IL-12p40 (A), IL-12p70 (B) IL-13 (C), IL-17 (D), IFN γ (E), TNF α (F), GM-CSF (G) e G-CSF	113
Figura 49. Concentrações séricas de KC (A), MCP1 (B) MIP1 α (C), MIP1 β (D), Eotaxina (E) e RANTES (F)	114
Figura 50. Concentrações de IFN γ (A), TNF α (B) e IL-10 (C) no coração	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das preparações de imunoglobulina	59
Tabela 2. Títulos de anticorpos anti-dengue presentes na IGIV específica	60

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADE	Facilitação por anticorpos da penetração viral em macrófagos
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
BAVT	Bloqueio Átrio Ventricular Total
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DCA	Doença de Chagas Aguda
DENV	Vírus Dengue
ELISA	Imunoensaio enzimático
EPM	Erro Padrão Médio
FC	Frequência Cardíaca
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
HBsAg	Antígeno De Superfície Do Vírus Da Hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HTAB	Brometo de hexadecil trimetilamônio
HTLV	Vírus T Linfotrópico Humano
IC	Insuficiência Cardíaca
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule 1
ICC	Insuficiência Cardíaca Crônica
IFN-α	Interferon Alfa
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IGIM	Imunoglobulina G Humana intramuscular
IGIV	Imunoglobulina G Humana Intravenosa

IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IV	Via Intravenosa
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
MEM	Minimal Essential Medium
MPO	Mieloperoxidase
MVEV	Vírus da encefalite de Murray Valley
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDIC	Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Crônica
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test
PTI	Púrpura Trombocitopênica Idiopática
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
S/D	Solvente/Detergente
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma Cruzi</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFP	Unidades Formadoras de Placa
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular-Vascular-1
VTBE	Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato
WHO	Organização Mundial da Saúde
WNV	Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. ANTICORPOS	23
2.2. HEMODERIVADOS	24
2.4. FRACIONAMENTO DO PLASMA	25
2.5. IMUNOGLOBULINA INTRAMUSCULAR	27
2.6. IMUNOGLOBULINA G ENDOVENOSA	28
2.7. SEGURANÇA VIRAL DAS PREPARAÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS	30
2.8. DENGUE	32
2.8.1. ASPECTOS GERAIS E CLÍNICOS	32
2.8.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	35
2.8.3. IMUNOGLOBULINA PARA O TRATAMENTO DA DENGUE	36
2.9. FRAGMENTAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA	37
2.10. DOENÇA DE CHAGAS	39
2.10.1. ASPECTOS GERAIS	39
2.10.2. FASES CLÍNICAS	40
2.10.3. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	42
2.10.4. TRATAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	44
2.10.5. IMUNOGLOBULINA PARA O TRATAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. OBJETIVO GERAL	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE IMUNOGLOBULINA	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA HUMANA POLIVALENTE	49
4.2. PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-DENGUE	52

4.3. CONTROLE DOS PRODUTOS ACABADOS	53
4.4. IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS ANTI-DENGUE	53
4.4.1. MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR	54
4.4.2. PREPARAÇÃO DOS ESTOQUES DOS VÍRUS: DENV-1, DENV-2 E DENV-3	54
4.4.3. NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS (PRNT)	55
4.4.4. CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE E DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS	55
4.4.5. VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS	56
4.4. PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-DENGUE FRAGMENTADA DA PORÇÃO Fc	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS ANTI-DENGUE	60
5.2. IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-DENGUE FRAGMENTADA DA PORÇÃO Fc	61

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO USO DE PREPARAÇÕES ESPECÍFICAS DE IMUNOGLOBULINA NO MODELO DE INFECÇÃO PRIMÁRIA PELO DENV-3

6. MATERIAIS E MÉTODOS	63
6.1. VÍRUS	63
6.2. ANIMAIS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	63
6.3. TITULAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE	65
6.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	65
6.5. DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	66
6.6. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PLAQUETAS CIRCULANTES	67
6.7. ANÁLISE DO ÍNDICE DE HEMATÓCRITO	68
6.8. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS TRANSAMINASES HEPÁTICAS NO SORO	68
6.9. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	68
6.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
7. RESULTADOS	70
8. DISCUSSÃO	76

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO USO DE IMUNOGLOBULINA POLIVALENTE PARA O TRATAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA EM MODELO ANIMAL INFECTADO CRONICAMENTE PELO *T. CRUZI*

	78
9. MATERIAIS E MÉTODOS	79
9.1. DESENHO DO ESTUDO EXPERIMENTAL	79

9.3. INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS POR <i>T. CRUZI</i>	80
9.4. ESQUEMA DE TRATAMENTO	81
9.5. AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA	81
9.6. AVALIAÇÃO FUNCIONAL POR ERGOMETRIA	82
9.7. AVALIAÇÃO FUNCIONAL POR ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO	82
9.8. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	83
9.9. AVALIAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	84
9.10. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS	84
9.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
10. RESULTADOS	86
10.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	86
10.1.1. AVALIAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS	86
10.1.2. AVALIAÇÕES ERGOMÉTRICAS E RESPIROMÉTRICAS	89
10.1.3. AVALIAÇÕES ECOCARDIOGRÁFICAS	91
10.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM IMUNOGLOBULINA	91
10.2.1. AVALIAÇÕES DE FUNÇÃO CARDÍACA	92
10.2.3. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS	100
10.2.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	111
11. DISCUSSÃO	116
12. CONCLUSÕES	121
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
APÊNDICES	148
ARTIGO 1	148
PRODUCTION OF INTRAVENOUS HUMAN DENGUE IMMUNOGLOBULIN FROM BRAZILIAN-BLOOD DONORS	148
ARTIGO 2	196
SUBVERSION OF EARLY INNATE ANTIVIRAL RESPONSES DURING ANTIBODY-DEPENDENT ENHANCEMENT OF DENGUE VIRUS INFECTION INDUCES SEVERE DISEASE IN MICE	196

1. INTRODUÇÃO

Hemoderivados são medicamentos biológicos obtidos a partir do fracionamento industrial do plasma humano, submetidos aos processos de industrialização e normatização que lhe conferem qualidade, estabilidade, atividade e especificidade (ANVISA, 2003). Dentre esses produtos se destacam as Imunoglobulinas (Ig), que atualmente representam a principal fração protéica por trás da necessidade de fracionamento de plasma (BURNOUF, 2007).

O fracionamento é definido como a separação das diferentes proteínas do plasma, através de condições físico-químicas adequadas, e teve origem na segunda guerra mundial, quando Cohn e colaboradores (1946) desenvolveram uma técnica de precipitação com etanol a frio. Esta técnica ainda é a mais amplamente utilizada para produção de Ig humana.

O uso de imunoglobulinas tem se mostrado útil em abortar ou modificar certo número de infecções por *Flavivirus*, incluindo infecções com os vírus da encefalite japonesa (KURODA, YASUI, 1988; ROEHRIG, et al., 2001), encefalite transmitida por carrapato (PHILLOTTS, STEPHENSON, PORTERFIELD, 1984), dentre outras. Ao que parece, por conseguinte, o único tratamento atualmente disponível para infecção viral, que poderia proporcionar um estado de imunidade imediata, é a transferência passiva de anticorpos específicos (CASADEVALL, 2002; CASADEVALL, SCHARFF, 1994). Neste sentido, imunoglobulina tem sido amplamente utilizada para o tratamento de uma arbovirose causada pelo Vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus - WNV) (WADEI, et al., 2004; KUMAR, 2004).

Os resultados da literatura (BEN-NATHAN et al., 2003) apoiam o uso de Imunoglobulina G intravenosa (IGIV) como tratamento de doenças infecciosas (KRAUSEL et al., 2002, HEMMING, 2001; NOUR et al., 1993), no entanto, quando se considera os efeitos benéficos de IGIV em pacientes com infecções virais, a fonte de plasma deve ser considerada, pois certas doenças são endêmicas para regiões específicas do mundo. Os resultados de Ben-Nathan e colaboradores (2003) indicam que na IGIV de Israel, os doadores de sangue conferiam proteção contra a infecção pelo WNV, o que não foi observado em uma preparação de IGIV dos EUA.

Dengue, outro *Flavivirus*, também representa um grave problema de saúde pública. Esta infecção viral sistêmica é transmitida entre humanos, geralmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. Cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) é capaz de causar um amplo espectro de manifestações clínicas. A maioria dos casos são assintomáticos (53-87%), entretanto os sintomas podem variar de uma debilitante, mas autolimitada, febre da dengue, até infecções mais graves, chamada de febre hemorrágica da dengue (FHD), com sangramento, choque e outras potenciais complicações letais (DEROUCHE, BOUTAYEB, TWIZELL, 2003).

O DENV acomete significativamente mais pessoas, que qualquer outro arbovírus. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue em todo o mundo. Esta estimativa inclui quinhentos mil casos de FHD e pelo menos 22 mil mortes, além de gastos anuais de milhões de dólares (WHO, 2010).

Atualmente, não há agentes antivirais eficazes para tratar a infecção da dengue, portanto uma terapia efetiva pra combater a infecção é uma necessidade urgente. O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, ao qual pertencem os vírus já citados, que constituem uma ameaça para a saúde pública, incluindo o vírus da febre amarela, WNV, o vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite transmitida por carrapato. Se compararmos Dengue e WNV, ambas as infecções são imunologicamente e patogenicamente similares, além disso, têm um curso de infecção semelhante. O Brasil, por se tratar de uma região endêmica, uma preparação de imunoglobulina produzida a partir do plasma de doadores brasileiros, apresenta títulos elevados de anticorpos específicos anti-dengue, pois muitos destes doadores já foram expostos ao vírus. Neste sentido, a utilização de IGIV brasileira, poderia reduzir as complicações associadas à infecção do vírus, assim como seu grau de mortalidade.

Este trabalho sugere ainda outra potencial aplicação de concentrados de imunoglobulina G humana, especificamente na terapia da cardiomiopatia chagásica.

Tripanossomíase americana (doença de Chagas) é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Existe a fase aguda (frequentemente assintomática) e crônica da doença. No caso de doença aguda não tratada, a infecção pode persistir por muitos anos e até mesmo décadas (PUNUKOLLU et. al., 2007).

Há de fato, relatos de tratamentos bem sucedidos após o uso de altas doses de IGIV, em pacientes com miocardite aguda e cardiomiopatia dilatada crônica (MCNAMARA et al., 2001; GULLESTAD et al., 2001; TEDESCHI et al., 2002), nos quais o tratamento convencional falhou. IGIV também pode ser benéfica para a miocardite associada a doenças autoimunes, como a doença de Kawasaki (LEUNG, 1993). Vários mecanismos de ação podem ser importantes para os efeitos clínicos da IGIV em doenças inflamatórias como, por exemplo, neutralização de antígenos microbianos e autoanticorpos, bloqueio de receptores Fc e de inativação do complemento (DWYER, 1992; WOLF, EIBL, 1996; BALOW, 1997). Além disso, alguns pesquisadores têm demonstrado que a IGIV também pode influenciar o nível de várias citocinas e moduladores de citocinas, resultando na regulação negativa de respostas inflamatórias (ANDERSON, BJORK, 1994; AUKRUST et al., 1994).

No Brasil, a doença de Chagas é, depois da cardiomiopatia dilatada idiopática e da cardiomiopatia isquêmica, a terceira mais frequente indicação para o transplante cardíaco (BOCCI, FIORELLI, 2001; PARRA et al., 2008). Portanto, o desenvolvimento de uma terapia que leve à diminuição das lesões cardíacas e ao bloqueio da evolução da cardiopatia é de grande interesse. Desde que a cardiomiopatia chagásica também é do tipo dilatada, a hipótese de testar a terapia com IGIV desponta como uma estratégia promissora para o tratamento da enfermidade.

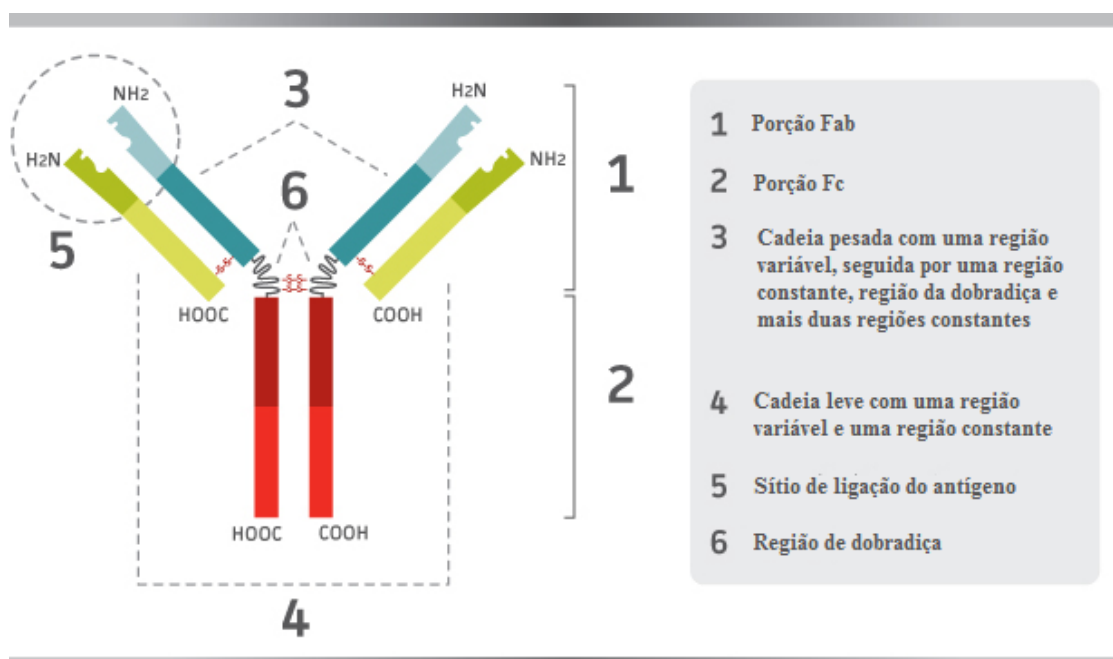
No **capítulo 1** deste trabalho, demonstrou-se a produção e caracterização de soluções de imunoglobulina humana. No **capítulo 2** foi avaliada a eficácia e segurança do uso de preparações específicas de imunoglobulina para o tratamento da infecção por dengue. Já no **capítulo 3**, foi explorada a eficácia terapêutica do uso de imunoglobulina polivalente, para o tratamento de animais infectados cronicamente pelo *Trypanosoma cruzi*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anticorpos

Os anticorpos, também chamados de imunoglobulinas constituem uma grande família de glicoproteínas que apresentam em comum, características estruturais e propriedades funcionais. Do ponto de vista funcional, eles podem ser caracterizados por sua capacidade de se ligar às células ou às proteínas especializadas do sistema imunológico. A unidade funcional do anticorpo, corresponde a estrutura da imunoglobulina G (IgG), formada por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves também idênticas, ligadas por pontes dissulfeto, intra e inter cadeias, 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 Fcγ 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 1** (PUMPHREY, 1986; BURNOUF, 2009) .

Figura 1. Estrutura básica da molécula de anticorpo



Fonte: Adaptado de (<http://www.bioatla.com/antibody-structure>)

2.2. Hemoderivados

Hemoderivados são medicamentos biológicos obtidos a partir do fracionamento industrial do plasma humano, submetidos aos processos de industrialização e normatização que lhe conferem qualidade, estabilidade, atividade e especificidade (ANVISA, 2003). OS quatro hemoderivados de base, que fazem parte da lista de medicamentos essenciais da OMS são a albumina, as imunoglobulinas poli-específicas, também chamadas de imunoglobulinas normais, e os concentrados de Fator VIII e de Fator IX da coagulação. Estes dois últimos produtos são utilizados no tratamento das pessoas portadoras de hemofilia A e B, respectivamente, já a albumina é utilizada no tratamento de grandes queimados, pessoas com cirrose, pacientes de terapia intensiva, entre outros.

2.3. Imunoglobulina G

As imunoglobulinas superaram os fatores da coagulação e a albumina como o principal produto da indústria de fracionamento de plasma (BURNOUF, 2007). Existem dois tipos de imunoglobulinas para uso clínico: as imunoglobulinas poli-específicas (polivalentes ou normais) e as imunoglobulinas específicas. As imunoglobulinas poli-específicas são produzidas a partir do pool de plasma de múltiplos doadores (1.000 a 40.000) e contêm milhões de diferentes moléculas de imunoglobulina G, refletindo a exposição cumulativa da população doadora ao ambiente. São referidas como polivalentes (WHO, 2005) para indicar que o plasma usado para esta preparação é obtido de doadores não triados para alguma IgG específica. Geralmente são utilizadas por via intravenosa, embora haja relatos de utilização por via subcutânea, intratecal, oral e até intra-auricular. Estão disponíveis para uso em apresentações de 500 mg, 1g, 2,5g, 5g, 6g e 10g, e têm como componente principal a IgG, apesar de também possuírem IgM e IgA, em quantidades que variam de acordo com o fabricante (BRASIL, 2004).

As imunoglobulinas específicas são aquelas que possuem altos títulos de anticorpos específicos – por exemplo, anti-hepatite B, anti-citomegalovírus, anti-raiva e antitétano. São produzidas a partir de plasma humano hiperimune, ou seja, com altos títulos de anticorpos clinicamente importantes. Podem ser usadas por via intravenosa ou intramuscular, dependendo do tipo de produto e do fabricante (BRASIL, 2004).

As imunoglobulinas têm sido usadas em uma imensa variedade de doenças, sendo hoje o produto que direciona a indústria de hemoderivados. 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 cromossomo 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). Há relatos de utilização das imunoglobulinas poli-específicas em mais de 90 diferentes situações médicas (BRASIL, 2004).

A grande variedade de utilizações, combinada com a necessidade de uma administração por maiores intervalos de tempo (3-4 semanas), em alguns pacientes, tem levado a um aumento significativo no consumo mundial de IGIV (STIEHM, KELLER, VYAS, 2008). Seu consumo em países da América do Norte e da Europa Ocidental tem apresentado um crescimento exponencial nos últimos anos. Nos Estados Unidos, de 1999 a 2009, o uso de IGIV cresceu a uma média de 9% ao ano, aumentando de 16.7 para 39.3 toneladas anualmente (SIBER, 1993). Na Austrália, no Canadá e na Alemanha, em 1996, este consumo era de 3,4 Kg/100.000 habitantes por ano – e desde então, vem aumentando cerca de 15% ao ano (HANNA et al., 2003). No Brasil, estima-se que o consumo anual de imunoglobulinas se situe em torno de 500 Kg a 1 tonelada, o que equivale a 0,3 a 0,6 Kg/100.000 habitantes por ano, sendo utilizada principalmente para terapia de reposição, doença de Kawasaki, púrpura trombocitopênica idiopática, infecções recorrentes em crianças com AIDS, dentre outras (BRASIL, 2004).

2.4. Fracionamento do Plasma

Na primeira metade do século passado, Cohn estabeleceu o fracionamento por etanol a frio como um método eficaz para isolar IgG em escala industrial (COHN et al., 1946). O trabalho de Cohn teve o objetivo de atender a uma demanda do exército americano que se preparava para entrar na segunda guerra mundial e buscava uma alternativa ao plasma humano. O plasma era a terapêutica de escolha para tratar o choque hipovolêmico, entretanto requeria uma logística muito grande para produção, estocagem e distribuição (DeGOWIN, HARDIN, 1941) (**Figuras 2, 3 e 4**).

Figura 2. Cartaz oficial do programa de doação de sangue das forças armadas americanas, 1951.



Figura 3. Transporte marítimo do plasma.

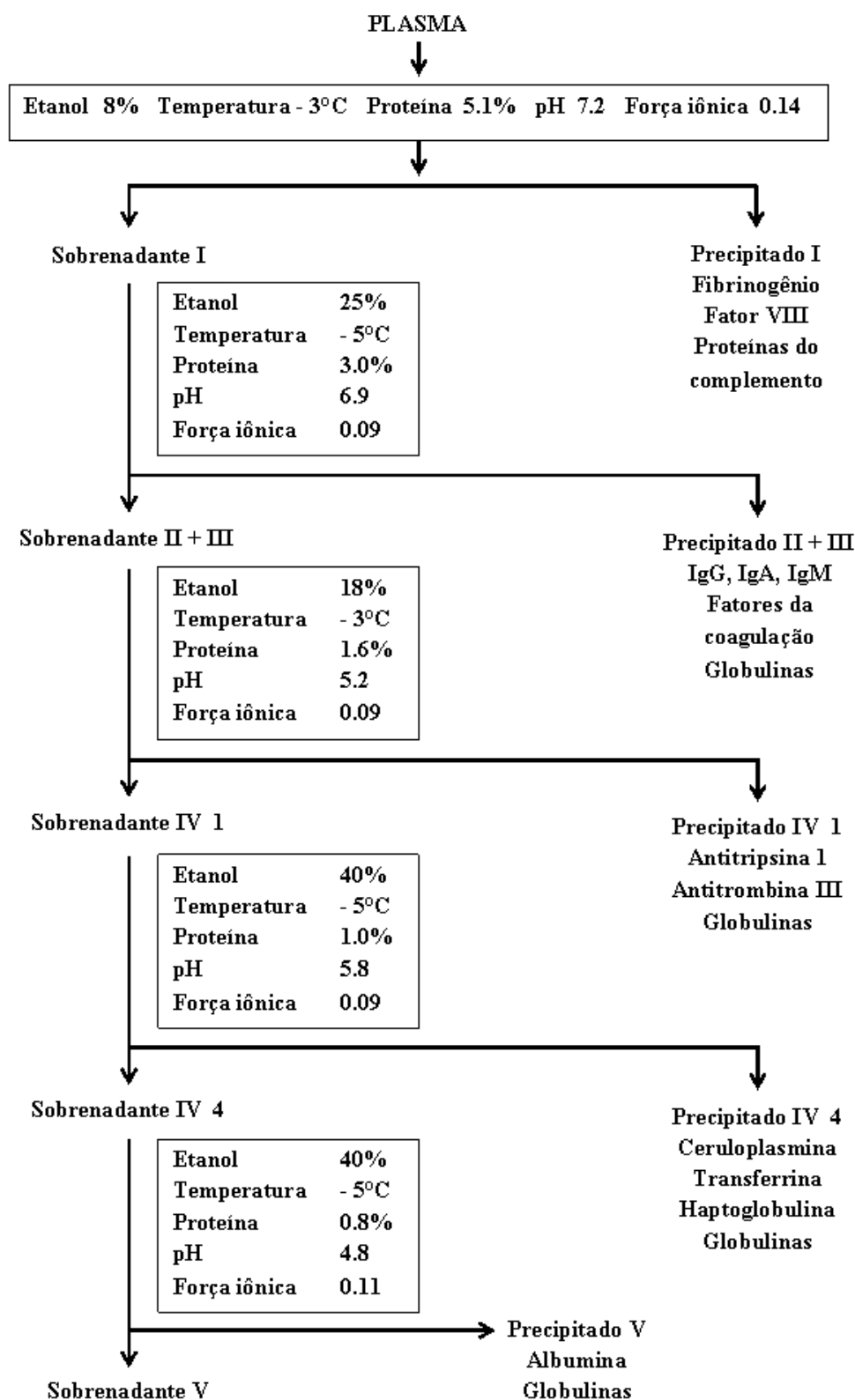


Figura 4. Carregamento de caminhão com plasma líquido da marinha americana.



Fonte: (<http://history.amedd.army.mil/booksdocs/wwii/blood/default.htm>)

A metodologia desenvolvida por Cohn (**Figura 5**) baseia-se na mudança de solubilidade das frações proteicas (precipitação de proteínas), por meio de ajuste do pH, temperatura, força iônica e concentração de álcool. O processo é realizado em baixas temperaturas, o que reduz o risco de contaminação bacteriana e evita a desnaturação das proteínas. O plasma congelado é agitado à temperatura na qual algumas proteínas (fibrinogênio, fator VIII) são insolúveis. Este material (crioprecipitado) é um intermediário na produção do fator VIII da coagulação. Após a remoção do crioprecipitado, o plasma é fracionado por sucessivas precipitações com etanol e etapas de remoção dos precipitados formados. O processo resulta em um concentrado de IgG conhecido como fator II ou fator II + III. A albumina (fator V) é produzida a partir de um intermediário, conhecido como sobrenadante da fração II + III. Este método, posteriormente refinado por Oncley (1949), ainda é utilizado, com poucas modificações, pela maioria dos fabricantes.

Figura 5. Esquema de fracionamento de plasma através do método de Cohn.

Fonte: (<http://www.genengnews.com/gen-articles/in-line-process-analytics-for-fractionation/3181/>)

2.5. Imunoglobulina Intramuscular

O método de Cohn-Oncley não inclui etapas de purificação adicionais, resultando no isolamento de uma fração de IgG para aplicação intramuscular ou subcutânea, composta de 70-80% de monômeros e quantidades substanciais de IgA e IgM. Quando infundida por via intramuscular, e produzidas a partir do plasma de pessoas sensibilizadas, a preparação revelava-se útil para prevenção e tratamento de poliomielites, sarampo, coqueluche e hepatite A. Esses produtos logo deixaram o mercado devido ao desenvolvimento de vacinas eficazes (STIEHM, 1988). Outros concentrados de imunoglobulinas hiperimunes tais como: anti-tétano, anti-D, anti-rábica, anti-hepatite B e anti-varicella zoster são comercializados até hoje. Somente quando Burton, (1952) publicou seu clássico artigo sobre a agamaglobulinemia, as indústrias passaram a oferecer IGIM poliespecífica. Essa terapia estava fundamentada na reposição de anticorpos aos portadores dessa doença de origem congênita.

Os concentrados de IgG poliespecíficas se mostraram eficazes tanto para o tratamento da agamaglobulinemia como para hipogamaglobulinemia (GITLIN, JANEWAY, 1956). Kim (1986) descreveu que a prevenção de infecções bacterianas em portadores de hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia até os anos sessenta, era realizada através da injeção de repetidas doses de IGIM, diversas vezes por semana. Apesar de eficaz, o tratamento era excessivamente doloroso para ser contínuo. Smith (1972) demonstrou que a aplicação IGIM causava proteólise local, apresentava baixa absorção e consequentemente baixa biodisponibilidade.

2.6. Imunoglobulina G Endovenosa

Diversas doenças, tal como a síndrome de Kawasaki, púrpura trombocitopênica idiopática e imunodeficiências primárias, requeriam elevadas doses de imunoglobulinas, possível apenas por via intravenosa. Knezevic-Maramica (2003) descreveu as tentativas realizadas para administração de solução de IGIM por via endovenosa, resultando em uma alta incidência de reações anafiláticas. Estes efeitos colaterais foram atribuídos à espontânea ativação, não específica, do sistema complemento, resultado da presença de agregados de imunoglobulina (BARANDUN, 1962). Agregados de IgG mimetizam o efeito estérico de complexos

antígeno-anticorpo, induzindo assim a ativação do complemento, na ausência de antígenos, quando entram na circulação sanguínea por via intravenosa.

O desejo de eliminar a atividade anticomplementar teve um significativo impacto no desenvolvimento de imunoglobulinas intravenosas (ARONSON, FINLAYSON, 1980; HOOPER, ALPERN, MANKARIOUS, 1988). Como fruto do trabalho de um grupo suíço, em 1984 a Cruz Vermelha Suíça obteve da U.S. Food and Drug Administration (FDA) o registro do primeiro concentrado de imunoglobulina, indicado para administração endovenosa nos Estados Unidos. O produto ficou conhecido como IGIV. O novo hemoderivado revolucionou a utilização dos concentrados de imunoglobulinas, que tiveram suas indicações terapêuticas ampliadas devido à inexistência de fatores limitantes, como a dose. Uma vantagem adicional se obtém pelo imediatismo da resposta após a infusão, especialmente quando se busca a neutralização da bacteremia.

Segundo Teschner (2007), a primeira geração de IGIV foi elaborada utilizando-se a pepsina para clivar enzimaticamente, os agregados que se formavam em uma solução obtida a partir da fração II de Cohn. O tratamento enzimático, para eliminação dos agregados foi embasado em experiências anteriores, quando se tratava o soro terapêutico com a pepsina com o objetivo de diminuir as reações pós-transfusionais daquele produto (EIBL, 2008).

Entretanto, submeter imunoglobulinas a modificações enzimáticas ou químicas, para suprimir a ativação espontânea do complemento, altera funções essenciais dos anticorpos. Como exemplo podemos citar a ativação do complemento por complexos antígeno-anticorpo, uma reação fisiológica importante para a destruição de bactérias por leucócitos (POLLACK, 1983). Além disso, anticorpos modificados eram rapidamente removidos da circulação pelo sistema retículo endotelial e tinham reduzida atividade de opsonização das bactérias (JANEWAY, et al., 1968).

A segunda geração de IGIV foi caracterizada por uma estrutura molecular não clivada, com baixa possibilidade de ativar o sistema anticomplementar sem a presença de antígeno (TESCHNER et al., 2007). Embora tivessem uma estabilidade maior em relação aos concentrados tratados enzimaticamente, a forma farmacêutica ainda era um líófilo. Esse tipo de produto era submetido a uma ou mais etapas de cromatografia. As atividades biológicas dos anticorpos, tais como opsonização bacteriana e neutralização viral, são melhores que em produtos enzimaticamente e

quimicamente tratados. Hoppe e colaboradores (1967) foram os primeiros a publicar o uso da cromatografia para purificar imunoglobulina em escala industrial. Falksveden usou cromatografia de troca iônica com o mesmo objetivo (FALKSVEDEN, 1970; FALKSVEDEN, LUNDBLAD, 1980). Tanaka (2000) usou as frações I + II + III de Cohn como material de partida e purificou a IgG utilizando Q-Sepharose e CM Sepharose (GE Healthcare, Uppsala Sweden), como trocador de íons, para produzir um concentrado altamente purificado. Como resultado, diversas preparações de IGIV fabricadas com etapas de cromatografias catiônica e/ou aniônica, precedidas por processos de precipitação e filtração, atualmente estão disponíveis no mercado.

Historicamente, IGIVs eram liofilizadas a fim de obter uma preparação estável por 2 a 3 anos. Em 1986, McCue e colaboradores relataram que o ajuste do pH para 4.25, produzia uma solução de IgG límpida e estável. Estudos clínicos demonstraram que pacientes toleravam soluções de IgG formuladas em um pH significativamente menor que a faixa habitual de 6.4 a 7.2 (SCHIFF, 1994). Este produto representou um importante avanço na formulação de IGIV. A vantagem de uma formulação líquida é a conveniência, uma vez que não necessita ser dissolvida antes da administração.

2.7. Segurança viral das preparações de Imunoglobulinas

Levando em consideração que milhares de doadores são necessários para a produção de um único lote de IGIV, a prevenção da transmissão viral por hemoderivados é um aspecto fundamental no desenvolvimento destes produtos. Entretanto, na produção dos primeiros concentrados de IGIV não houve grande preocupação com o risco de transmissão de agentes infecciosos, tais como os vírus da AIDS, da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), associados com graves consequências. O fracionamento de Cohn é associado com a remoção significativa destes agentes e pode ser especialmente eficaz na presença de anticorpos, capazes de formar complexos com o vírus e aumentar a sua remoção. Estudos revelaram que vírus envelopados, tais como HIV e o HBV, são inativados pelo etanol a frio, sob condições usadas na produção de IGIV (PISZKIEWICZ et al., 1985; WELLS et al., 1986; MITRA et al., 1986; HÉNIN et al., 1988; HAMAMOTO et al., 1987).

A percepção de que imunoglobulinas produzidas por etanol a frio não possuía risco de transmissão de infecções virais mudou em 1983 quando Lane relatou que uma IGIV, produzida por etanol a frio, transmitiu hepatite não-A, não-B (LANE, 1983). Durante este mesmo período, o HIV foi isolado e se mostrou transmissível por sangue e derivados (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; CDC, 1985). O surgimento do HIV e relatos de hepatite não-A, não-B e hepatite C, transmitida por algumas preparações de IGIV (OCHS et al., 1985; BJORKANDER et al., 1988) levou fabricantes e agências reguladoras a examinar os atuais procedimentos de fabricação da IGIV, em relação a sua capacidade de eliminar vírus (PRINCE et al., 1985; WELLS et al., 1986; MITRA et al., 1986; YEI, YU, TANKERSLEY, 1992; KEMPF et al., 1991, HAMAMOTO et al., 1987). O desenvolvimento de procedimentos de inativação de vírus durante a produção de IGIV foi então iniciado. Além disso, a descoberta de novos vírus, como o da síndrome respiratória aguda severa (*Severe Acute Respiratory Syndrome – SARS*) (REILLEY et al., 2003) e o aumento nos padrões de qualidade para hemoderivados, levou ao desenvolvimento de processos de produção com diversas etapas de inativação viral.

Apesar da triagem prévia dos doadores, com métodos de detecção viral, diversos métodos de redução de vírus foram desenvolvidos para melhorar a segurança dos hemoderivados. A etapa de inativação ou redução viral é, geralmente, integrada ao processo de produção e compreende o uso de agentes químicos, como solvente/detergente (S/D) (HOROWITZ et al., 1985; EDWARDS et al., 1987; HOROWITZ et al., 1998), condições físicas extremas, como incubação em pH baixo (KIM et al., 2001) ou alta temperatura (UEMURA et al., 1989), radiação ultravioleta (CAILLET-FAUQUET et al., 2004) e nanofiltração (BURNOUNF et al., 1994; YOKOYAMA et al., 2004; BURNOUNF, RADOSEVICH, 2003).

Em 1988, Horowitz reportou que um tratamento com solvente/detergente, originalmente desenvolvido para inativar vírus em concentrados de Fator VIII, era efetivo na inativação viral de soluções de IGIV. Atualmente o tratamento com S/D é adotado por diversos fabricantes de imunoglobulinas. Outra forma efetiva de inativar vírus envelopados é o tratamento em condições físicas mais extremas. Inicialmente introduzido para reduzir a atividade anticomplementar, o tratamento com baixo pH, a 37° C por 20 horas ou mais, foi identificado como uma forma efetiva de inativação viral, incluindo o HIV (OMAR et al., 1996; BIESERT, 1996; REID et al., 1988). A eficácia virucida do tratamento com baixo pH, promoveu o desenvolvimento de

várias versões do processo para uso na formulação do produto final. A incubação de IGIV em pH 4.25 por 21 dias a 21° C inativa vírus envelopados, como o HCV (LOUIE et al., 1994). Diversas outras condições, do tratamento com baixo pH, demonstraram inativar vírus envelopados e alguns não-envelopados (POELSLER et al., 2008).

2.8. Dengue

2.8.1. Aspectos gerais e clínicos

A dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Constitui-se de uma doença febril, exantemática e aguda de grande relevância em termos de morbidade e mortalidade em todo o mundo (GUZMÁN et. al., 2010). O conceito de arbovirose deriva da expressão “arthropod-borne viruses”, que significa vírus transmitido por artrópodes. A capacidade do vírus se replicar, tanto em artrópodes quanto em células de vertebrados, tem permitido sua perpetuação na natureza (FORATTINI, 1965; BROOKS et. al., 2000).

Em 1945, Albert Sabin isolou o vírus responsável pela doença, identificando os dois primeiros sorotipos, DENV tipo 1 e 2. Hammon, no ano de 1960, isolou os sorotipos DENV tipo 3 e 4, em pacientes com febre hemorrágica da dengue (HALSTEAD, 1992).

O vírus dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, do latim “*flavus*” = amarelo, sendo tradicionalmente classificado em 4 sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, distinguíveis por suas características antigênicas, e não apresentando proteção cruzada entre si (MIAGOSTOVICH et. al., 2000; GUBLER, 2002).

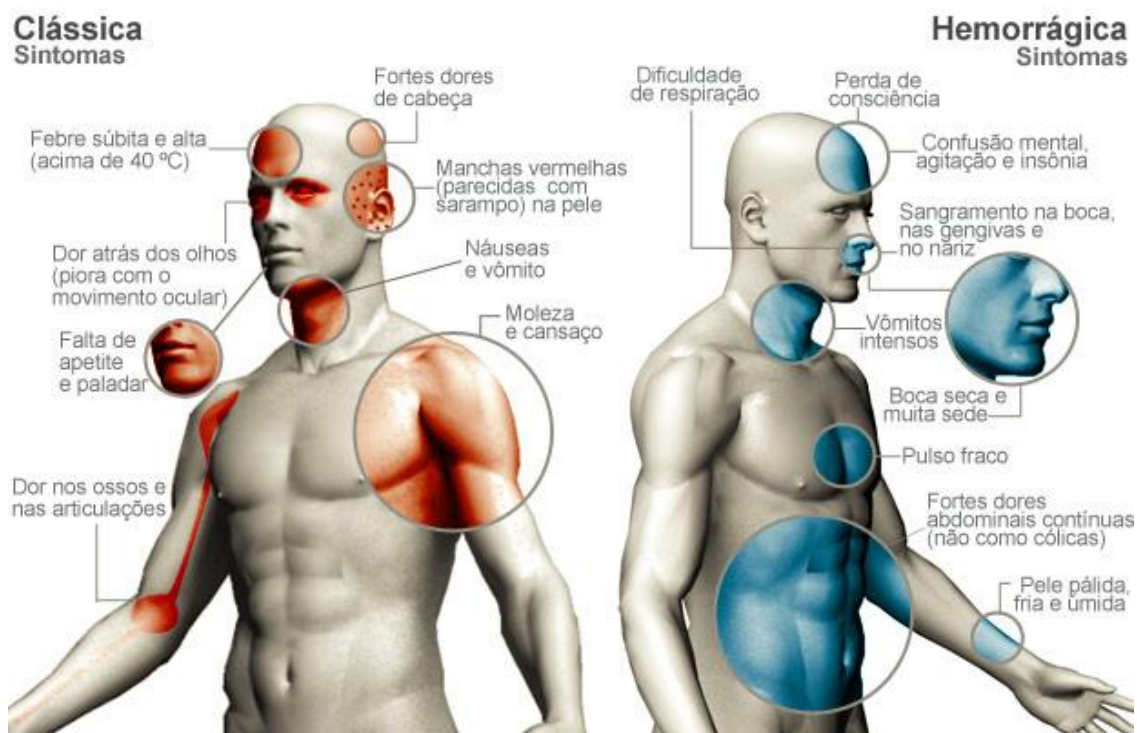
O vírus realiza sua primeira replicação nas células musculares estriadas e lisas, fibroblastos e linfonodos locais, após a sua inoculação através da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (GUZMAN; KOURI, 2003). Após sua multiplicação, ocorre o início da fase de viremia, quando o vírus se dissemina por todo o organismo, circulando livremente no plasma sanguíneo ou no interior dos monócitos (HALSTEAD et. al., 2005). A viremia está diretamente ligada aos sintomas gerais da dengue, que estão relacionados aos elevados níveis séricos de citocinas, liberadas pela interação dos macrófagos com os linfócitos T auxiliares CD4+ ativados (HOMBACH et. al., 2005). Nesta fase também são observados altos níveis séricos de interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN-γ), interferon alfa (IFN-α),

que se mantêm elevados 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, assim como a discreta e transitória depressão medular, que se apresentam nesses casos, também relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas (KURANE et. al., 2001).

Os pacientes com dengue apresentam uma resposta humoral bastante vigorosa com produção de anticorpos, provenientes da ativação dos linfócitos B. A partir do quarto dia após o início da sintomatologia, tornam-se detectáveis os anticorpos IgM específicos, que têm seus níveis elevados até o oitavo dia de infecção, quando enfim passam a ser indetectáveis após alguns meses depois da cura. Já as imunoglobulinas G específicas, são detectáveis a partir do quarto dia após os sintomas iniciais, elevam-se gradualmente até duas semanas após a infecção e podem ser detectáveis por diversos anos, conferindo ao indivíduo imunidade permanente contra aquele sorotipo ao qual foi infectado (KURANE; ENNIS, 1992; FIGUEIREDO; FONSECA, 1996).

A infecção pelo vírus dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente inaparentes (Dengue Clássica), até quadros graves de manifestações hemorrágicas e choque (Febre hemorrágica da Dengue - FHD), podendo evoluir para o óbito (LIGON, 2004). A dengue clássica inicia-se com febre alta, geralmente em torno de 39°C-40°C, com início repentino, associada à cefaleia, prostração, artralgia e dor retroorbitária, ocorrendo também episódios de náuseas, vômitos e diarreia. Pode ainda causar petéquias, gengivorragias, metrorragia e outras manifestações hemorrágicas ao final do período febril (BRASIL, 2005c).

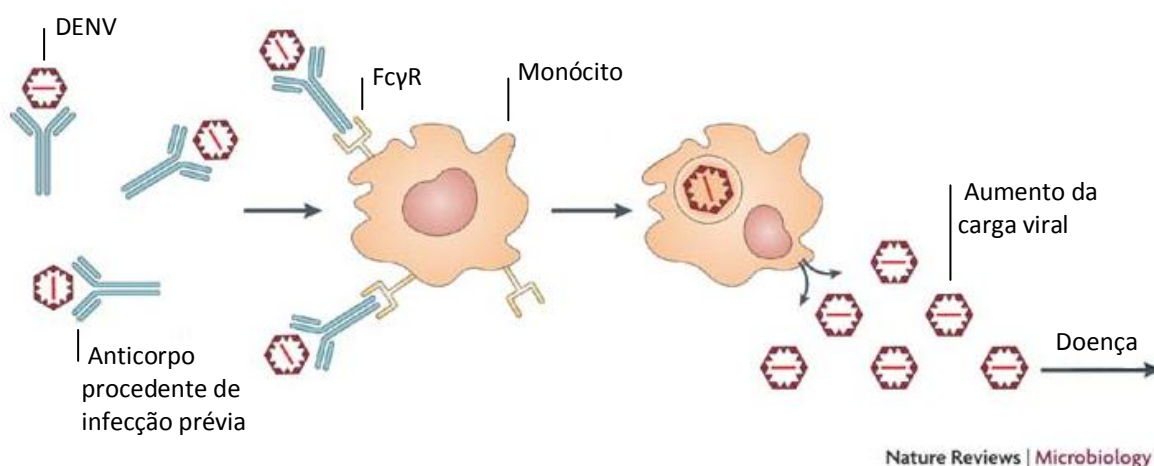
A dengue hemorrágica inicia-se com os mesmos sintomas descritos na fase clássica quando, entre o terceiro e sétimo dia, ocorre febre alta, seguida de fenômenos hemorrágicos mais intensos. Nesta fase, pode ocorrer extravasamento plasmático, plaquetopenia (menor que 70.000/mm³), elevação do hematócrito e muitas vezes falência do sistema circulatório (OMS, 2011). O dano hepático é outra complicação frequente, com níveis séricos de aminotransferases totalmente alterado, sendo este um importante marcador na avaliação da gravidade dos casos (SOUZA et. al., 2007). A **figura 6** diferencia os sintomas da dengue clássica da hemorrágica.

Figura 6. Aspectos clínicos da dengue clássica e hemorrágica

Fonte: (<http://g1.globo.com/luta-contra-a-dengue/noticia/2011/02/saiba-reconhecer-os-sintomas-da-dengue.html>).

Os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da 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, 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, que estão ligados ao envelope viral, para a ligação com os receptores de membrana Fcγ, presentes na membrana celular macrófaga. Trata-se do fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes (*antibody dependent enhancement* - ADE) (**Figura 7**), 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; WHITEHEAD et al., 2007).

Figura 7. Modelo para o fenômeno de imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE), causado pelo vírus dengue.



Fonte: (http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1690_F3.html)

2.8.2. Aspectos Epidemiológicos

Há aproximadamente 2.5 bilhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas de dengue e existe um número estimado de 100 milhões de novos casos por ano (GUBLER, 1998). Atualmente, cerca de 2/5 da população mundial corre o risco de contrair a doença. Estima-se que a cada ano, podem surgir 50 milhões de novos casos de dengue no mundo (GUZMAN et. al. 2010, OMS, 2009). A maior incidência da doença ocorre em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em períodos quentes e chuvosos (OMS, 1999; BLAIR et. al., 2000). No Brasil, as primeiras referências sobre a dengue datam de 1846, em São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador, sendo conhecida popularmente como “polca” e “patuléia” (BRASIL, 1996a).

Entre os anos de 1981 e 1982 foi registrada a primeira epidemia de dengue no país, esta epidemia atingiu o número de 11 mil casos, onde os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram isolados (SIQUEIRA et. al., 2004; NOGUEIRA et. al., 2007). As primeiras notificações de casos de Febre Hemorrágica da Dengue ocorreram em 1990 no Estado do Rio de Janeiro, a partir da introdução do DENV-2 (NOGUEIRA et. al., 2002). O sorotipo 3 da dengue foi inicialmente notificado em 1998 no Estado de São Paulo e, em 2002, foi responsável pela maior e mais grave epidemia da doença ocorrida no Brasil (DA SILVA et. al., 2002; PAHO, 2003). Após a reintrodução do DENV-4 em 2010, o país possui, atualmente, os quatro sorotipos

circulantes (GUZMÁN; KOURI, 2002; BRASIL, 2011e). O Brasil concentra mais de 70% dos casos de dengue registrados na América do Sul e 60% dos casos notificados no mundo (TEIXEIRA et. al., 2009).

2.8.3. Imunoglobulina para o tratamento da dengue

Atualmente, não há vacina ou tratamento específico, comercialmente disponíveis, para combater a infecção por dengue. Os laboratórios acadêmicos e as empresas farmacêuticas têm desenvolvido diversas vacinas candidatas contra a dengue, utilizando diferentes tecnologias, como, por exemplo, vacinas contendo vírus vivos atenuados, vetores virais recombinantes que expressam os antígenos do envelope do DENV, proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Dentre as várias candidatas, a vacina desenvolvida pela Sanofi Pasteur, uma vacina tetravalente que contém vírus recombinantes atenuados e que tem como base a cepa da vacina 17D contra a febre amarela (YF17D) (GUY et. al., 2011), está a frente nas pesquisas, mostrando eficácia de 61,2% contra o tipo 1 do DENV, 81,9% contra o tipo 3 e 90% contra o tipo 4. Não sendo confirmada proteção contra o vírus tipo 2 no contexto epidemiológico específico da Tailândia, mas os estudos continuam em andamento (SABCHAREON et. al., 2012).

Sendo assim, novas terapias para o combate da doença são uma necessidade urgente (WALLACE et. al., 2013; BEAUMIER et. al., 2013). Neste contexto, a transferência passiva de anticorpos específicos surge como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções virais, de forma a promover uma rápida recuperação do paciente.

O conhecimento da virologia, reunido ao longo dos anos, sugere que preparações de imunoglobulinas específicas são úteis para a neutralização viral, como no caso da hepatite B e de um arbovírus denominado vírus do Nilo Ocidental (WNV) (LAW, HANGARTNER, 2008; WADEI et al., 2004, HALEY et al., 2003). Se compararmos Dengue e WNV, ambas as infecções possuem similaridades imunológicas e patogênicas, além disso, têm um curso de infecção semelhante. A literatura tem mostrado que IgG específica, isto é, IgG anti-WNV, é eficiente na redução de títulos virais em pacientes gravemente infectados com WNV (SAQUIB et al., 2008, WADEI et al., 2004, HALEY et al., 2003). Em estudos pré-clínicos, IgG anti-WNV reduziu substancialmente a mortalidade em ratos infectados pelo vírus.

Em contraste, uma alta taxa de mortalidade é observada em camundongos, infectados por WNV, tratados com imunoglobulina polivalente, em substituição à específica (BEN-NATHAN et al., 2003). Atualmente, IGIV específica é muito utilizada para tratar infecção por WNV (AGRAWAL, PETERSEN, 2003; SHIMONI et al., 2001; HAMDAN et al., 2002). Baseado nessas premissas, a utilização de IGIV com altos títulos de anticorpos anti-dengue poderia reduzir as complicações associadas à infecção do vírus, assim como seu grau de mortalidade.

No entanto, a segurança da utilização de uma IGIV produzida no Brasil, ou seja, com altos títulos de anticorpos anti-dengue, em pacientes infectados pelo vírus, merece atenção. A pré-existência de anticorpos heterólogos, na presença de uma infecção por um sorotipo distinto, pode provocar ADE (GUBLER, 2002; GUZMÁN, KOURI, 2004; ROSS, 2010; WILDER-SMITH et al., 2005). Desde que os quatro sorotipos da dengue circulem no Brasil, o tratamento com IGIV brasileira, em pacientes infectados, pode causar o fenômeno de imunoamplificação dependente de anticorpos (GUZMÁN; KOURI, 2002; BRASIL, 2011e).

É bem descrito que ADE é dependente da porção Fc dos anticorpos (HALSTEAD, 1979; ROTHMAN; ENNIS, 1999; MONGKOLSAPAYA et al., 2003; WHITEHEAD et al., 2007), portanto a utilização de anticorpos fragmentados desta porção conservaria a capacidade de neutralização viral e evitaria a possibilidade de ocorrência do fenômeno ADE.

2.9. Fragmentação de imunoglobulina

Moléculas de anticorpos podem ser clivadas em fragmentos com funções biológicas distintas. Uma variedade de enzimas pode ser utilizada para este propósito, tais como ficina, bromelina, elastase, pepsina e papaína, sendo as duas últimas mais amplamente utilizadas (LUO et al., 2002).

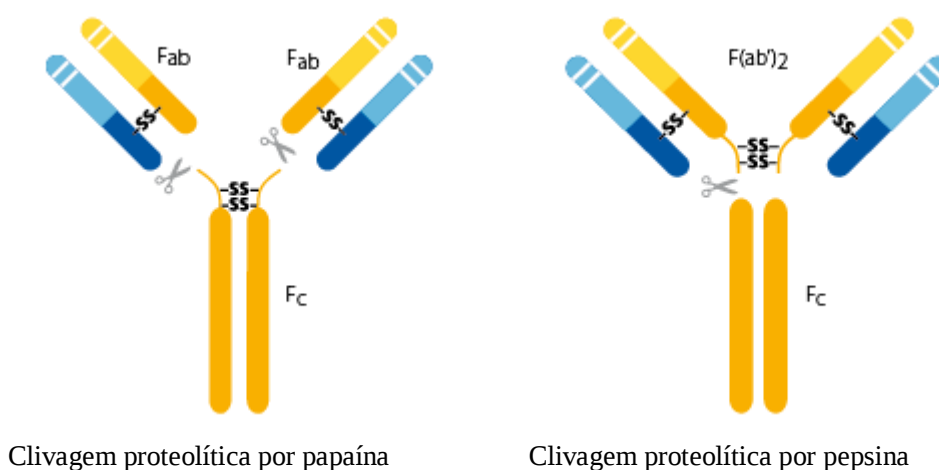
Fragmentos de anticorpos oferecem particulares vantagens, em relação à molécula íntegra, para o uso em determinadas técnicas imunohistoquímicas e aplicações experimentais. Anticorpos intactos, devido ao peso molecular relativamente alto (aproximadamente 160 KDa), apresentam, em alguns casos, cinética desfavorável e fraca penetração tecidual (JAIN, 1987; MILENIC et al., 1990; PRIMUS et al., 1980; YOKOTA et al., 1992). Além disso, a clivagem enzimática de anticorpos permite eliminar uma função biológica indesejada, realizada por apenas

uma parte da molécula. A remoção da porção Fc elimina, ou reduz significativamente, sua interação com células do sistema imune, além de diminuir reações não específicas (LAMOYI, 1986).

A região de dobradiça do anticorpo, a qual contém as pontes dissulfeto intercadeias, que separa o sítio de ligação do antígeno da porção Fc, é a região preferencialmente alvejada por enzimas proteolíticas. O tratamento com pepsina causa a clivagem do anticorpo no lado C-terminal, imediatamente adjacente às ligações dissulfeto, que ligam as duas cadeias pesadas (**figura 8**), formando assim um fragmento Fc e um fragmento bivalente $F(ab')_2$ (HASEMANN, CAPRA, 1989). Isto resultou nas primeiras preparações de IGIV humana que continham mais de 80% de fragmentos $F(ab')_2$ (BARANDUN et al., 1962). Estes fragmentos mantêm a capacidade de formar complexos antígeno-anticorpo, retendo assim o potencial de neutralizar agentes patogênicos, entretanto são desprovidos de funções efetoras.

Já o tratamento com papaína cliva a IgG no lado N-terminal, imediatamente antes das ligações dissulfeto (**figura 8**), resultando na geração de um fragmento Fc e dois fragmentos monovalentes Fab idênticos. Os fragmentos Fab conservam a capacidade de reagir com os antígenos, entretanto a capacidade de neutralização é limitada contra alguns patógenos. Como as subclasses de IgG exibem vários graus de resistência à papaína, 30-40% das moléculas de IgG permanecem intactas, portanto a preparação mantém alguma função efetora específica e não-específica (BARANDUN et al., 1975).

Figura 8. Tratamento proteolítico de Imunoglobulina



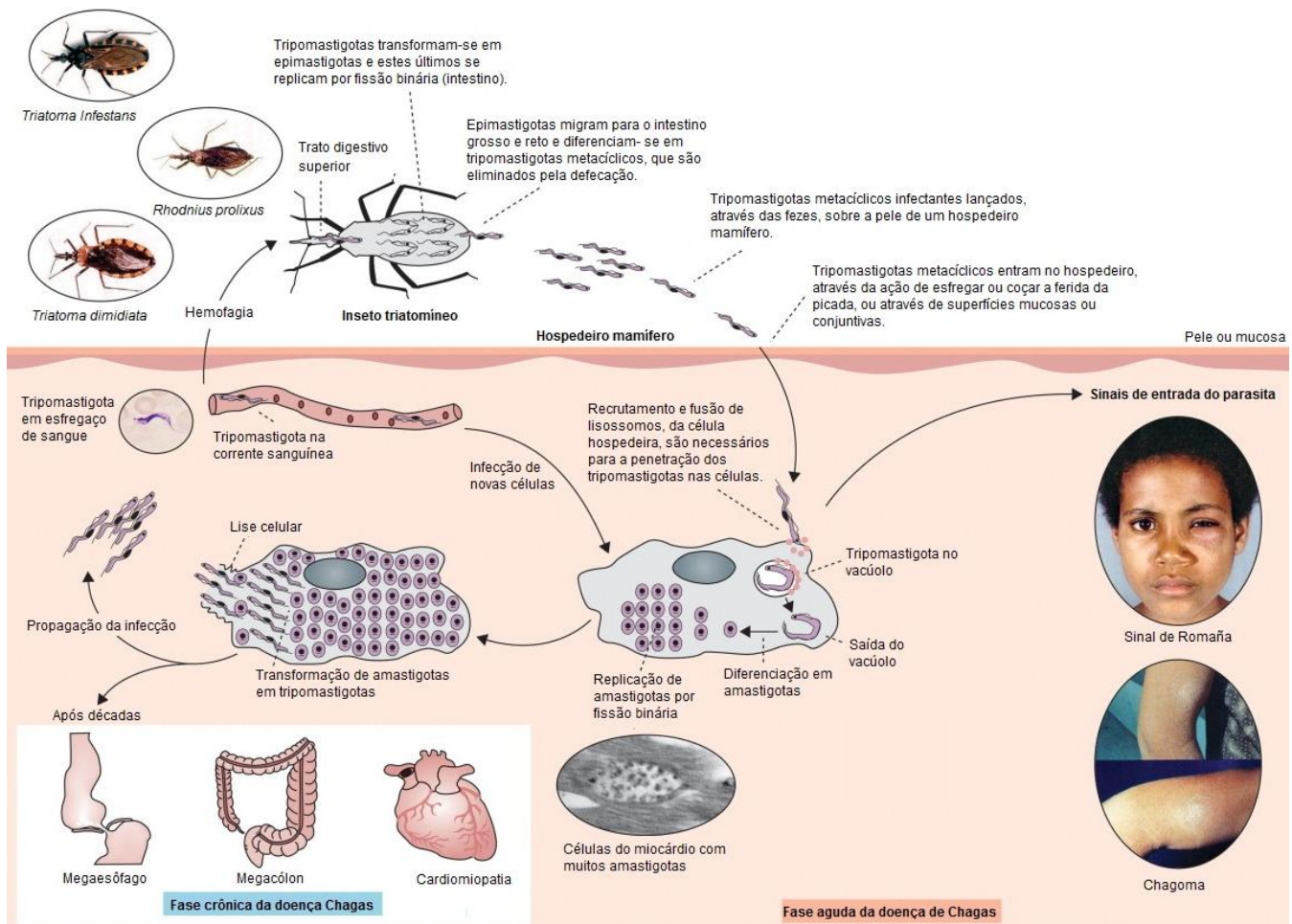
2.10. Doença de Chagas

2.10.1. Aspectos gerais

No ano de 1908, o pesquisador brasileiro Carlos Chagas, descreveu em um artigo clássico, datado de 1909, tanto a forma clínica característica da doença, como também seu agente etiológico, principal mecanismo de transmissão (CHAGAS, 1909). O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo assim denominado em homenagem a Oswaldo Cruz, seu antigo orientador. Mesmo tendo sido descrita há mais de 100 anos, a doença de Chagas ainda representa um importante problema de saúde pública, encontrada em 18 países da América do Sul e Central (ROCHA et. al., 2007).

O ciclo biológico da doença (**figura 9**) envolve um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (vetor). O parasito circula na natureza, entre seus hospedeiros, sob três estágios morfológicos distintos: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

Figura 9. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (Rassi Jr, Rassi, Marin-Neto, 2010)

Hoje, estima-se que na América Latina existam cerca de 12 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* e que 75 milhões estejam expostas à infecção (OMS, 2013). No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos da doença decorrentes de infecções adquiridas no passado, com cerca de três milhões de indivíduos infectados. (BRASIL, 2012). As regiões endêmicas normalmente se localizam nas zonas rurais, onde em geral as condições socioeconômicas são mais precárias. Em razão destas dificuldades econômicas, ao longo dos anos, as populações rurais vêm migrando para as zonas urbanas, diminuindo a população exposta a vetores infectados.

A transmissão da doença também pode ocorrer por via congênita, embora em menor proporção. No Brasil, a infecção por essa via é menor que 1% do total dos casos. Outra forma de transmissão acontece por meio do transplante de órgãos de indivíduos infectados, principalmente rins, coração, medula óssea e pâncreas, tanto de doadores vivos como cadavéricos (DIAS et. al., 2007). Existe ainda a probabilidade de transmissão por doação sanguínea, sendo esta a mais frequente em países não endêmicos, como EUA e Canadá, e países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor. No ano de 2006, através de um programa de triagem nos bancos de sangue dos EUA, detectou-se mais de 500 doações infectadas pelo *T. cruzi* (BERN et. al., 2007). No Brasil, nos anos 80, esse tipo de transmissão apresentava prevalência média de 7,03%, esse coeficiente caiu para 3,18% na década de 90 e atualmente gira em torno de 0,6%. Esses índices refletem a efetividade dos programas de combate ao vetor e maior controle do sangue e hemoderivados, através da triagem clínica da doação voluntária (BRASIL, 2012).

2.10.2. Fases Clínicas

A doença de Chagas pode ser reconhecida por suas fases clínicas: aguda e crônica.

2.10.2.1. Fase Aguda

Esta fase é frequentemente assintomática, com duração de 6 a 8 semanas. Nesta ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, o que torna possível sua detecção na circulação. A escassez e/ou ausência de sintomas ocorre na maioria

dos pacientes e, quando existentes, suas manifestações são comuns a qualquer infecção sistêmica, como febre, linfadenopatia, taquicardia, esplenomegalia, vômito, diarreia, anorexia, edema e linfocitose. A presença de inflamação no local de entrada do parasito, em geral próximo aos olhos (edema palpebral unilateral), o chamado “Sinal de Romaña” (**figura 9**), é bastante característico da doença, entretanto só é encontrado em cerca de 50% dos casos agudos. Estima-se que esta fase seja diagnosticada em menos de 10% dos indivíduos infectados (PUNUKOLLU et. al., 2007).

O tratamento é feito com benzonidazol, indicado durante a fase aguda, na infecção congênita e na infecção crônica recente, esta última característica de crianças em idade escolar de zonas endêmicas. O tratamento da fase aguda promove melhora dos sintomas, desaparecimento dos parasitos circulantes após cerca de 5 dias de tratamento e, mais tardiamente, a negatificação da sorologia em até 80% dos casos (PRATA et. al., 2001; URBINA et. al., 2003).

2.10.2.2. Fase Crônica

A fase crônica da doença inicia-se quando a parasitemia cai a níveis indetectáveis e quando os sintomas clínicos relacionados à fase aguda desaparecem, ou seja, após 4 a 8 semanas de infecção. Na fase crônica, entre 60% e 70% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos pelo resto da vida, evoluindo na forma chamada indeterminada, laboratorial ou subclínica da doença. No entanto, de 10 a 30 anos após a infecção aguda, 30% a 40% dos pacientes desenvolvem manifestações clínicas, decorrentes de alterações cardíacas e/ou digestivas. Essas ocorrências são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino entre 20 e 45 anos de idade (BARRET et. al., 2003; ANDRADE et. al., 2005).

A cardiomiopatia chagásica ou cardiomiopatia dilatada inflamatória acomete cerca de 30% dos infectados pelo *T cruzi*, um terço destes desenvolve a doença grave, que inclui arritmias malignas, dilatação ventricular e insuficiência cardíaca (URBINA et. al., 2003; DIAS et. al., 2007). Por fim, 8% a 10% dos indivíduos desenvolvem a forma digestiva com gravidade variada. Nestes casos é frequente observar algum grau de acometimento do sistema nervoso autônomo, que, em geral, precede as alterações de motilidade, com consequente dilatação desses órgãos, levando ao megaesôfago e ao megacólon (PRATA et. al., 2001; BARRET et. al., 2003).

2.10.3. *Cardiomiopatia chagásica crônica*

Resultante do progressivo dano ao miocárdio, através de uma miocardite fibrosante, a cardiomiopatia chagásica é uma das características mais evidentes da doença de Chagas. Apenas 25% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* podem apresentar manifestações clínicas mais graves e conseqüentemente a evolução para o óbito. Dentre as causas de óbitos em pacientes infectados pela doença, as mais comuns são a insuficiência cardíaca, tromboembolismo pulmonar e sistêmico, arritmias graves e também a morte súbita. Em um estudo com 411 indivíduos, observou-se que a morte súbita ocorreu em 60% dos pacientes crônicos, obtendo uma taxa de mortalidade de 3,9% ao ano (RASSI et. al., 2006). Outros trabalhos também demonstram que a sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia chagásica é de 2 a 4 vezes menor que de pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática (MADY et. al., 1994; RASSI et. al., 2006).

Um terço dos casos de insuficiência cardíaca no Brasil é decorrente da cardiomiopatia chagásica, e este mesmo problema é a terceira maior causa de indicação de transplante no país (MENDEZ et. al., 2001; BOCCHI et. al., 2001). Os mecanismos mais estudados, que levam a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), envolvem a inflamação em resposta ao parasito e a autoimunidade. Na fase aguda, foram descritas alterações em componentes do sistema β -adrenérgico cardíaco de transdução de sinais, que incluem a redução dos níveis plasmáticos de catecolaminas, a diminuição de afinidade do agonista pelo receptor β -adrenérgico cardíaco, e elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) na célula cardíaca (BUSTAMANTE et al., 2003; LO PRESTI et al., 2006).

Na forma indeterminada foi observado que a regulação da função cardíaca pela noradrenalina também está comprometida e, provavelmente, associada às modificações no sistema adrenérgico cardíaco, que ocorreram no início da infecção. Além disso, o tipo de cepa do parasito, fatores genéticos do hospedeiro e reinfecções nas fases aguda e indeterminada podem agravar o comprometimento cardíaco (BUSTAMANTE et. al., 2007).

Segundo Gironès e Fresno (2003), a cronicidade da lesão ao miocárdio decorre da ativação da resposta imune ao parasito, juntamente aos múltiplos antígenos cardíacos. Na realidade, o mimetismo molecular entre os antígenos do hospedeiro e do parasito resultaria em resposta das células efectoras T e B contra os

antígenos cardíacos, levando à lesão do miocárdio. Essa agressão crônica ao coração culmina em dano progressivo às fibras miocárdicas e consequente formação de cicatriz fibrótica. Contudo, ainda não há evidência que defina a etiologia da miocardite crônica e insidiosa que resulta na CCC.

Estudos clínicos, em pacientes cardiopatas de etiologia chagásica, revelaram um padrão de citocinas mais predominante de resposta Th1, com produção de IFN- γ e níveis elevados de TNF- α , especialmente em pacientes com comprometimento mais severo (SILVA et. al., 1992; ABEL et. al., 2001). Os modelos experimentais da doença de Chagas, aguda e crônica, revelaram que as citocinas são elementos importantes na geração e controle da resposta imune, que pode levar ao dano tecidual (SILVA et. al., 1992; SOARES et. al., 2001). Essas citocinas, que são produzidas na infecção do *T. cruzi*, têm seus efeitos influenciados por vários fatores, como virulência da cepa, fatores genéticos do hospedeiro e presença ou não de reinfecções (SAMUDIO et. al., 1998; REVELLI et. al., 1999).

Mesmo com os mecanismos patogênicos da cardiomiopatia chagásica, ainda não elucidados totalmente, não existe dúvida de que o infiltrado inflamatório cardíaco é o maior causador da lesão no miocárdio. As características histopatológicas da cardiomiopatia dilatada ocorrem devido à presença de miocardite difusa com intenso infiltrado linfomononuclear, destruição das fibras cardíacas e consequentemente fibrose, que também atinge o sistema de condução cardíaco. Além disso, há inflamação crônica deste sistema de condução, o que explica as frequentes arritmias observadas nos pacientes cardiopatas (HIGUCHI et. al., 1993; ENGMAN et. al., 2002).

O infiltrado inflamatório é constituído de macrófagos (50%), linfócitos T (40%) e linfócitos B (10%) (MILEI et. al., 1992). Com relação à resposta imune celular, observa-se que existe predomínio de linfócitos T CD8⁺ sobre os linfócitos T CD4⁺, numa proporção de 2:1 (REIS et al., 1993; TOSTES et al., 1994). Histiócitos e células endoteliais do tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica apresentam aumento da expressão de moléculas antígeno leucocitário humano (HLA, *human leukocyte antigen*) de classe I e II. Essas moléculas estão envolvidas na apresentação de antígenos para os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente.

Em concordância com o que se observa no coração, diversos trabalhos com células do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas têm mostrado que a infecção crônica induz desvio da resposta imunológica para um perfil pró-

inflamatório, com produção de citocinas do tipo Th1 e supressão de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (CUNHA-NETO et. al., 1998; ABEL et. al., 2001; GOMES et. al., 2003; MARIN-NETO et. al., 2007). O número de linfócitos, produtores de IFN- γ , de pacientes cardiopatas crônicos, é significativamente maior do que o de pacientes na forma indeterminada da doença, indicando uma capacidade aumentada destes pacientes em responder ao estímulo pró-inflamatório do parasito (ABEL et. al., 2001).

Os níveis de TNF- α estão significativamente mais elevados em pacientes com doença de Chagas que em indivíduos normais. Esses níveis estão ainda mais elevados em pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica sem disfunção ventricular ou na forma indeterminada da doença (FERREIRA et. al., 2003; TALVANI et. al., 2004). A elevação do TNF- α observada nos pacientes com disfunção ventricular é provavelmente secundária à insuficiência cardíaca em si (LEVINE et al., 1990). Entretanto, o aumento do TNF- α observado em cardiomiopatas crônicos sem disfunção ventricular sugere a existência de um estímulo contínuo para a produção de citocinas inflamatórias ao longo da infecção, o que pode contribuir para o desenvolvimento ou a progressão da cardiomiopatia.

2.10.4. Tratamento da cardiomiopatia chagásica crônica

A terapia disponível para doença de Chagas consiste no uso do benzonidazol, eficaz na erradicação do parasito na fase aguda da doença. No entanto, sua eficácia na cura da CCC estabelecida é bastante discutida, apesar de ensaios experimentais recentes apontarem um efeito benéfico do uso do referido medicamento na fase crônica da doença, ao reduzir os distúrbios cardíacos característicos da CCC (GARCIA et al., 2005). De forma geral, o paciente recentemente diagnosticado como portador da doença de Chagas deverá, inicialmente, além da história clínica e exame físico detalhado, realizar eletrocardiograma. Caso esta avaliação inicial não apresente alterações o indivíduo deverá ser mantido em acompanhamento, em nível ambulatorial, anualmente. Se os achados da avaliação inicial evidenciarem comprometimento cardíaco o paciente deverá ser submetido ao Holter 24 horas, ecocardiograma e teste ergométrico. No caso de sintomas gastrointestinais, além dos já mencionados, é recomendado a realização de exame contrastado com bário do trato digestivo (BERN et al., 2007).

A única alternativa para os pacientes com CCC, agravada pela insuficiência cardíaca (IC), é o transplante de órgão. Portanto, a CCC tem frequentemente um curso fatal, já que o tratamento é sintomático e a possibilidade de realização de transplantes cardíacos é bem menor que a demanda (DIAS et al., 1997). Este procedimento é dispendioso e complexo, e, no caso específico da insuficiência cardíaca de etiologia chagásica, apresenta ainda como agravante o uso de imunossupressores pós-transplante, que pode reativar a infecção devido ao parasitismo tecidual persistente na fase crônica da doença.

Ainda como agravante do tratamento, grande parte dos indivíduos com CCC, que evoluem para insuficiência cardíaca congestiva franca, pertencem a camadas socioeconômicas mais desfavorecidas, para a qual o acesso aos tratamentos clínico e cirúrgico adequados, transplante cardíaco e o uso de drogas imunossupressoras é limitado. A IC grave impossibilita o indivíduo de trabalhar, acarretando ônus para o Estado e baixa qualidade de vida para o enfermo (BERN et al., 2007; DIAS et al., 1997). Portanto, o estabelecimento de uma terapia eficaz reduzirá, consideravelmente, os custos com internações hospitalares e aposentadorias precoces.

2.10.5. Imunoglobulina para o tratamento da Cardiomiopatia Chagásica Crônica

A doença de Chagas afeta uma população de cerca de 25 milhões de pessoas na Américas Latina. Como a cardiomiopatia chagásica crônica ocorre em cerca de 25% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, se hoje conseguíssemos erradicar totalmente a transmissão da doença ainda nos restaria uma população de cerca 7,5 milhões de cardiopatas chagásicos, que estariam evoluindo para morte nos próximos anos (CENTRO de GESTÃO e ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2006). Sendo assim, o desenvolvimento de uma terapia que leve a diminuição das lesões cardíacas e ao bloqueio da evolução da CCC é de grande interesse.

Apesar dos avanços dos tratamentos medicamentosos, a insuficiência cardíaca crônica (ICC) ainda é uma doença progressiva e com alta taxa de morbidade e mortalidade. Diversos estudos mostram que as citocinas inflamatórias, como TNF α , interleucina IL- β e IL-6, têm seus níveis aumentados progressivamente de acordo com a gravidade da doença (MANN et. al., 2002; AUKRUST et. al., 2005). Interessantemente o aumento dos mediadores inflamatórios não é acompanhado por

incremento das citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 (AUKRUST et al., 1999). Uma série de estudos experimentais tem demonstrado que os efeitos biológicos dessas citocinas pró-inflamatórias podem explicar diversos mecanismos de progressão da doença, como, por exemplo, a indução de apoptose, desenvolvimento de fibrose, dentre outros (MANN et. al., 2002; AUKRUST et. al., 2005).

Embora não completamente elucidada, sabe-se que na cardiopatia chagásica crônica as lesões inflamatórias apresentam um aspecto de reação de hipersensibilidade tardia, sugerindo assim, a participação de linfócitos Th1 na sua patogênese, uma vez que esta subpopulação celular promove a ativação de macrófagos pela secreção de citocinas como o IFN- γ (LIEBERMANN et al., 1991). Também é caracterizada por uma bem reconhecida cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva, sendo um aspecto grave na morbidade dos portadores (KÖBERLE, 1968).

A descrição de ativação das citocinas em insuficiência cardíaca levanta a possibilidade de utilizarmos imunoglobulina venosa procurando seu efeito benéfico através da imunomodulação. Apesar da atraente hipótese, existem poucos estudos disponíveis na literatura visando esta forma de tratamento.

Na área cardiológica, as imunoglobulinas polivalentes têm sido utilizadas há relativamente pouco tempo, apesar de sua ação imunorreguladora ser reconhecida por mais de duas décadas. Neste contexto, há relatos de sua utilização em cardiologia, notadamente na cardiopatia dilatada e na insuficiência cardíaca crônica (MCNAMARA; ROSENBLUM; JANOSKO, 1997; BOZKURT; VILLANUEVA; HOLUBKOV, 1999). Foram demonstrados efeitos benéficos em pacientes com cardiomiopatia dilatada após o tratamento com altas doses de IGIV, inclusive com pacientes refratários ao tratamento com anti-hipertensivos e anticoagulantes (BALLOW, 1997; GULLESTAD et al., 2001).

Desde que a cardiomiopatia chagásica também é do tipo dilatada, a realização de um trabalho experimental de terapêutica com IGIV, em murinos cardiopatas chagásicos crônicos, mostra-se promissor. Este trabalho visa estabelecer o efeito cardioprotetor, resultante do uso de imunoglobulina humana intravenosa, através da avaliação morfológica, imunológica e funcional, como forma de terapêutica eficaz para o tratamento da CCC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produção de soluções de imunoglobulina humana intravenosa e avaliação de sua eficácia para o tratamento da dengue e da cardiomiopatia chagásica.

3.2. Objetivos Específicos

- Produção, através de metodologia clássica de Cohn-Oncley, de lote piloto de IGIV polivalente;
- Triagem de plasmas de doadores voluntários para identificação e seleção de bolsas contendo anticorpos específicos anti-dengue;
- Produção de solução de imunoglobulina G anti-dengue;
- Produção de solução de imunoglobulina G anti-dengue, clivada da porção Fc;
- Caracterização das soluções de IgG obtidas, segundo o que preconiza a última edição da Farmacopéia Européia;
- Identificação da ação neutralizante da IGIV específica frente a diferentes sorotipos de DENV;
- Investigação da eficácia e segurança pré-clínica do uso de imunoglobulina específica no modelo de infecção primária pelo DENV-3;
- Avaliação da eficácia pré-clínica do uso de IGIV polivalente para o tratamento da cardiomiopatia chagásica em modelo animal infectado cronicamente com o *Trypanosoma cruzi*.

Capítulo 1

Produção e caracterização de soluções de imunoglobulina humana

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção de imunoglobulina humana polivalente

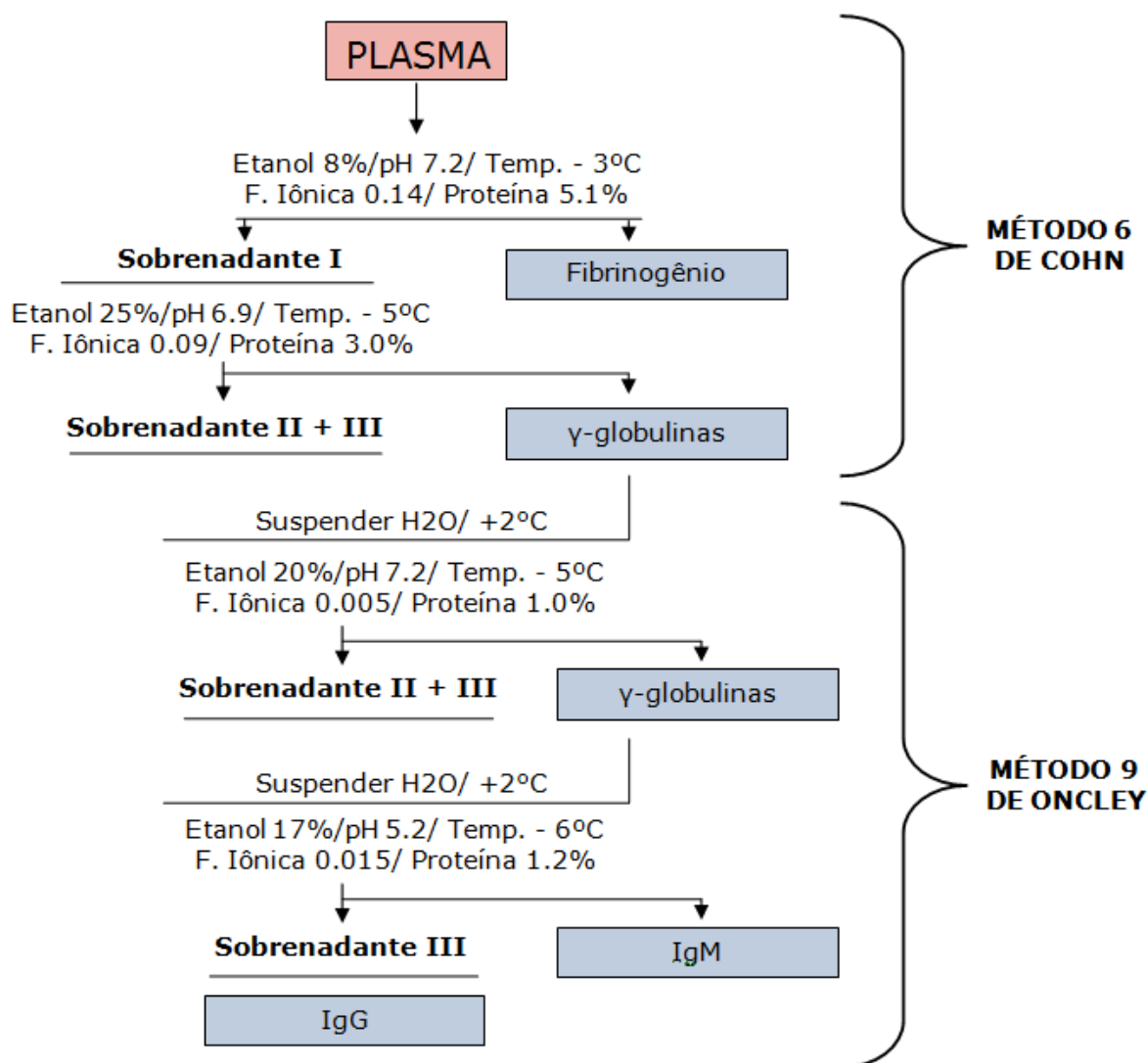
Este projeto experimental foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética do HEMOPE (processo nº 002/2011). Os pacientes não foram identificados e os dados do estudo foram analisados de forma anônima.

O material de partida utilizado foi o plasma fresco congelado, recebido na Fundação HEMOPE. Todo o plasma utilizado foi previamente triado no setor de sorologia do HEMOPE para checar a ausência de contaminação pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV1, HIV2), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), vírus da hepatite C (HCV), Vírus T Linfotrófico Humano (HTLV), doença de Chagas e sífilis.

A IgG foi obtida através do método de Cohn-Oncley (**figura 10**) (precipitação com etanol a frio). O processo geral utilizado neste trabalho é ilustrado na **figura 11**. O método de fracionamento com etanol a frio baseia-se na mudança de solubilidade das proteínas plasmáticas através do ajuste do pH, temperatura, força iônica e concentração de etanol.

Uma mistura de 1.000 bolsas (doadores) de plasma (170 L) foi descongelada a 4°C, temperatura na qual algumas proteínas (crioprecipitado) são insolúveis e precipitam. O crioprecipitado foi então removido por centrifugação e o sobrenadante tratado segundo o método 6 de Cohn *et al.*, (1946). O fibrinogênio foi precipitado na fração I de Cohn e a imunoglobulina G separada da albumina (fração V) através da precipitação da fração II + III. Os precipitados foram removidos do sobrenadante através de centrifugação a 12.000 rpm.

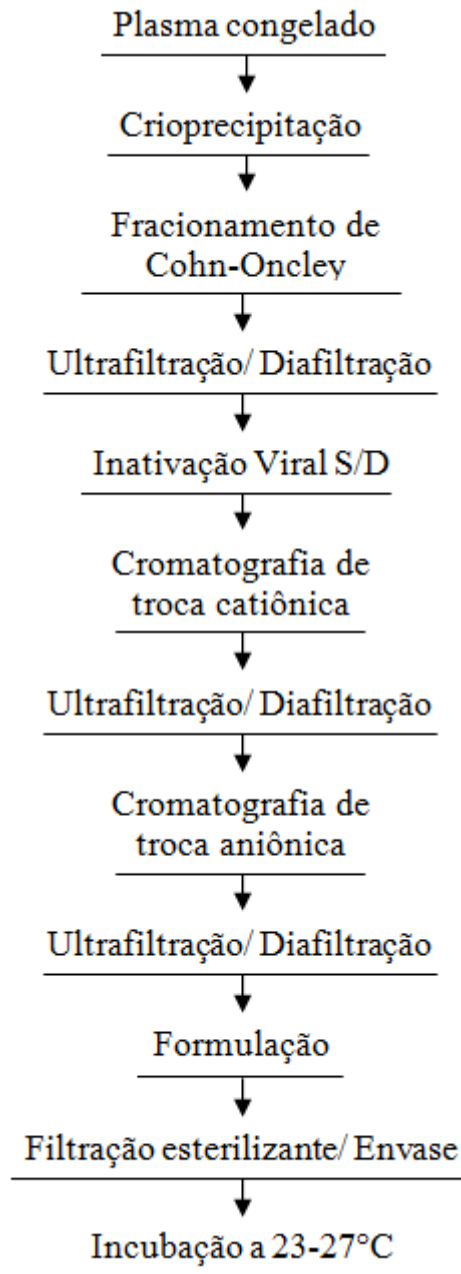
Figura 10. Isolamento de IgG do plasma humano.



Fonte: (Cohn et al., 1946; Oncley et al., 1949)

De acordo com o método 9 de Oncley *et al.*, (1949), a fração II + III foi solubilizada e, em seguida, a fração III precipitada. O sobrenadante foi clarificado por filtração. A partir da solução filtrada 1,9 Kg de pasta de IgG (fração II) foi precipitada e separada por centrifugação a 12.000 rpm. A pasta de IgG foi, por fim, dissolvida em água purificada e clarificada por filtração.

Figura 11. Processo geral de produção de imunoglobulina intravenosa humana.



Para reduzir a força iônica, a solução foi diafiltrada com água purificada e teve sua concentração proteica ajustada para 5% (peso/volume). Um sistema *Pellicon - Millipore* de 30kD foi usado para realizar a diafiltração e ajuste da concentração proteica. A solução com baixa força iônica foi submetida a um processo de inativação viral por ação da mistura solvente/detergente empregando-se 0,3% (m/m) de Tri-n-butilfosfato e 1% (m/m) de Tween 80, sob temperatura de 25°C (HOROWITZ et al., 1985). Com o objetivo de remover solvente e detergente residuais, um processo de cromatografia de troca catiônica foi realizada, com *CM-Sepharose FF* como fase estacionária. Para remover IgA e outras impurezas, uma cromatografia de troca aniônica, em *DEAE-Sepharose FF*, foi empregada. Os eluatos cromatográficos foram concentrados por ultrafiltração (*Pellicon - Millipore* de 10kD) e diafiltrados com uma solução de glicina a 0.25 mol/L, usando o mesmo sistema. A concentração proteica foi ajustada para 5% (peso/volume) e o pH ajustado a 4.2 – 4.3 com HCl 0,1N. A solução foi filtrada em filtros esterilizantes e envasada de forma asséptica. Por fim, foi realizada uma última etapa de inativação viral, através da incubação do recipiente final a 23-27°C por 21 dias, antes do estoque a 2-8°C.

4.2. Produção de imunoglobulina humana anti-dengue

Para a produção de IGIV anti-dengue foi utilizada a metodologia descrita na seção 4.1, entretanto, por se tratar de uma preparação específica, foi utilizada uma mistura de plasma previamente triado.

Um “pool” de plasma de doadores brasileiros selecionados (região Nordeste) foi empregado para produzir as preparações de IGIV. Um kit ELISA comercial (E-DEN01G panbio diagnostics, Cheshire, UK) foi utilizado para a determinação indireta dos títulos de anticorpos IgG anti-dengue e seleção dos plasmas.

Plasma fresco congelado obtido na Fundação HEMOPE, de doadores brasileiros saudáveis, foi coletado e as bolsas de plasma livre de contaminantes foram selecionadas. Em seguida foram selecionadas bolsas de plasma ricas em anticorpos anti-dengue. Para este fim, utilizou-se o kit ELISA comercial para identificar a presença de anticorpos anti-dengue. Ao final da triagem, foram selecionadas 200 bolsas de plasma contendo anticorpos específicos, as quais forneceram 346g de pasta de IgG (fração II de Cohn).

4.3. Controle dos produtos acabados

Para checar as propriedades funcionais dos produtos, durante o processo e das preparações finais, foram utilizados os protocolos definidos pela Farmacopéia Européia e descritos pela Agência Regulatória Nacional (BRASIL, 2000). Determinação de polímeros e agregados foi realizada usando cromatografia de filtração em gel, com coluna Biosep SEC-S3000 (600 x 7.8mm) (Phenomenex). Imunodifusão radial foi usada para determinar IgM e distribuição das subclasses de IgG. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi utilizada para mensurar IgA e IgE, além de confirmar a ausência de contaminantes no plasma, como HIV1 e HIV2, HBsAg, HCV, HTLV, doença de Chagas e sífilis.

Com o objetivo de mensurar γ -globulina, foi utilizada eletroforese em acetato de celulose. Os métodos utilizados para a determinação de pirogênios e da atividade anticomplementar estão de acordo com as monografias da Farmacopéia Européia (2.6.8 e 2.6.17 respectivamente). Análise de termoestabilidade foi desempenhada através da incubação da preparação final em banho-maria a 57 ° C por 4 horas.

4.4. Identificação de sorotipos anti-dengue

A determinação dos anticorpos antidengue específicos para cada um dos sorotipos do vírus circulantes foi realizada pela técnica de neutralização por redução de placas (PRNT) de acordo com a metodologia descrita por Morens e colaboradores (1985), com pequenas modificações, e seguindo as recomendações da OMS (2007). Foram avaliadas, pela técnica de PRNT, três amostras: a mistura de plasma inicial (selecionado para a produção de IGIV anti-dengue), a preparação de imunoglobulina anti-dengue e uma IGIV polivalente comercial (Kiovig/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA). O teste, bem como a preparação de estoques de vírus e manutenção da cultura celular, foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

4.4.1. Manutenção da Cultura Celular

Foram utilizadas células da linhagem Vero (Rim de macaco verde africano), propagadas em garrafas de cultivo de células (T175) a cada 5-6 dias, utilizando-se o meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) (Gibco, Scotland), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Scotland) e antibióticos penicilina/estreptomicina a 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA). As garrafas de células foram mantidas em estufa à 37°C, com atmosfera 5% de dióxido de carbono (CO₂). As células Vero foram mantidas durante todo o experimento e utilizadas para o crescimento de vírus e preparação das placas para o teste de neutralização.

Para a preparação das placas, a contagem das células Vero foi efetuada em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital Trypan blue (Sigma, St Louis, MO, USA). Em seguida, suspensões de células Vero, a uma densidade de 300.000 células/mL, foram distribuídas em placas de 24 poços (NUNC), no volume de 0,5 mL por poço. As placas foram mantidas em estufa à 37°C, a uma atmosfera 5% de CO₂ durante 24 a 48 horas, até a realização do teste PRNT.

4.4.2. Preparação dos Estoques dos Vírus: DENV-1, DENV-2 e DENV-3

As amostras de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 pertencem à coleção de vírus do LaViTE e correspondem às amostras de vírus isolados nas epidemias ocorridas no estado de Pernambuco, doadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE). Os isolados utilizados foram: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808) e DENV-3 (PE/02-95016).

Amostras de cada sorotipo foram inoculadas em células Vero, crescidas em garrafas T175, mantidas em meio MEM (GIBCO), suplementado com 2% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% penicilina/estreptomicina, e incubadas a 37°C em 5% CO₂, a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0.1, por 5-6 dias a 37 °C in 5% CO₂.

As suspensões de células contendo os vírus foram submetidas ao congelamento e descongelamento e, em seguida, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes contendo as partículas virais foram coletados e adicionado SFB na proporção de 20%, em seguida distribuídos em criotubos em alíquotas de 0,5 mL e estocadas à -80 °C. Cada suspensão viral foi titulada por ensaio de placa, utilizando células da linhagem VERO, para determinar a diluição adequada para o teste, devendo conter de 20 a 30 unidades formadoras de placa (UFP).

4.4.3. Neutralização por redução do número de placas (PRNT)

Inicialmente, as três amostras de IgG (20µl) foram inativadas por 30 minutos em banho-maria a 56°C, em seguida foi realizada a diluição da amostra do pool de plasma (1/20 até 1/2560) em MEM utilizando-se microplacas de 96 poços (NUNC), no volume final de 100µl, sendo uma placa para cada sorotipo viral. Após a diluição, 100µl da suspensão viral de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, previamente titulados, com uma concentração de aproximadamente 30 UFP/mL foram adicionados nos locais correspondentes a cada um dos três sorotipos.

Após incubação a 37°C, em 5% de atmosfera de CO₂ por 1 hora, o meio das placas de 24 poços contendo as células Vero foi descartado e 50µL de cada diluição da mistura vírus-IgG foi inoculado, em triplicata. As placas foram novamente incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 1 hora, para permitir a adsorção do vírus. Após este período, as células foram cobertas com 500µL de meio semi-sólido: 10 % de MEM, 10% de soro fetal bovino (SFB), 80% de carboximetilcelulose (CMC) a 3%, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de Fungizon. Em seguida as placas foram incubadas por 6-7 dias, à 37 °C, em 5% de CO₂. Após incubação, o meio semi-sólido foi descartado das placas de 24 poços e uma solução de formalina a 3,5M foi adicionada (2mL por poço, incubadas por 1 hora) para fixação das células e inativação das partículas virais. Após, descarte da formalina, as células foram coradas com solução (1:50) de cristal violeta (0,5mL/poço), lavadas em água corrente e, após secagem, as placas foram contadas manualmente.

4.4.4. Critérios de positividade e determinação dos títulos de anticorpos

Amostras da mistura de plasma inicial, da preparação de imunoglobulina anti-dengue e da Kiovig, que apresentaram redução de 50% ou mais no número de placas virais (PRNT50), em comparação com as amostras dos vírus inoculadas sozinho, foram consideradas positivas. Amostras que não apresentaram redução de, no mínimo, 50% das placas virais na menor diluição de soro utilizada (1:20) foram consideradas negativas.

O percentual de neutralização foi calculado utilizando a fórmula proposta por Vazquez e colaboradores (2003), apresentada a seguir:

$$\% \text{ Redução} = [1 - (P \text{ amostra} / P \text{ vírus controle})] \times 100, \text{ onde } P \text{ significa contagem de placas.}$$

4.4.5. Validação dos resultados

Para garantir a acurácia e diminuir as variações intra e inter teste, todos os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos pelo mesmo técnico. Controles positivos (vírus inoculado na ausência de soro) e negativos (soro de indivíduos sabidamente negativos) foram incubados para cada um dos vírus. Poços com células não-infectadas também foram utilizados como controle. Os critérios utilizados para validar o resultado do teste foram: integridade da monocamada de células não-infectadas, pouca ou nenhuma redução na contagem de placas dos soros negativos e apropriadas contagem de placas do controle positivo.

4.5. Produção de imunoglobulina humana anti-dengue fragmentada da porção Fc

Como material de partida para a produção de solução de fragmentos $F(ab')_2$ de IgG anti-dengue foi utilizado a IGIV específica preparada como descrito na seção 4.3. Cinquenta mililitros da solução a 5% de IGIV anti-dengue foi diluída a 2,5% com tampão acetato pH 4.0 e, em seguida, diafiltrada (*Pellicon - Millipore* de 30kD) contra 5 volumes do mesmo tampão. Cem mililitros de uma solução de pepsina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a 1,25% foram então adicionados. O pH da solução foi ajustado para 4.0 e a mesma foi incubada a 37 °C por 24 horas, sob agitação branda. A digestão da pepsina foi interrompida pelo reajuste do pH para 7.0 usando hidróxido de sódio 0.5M. A solução foi filtrada em filtro 0,22 µm, diluída a 2% com tampão fosfato (PBS pH 7.0) e diafiltrada contra 5 volumes do mesmo tampão.

Três colunas de proteína G (5mL HiTrap – GE Healthcare) foram postas em série e usadas para purificar os fragmentos $F(ab')_2$. A coluna foi equilibrada com PBS pH 7.0 e a solução diafiltrada foi então aplicada. Em seguida a coluna foi lavada com PBS para remoção dos fragmentos $F(ab')_2$. Para a eluição dos fragmentos Fc e IgG residual foi utilizado tampão glicina 0.1M. Foram realizados três ciclos, onde, para cada um deles, foram aplicados 75mL (ou um total de 375 mg de proteína) do diafiltrado na coluna. O fluxo utilizado correspondeu a 5mL/min.

Os eluatos cromatográficos que continham os fragmentos $F(ab')_2$ foram coletados e combinados e, em seguida, filtrados a 0,22 μ m. Os eluatos foram concentrados por ultrafiltração (*Pellicon - Millipore* de 10kD) e diafiltrados com uma solução de glicina a 0.25 mol/L, usando o mesmo sistema. A concentração proteica foi ajustada para 5% (peso/volume) e o pH ajustado em 4.2 – 4.3. A solução foi filtrada em filtros esterilizantes e envasada de forma asséptica.

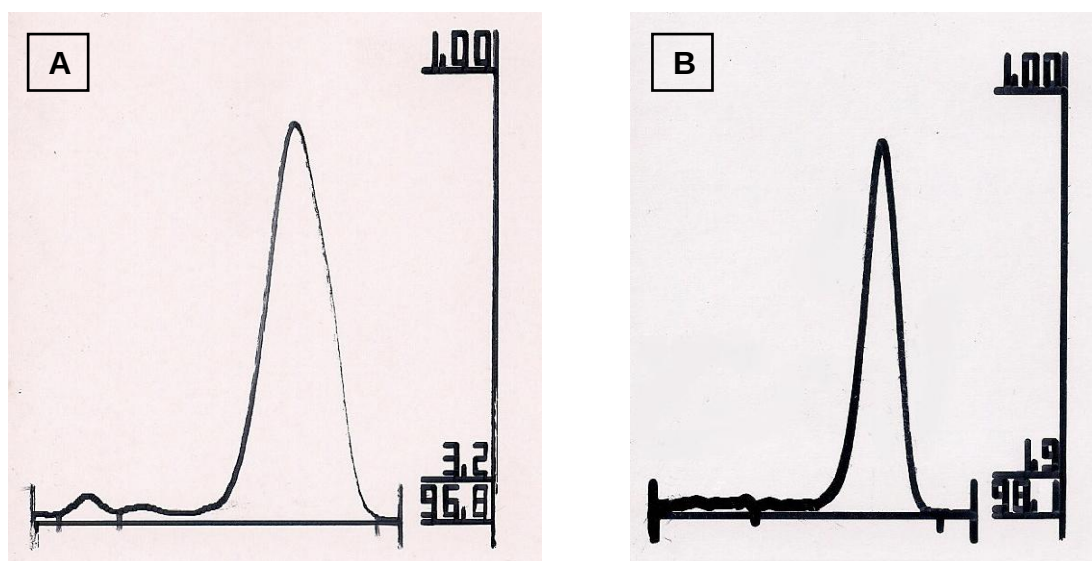
A determinação dos pesos moleculares e pureza da solução foram realizadas usando cromatografia de filtração em gel, com coluna Biosep SEC-S3000 (600 x 7.8mm) (Phenomenex, Torrance, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **tabela 1**, resumimos as propriedades bioquímicas e biofísicas das preparações de imunoglobulinas produzidas. Para as análises foram utilizados os protocolos definidos pela Farmacopéia Européia e descritos pela Agência Regulatória Nacional (BRASIL, 2000).

A eletroforese mostrou um nível de pureza satisfatório, com 96,8 e 98,1% das proteínas migrando na região de gamaglobulinas (**figura 12**). A distribuição de subclasses de IgG, presentes nas amostras, são compatíveis com as presentes no soro normal (MORELL et al., 1972).

Figura 12. Eletroforetogramas de soluções de imunoglobulina polivalente (A) e anti-dengue (B) com bandas, correspondentes à fração gamaglobulina, de 96.8 e 98,1% respectivamente.



As IGIVs produzidas contêm traços de imunoglobulinas IgA e IgM, estas foram principalmente removidas por etapas de cromatografia de troca catiônica e aniônica, respectivamente. Alguns autores têm apontado que a administração de soluções de imunoglobulina, com quantidades significativas de IgA, pode causar reação anafilática grave em pacientes com deficiência de IgA (VYAS et al., 1968, BJORKANDER et al., 1987), razão pela qual a mesma foi removida.

Tabela 1. Caracterização das preparações de imunoglobulina

Análise	Valores de referência	IGIV polivalente	IGIV anti-dengue
pH	4,0 – 7,4	4,25	4,27
Concentração proteica	45 – 55 mg/mL	52,1 mg/mL	51 mg/mL
Pureza eletroforética	Mínimo de 95% de gamaglobulina	96,8%	98,1%
Polímeros e agregados	Mínimo de 90% de monômeros e dímeros	97,4%	97,9%
	Máximo de 3% de polímeros e agregados	1,3%	1,0%
IgA	-	0.13 mg/mL	0.16 mg/mL
IgM	-	0.18 mg/mL	0.10 mg/mL
Distribuição de subclasses	<i>Percentual</i>	<i>Percentual</i>	<i>Percentual</i>
IgG ₁	65 – 70	66	68
IgG ₂	20 – 25	22	19
IgG ₃	7 – 10	8	7
IgG ₄	3 – 6	4	6
Atividade anticomplementar (%)	≤ 50	46	39
Termoestabilidade (57 °C/4h)	Ausência de gelificação	Ausência de gelificação	Ausência de gelificação
Anti-HBs*	Mínimo de 0.5 IU/g	6.7 IU/g	1.24 IU/g
Pirôgenos	Ausente	Ausente	Ausente

* Anti-HBs = Anticorpos contra antígeno de superfície do vírus da hepatite B

A quantidade total de agregados presente nas preparações estão dentro dos limites aceitáveis. Dimerização de IgG e formação de agregados também estão associados ao aumento do risco de ocorrência de efeitos adversos (KROEZ et al., 2003). Esses agregados ligam-se e ativam componentes do sistema complemento e,

portanto, a determinação da atividade anticomplementar foi adotada rotineiramente. Nas preparações de IgG produzidas, o consumo de complemento não foi superior a 50%, como requerido pela Farmacopeia Europeia. Os produtos foram mantidos em pH 4.0 – 4.5, como é recomendado para manter a IgG em um estado não agregado (GELFAND, 2006). Inicialmente desenvolvida para produzir uma solução estável, a formulação em baixo pH também foi utilizada para desenvolver uma etapa de inativação viral ao final do processo de produção.

Foram realizadas duas etapas de inativação viral: tratamento com solvente/detergente e incubação em baixo pH. O tratamento com S/D é efetivo contra vírus envelopados (UEMURA et al., 1994; CHANG et al., 2000). A incubação em baixo pH também representa um robusto método de inativação de vírus envelopados, incluindo o HIV (BOS et al., 1998; OMAR et al., 1996; BIESERT, 1996; REID et al., 1988). Os produtos reagiram negativamente, ou seja, não foram reativos ao HCV, HIV₁ e HIV₂, HTLV, HBsAg, doença de Chagas e sífilis, que são importantes parâmetros de biossegurança.

Completando as análises bioquímicas e biofísicas, as amostras foram submetidas à prova de termoestabilidade, na qual nenhuma alteração, como gelificação ou floculação, foi observada. Os produtos, formulados em glicina (0.25 mol/L), demonstraram adequada osmolalidade.

5.1. Identificação de sorotipos anti-dengue

Uma vez que a IGIV anti-dengue foi cuidadosamente caracterizada, nós decidimos quantificar os anticorpos contra os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, presentes na preparação. A **tabela 2** apresenta estes dados.

Tabela 2. Títulos de anticorpos anti-dengue presentes na IGIV específica

Amostra*	DENV-1	DENV-2	DENV-3
Mistura de plasma inicial	1:160	1:640	1:40
IGIV anti-dengue	1:160	1:1280	1:160
Kiovig (IGIV comercial - USA)	1:40	1:40	< 1:20 (negativo)

* Os experimentos foram realizados em triplicata e de forma independente.
Os dados apresentados correspondem ao experimento médio.

A preparação de imunoglobulina específica apresentou nível elevado de anticorpos anti-dengue, com títulos de 1:1280 para DENV-2 e 1:160 para DENV-1 e DENV-3. Como a IGIV foi produzida usando o plasma, previamente triado, de uma área endêmica (CORDEIRO et al., 2007), este resultado era esperado. No Brasil, por ocasião da coleta das amostras, três sorotipos estavam em circulação, DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e com casos isolados de infecção por DENV-4 na Região Norte do país (Roraima, Manaus e Belém) (BRASIL, 2010, 2011a, 2011b). A ampla capacidade neutralizante sob os diferentes sorotipos virais confirmou a atividade funcional deste produto. Como esperado, a preparação comercial de IGIV - Kiovig (preparada a partir do plasma de doadores americanos) não apresentou títulos de anticorpos anti-dengue significativos.

A viabilidade de uma IGIV brasileira (com títulos elevados de anticorpos anti-dengue) para o tratamento da infecção por dengue, relaciona-se a aplicabilidade de IGIV específica para o tratamento de WNV (SAQUIB et al., 2008; WADEI et al., 2004; HALEY et al., 2003). Entretanto, a segurança do uso de uma preparação brasileira de IGIV em pacientes com infecção pelo DENV ainda precisa ser confirmada. A pré-existência de anticorpos heterólogos, na presença de uma nova infecção, por um sorotipo distinto, pode causar ADE (GUBLER, 2002; GUZMÁN, KOURI, 2004; ROSS, 2010; WILDER-SMITH et al., 2005). Sabendo que os quatro sorotipos do vírus existem no Brasil, estudos são necessários para verificar se a administração de IGIV brasileira, em paciente infectados por dengue, é segura ou pode causar ADE.

5.2. Imunoglobulina humana anti-dengue fragmentada da porção Fc

A determinação dos pesos moleculares e pureza da solução de fragmentos $F(ab')_2$ foi realizada usando cromatografia de filtração em gel. A preparação final contém 80% de fragmentos $F(ab')_2$ (~110 kDa) e cerca de 10% de pequenos fragmentos (< 50 kDa). Cerca de 8,5% da preparação possui peso molecular próximo à região de monômeros (IgG íntegra) (> 150 kDa) e apenas 1,5% possui peso molecular superior a 200 kDa.

A solução fragmentada da porção Fc possui pH final de 4.29 e concentração proteica igual a 51,4 mg/mL. Assim como sua preparação precursora, a solução de fragmentos $F(ab')_2$ não apresentou pirogênios.

Capítulo 2

Avaliação da eficácia e segurança do uso de preparações específicas de imunoglobulina no modelo de infecção primária pelo DENV-3

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados em colaboração com o laboratório de Interação Microrganismo/Hospedeiro do Departamento de Microbiologia da UFMG, integrante do Instituto Nacional de Pesquisa em Dengue (INCT em Dengue, CNPq).

6.1. Vírus

Neste trabalho foi utilizado o sorotipo 3 do vírus dengue (DENV-3) previamente adaptado ao hospedeiro murino como descrito em Costa e colaboradores (2012).

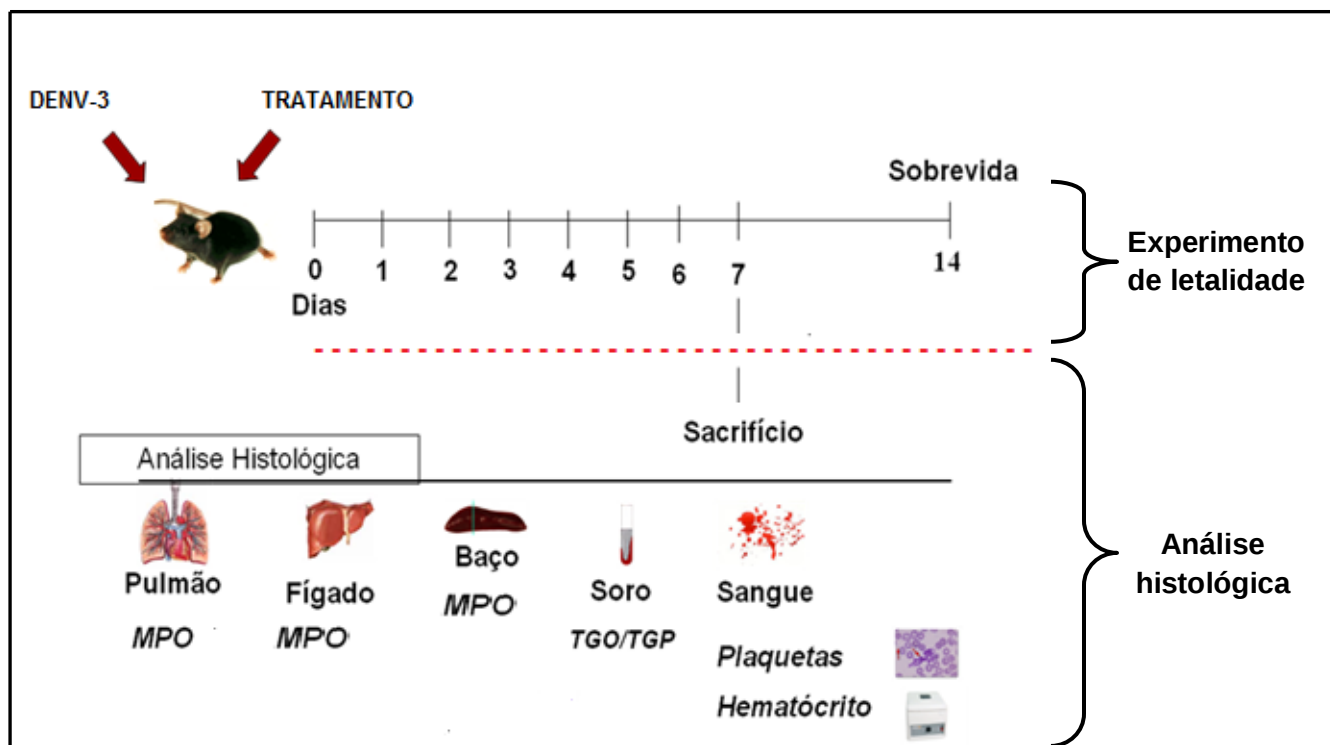
6.2. Animais e protocolos experimentais

Camundongos da linhagem C57BL/6j (8 a 10 semanas) machos ou fêmeas obtidos no centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas foram usados nesse trabalho. Estes animais foram mantidos em micro-isoladores com livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da UFMG (CETEA 113/ 2009).

Para indução da dengue experimental os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 100PFU/100µL de DENV-3 baseado na DL50 determinada em Costa e colaboradores (2012). Nos experimentos de letalidade, a mesma foi avaliada nos animais a cada 12 horas, durante 14 dias, após a inoculação do vírus (**figura 13**).

O tratamento com as IGVs foi realizado por via intravenosa. Diversos protocolos de administração foram realizados inicialmente, avaliando a curva de letalidade dos animais. Esses protocolos consistiram em dose única (4 horas antes ou 4 horas após a infecção) ou em administrações múltiplas (4 horas antes, 24 e 72 horas após), inicialmente na dose de 300mg/kg e, posteriormente, em diferentes doses (10, 30 ou 300mg/kg).

Figura 13. Estratégia experimental do estudo



Experimento de letalidade

1) Animais tratados com 300 mg/kg de IGIV anti-dengue:

Grupo A. Animais (n=6) tratados apenas com veículo (água e glicina 0,3 M);

Grupo B. animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue 4 horas antes da infecção;

Grupo C. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue 4 após a infecção;

Grupo D. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue 4 horas antes, 4 horas após e em administração múltipla (4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção).

2) Animais tratados com IGIV anti-dengue (4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção):

Grupo A. Animais (n=6) tratados apenas com veículo (água e glicina 0,3 M);

Grupo B. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue na dose de 10mg/Kg;

Grupo C. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue na dose de 30mg/Kg;

Grupo D. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue na dose de 300mg/Kg.

Análise histológica após tratamento com 10 mg/Kg 4 horas antes, 24 e 72 horas após infecção

Grupo A. Animais (n=6) não infectados;

Grupo B. Animais (n=6) tratados apenas com o veículo (água e glicina 0,3 M);

Grupo C. Animais (n=6) tratados com IGIV polivalente comercial (KIOVIG/ Baxter International Inc, USA);

Grupo D. Animais (n=6) tratados com IGIV anti-dengue.

6.3. Titulação do vírus Dengue

Células Vero foram crescidas em meio RPMI com 5% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona (2ug/mL), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50ug/mL). Em seguida tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas 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, quando então seus poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de baço foram pesadas, maceradas com “cadinho” e pistilo de porcelana estéreis e diluídas seriadamente em meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de sangue foram somente diluídas em meio RPMI. 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 RPMI com antibióticos na ausência de SFB.

As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C (período de adsorção) durante o qual foram 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 (“*tampão fosfato* – PBS”) (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO_4). Em seguida, foi adicionado 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 foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

6.4. Determinação dos níveis de citocinas

Para dosagem de citocinas, fragmentos de pulmão e baço, foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “*fluoreto de fenilmetilsulfonil*”, 0,1 mM “*cloreto de benzetônio*”, 10 mM “EDTA” e 20 KI aprotinina A) e 0,05% “*Tween 20*”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher

Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi usado para as dosagens, após centrifugação de 5.500 rpm, durante 10 minutos à 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O soro foi obtido a partir do sangue total (15 min à 37° C seguidos de 30 min à 4° C) por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e posteriormente armazenado à -20° C até análise posterior.

As amostras de soro, pulmões e baço foram analisadas na diluição 1:2 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, ao passo que as amostras de fígado foram analisadas na diluição 1:5 como previamente padronizadas em Costa e colaboradores (2012).

Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e CXCL1 foram medidos no baço, soro e pulmões (apenas CXCL-1) dos animais pela técnica de ELISA, utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante 18 horas à 4° C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma, Chemical Co., USA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) adicionados ao poços e incubados por 18 hs. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4000) e revelada com “OPD (*o*-fenilenodiamina dicloridrato” – Sigma Aldrich, St Louis, USA). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

6.5. Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase como descrito anteriormente (MATOS et al., 1999). Sumariamente, fragmentos de tecido dos animais infectados ou controles foram removidos e congelados a -20°C. Após o descongelamento, 1 g de tecido foi homogeneizado em 1,9 mL de tampão (pH 4,7) (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), e centrifugado a 5.500 rpm, por 15 minutos

(Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (15 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em tampão NaPO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de “*hexadeciltrimetilamônio* (HTAB)” 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3000 g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão NaPO_4 0,05 M na razão 1:3 (fígado) 1:10 (pulmão) e 1:20 (baço).

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspendido foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando “*tetrametilbenzidina*” (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos em unidades relativas.

6.6. Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício, 10 μL do sangue dos animais NI e infectados foram coletados da veia cava inferior e colocados em tubos heparinizados. Este volume foi diluído na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1%, o volume incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 10 μL colocados na câmara de Neubauer Bright-Line (Optik Labor, Bad Homburg, Germany). Após nova incubação de 15 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido (TCM 400 - LABOMED, Culver City, CA, USA) utilizando a objetiva de 40X.

6.7. Análise 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 (Perfecta), o qual foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito, rotação por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). 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:

Branco + Vermelho ----- 100%

Vermelho ----- X

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

6.8. Avaliação dos níveis das Transaminases Hepáticas no soro

O sangue de animais NI e infectados foi coletado pela veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. A dosagem das transaminases hepáticas foi realizada através de teste colorimétrico utilizando sistemas reagentes específicos para cada uma delas. A transaminase ALT foi dosada pelo Kit K035 Bioclin (Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 505 nm.

6.9. Análise Histopatológica

No sétimo dia após a infecção, os animais foram sacrificados e o fígado dos animais 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, os tecidos foram submetidos a subsequentes passagens em etanol em diferentes concentrações (80%, 90% e absoluto (2x) – 30 minutos cada), xilol (2x – 20 minutos cada) e em parafina líquida (2x – 30 minutos cada) (Paraplast – Sigma, Deisenhofen, Germany). Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina.

Cortes de 5 micrótomos (μm) de espessura foram 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). Em seguida, houve a desidratação (álcool 70, 80, 90% e absoluto (2x) – 5 imersões; xilol (2x) – 5 imersões) e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá sintético.

6.10. Análise estatística

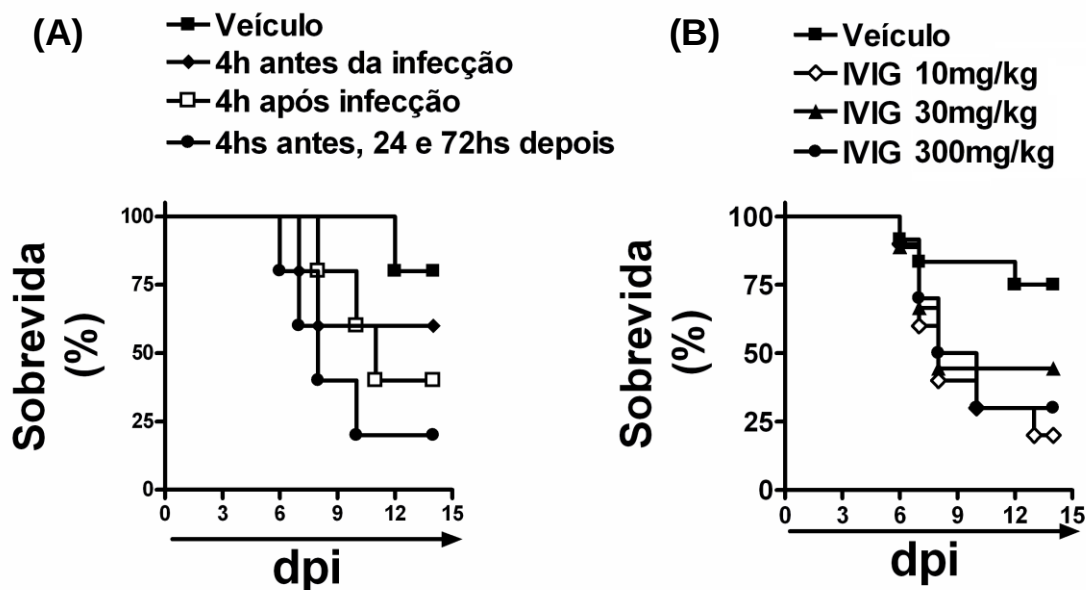
Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio (EPM). As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizado o teste t de student. Diferenças entre as curvas de sobrevida foram calculadas usando o teste *Log rank*. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

Foram avaliados os efeitos do tratamento de baixa dose (10 – 300mg/kg) da preparação de IGIV anti-dengue, no modelo de infecção primária pelo DENV-3. IGIV polivalente comercial (KIOVIG/ Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA) foi utilizada como controle dos experimentos.

Baseado no trabalho de Ben-Nathan e colaboradores (2003), buscou-se definir o melhor protocolo de tratamento com a IGIV anti-dengue. Para isso a dose de 300mg/kg foi escolhida e diferentes protocolos experimentais foram adotados para a avaliação da letalidade dos animais após a infecção pelo DENV-3 (vide metodologia). A **figura 14A** mostrou que nenhum dos protocolos experimentais adotados foi capaz de neutralizar ou impedir a letalidade dos animais frente à infecção pelo DENV-3 adaptado.

Figura 14. Efeito do tratamento com IVIG anti-dengue sobre a letalidade após a infecção primária com o DENV-3. (A) Diferentes grupos de camundongos da linhagem C57BL/6j (n=6 por grupo) foram tratados com 300 mg/kg de IVIG anti-dengue 4 horas antes, 4 horas após ou 4 horas antes + 24 e 72 horas após a infecção i.p com 100 PFU/100µL do DENV-3. A letalidade foi verificada a cada 12 horas durante 14 dias. (B) Camundongos (n=6 por grupo) foram tratados com diferentes doses de IVIG anti-dengue (10, 30 ou 300 mg/kg) 4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção i.p com 100 PFU/100µL do DENV-3. A letalidade foi verificada a cada 12 horas durante 14 dias. **Resultados são expressos como % de sobrevivência.** dpi = dias após a infecção. i.p = intraperitoneal.



O protocolo de tratamento 4h antes, 24 e 72 horas após a infecção com um inóculo de 100PFU de DENV-3, acarretou uma maior letalidade dos animais tratados com a IGIV anti-dengue, se comparada aos animais que receberam somente o veículo. Em seguida, buscamos então investigar se o tratamento com diferentes doses (dentro da categoria de baixa terapia) resultaria em maior letalidade dos animais. A **Figura 14B** mostra que não houve diferença significativa entre a taxa de letalidade dos animais submetidos ao tratamento com as doses de 10, 30 ou 300 mg/kg da IGIV anti-dengue.

Diante desses dados, decidiu-se investigar os motivos pelos quais os animais tratados com a IGIV anti-dengue apresentaram maior letalidade após a infecção pelo DENV-3. Para isso, foi utilizado o protocolo de tratamento de 4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção na dose de 10mg/kg de ambas as Imunoglobulinas (Kiovig e IGIV anti-dengue).

A **Figura 15** mostra que os animais tratados com IGIV anti-dengue apresentaram intensa alteração hematológica no sétimo dia após a infecção, demonstrado pelo aumento dos níveis de hematócrito e marcante queda no número de plaquetas circulantes (**Fig. 15A e 15B, respectivamente**).

Os animais tratados com Kiovig apresentaram alterações hematológicas importantes muito similares às encontradas nos animais tratados com IGIV anti-dengue (**Fig. 15A e 15B**). Entretanto, os animais tratados com IGIV anti-dengue apresentaram aumento muito importante, e mais significativo, nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (**Fig. 15C**), onde esse aumento foi condizente com a lesão hepática vista neste grupo (**Fig. 16**). Os painéis (D-F) mostram o intenso acúmulo de neutrófilos nos órgãos dos animais tratados com IGIV anti-dengue.

Nos animais tratados com KIOVIG, os níveis de atividade da mieloperoxidase (MPO) foram semelhantes aos níveis verificados no grupo que recebeu apenas o veículo, exceto no fígado dos animais tratados com KIOVIG, que apresentaram níveis mais elevados (**Fig 15D-F**).

Figura 15. Efeito do tratamento com IVIG anti-dengue (DV) após a infecção primária com DENV-3 (100 PFU/100 μ L). Camundongos (n=6 por grupo) foram tratados com 10mg/kg de IVIG anti-dengue ou Kiovig (IVIG CT), 4 horas antes + 24 e 72 horas após a infecção. Após 7 dias de infecção, os animais foram sacrificados e o sangue, baço, fígado e pulmão coletados para as seguintes análises: **(A)** Índice de hematócrito, expresso em porcentagem (%). **(B)** Número de plaquetas no sangue expresso em número de plaquetas X 10³ μ L de sangue. **(C)** Níveis da transaminase hepática ALT no soro, apresentados em U/mL de soro, **(D-F)** análise da atividade da MPO. Os resultados são apresentados como unidades relativas por 100mg de tecido. Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. **NI-não infectado.** * para p< 0.05, quando comparado aos animais NI. # para p< 0.05, quando comparado ao grupo infectado com inóculo subletal. ## para p< 0.05, quando comparado ao grupo IVIG CT.

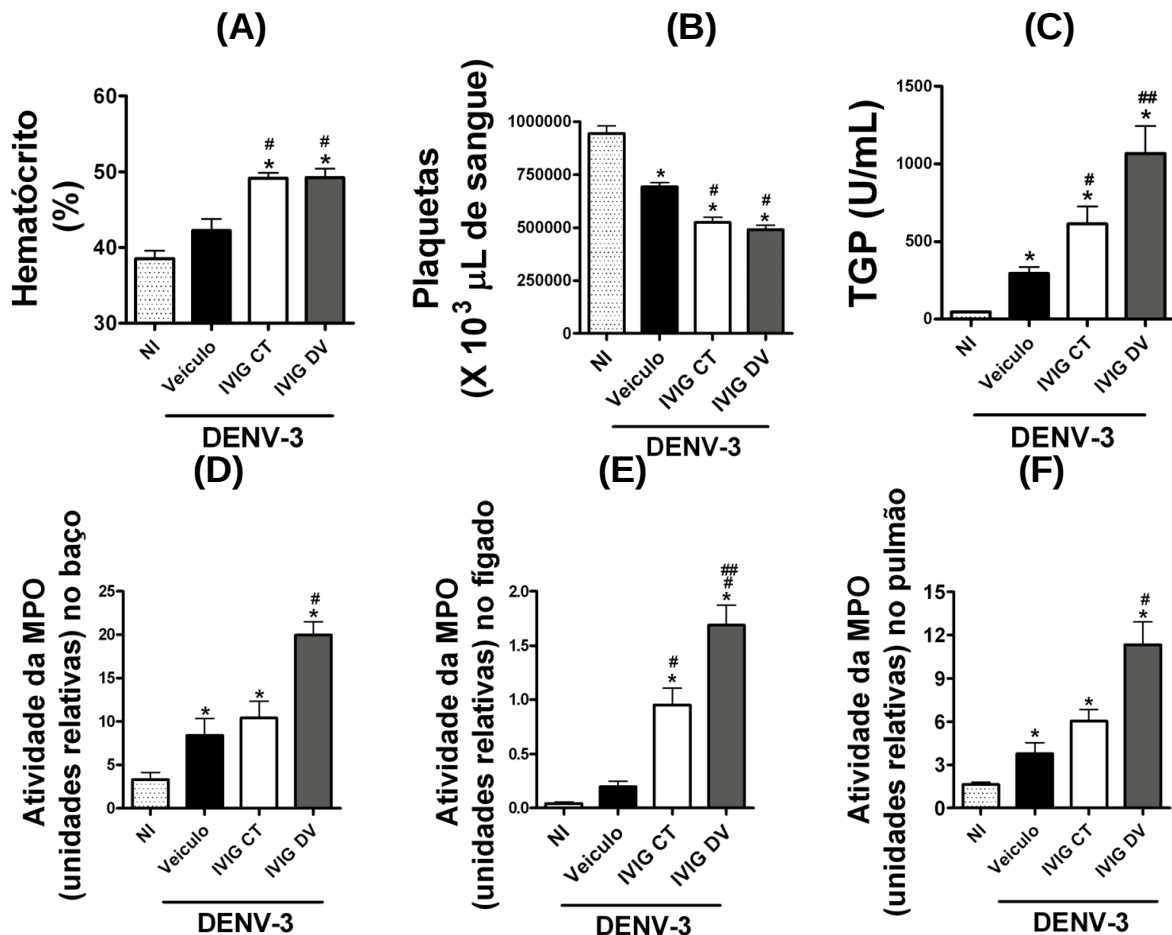
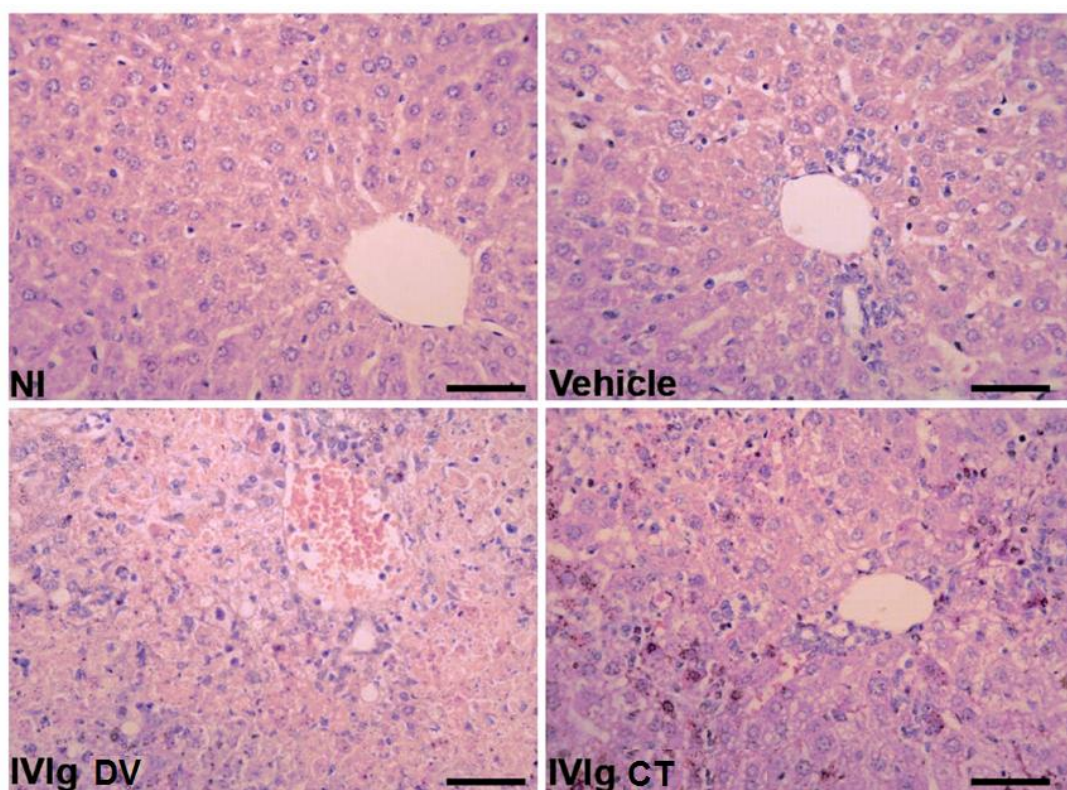


Figura 16. Análise histológica do tecido hepático após tratamento com a IVIG anti-dengue (DV) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100 μ L). Camundongos (n=6 por grupo) foram tratados com 10mg/kg de IVIG anti-dengue ou Kiovig (**IVIG CT**), 4 horas antes + 24 e 72 horas após a infecção. Após 7 dias de infecção, os animais foram sacrificados e o fígado foi coletado, processado e os cortes corados pela técnica de H&E para análise histopatológica. As figuras são representativas de um animal de cada grupo. **NI- não infectado.**



Corroborando os dados de maior letalidade, assim como maior manifestação da doença, os animais tratados com a IGIV anti-dengue apresentaram elevados níveis de todas as citocinas avaliadas (IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-10) assim como da quimiocina CXCL-1. Já nos animais tratados com KIOVIG, os níveis dessas citocinas foram mais semelhantes às observadas nos animais que receberam o veículo, exceto para TNF- α que esteve mais aumentado nos animais que receberam a KIOVIG (**Fig. 17**).

Finalizando as análises, a carga viral no baço e no sangue dos camundongos tratados com a IGIV anti-dengue, KIOVIG ou com o veículo foi realizada. A **Figura 18** mostra a elevada carga viral tanto no baço quanto no sangue dos animais tratados com a IGIV anti-dengue. No baço a diferença foi superior a 2 log, em relação aos animais tratados com o veículo. Os animais que receberam KIOVIG também apresentaram níveis muito elevados de carga viral em ambos os sítios analisados. Os valores nesse grupo foram similares aos encontrados nos animais tratados com a IGIV anti-dengue.

Figura 17. Concentração das citocinas após tratamento com IVIG anti-dengue (DV) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100 μ L). Camundongos da linhagem C57BL/6j (n=8 por grupo) foram tratados com 10mg/kg de IVIG anti-dengue (DV) ou KIOVIG (IVIG CT) 4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção. Após 7 dias de infecção, os animais foram sacrificados e o baço, pulmão e soro coletados para análise por ELISA da concentração das citocinas IL-6 (A), TNF- α (B e G) e IFN- γ (D e H), IL-10 (E) da quimiocina CXCL-1 (C e F). Houve aumento dos níveis de citocinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10) e da quimiocina CXCL-1). Os resultados são expressos por pg/100mg de tecido ou pg/mL de soro. NI = não infectado. i.p = intraperitoneal. ND = não-detectável. Todos os resultados são expressos como média $\pm$ SEM e são representativos de pelo menos 2 experimentos. * para $p < 0.05$, quando comparado aos animais NI. # para $p < 0.05$, quando comparado ao grupo infectado com inóculo subletal. ## para $p < 0.05$, quando comparado ao grupo KIOVIG (IVIG CT).

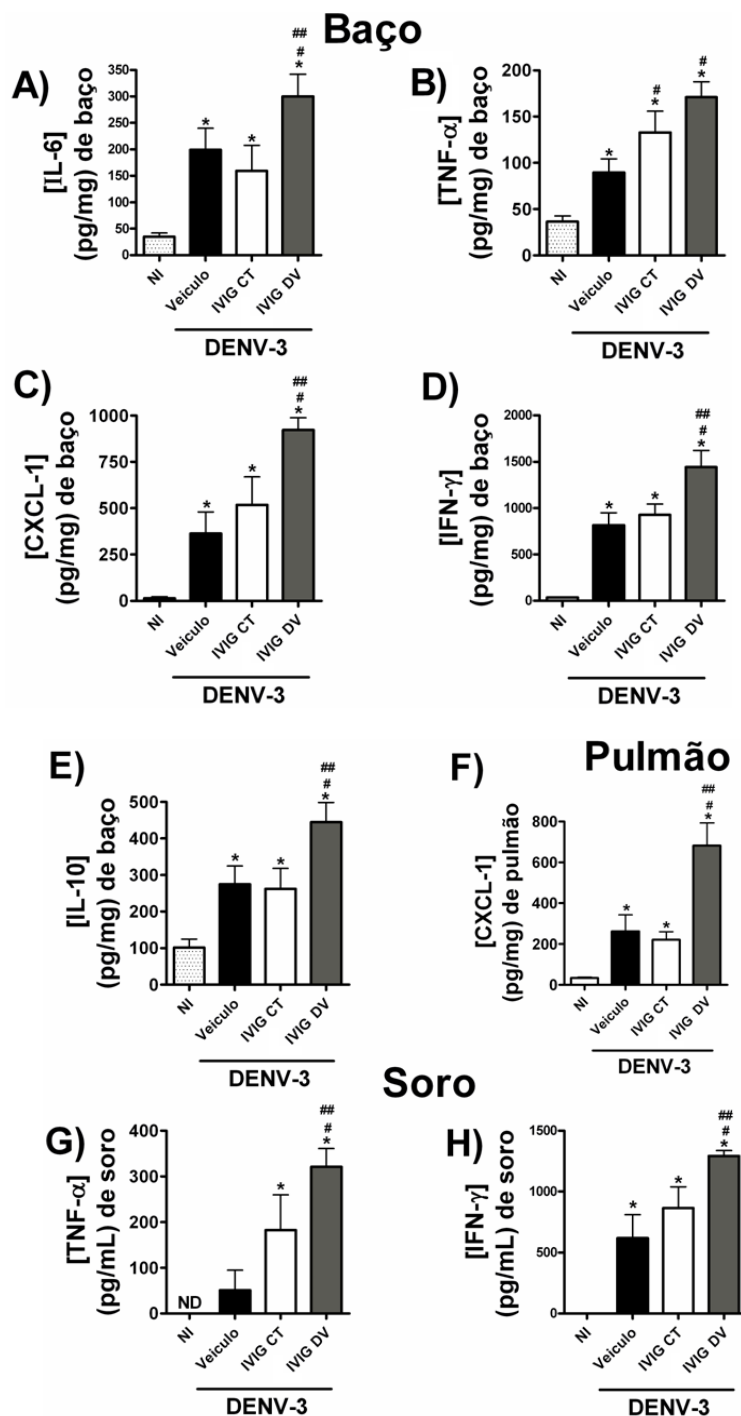
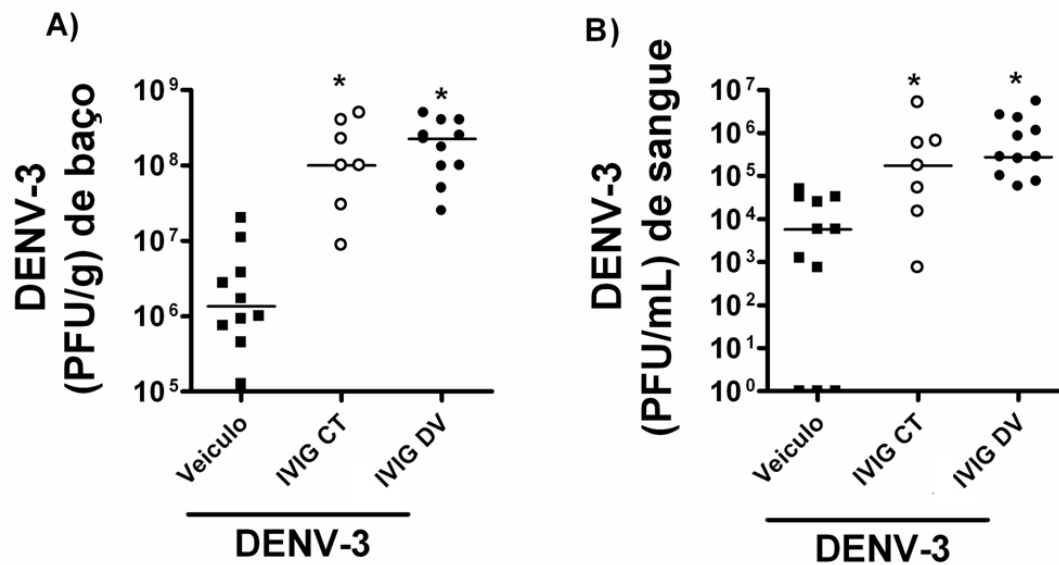


Figura 18. Carga viral no baço e sangue após tratamento com IVIG anti-dengue (DV) ou KIOVIG (IVIG CT) em animais infectados com DENV-3 (100 PFU/100 μ L). Camundongos da linhagem C57BL/6j (n= 7-11 por grupo) foram tratados com 10mg/kg de IVIG anti-dengue (DV) ou KIOVIG (IVIG CT) 4 horas antes, 24 e 72 horas após a infecção. Após 7 dias de infecção, os animais foram sacrificados e o baço e sangue coletados para o ensaio de titulação viral. (A) carga viral no baço representada por log do PFU/g de baço e (B) viremia expressa por log de PFU/mL de sangue. i.p = intraperitoneal. **ND = não-detectável**. Resultados expressos como mediana. * para $p < 0.05$, quando comparado com o grupo veículo.



8. DISCUSSÃO

Uma das grandes limitações para a criação de modelos experimentais de dengue decorre da dificuldade de isolados do vírus DENV infectarem e replicarem-se no hospedeiro murino. Nesse trabalho, foram utilizados isolados de DENV-3 adaptados ao camundongo (SOUZA et al, 2009), que reproduzem em grande parte a doença grave (FHD/SCD) vista em humanos. Esses modelos de infecção primária têm permitido o estudo de diversas moléculas bem como dos mecanismos de proteção e/ou doença associados à infecção pelo Dengue (ATRASHEUSKAYA et al, 2003; SOUZA et al, 2009; ASSUNÇÃO-MIRANDA et al, 2010; GUABIRABA et al, 2010; FAGUNDES et al, 2011; COSTA, 2012).

Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que a maioria dos casos de dengue grave está relacionada a indivíduos que sofreram infecção secundária heteróloga ao sorotipo inicial ou é decorrente de crianças nascidas de mães imunes a um ou mais sorotipos do DENV. O fenômeno da ADE é considerado então o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de dengue grave (GUZMAN et al, 2002; HALSTEAD et al, 1979; FAGUNDES et al, 2011). Entretanto, pouco se sabe a respeito deste mecanismo *in vivo* e sua real contribuição com a fisiopatologia da doença. Até o presente momento, apenas dois estudos foram publicados demonstrando a ocorrência desse fenômeno em camundongos *in vivo* (BALSITIS et al, 2010; ZELLWEGGER et al, 2010).

A administração passiva de anticorpos específicos tem se mostrado uma importante terapia no tratamento ou mesmo na modificação do curso de um grande número de infecções por diferentes *Flavivirus*, incluindo a infecção pelo vírus da Encefalite Japonesa (KURODA, YASUI, 1988; ROEHRIG, et al., 2001), pelo vírus da Encefalite de Murray Valley (KURODA, YASUI, 1988; BROOM et al., 2000), do vírus da encefalite de Saint Louis (KURODA, YASUI, 1988; MATHEWS, ROEHRIG, 1984), do vírus do Oeste do Nilo (BEN-NATHAN et al., 2003), bem como do vírus da febre amarela cepa 17D (SCHLESINGER, BRANDRISS, WALSH, 1985). Entretanto, evidências a cerca dos efeitos do tratamento com *pools* de imunoglobulina humana na infecção por dengue são bastante escassas e controversas (RAJAPAKSE, 2009).

Utilizando o modelo de infecção primária sistêmica pelo DENV-3 buscou-se verificar os efeitos do tratamento de baixa dose de uma IGIV específica. Os resultados são sugestivos de ocorrência do fenômeno ADE nos camundongos

tratados com IGIV anti-dengue. Esses animais apresentaram exacerbação de todos os parâmetros clínicos, bioquímicos e virológicos descritos anteriormente para os animais tratados com anticorpos específicos. De maneira interessante, os animais tratados com a IGIV anti-dengue também apresentaram níveis da citocina IL-10 bastante aumentados. Assim como para o TNF- α , elevados níveis de IL-10 no soro de pacientes, também foram associados a manifestações mais graves da doença em humanos (CHATURVEDI et al, 2000; CHEN et al, 2006; NGUYEN et al, 1997).

Corroborando os dados em humanos, em um estudo *in vitro* com o vírus Ross River, Mahalingam e Lidbury (2002) descreveram que a facilitação da infecção e principalmente o aumento da replicação viral nas células da linhagem fagocítica mononuclear não estavam apenas associados com os processos extrínsecos relacionados à adsorção do vírus, mas também com o aumento da produção de IL-10 e consequente supressão de importantes mecanismos intracelulares relacionados com a produção de mediadores antivirais, como os IFNs do tipo I e o óxido nítrico. Mais recentemente, Chareonsirisuthigul, Kalayanaroj e Ubol (2007), descreveram esse mesmo perfil de subversão de mecanismos intracelulares, induzida por anticorpos, em células humanas da linhagem THP-1 frente à infecção pelo DENV-2. O tratamento com KIOVIG (Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA) causou a exacerbação dos parâmetros hematológicos e da carga viral, semelhantes aos vistos nos animais que receberam a IGIV anti-dengue. Por se tratar de uma preparação importada, proveniente de área não endêmica para DENV, os títulos encontrados para os sorotipos do vírus dengue não foram significativos (**tabela 2**). Sendo assim, a exacerbação dos parâmetros observados, após tratamento com KIOVIG, deva-se, provavelmente, a existência de anticorpos para outros *Flavivírus*, a exemplo do Vírus do Oeste do Nilo, que estejam permitindo a ocorrência de fenômeno de ADE, de menor intensidade, nesses animais.

A fim de alcançar um estado de imunidade frente à infecção por DENV e afastar a possibilidade de ocorrência de ADE foi produzida uma preparação intravenosa de fragmentos F(ab')₂ de IgG anti-dengue (seção 4.4). Estes fragmentos mantêm a capacidade de formar complexos antígeno-anticorpo, retendo assim o potencial de neutralização viral, entretanto, por serem desprovidos da porção Fc eliminam a possibilidade de ocorrência de ADE, fenômeno dependente desta porção. A avaliação da eficácia do uso dos fragmentos F(ab')₂, no modelo de infecção primária pelo DENV-3, ainda será conduzida.

Capítulo 3

Avaliação do uso de imunoglobulina polivalente para o tratamento da cardiomiopatia chagásica em modelo animal infectado cronicamente com o *T. cruzi*.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

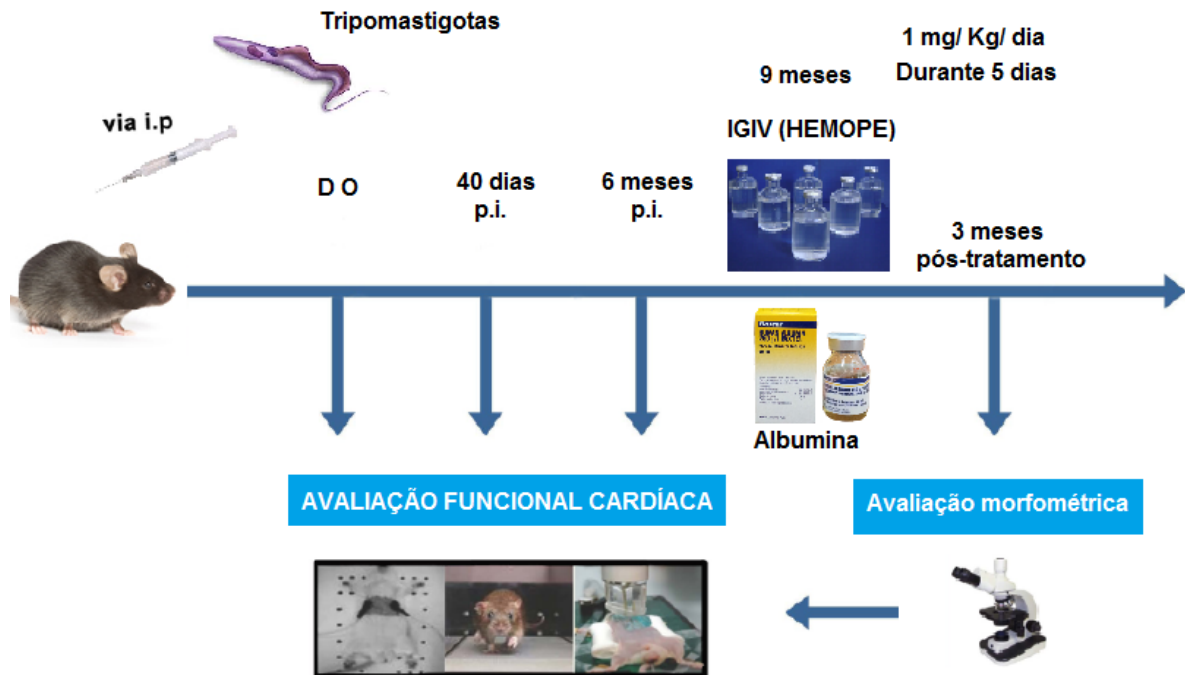
9.1. Desenho do estudo experimental

Este projeto experimental foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC), Hospital São Rafael, Salvador – BA (número de protocolo 245/ 2009, protocolo de renovação). Trinta camundongos da linhagem C57BL/6, pesando entre 23 - 28 g, sexo feminino, foram obtidas do biotério central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas–SP. Os camundongos foram randomizados em 3 grupos: grupo controle (n=10), grupo albumina (n=10) e grupo imunoglobulina (n=10).

Não foi realizado nenhum tipo de tratamento nos animais do grupo controle, enquanto que nos outros dois grupos (albumina e imunoglobulina) foram inoculadas, por via intraperitoneal, 1.000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. No 15º dia pós infecção foi realizada leitura em microscópio óptico com a finalidade de acompanhamento da parasitemia. No 40º e 180º dias pós-infecção, todos os animais foram submetidos à avaliação funcional cardíaca, que consistiu na realização de eletrocardiograma, ecocardiograma e teste ergométrico. Após 9 meses da infecção, os animais do grupo imunoglobulina receberam dose de 1 mg/kg/dia da imunoglobulina humana polivalente (HEMOPE), diluída em salina, durante 5 dias, por via intraperitoneal. Os animais do grupo albumina receberam 1mg/kg/dia de albumina humana (Albumina Sérica Humana Normal a 20% - Baxter Bioscience) diluída em salina durante 5 dias, também por via intraperitoneal.

Três meses após o uso de imunoglobulina ou albumina, os animais dos 3 grupos realizaram nova avaliação funcional cardíaca, sendo posteriormente sacrificados e submetidos à avaliação morfométrica e dosagem de citocinas (**Figura 19**).

Figura 19. Desenho do estudo experimental.



9.2. Animais

Trinta camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram mantidos no biotério do CBTC (Centro de Biotecnologia e Terapia Celular) com água e comida *ad libitum*, sob condições ideais de temperatura e luminosidade. Todo o protocolo foi acompanhado por veterinário do biotério do CBTC, e as manipulações foram feitas de acordo com as normas de manipulação de animais do *National Institutes of Health* (NIH).

9.3. Infecção de camundongos por *T. cruzi*

Vinte camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade foram inoculados por via intraperitoneal com 1.000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (FEDERICI et al, 1964), obtidos do sobrenadante de cultura de células da linhagem LCC-MK2 infectadas. A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica. Os níveis parasitêmicos dos camundongos infectados foram acompanhados a partir do 15º dia pós-infecção pela contagem em

microscópio óptico dos parasitos presentes em 50 campos (magnitude de 400x) em uma lâmina contendo 5 µl de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberto com uma lamínula 24 x 24 mm (MELO et al., 1978).

9.4. Esquema de tratamento

Visando explorar os efeitos imunomodulatórios da IgG, para esta fase do trabalho, foi utilizada a preparação de imunoglobulina polivalente humana produzida no HEMOPE, cuja produção foi descrita na seção 4.1.

Dez camundongos chagásicos crônicos (com 9 meses de infecção) foram alocados no grupo imunoglobulina e receberam uma administração de 1 mg/kg/dia em salina durante 5 dias, por via intraperitoneal. Outros 10 camundongos com mesmo tempo de infecção receberam solução contendo 1 mg/kg/dia de albumina humana (Albumina Sérica Humana Normal à 20% - Baxter Bioscience) em salina durante 5 dias, também por via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados durante este período para observar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos.

9.5. Avaliação eletrocardiográfica (ECG)

As análises do ECGs incluíram a mensuração da frequência cardíaca, além das medidas dos intervalos PR e QT corrigido e, a avaliação quanto à presença de distúrbios de condução e arritmias. A fim de minimizar as interferências do ambiente sobre os registros foi utilizado um filtro de corte de 0,1 a 1 Hz (ROCHA et al., 2006).

Como os ECGs de roedores não apresentam a onda T separada do complexo QRS (BESTETTI et al., 1990), o intervalo QTc foi mensurado no lugar da duração do complexo de QRS. O intervalo de QT foi medido utilizando como referência o início do complexo QRS e o final da onda T. Para encontrar o QTc, utilizou-se a medida do QT dividida pela raiz quadrada do intervalo RR.

Após a indução de anestesia utilizando o sistema de isofluorano (0,5 a 2%), foi iniciada a aquisição dos registros eletrocardiográficos. Os registros de eletrocardiogramas foram adquiridos usando um equipamento Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, Australia), que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador e analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia).

9.6. Avaliação funcional por ergometria

Dentre os parâmetros que avaliam o grau de acometimento do coração na CCC, a tolerância ao esforço é o de maior significado. O teste ergoespirométrico é um exame importante na avaliação funcional cardíaca em geral. Quando comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes cardiopatas habitualmente apresentam menor tempo de exercício e distância percorrida.

Quanto aos parâmetros espirométricos, no início do exercício, observa-se que a produção de CO_2 aumenta linearmente com o consumo de O_2 , mantendo uma relação VCO_2/VO_2 (também chamada de quociente respiratório) próxima de 1. Com a progressão do esforço, a produção de CO_2 ultrapassa o consumo de O_2 , e começa a haver aumento do QR, que é um indicador do substrato energético utilizado pelo organismo.

Para os estudos de ergometria foi utilizado o equipamento LE 8700 – CO (Panlab, Barcelona, Espanha), com fluxo de ar na câmara controlado por um trocador de gases (LE 400, Panlab). A amostra de gases foi levada por um circuito fechado ao analisador de gases (OXYLET 00, Panlab), sendo os dados enviados ao computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital (ML 820, PowerLab, ADInstruments, Austrália). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System.

Os animais foram colocados na esteira 20 minutos antes de iniciar o exercício. A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com modificação do estágio a cada 5 minutos, com incrementos na velocidade de 6 cm/s. Os testes foram realizados até os animais entrarem em exaustão, caracterizada pela permanência por 5 segundos ou mais na área de choque. Os parâmetros avaliados foram tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final, estágio máximo alcançado, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono, quociente respiratório e gasto energético.

9.7. Avaliação funcional por ecocardiograma transtorácico

O ecocardiograma transtorácico é um exame complementar de baixo custo, que fornece informações fundamentais sobre a função ventricular esquerda e direita, sistólica e diastólica, sobre os volumes e diâmetros das cavidades cardíacas, sobre o funcionamento das válvulas, dentre outras. Na CCC, em sua forma dilatada,

observa-se disfunção ventricular de grau variados, associada à dilatação de câmaras cardíacas, marcadamente do ventrículo esquerdo.

Para aquisição das imagens foi utilizado equipamento desenhado para pequenos roedores, o Vevo da Visual Sonics (Toronto, Canadá), que dispõe de transdutor de 30 Mhz e propicia elevado detalhamento da anatomia cardíaca. Os exames foram gravados no disco rígido do próprio equipamento.

Para a realização do estudo ecocardiográfico os animais foram anestesiados com isoflurano (0,5 a 2%) por via inalatória, sendo controlada a concentração do anestésico ofertado pela frequência cardíaca, que deveria manter-se acima de 350 bpm (STYPMANN et al., 2007). Apesar de o anestésico deprimir a frequência cardíaca, a relação frequência cardíaca/fração de encurtamento mantém-se constante (ROTTMAN et al., 2007). Anestesiado, o animal foi colocado em decúbito dorsal em mesa móvel, facilitando a aquisição da imagem nas diferentes janelas acústicas, e aquecida a 37° C, com o intuito de evitar hipotermia. A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas os modos unidimensional (modo-M) e bidimensional, e o doppler pulsado.

A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada utilizando as janelas paraesternal longitudinal, paraesternal transversal e paraesternal direita. O diâmetro ventricular foi mensurado em cinco ciclos cardíacos seguidos.

9.8. Avaliações histológica e morfométrica

Após eutanásia dos animais, os corações e fragmentos de músculo esquelético foram removidos e fixados em formalina 4%, para processamento histológico. Secções dos corações e dos músculos dos animais foram coradas por hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de campo claro, para a contagem de células inflamatórias, ou por tricrômio de Masson, para a avaliação do percentual de fibrose.

As quantificações foram realizadas em cortes de coração inteiro depois de escaneamento das lâminas utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista, CA). As imagens foram analisadas com o programa Image Pro Plus (versão 7.0, Media Cybernetics, San Diego, CA).

9.9. Avaliação por imunofluorescência

As quantificações foram realizadas em cortes de coração inteiro depois do escaneamento das lâminas utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista). Secções de 4 µm foram desparafinizadas (xilol 1 e 2 - 10 minutos cada), reidratadas (álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70%, álcool 30% e água destilada - 5 minutos cada) e submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato (Zymed, San Francisco, CA) à temperatura controlada (95° - 98°C) por 20 minutos. Após esfriar, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas 10 minutos com *background blocker* (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA) para bloqueio das ligações inespecíficas e incubadas com anti-IgG humana conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, MD, USA) por 12 h a 4° C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS Tween 20 0,05%, contracoradas com azul de Evans 0,001% (10 minutos) e lavadas com PBS. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro utilizando-se o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) contendo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) para marcação dos núcleos. As imagens foram obtidas em microscópio confocal Fluoview 1000 (FV 1000, Olympus, Japão).

9.10. Avaliação das concentrações de citocinas

O perfil de citocinas, produzido nos diferentes grupos experimentais, foi analisado em amostras de soro dos animais usando o kit Bio-Plex de citocinas para camundongos (Bio-Rad, Richmond, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisadas as seguintes citocinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES e TNF- α .

As amostras de soro, diluídas 1:4, assim como as citocinas recombinantes, foram incubadas com microesferas fluorescentes ligadas a anticorpos, e depois com o anticorpo de detecção conjugado com biotina, seguido de incubação com estreptavidina-ficoeritrina. As microesferas foram contadas no Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Richmond, CA), sendo os dados analisados com auxílio do software Bio-Plex Manager.

Foram mensuradas as concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 em extrato de coração. As proteínas do coração foram extraídas de 100 mg de tecido/mL em solução salina e adicionados 0,4 mmol/L de cloreto de sódio, 0,05% Tween 20, e inibidores da protease (0,1 mmol/L de fenilmetilsulfonilfluoride, 0,1 mmol/L cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de ácido etilenodiaminotetracético e 20-KI A/100 aprotinina mL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 g, com manutenção dos sobrenadantes congelados a 70° C. As concentrações de citocinas no extrato foram estimadas usando kits de ensaio imunoenzimático TNF- α , IFN- γ e IL-10 (R & D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi revelada após incubação com conjugado de estreptavidina-peroxidase, seguido por detecção utilizando 3,3' 5,5' - tetrametilbenzidina e da leitura em 450 nm.

9.11. Análise estatística

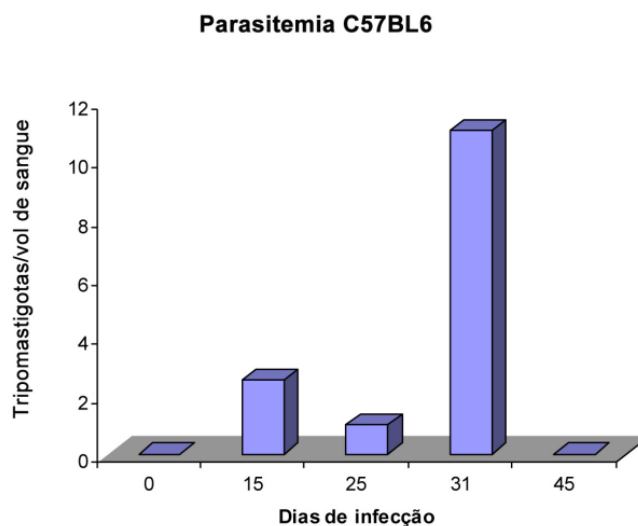
As variáveis eletrocardiográficas (IPR, QTc e FC) foram comparadas pelo one-way ANOVA com pós-teste Tukey nos grupos controle, albumina e imunoglobulina. O teste de Fisher foi utilizado para comparar a frequência da arritmia entre os animais tratados e não tratados com imunoglobulina. Variáveis ecocardiográficas avaliadas sequencialmente no mesmo animal foram comparadas entre os grupos por ANOVA de medidas repetidas (repeated measures) com o pós-teste Tukey nas avaliações ecocardiográficas. O teste t de *student* não pareado foi utilizado na ergometria, ecocardiografia e histopatologia para comparar os animais crônicos com os controles não infectados de mesma idade e, para comparar os animais chagásicos crônicos dos dois grupos. A avaliação das citocinas foi feita através do teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Neuwan-Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Os dados obtidos foram avaliados considerando distribuição paramétrica com o auxílio dos programas Graphpad Prism 5 (2007) e BioCalc.

10. RESULTADOS

10.1. Caracterização do modelo de cardiomiopatia chagásica crônica

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 1.000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A contagem das formas tripomastigotas no sangue foi realizada em diferentes dias pós-infecção, tendo sido observado o pico de parasitemia por volta do 30º dia (**Figura 20**).

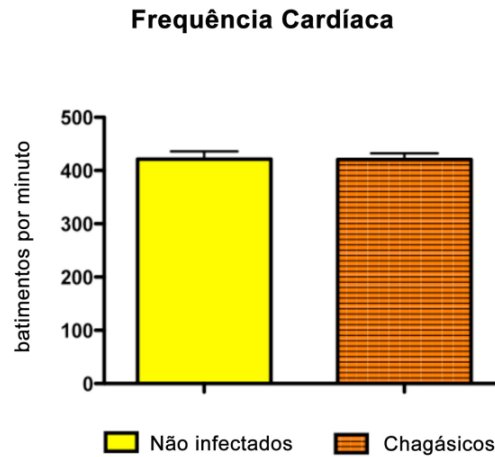
Figura 20. Avaliação da infecção aguda, pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, através da análise da parasitemia.



10.1.1. Avaliações eletrocardiográficas

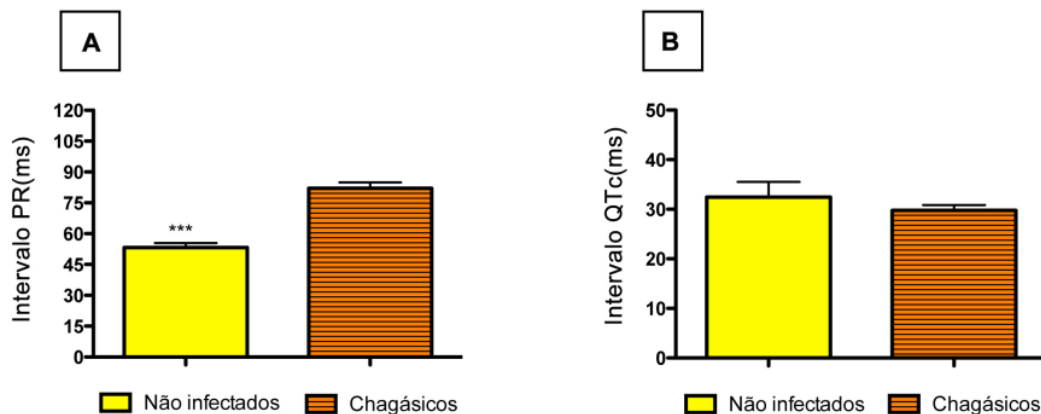
Para esta análise foram utilizados os dados eletrocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação dos intervalos medidos. Avaliada de forma isolada a frequência cardíaca (FC), entre os animais não infectados (n=9) e chagásicos (n=19), não observamos diferença com significância estatística, com FC: $421,3 \pm 14,53$ bpm no grupo não infectado e FC: $420,7 \pm 11,55$ bpm nos animais chagásicos (IC 95%: -39,71 - 0,41; $p = 0,97$) (**Figura 21**).

Figura 21. Avaliação da frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos. Resultados são expressos como a média $\pm$ SEM de 9 animais não infectados e 19 animais chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção).



O prolongamento do intervalo PR, que indica o retardo na condução entre os átrios e os ventrículos, não foi observado nos animais chagásicos crônicos, que tiveram duração do intervalo PR maior do que os animais não-infectados ($73,53 \pm 5,34$ ms $\times$ $58,56 \pm 16,37$ ms; IC 95% = -32,93 - -2,98; $p=0,098$), porém sem atingir significância estatística (**Figura 22A**). Não houve diferença entre os animais dos dois grupos quanto à duração do intervalo QTc ($29,84 \pm 2,34$ ms $\times$ $28,5 \pm 3,11$ ms; IC 95% = -9,43-6,74; $p=0,73$) (**Figura 22B**).

Figura 22. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos. Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos não-infectados e chagásicos (6 meses pós-infecção). Resultados expressos como a média + SEM de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos.



Os animais não-infectados (n=9) não apresentaram arritmias cardíacas as quais foram observadas nos animais chagásicos crônicos. Dos 19 animais infectados crônicos 3 evoluíram para ritmo de BAVT e 5 evoluíram com diversas bradiarritimias (**Figuras 23 e 24**).

Figura 23. Traçados eletrocardiográficos. (A) ECG de camundongo não-infectado. Observam-se todos os complexos QRS precedidos por onda P, com intervalo PR normal. (B) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 2o grau Mobitz tipo II. Os intervalos PRs são constantes, com presença de uma onda P bloqueada (*), não seguida de QRS. (C) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 3o grau, no qual onda P (**) e QRS não se correlacionam; os átrios e os ventrículos estão dissociados. (D) ECG de camundongo chagásico, com evidência de ritmo juncional, no qual se observa onda P (***) retrógrada, localizada após o QRS.

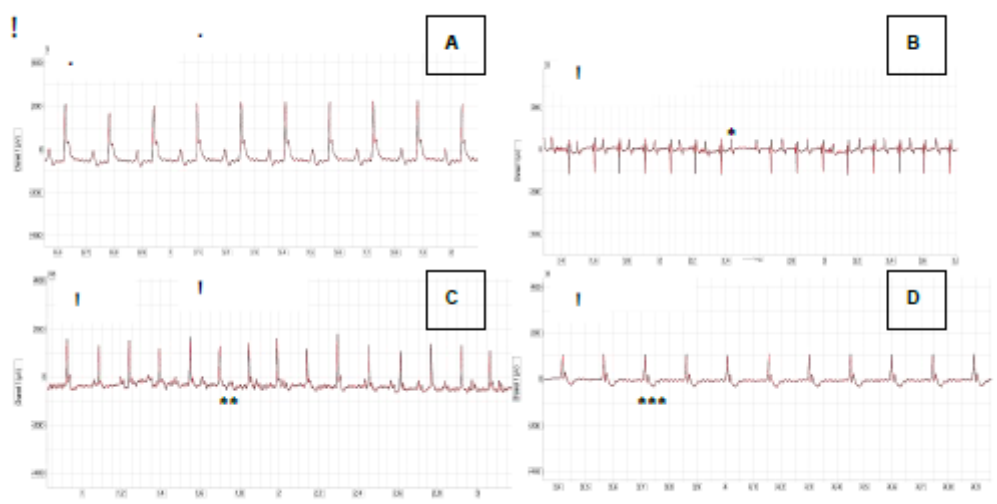
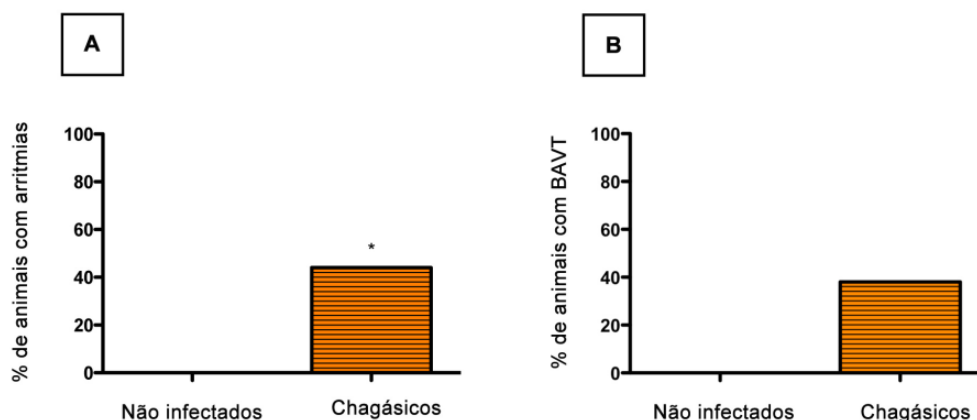


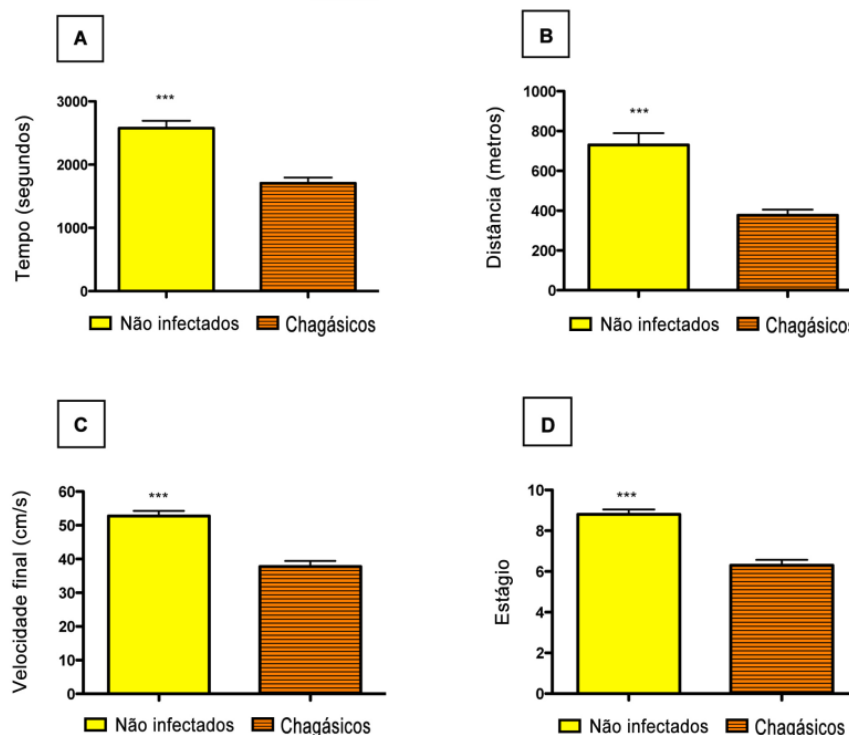
Figura 24. Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos. Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos não-infectados e em chagásicos crônicos (6 meses). Resultados expressos em percentuais de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos. * $p < 0,05$.



10.1.2. Avaliações ergométricas e respirométricas

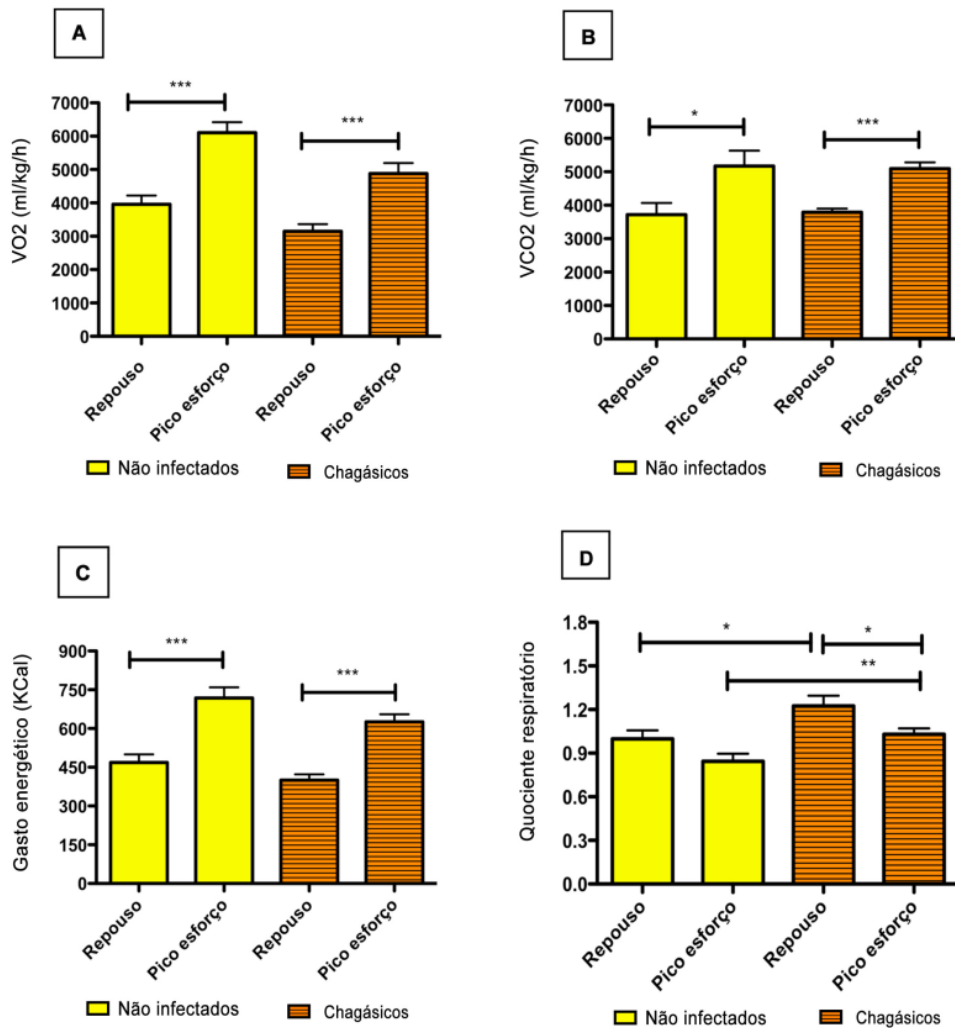
Para esta análise foram utilizados os dados eletrocardiográficos e respirométricos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. O tempo de exercício ($2.577 \pm 117,3$ s $\times$ $1.688 \pm 83,95$ s; IC 95%: 587,1-1.190; $p = <0,0001$), a distância percorrida ($730,4 \pm 59,19$ m $\times$ $348,6 \pm 25,73$ m; IC95%: 269,7-493,8; $p = <0,0001$), o estágio alcançado ($8,8 \pm 0,25 \times 6,18 \pm 0,28$; IC95%:1,69-3,55; $p = <0,0001$) e a velocidade final atingida ($52,8 \pm 1,50$ cm/s $\times$ $37,09 \pm 1,70$ cm/s; IC95%:10,12-21,3; $p = <0,0001$) foram maiores entre os animais não-infectados, quando comparados aos animais chagásicos (**Figura 25**).

Figura 25. Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção). (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos. *** $p < 0,0001$.



Os animais não infectados e chagásicos tiveram um aumento nos valores de VO_2 , VCO_2 e gasto energético com a progressão do esforço, com significância estatística, porém não foi detectada diferença entre os dois grupos nestes parâmetros. Os valores de QR, tanto em repouso quanto no pico do esforço, foram maiores nos animais chagásicos que tiveram uma discreta queda no QR no pico do esforço, o que não ocorreu nos animais não-infectados (**Figura 26**).

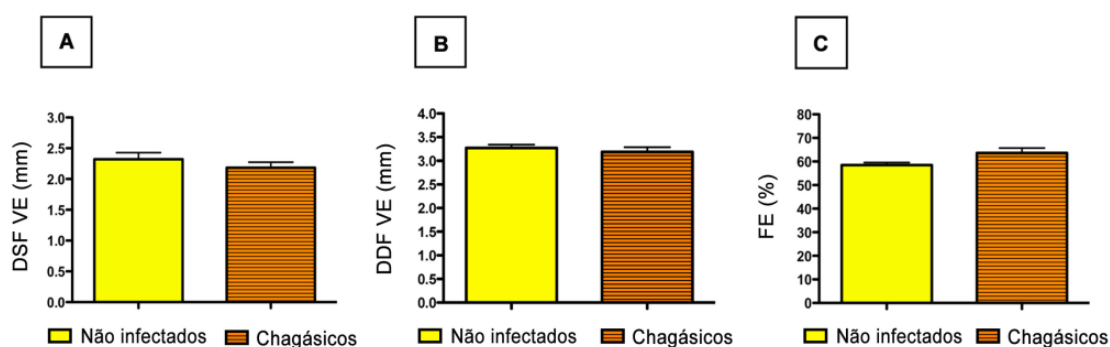
Figura 26. Avaliação dos dados respirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos. (A) VO_2 . (B) VCO_2 . (C) Gasto energético. (D) Quociente respiratório. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos. * $p < 0,05$. ** $p < 0,001$. *** $p < 0,0001$.



10.1.3. Avaliações ecocardiográficas

Para esta análise foram utilizados os dados ecocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de camundongos não-infectados e o de chagásicos crônicos, quando avaliados fração de ejeção ($63,89 \pm 3,68 \% \times 66,5 \pm 3,39 \%$; IC95%:-14,33-9,11; $p=0,64$), diâmetro diastólico ($3,27 \pm 0,07 \text{ mm} \times 3,05 \pm 0,07 \text{ mm}$; IC95%:-0,02-0,44; $p=0,07$) e diâmetro sistólico ($2,32 \pm 0,10 \text{ mm} \times 1,94 \pm 0,08 \text{ mm}$; IC95%: 0,09-0,65; $p=0,06$) do ventrículo esquerdo (**Figura 27**), evidenciando que neste modelo os animais não evoluem com dilatação ventricular e disfunção sistólica.

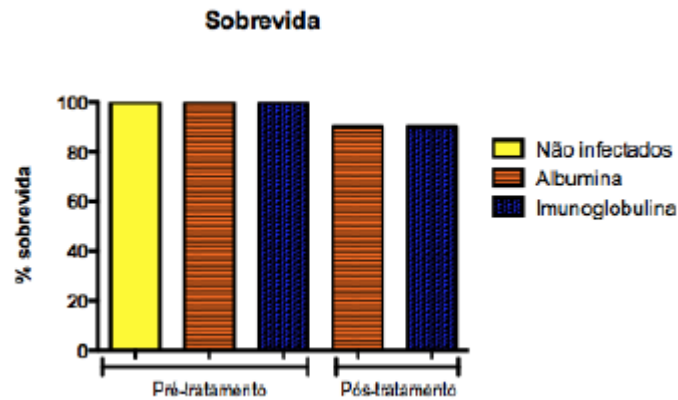
Figura 27. Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos. Diâmetros sistólico (A) e diastólico (B) finais do ventrículo esquerdo. (C) Fração de ejeção. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos.



10.2. Avaliação dos efeitos da terapia com imunoglobulina

Os animais chagásicos foram divididos em dois grupos, sendo que um recebeu albumina e o outro imunoglobulina G humana, ambos por via intraperitoneal. Dos 20 animais iniciais (10 grupo albumina e 10 grupo imunoglobulina) ocorreram 02 óbitos, sendo 01 em cada grupo, assim, restando 18 animais para serem avaliados. As avaliações cardiológicas foram repetidas nos 18 animais chagásicos após 120 dias da infusão de albumina ou imunoglobulina (**Figura 28**).

Figura 28. Sobrevida dos animais não-infectados e chagásicos crônicos do grupo albumina e do grupo imunoglobulina. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos.

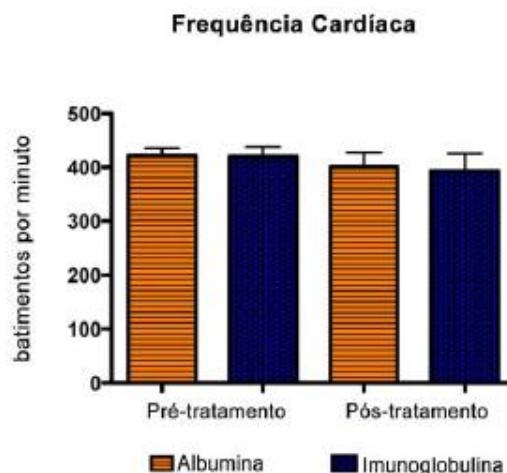


10.2.1. Avaliações de função cardíaca

10.2.1.1. Resultados eletrocardiográficos

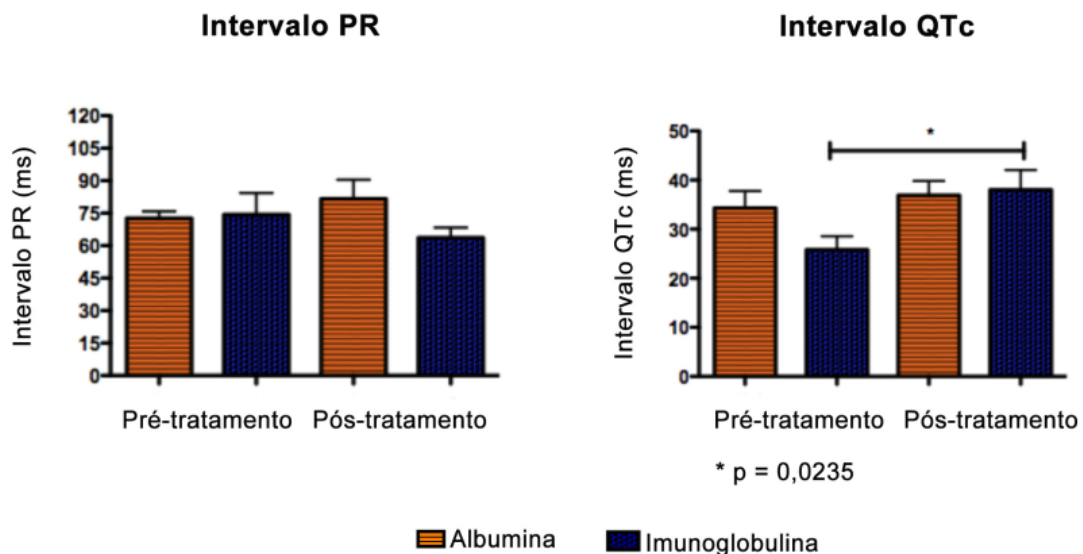
Para esta análise foram utilizados os dados ecocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. À avaliação da frequência cardíaca, entre os animais chagásicos tratados com albumina e imunoglobulina (Figura 12), não foi observado diferença com significância estatística com FC: $421,3 \pm 14,53$ bpm no grupo albumina e FC: $420,1 \pm 18,49$ bpm no grupo imunoglobulina (IC 95%: -40,18 – 52,65; $p = 0,95$).

Figura 29. Avaliação da frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



Também, não houve diferença com significância estatística, quando avaliado o intervalo PR, entre os animais chagásicos tratados com albumina, quando comparados entre si ($72,3 \pm 3,26$ ms $\times$ $81,5 \pm 8,84$ ms; IC95%:-27,31-9,55; $p=0,31$), ou no grupo imunoglobulina no pré e pós tratamento ($74,3 \pm 9,97$ ms $\times$ $63,6 \pm 4,70$ ms; IC95%:-29,4-50,77; $p=0,56$). Entretanto, houve influência da terapia com imunoglobulina no prolongamento do intervalo QTc, quando avaliado este grupo nas fases pré e pós-tratamento ($25,8 \pm 2,76$ ms $\times$ $38,0 \pm 4,08$ ms; IC95%:-22,5- -1,84; $p=0,02$) (**Figura 30**).

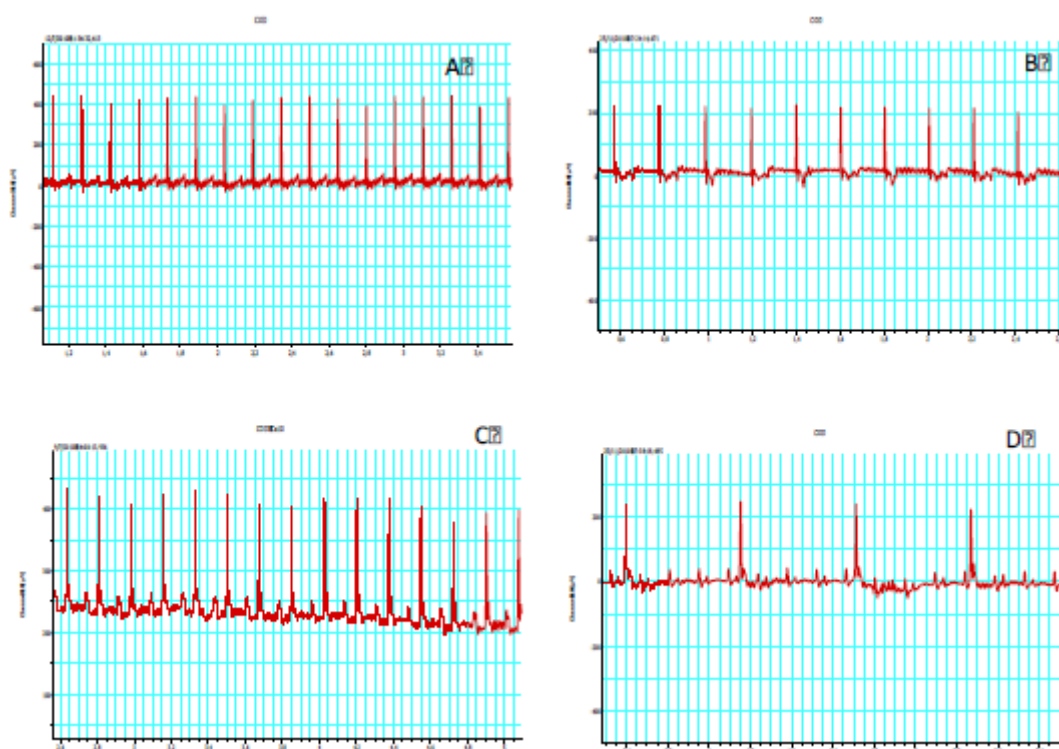
Figura 30. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina. Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



No grupo albumina, dos 09 camundongos analisados, 07 inicialmente encontravam-se em ritmo sinusal e 2 animais em BAVT. Após o uso da albumina apenas 04 dos 07 animais mantiveram-se em ritmo sinusal. Dos 05 animais restantes, 02 permaneceram em BAVT, 01 animal evoluiu para ritmo juncional e 02 para BAVT, totalizando 05 animais com progressão de doença arrítmica (**Figura 30**).

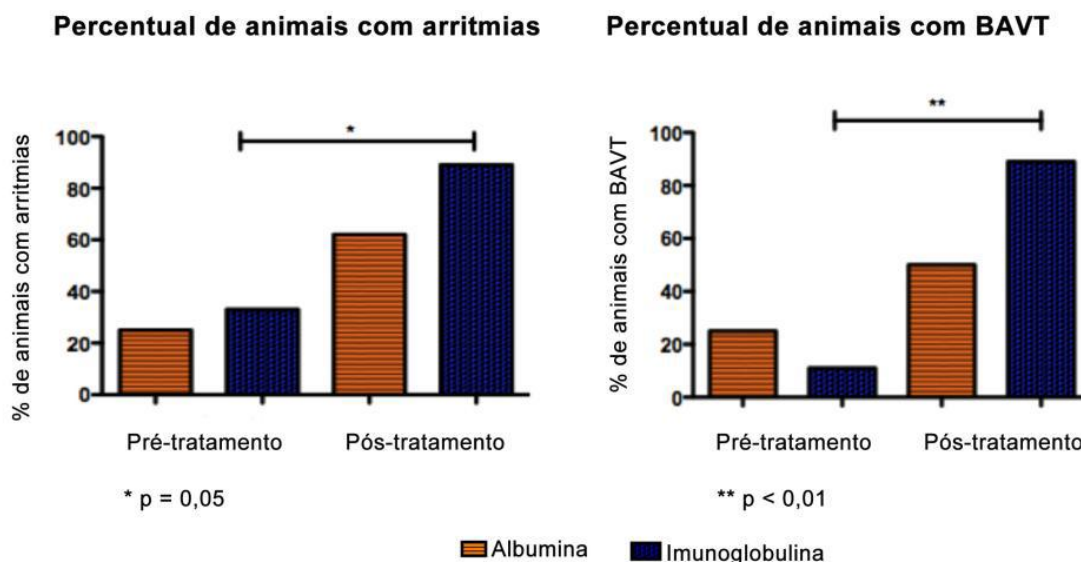
No grupo imunoglobulina, dos 09 animais analisados, 06 inicialmente encontravam-se em ritmo sinusal, 02 animais em BAV 2º grau Mobitz II e, 1 em BAVT. Após o uso de imunoglobulina apenas 01 animal manteve-se em ritmo sinusal, sendo observada a progressão da doença arritmica nos 08 animais restantes que progrediram para ritmo de BAVT (**Figura 31**).

Figura 31. Traçados eletrocardiográficos de animais chagásicos crônicos. ECG de camundongo albumina pré-tratamento, em ritmo sinusal (A) e pós-tratamento, em BAVT (B). ECG de camundongo imunoglobulina pré-tratamento, em ritmo sinusal (C) e pós-tratamento, em BAVT (D).



As diferenças entre os percentuais de arritmias em geral e de BAVT foram significativas quando comparados os grupos tratado com albumina ou com imunoglobulina (**Figura 32**).

Figura 32. Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas diferentes fases do tratamento. Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos chagásicos nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

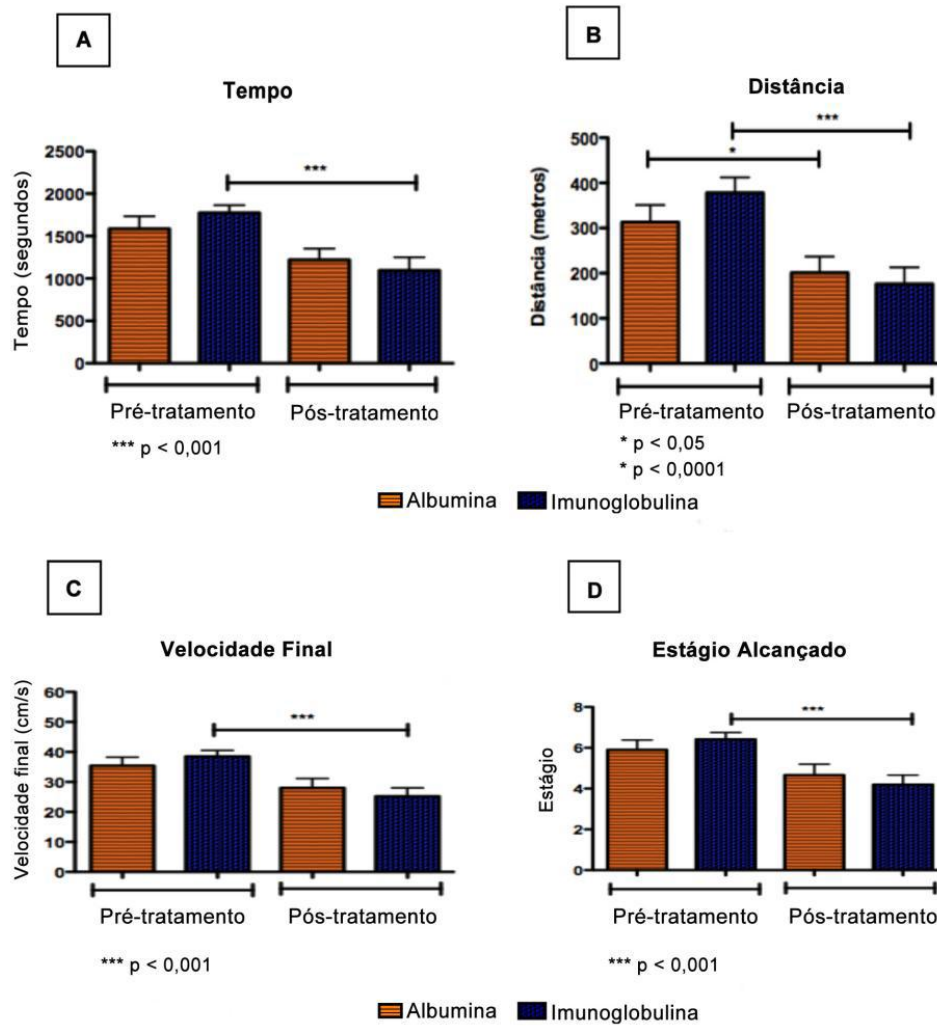


10.2.1.2. Resultados da avaliação funcional ergométrica e respirométrica

Para esta análise foram utilizados os dados dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Quando considerados os parâmetros de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final e estágio máximo alcançado, observamos uma diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos, com importante agravamento funcional nos animais tratados com imunoglobulina (**Figura 33**).

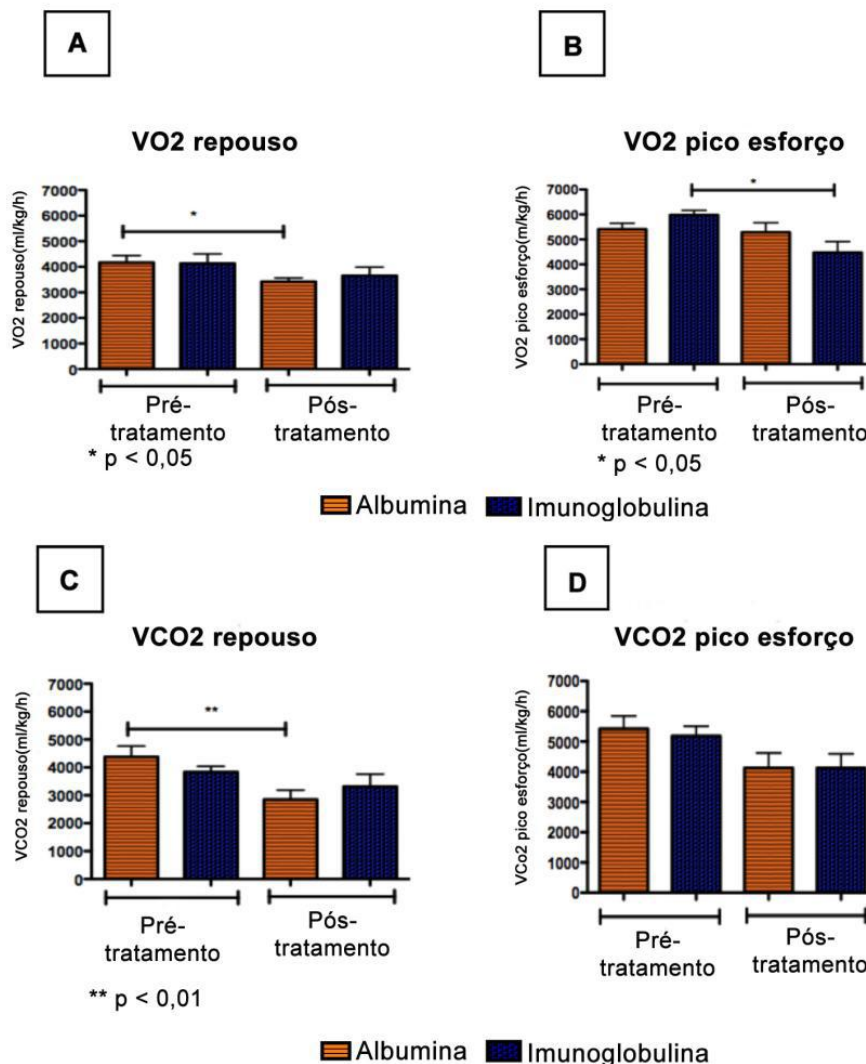
Nos animais tratados com imunoglobulina observamos uma redução significativa do tempo de exercício ($1774 \pm 91,06$ s $\times$ $1096 \pm 156,1$ s; IC95%: 315,8-1040; p < 0,001), distância percorrida ($378,3 \pm 34,0$ m $\times$ $175,9 \pm 37,0$ m; IC95%: 97,34-307,3; p < 0,001), velocidade final alcançada ($38,5 \pm 2,01$ cm/s $\times$ $25,2 \pm 2,80$ cm/s; IC95%: 6,26-20,34; p < 0,001) e estágio final ($6,41 \pm 0,33$ $\times$ $4,20 \pm 0,46$; IC95%: 1,04-3,39; p < 0,001) quando comparamos pré- e pós-uso da terapia com imunoglobulina humana. Entretanto, não evidenciamos uma redução significativa dos parâmetros acima mencionados (tempo de exercício, velocidade final e do estágio máximo alcançado) no grupo albumina.

Figura 33. Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina. (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



O grupo imunoglobulina evoluiu com redução do VO₂ no pico do esforço (5981 ± 185,2 ml/Kg/h × 4479 ± 436,7 ml/Kg/h; IC95%:403,9-2600; p<0,05), com significância estatística, não sendo observado alterações no grupo albumina (**Figura 34**).

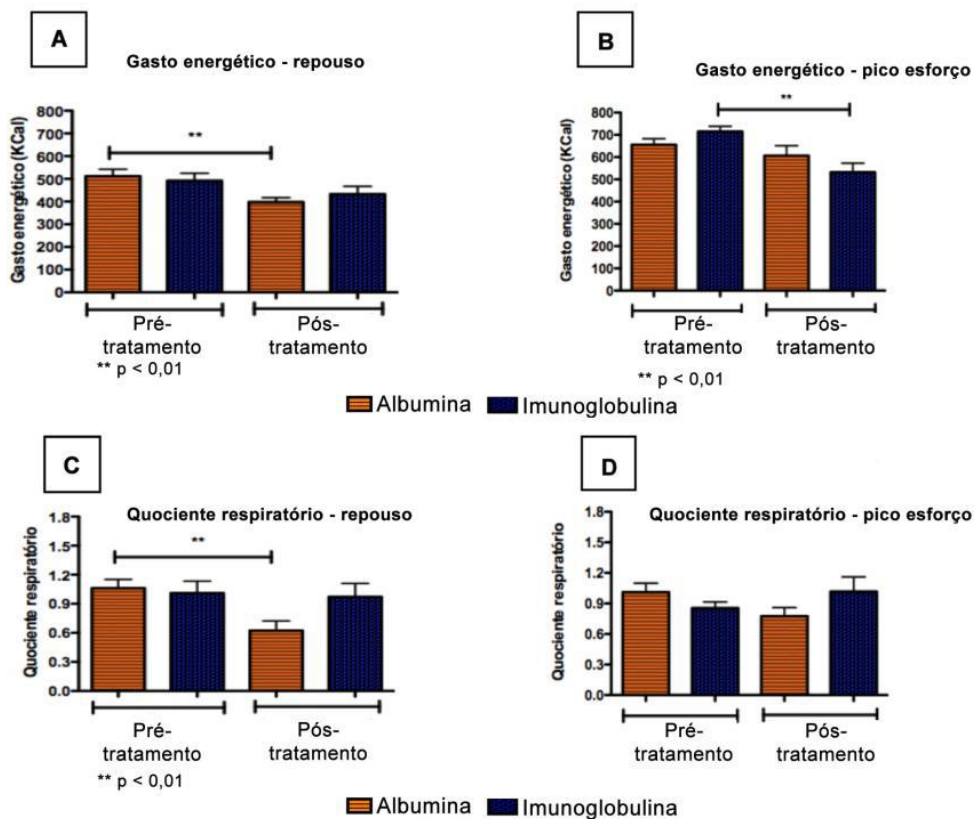
Figura 34. Avaliação de VO₂ e VCO₂ em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina. VO₂ de repouso (A) e de pico do esforço (B). VCO₂ de repouso (C) e de pico do esforço (D). Resultados expressos em média ± SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



Quanto à produção de dióxido de carbono pôde-se observar queda acentuada no VCO₂ em repouso no grupo albumina, não sendo evidenciadas alterações significativas no grupo tratado com imunoglobulina (**Figura 34**).

Os animais de ambos os grupos apresentaram gasto energético similar em repouso, porém com piora do gasto energético no pico do esforço no grupo tratado com imunoglobulina ($715,3 \pm 23,2$ Kcal $\times$ $532,1 \pm 40,8$ Kcal; IC95%: 76,3-290; $p < 0,001$), não sendo evidenciadas variações no grupo albumina. Observou-se ainda queda do quociente respiratório nos dois grupos, sem significância estatística no pico do esforço (**Figura 35**).

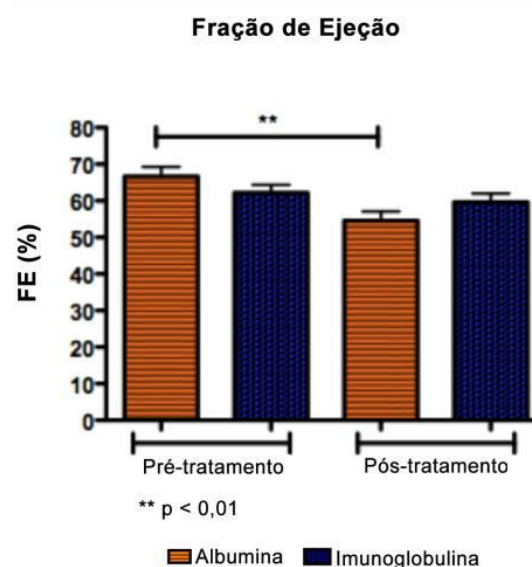
Figura 35. Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina. Gasto energético em repouso (A) e no pico do esforço (B). Quociente respiratório em repouso (C) e no pico do esforço (D). Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



10.2.1.3. Resultados ecocardiográficos

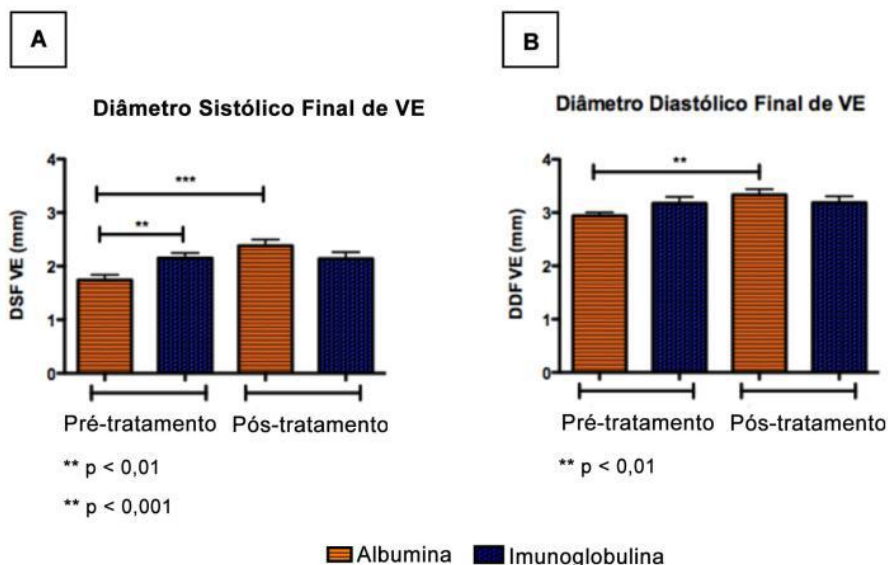
Foi evidenciada uma queda da fração de ejeção mensurada ao ecocardiograma em ambos os grupos, porém com significância estatística apenas no grupo albumina ($66,6 \pm 2,65$ % $\times$ $54,5 \pm 2,54$ %; IC95%: 4,27-19,89; $p < 0,01$) (**Figura 36**).

Figura 36. Avaliação da fração de ejeção mensurada pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



Quando da avaliação dos diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo não observamos alterações no grupo imunoglobulina, porém ganho significativo desses volumes no grupo albumina (**Figura 37**).

Figura 37. Avaliação dos diâmetros sistólico e diastólico final do VE mensurados pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



10.2.3. Avaliações histológicas e morfológicas

Secções de corações de camundongos chagásicos crônicos apresentaram alterações histológicas características da cardiomiopatia chagásica crônica (**Figura 38**), com evidência de infiltrados inflamatórios focais e disseminados compostos predominantemente por células mononucleares, miocitólise, mionecrose e fibrose. Na **figura 38A**, um corte de coração normal, com coloração por hematoxilina e eosina, mostra fibras cardíacas sem alterações morfológicas e/ou inflamatórias. A **figura 38B** mostra corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, com coloração por hematoxilina e eosina, evidenciando intenso infiltrado inflamatório multifocal produzido por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas nas mesmas. Na **figura 38C**, observa-se corte de coração chagásico crônico tratado com albumina, com coloração por tricrômio de Masson, evidenciando aumento de deposição de colágeno no interstício das fibras cardíacas.

Figura 38. Histologia de seções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina.

(A), Corte de coração normal, coloração pela H&E, mostrando fibras cardíacas sem alterações morfológicas e ou inflamatórias. Aumento de 60x.

(B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração pela H&E, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas. Aumento de 60x.

(C), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração por tricômio de Masson, mostrando em azul, a proliferação colágena no interstício de fibras cardíacas. Aumento de 20x.

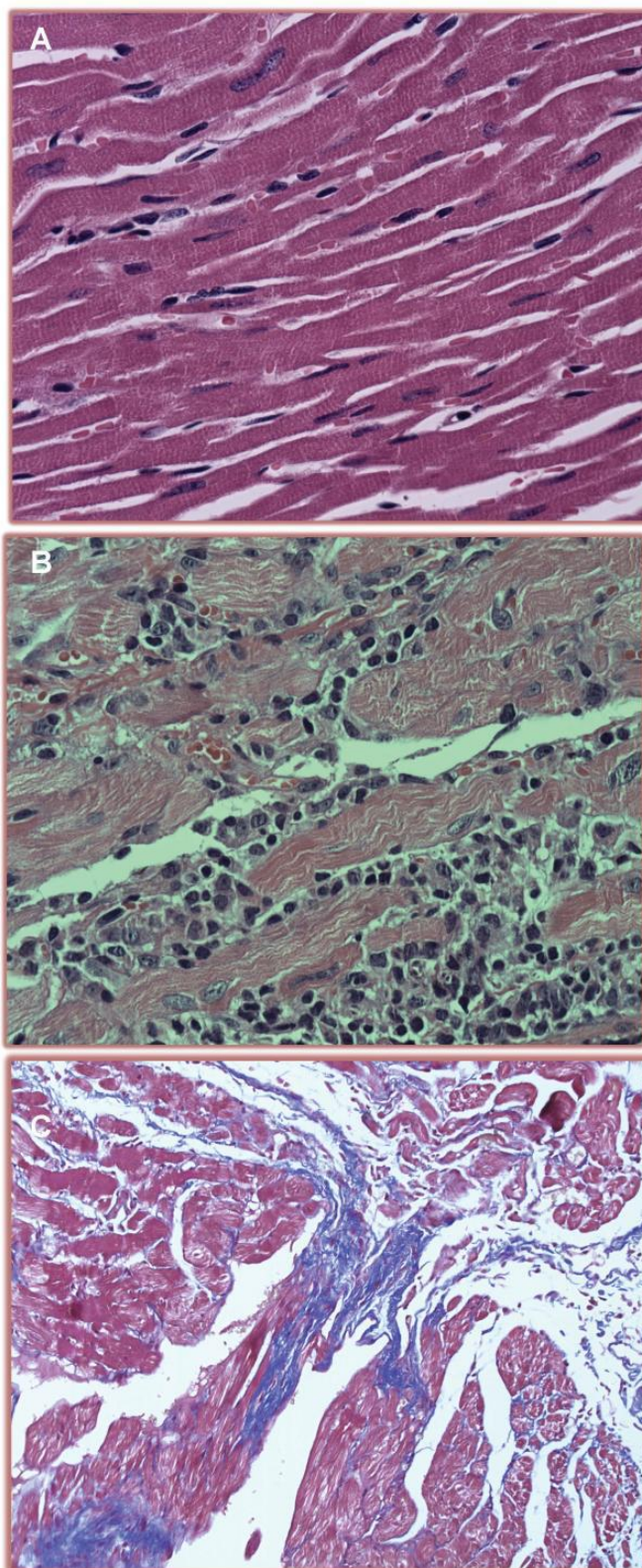
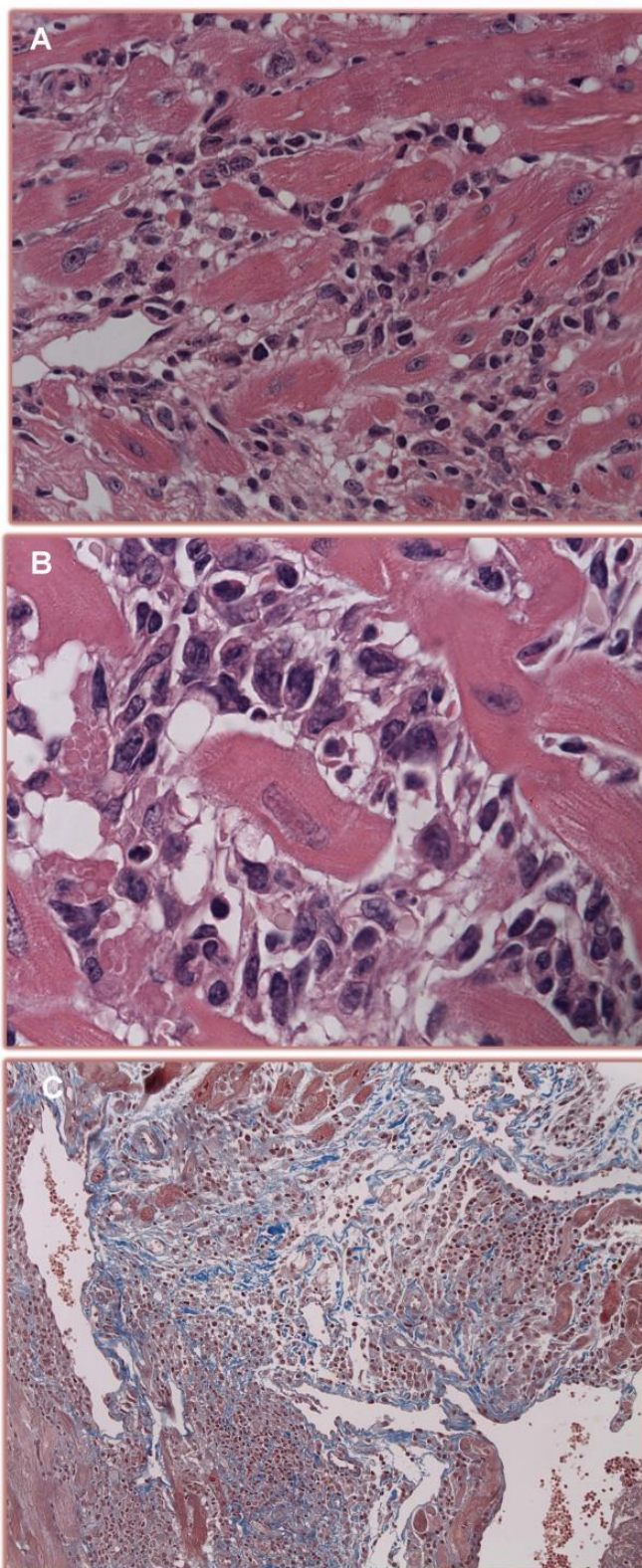


Figura 39. Histologia de seções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina.

(A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando intenso infiltrado inflamatório focal intenso e agressivo por células mononucleares, produzindo lesões miocitolíticas em células cardíacas. Aumento de 60x.

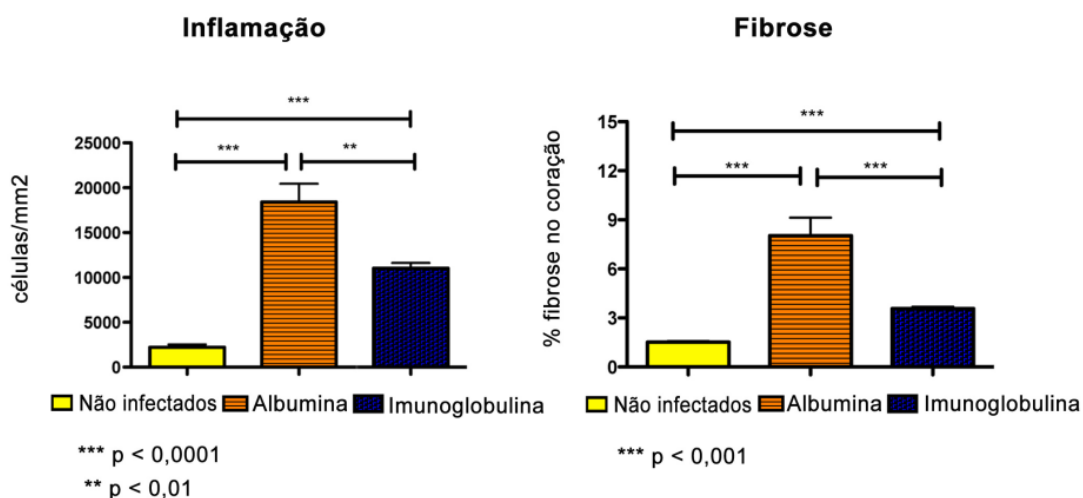
(B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando intenso infiltrado inflamatório focal intenso e agressivo por células mononucleares, produzindo destruição e amputação de uma fibra cardíaca. Aumento de 100x.

(C), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por tricômio de Masson, mostrando em azul, fibrose difusa em área com cardite multifocal, por células mononucleares. Aumento de 20x.



Ao avaliar por morfometria a inflamação e fibrose de forma comparativa, entre os dois grupos de animais chagásicos, observamos uma redução tanto de fibrose e inflamação nos animais tratados com imunoglobulina. Ocorreu uma redução substancial da área de fibrose nos animais chagásicos tratados com imunoglobulina comparados aos tratados com albumina ($3,56 \pm 0,11\% \times 8,032 \pm 1,09\%$; IC 95%: 2,24-6,69; $p = <0,001$) com significância estatística. Avaliando isoladamente inflamação, também observamos uma redução significativa na comparação dos dois grupos ($11.039 \pm 569,3 \text{ células/mm}^2 \times 18.410 \pm 20303 \text{ células/mm}^2$; IC95%:2902-11840; $p = <0,001$) (**Figura 40**).

Figura 40. Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina. (A) Número de células inflamatórias por mm^2 quantificado em secções coradas com H&E. (B) Percentual de fibrose quantificado em secções coradas com tricrômio de Masson. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.



A avaliação histopatológica no coração dos animais tratados com imunoglobulina caracteriza-se por processo inflamatório, focal e agressivo em fibras cardíacas com achado frequente de vasos com arterite por células mononucleares, muitos apresentando substância hialina acidófila depositada na íntima, e em outros casos pode ser visto a obliteração completa dos vasos por trombose. Vários vasos com alterações foram encontrados na junção atrioventricular. Em contrapartida, a análise histopatológica do coração dos animais do grupo albumina, evidenciou inflamação multifocal, não sendo observada arterite exuberante, nem depósito de substância acidófila nos vasos (**Figura 41**).

Observou-se intensa inflamação dos plexos nervosos intracardíacos, com grande destruição dos plexos neuronais intracardíacos, com grande destruição dos neurônios no grupo imunoglobulina, fato pouco evidente no grupo albumina (**Figura 42- 43**).

Além do coração, foi realizada a avaliação histopatológica de músculo esquelético. Tanto os animais chagásicos tratados com albumina quanto com imunoglobulina apresentaram inflamação acentuada no músculo esquelético, caracterizando uma miosite intensa observada na fase crônica da doença (**Figura 44**). Na **figura 44A**, observa-se corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. **A figura 44B** mostra corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. Observa-se predomínio de arterite obliterante, com depósito de substância hialina acidófila na camada íntima. Já nas **figuras 45 e 46** são observados depósitos de IgG em secções de coração dos camundongos, após tratamento com albumina e imunoglobulina.

Figura 41. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina e imunoglobulina. (A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração pela H&E, mostrando infiltrado inflamatório por células mononucleares, multifocal. O corte foi realizado na junção atrioventricular, mostrando uma arteríola sem arterite, pervingua, e com espessamento da camada média. Aumento de 10x. **(B),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração pela H&E, mostrando infiltrado inflamatório por células mononucleares, com arteríola pervingua, com discreto espessamento da camada média. Aumento de 40x. **(C),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando intensa arterite, com deposição de substância hialina acidófila na camada íntima, produzindo semi-oclusão da arteríola localizada na junção atrioventricular. Aumento de 10x. **(D),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando intensa arterite, com deposição de substância hialina acidófila na camada íntima, produzindo semi-oclusão da arteríola. Aumento de 60x.

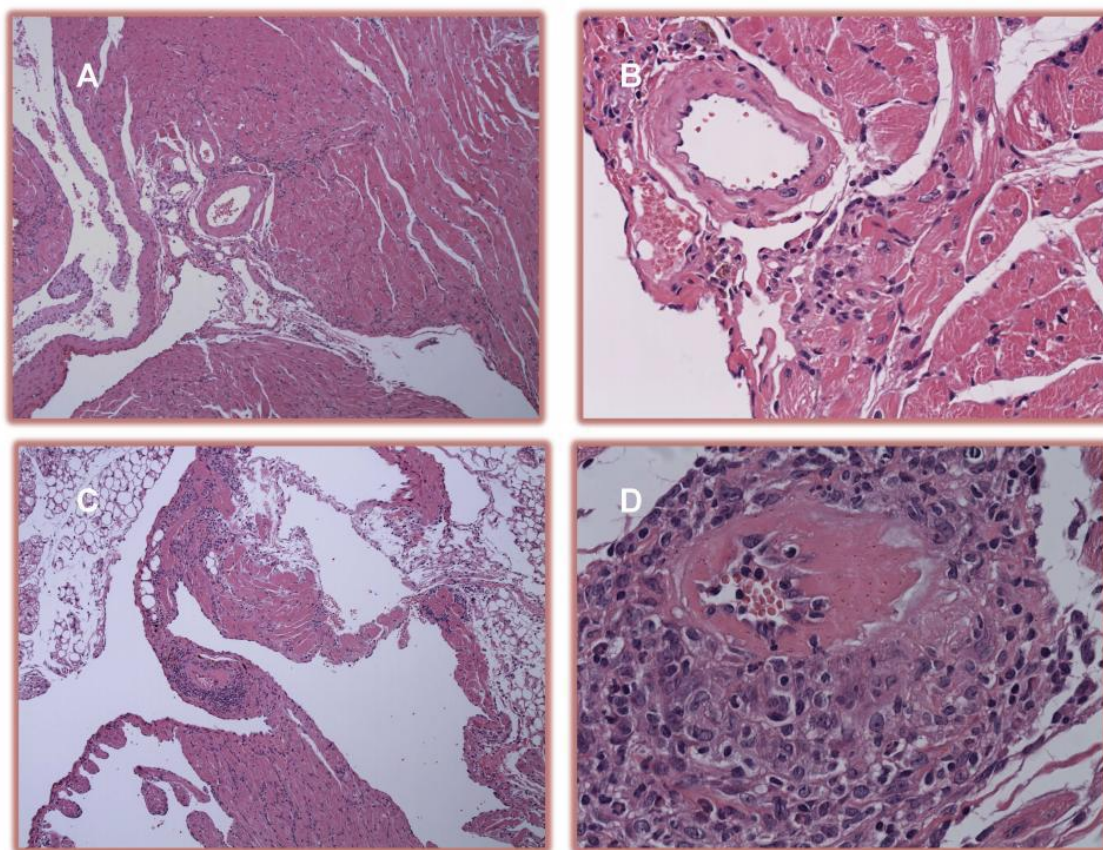


Figura 42. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina. (A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando plexo neuronal intracardiaco, com aspecto morfológico normal, sem alterações neuronais. (B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando pequeno plexo neuronal intracardiaco, com discreta inflamação por células mononucleares. Secções coradas com H&E. Aumento de 100x.

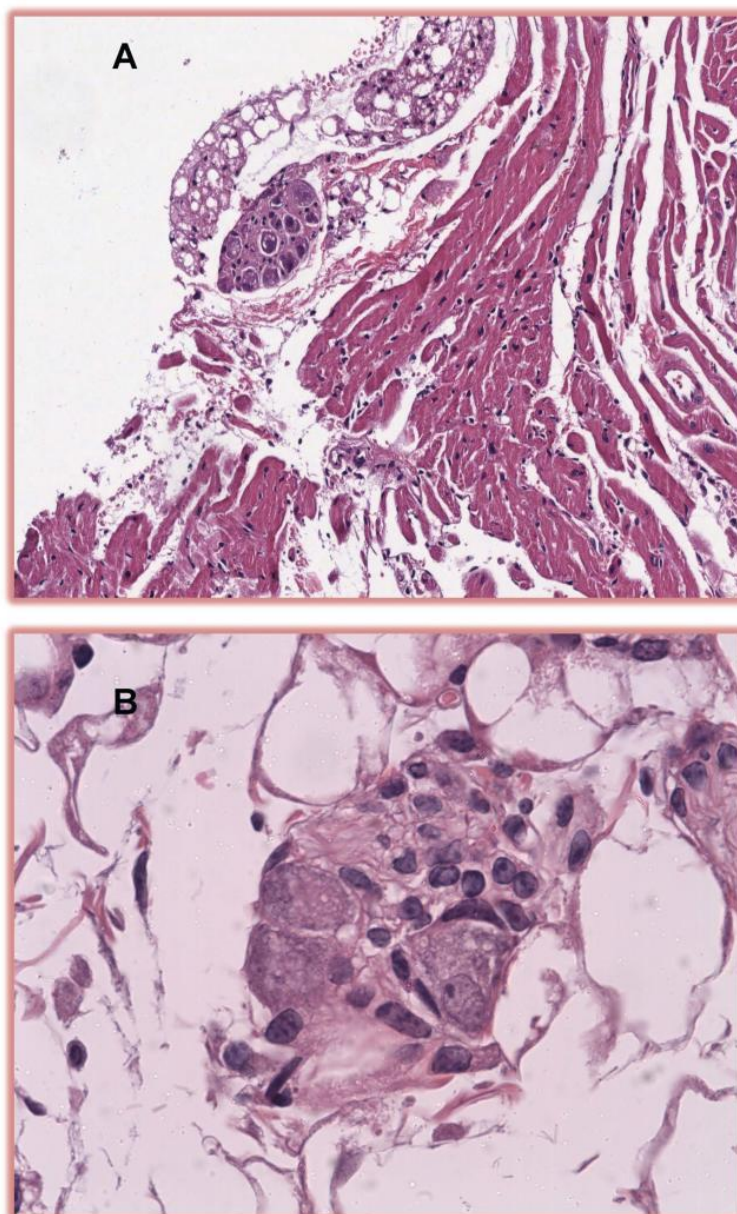


Figura 43. Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina.

(A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intenso infiltrado inflamatório circunjacente por células mononucleares. Aumento de 20x.

(B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração pela H&E, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intenso infiltrado inflamatório circunjacente por células mononucleares. Aumento de 60x.

(C), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por tricômio de Masson, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intensa fibrose e destruição neuronal. Aumento de 60x.

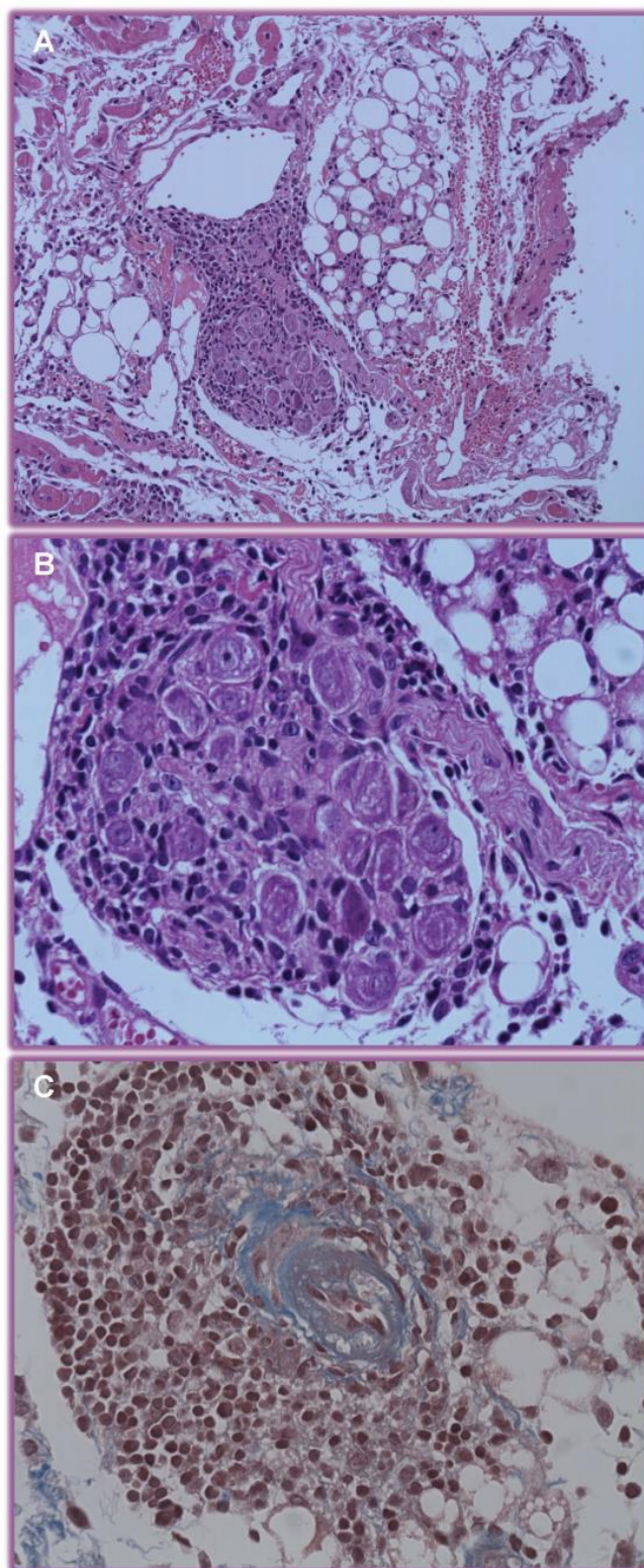


Figura 44. Histologia de secções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina. (A), Corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. **(B),** Corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. Observa-se predomínio de arterite obliterante, com depósito de substância hialina acidófila na camada íntima. Secções coradas com H&E. Aumento de 20x.

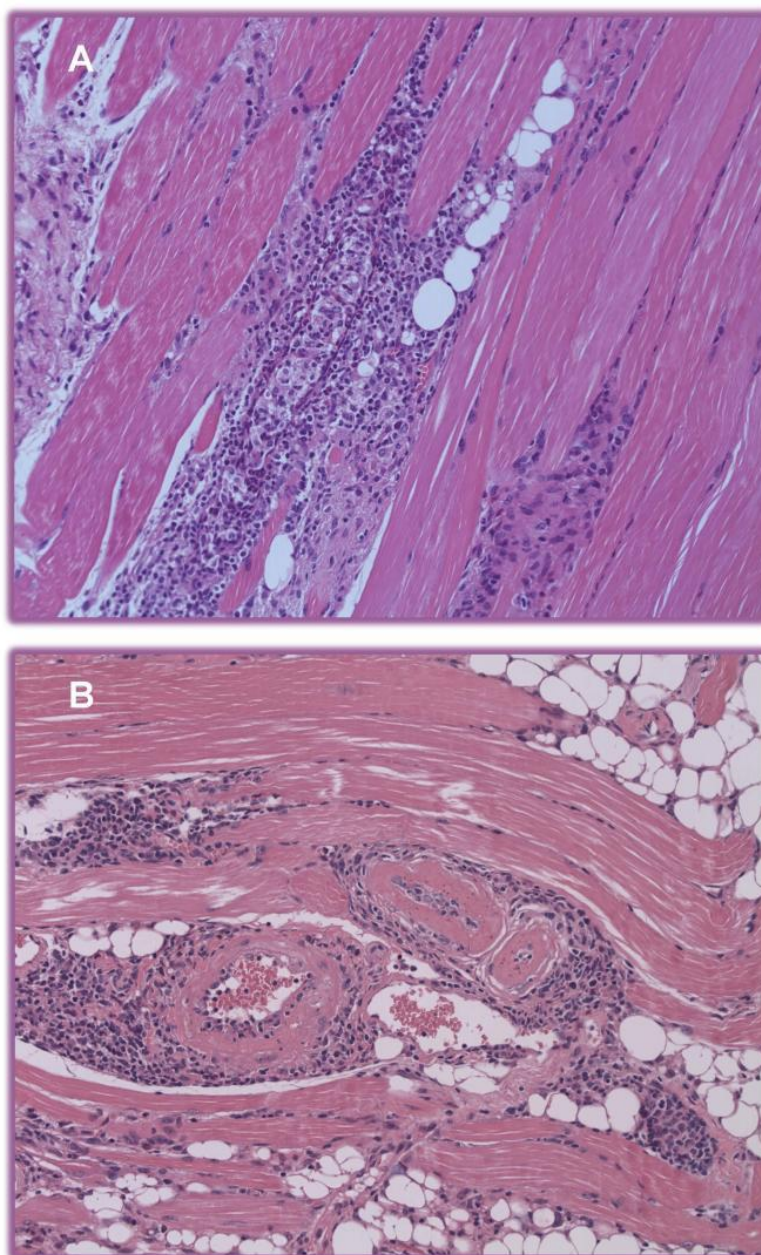


Figura 45. Imunofluorescência de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina. (A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando pequena arteríola com depósito de IgG no lúmen. O depósito de IgG (em verde) foi marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFluor 488. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento de 60x. **(B),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando uma arteríola com vasculite de pequena intensidade, sem depósito de IgG no lúmen. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento de 60x.

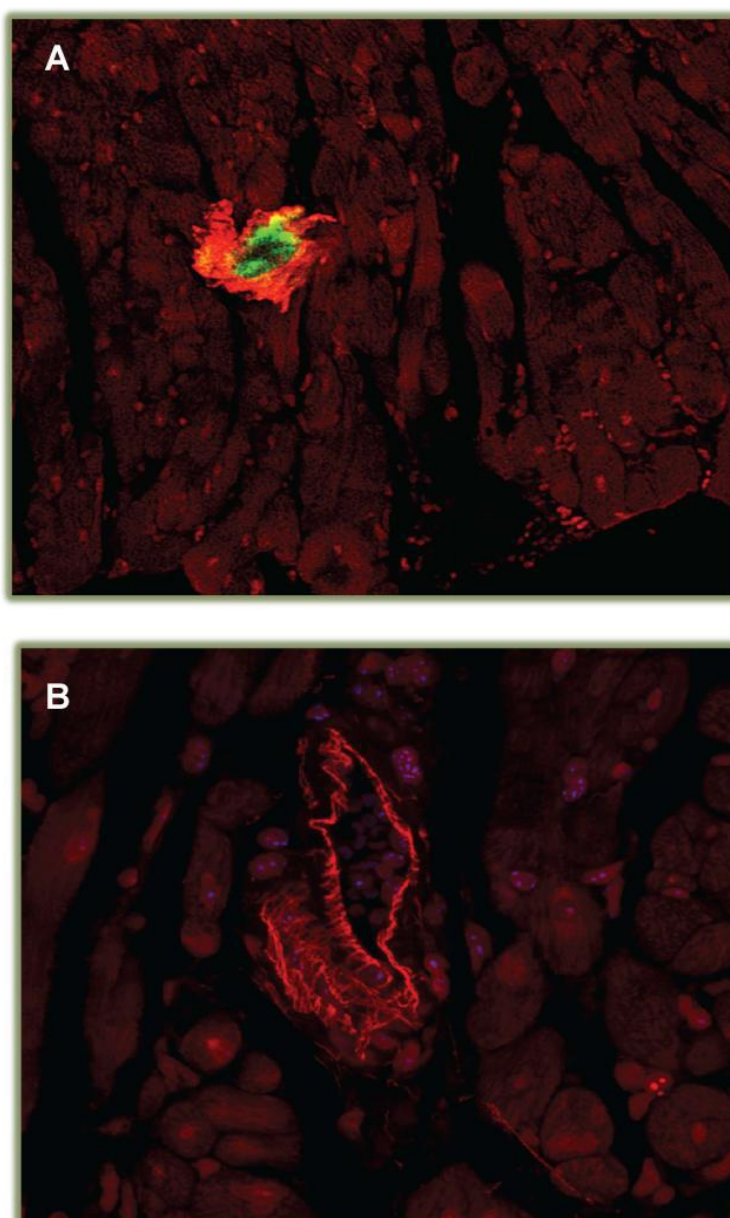
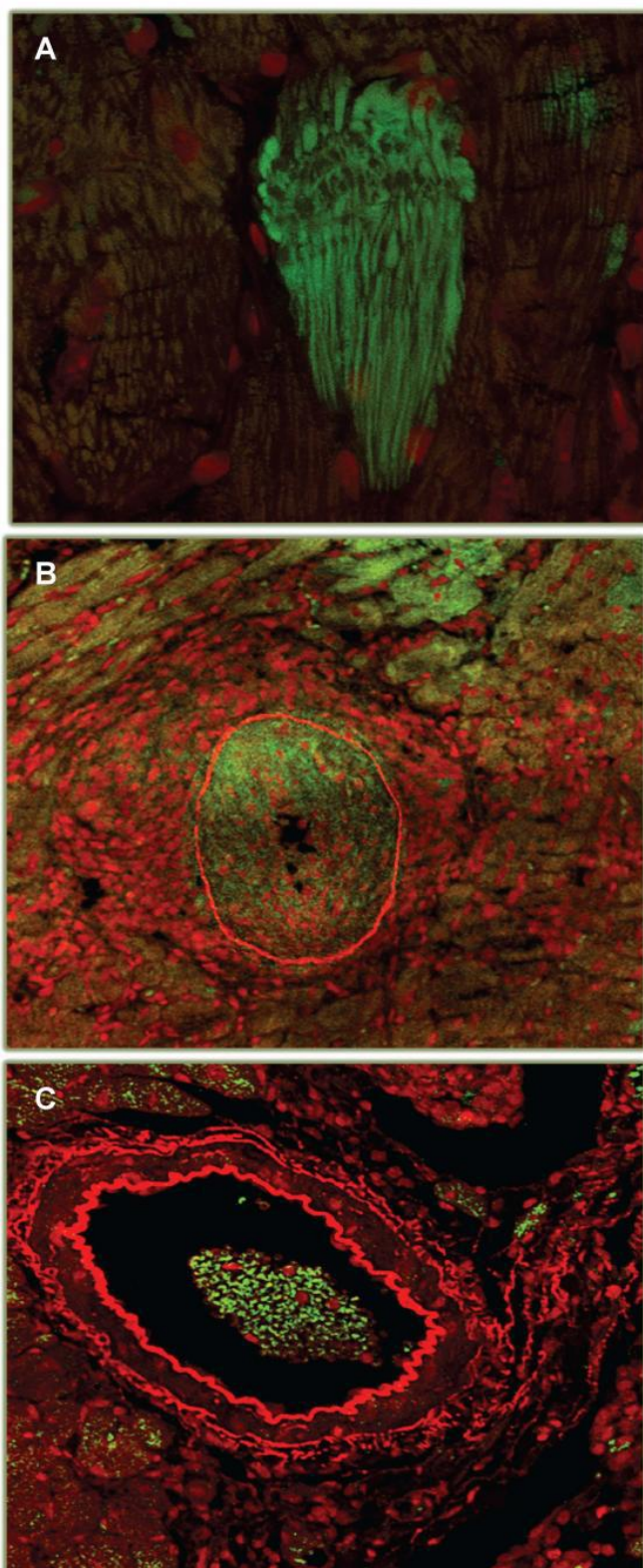


Figura 46. Imunofluorescência de secções de corações de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina.

(A), Fibra cardíaca em animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando depósito de IgG através de anticorpo anti-IgG humana marcado com AlexaFlúor 488. Aumento de 60x.

(B), Corte de coração em animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando um vaso com arterite obliterante, o depósito de IgG (em verde) foi marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFlúor 488. Em fibras cardíacas podem ser evidenciados alguns depósitos de IgG. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento de 60x.

(C), Corte de coração em animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando uma arteríola com trombo de IgG e células. O depósito de IgG (em verde) foi marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFlúor 488. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento de 60x.



10.2.4. Avaliação da produção de citocinas

Foi avaliado um painel de citocinas no soro de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina e imunoglobulina, sacrificados dois meses após o início do tratamento. As concentrações de 22 citocinas foram determinadas usando a plataforma Luminex (**Figuras 47-49**).

De um modo geral, houve um aumento ou tendência de elevação da maioria das citocinas quando comparadas as concentrações no soro de animais normais e chagásicos controles. As seguintes citocinas apresentaram-se significativamente aumentadas no grupo chagásico controle (tratado com albumina): IL-1 β , IL-5, IL-10, IL-17 e RANTES.

Quando os resultados dos grupos chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina foram comparados, observamos uma elevação estatisticamente significativa em várias citocinas (IL-2, IL-3, IL-9, IL-12p40, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MIP1 α , KC, MCP-1, eotaxina) no grupo tratado com imunoglobulina em relação ao grupo chagásico tratado com albumina.

Foi realizada também a avaliação dos níveis de IFN γ , TNF α e IL-10 no tecido cardíaco. Extratos de corações de camundongos chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina humana apresentaram níveis similares dessas três citocinas (**Figura 50**).

Figura 47. Concentrações séricas de IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-9 (G) e IL-10 (H). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 5 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$.

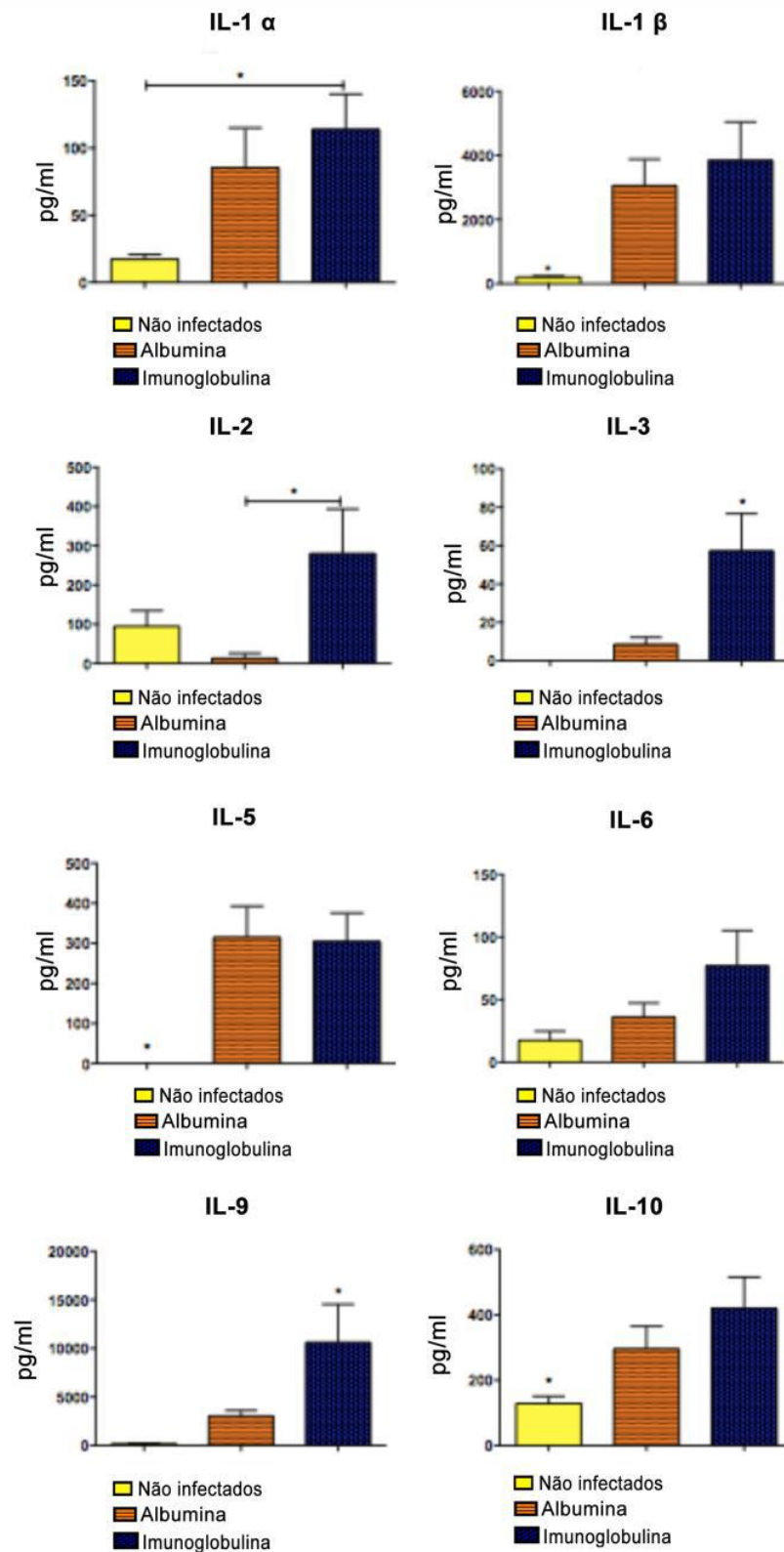


Figura 48. Concentrações séricas de IL-12p40 (A), IL-12p70 (B), IL-13 (C), IL-17 (D), IFN γ (E), TNF α (F), GM-CSF (G) e G-CSF (H). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 5 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

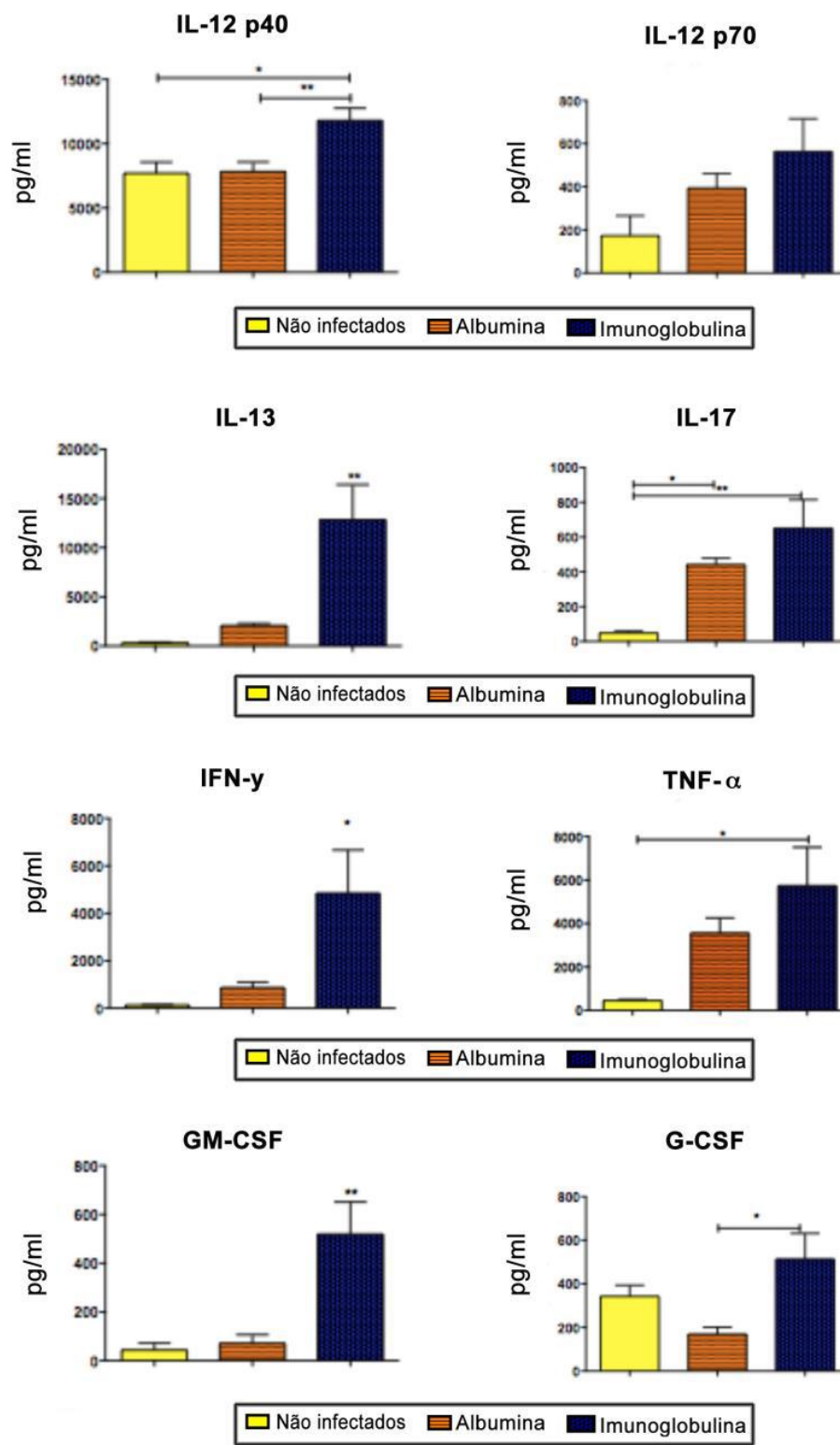


Figura 49. Concentrações séricas de KC (A), MCP1 (B), MIP1 α (C), MIP1 β (D), Eotaxina (E) e RANTES (F). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 5 a 8 animais por grupo. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

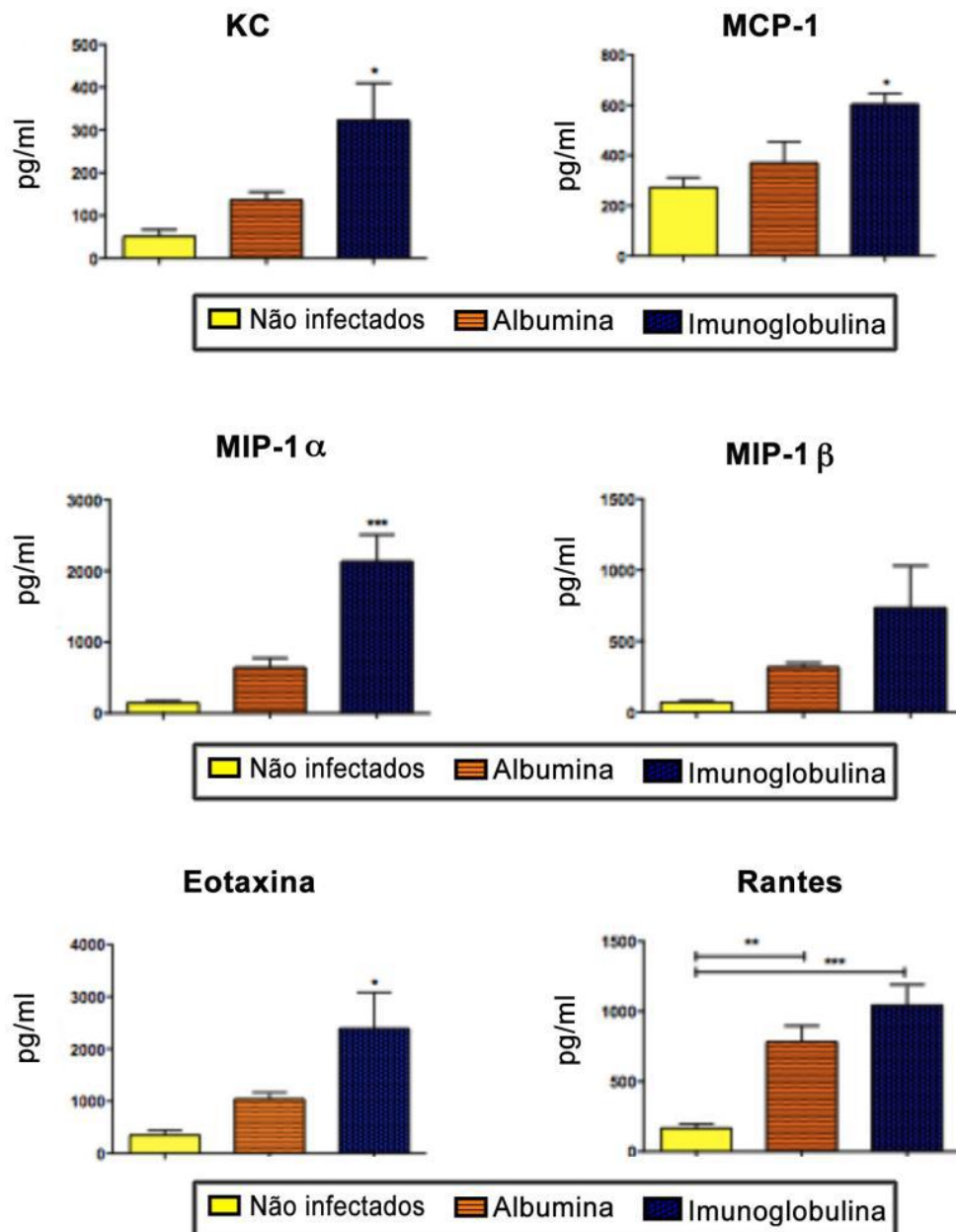
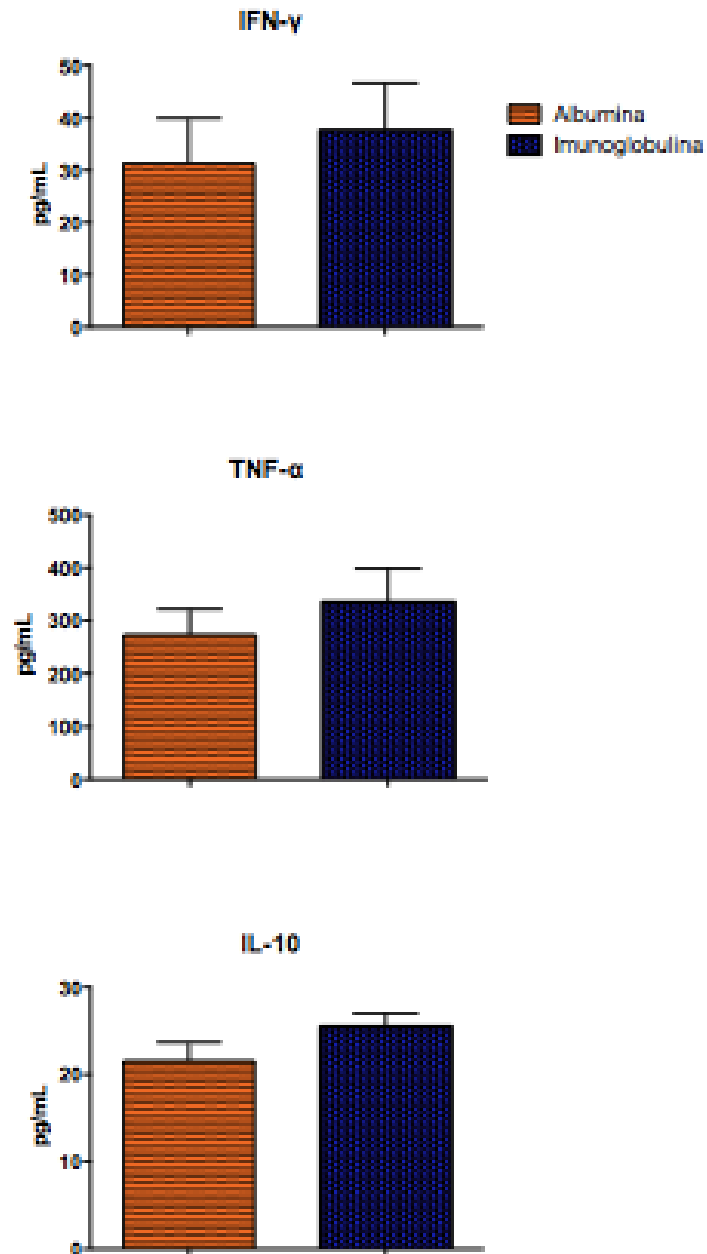


Figura 50. Concentrações de IFN γ (A), TNF α (B) e IL-10 (C) no coração. Extratos de corações de animais chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina foram utilizados para a dosagem de citocinas por ELISA. Resultados expressos em média $\pm$ SEM de 5 a 8 animais por grupo.



11. DISCUSSÃO

A cardiomiopatia chagásica crônica é forma comum da cardiomiopatia dilatada e causa importante morbimortalidade na América Latina, sendo o seu prognóstico pior do que o das outras etiologias. Nas últimas décadas, várias opções terapêuticas vêm sendo desenvolvidas ou aprimoradas no sentido de retardar o progresso da disfunção ventricular em pacientes com insuficiência cardíaca, porém a reversão do processo nunca foi alcançada na sua plenitude, e o prognóstico desses pacientes continua sendo bastante limitado. O presente estudo experimental, com o uso de modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica, de forma inédita, demonstra que o uso de imunoglobulina humana, administrada por via intraperitoneal, está associado à melhora do padrão histológico, porém esta melhora não se correlaciona com a melhora dos distúrbios da condução atrioventricular e/ou melhora funcional cardíaca.

Do ponto de vista de caracterização da doença, os animais chagásicos, neste trabalho, apresentaram alterações eletrocardiográficas representadas principalmente, por prolongamento do intervalo PR e arritmias, e na maioria dos camundongos, por bloqueio atrioventricular total. Do mesmo modo, os animais chagásicos, quando comparados aos não-infectados, apresentaram pior desempenho nos parâmetros ergométricos de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final alcançada e estágio máximo atingido. Animais chagásicos e não-infectados apresentaram valores semelhantes de gases ao teste respirométrico, bem como de parâmetros ecocardiográficos, não tendo sido evidenciada dilatação de câmaras cardíacas ou disfunção ventricular nos animais infectados com *T. cruzi*.

A escolha do modelo utilizado no presente trabalho teve como base a publicação de Soares e colaboradores, em 2004. Estes autores inocularam tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c e C57BL/6, com a demonstração de significativa redução de infiltrados inflamatórios por apoptose de células inflamatórias no coração, além de redução da fibrose intersticial, seis meses após o transplante com células-tronco mononucleares de medula óssea. Porém, vale ressaltar que os autores não realizaram avaliação funcional cardíaca nos animais.

Em 2006, Rocha e colaboradores publicaram artigo descrevendo a caracterização da função cardiopulmonar em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados por *T. cruzi*, utilizando o modelo de infecção com 100 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana. Foi evidenciado, ao eletrocardiograma, um aumento do intervalo PR e distúrbios de condução do coração, sendo o BAV 1^o grau relacionado a uma redução na densidade de receptores adrenérgicos β_1 e ao aumento na densidade de receptores muscarínicos M_2 no coração de camundongos chagásicos crônicos quando comparados aos normais. De forma similar, nosso trabalho também demonstrou, com este modelo, o prolongamento do intervalo PR e a presença de arritmias cardíacas em camundongos chagásicos crônicos.

No entanto, não observamos disfunção sistólica e/ou dilatação das câmaras cardíacas ao ecocardiograma, com o modelo utilizado, não podendo, portanto, caracterizá-lo como cardiomiopatia dilatada chagásica crônica. No trabalho de Rocha, em 2006, quando avaliadas as alterações ecocardiográficas, observam-se dados compatíveis com disfunção diastólica, sem evidências também de dilatação de câmaras cardíacas. Gonçalves e colaboradores, em 1986, demonstraram metodologia capaz de induzir experimentalmente cardiomiopatia dilatada, muito semelhante a CCC, inclusive com caracterização de aneurisma apical do ventrículo esquerdo em cerca de 45% dos animais. Recentemente, Goldenberg e colaboradores (2008) utilizaram modelo de infecção com tripomastigotas da cepa Brasil de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C-129, mostrando, à ressonância nuclear magnética, dilatação do ventrículo direito, sem alterações no diâmetro do ventrículo esquerdo. Assim, não conseguimos reproduzir experimentalmente dilatação das câmaras cardíacas no modelo por nós utilizado, porém observamos alterações arrítmicas significativas, caracterizando portanto a forma arrítmica da doença.

Quando analisamos, de forma comparativa, os animais controles e os infectados quanto ao desempenho funcional cardíaco avaliado pela ergometria, observamos a piora funcional nos camundongos chagásicos. Esta piora funcional foi inicialmente relacionada à disfunção ventricular esquerda, o que não se confirmou após análise dos parâmetros ecocardiográficos. Observamos também a piora funcional no grupo imunoglobulina em relação ao grupo albumina, traduzida por redução do tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final alcançada e estágio máximo atingido. Os camundongos do grupo imunoglobulina evoluíram para

ritmo de BAVT em quase sua totalidade o que pode ter influenciado na piora funcional, visto não apresentarem disfunção sistólica caracterizada por dilatação ventricular e queda da fração de ejeção ao ecocardiograma. Todavia, na avaliação histopatológica do músculo esquelético, tanto dos animais chagásicos tratados com albumina quanto os que utilizaram imunoglobulina, foi evidenciada inflamação acentuada, caracterizando miosite intensa, o que pode ter contribuído para o fraco desempenho funcional à ergometria. Desta forma, a utilização da ergometria com a finalidade de avaliação da capacidade funcional cardiovascular no modelo de CCC, deverá ser validada em outros trabalhos, já que o processo inflamatório em músculo esquelético pode ser considerado um fator limitante para a avaliação do desempenho cardiovascular.

O mecanismo pelo qual a imunoglobulina humana exerce seu papel na imunomodulação ainda não é inteiramente compreendido. Já foi demonstrado o papel patogênico de anticorpos no soro de pacientes com Chagas que reagem contra receptores muscarínicos e adrenérgicos dos cardiomiócitos (BORDA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2007). A imunização de camundongos com proteínas recombinantes P0 e P₂β do *T. cruzi* induz a produção de altos títulos de anticorpos com reatividade cruzada com o receptor β-adrenérgico, levando à presença de arritmias ventriculares, alterações de repolarização e defeitos de condução nesses animais (BERGAMI et al., 2001). Esses dois mecanismos acima mencionados poderiam ser responsáveis pela maior prevalência de eventos bradiarrítmicos. Além do que, apesar da melhora significativa do percentual de fibrose e da inflamação do tecido cardíaco dos animais tratados com imunoglobulina, o processo inflamatório no grupo imunoglobulina caracterizou-se por ser focal e mais agressivo, com o acometimento dos vasos arteriais, levando à deposição de matéria hialina acidófila na camada íntima, com consequente obliteração das arteríolas, visto de forma mais acentuada na junção atrioventricular, o que de certa forma poderia justificar a piora dos distúrbios de ritmo observado neste grupo.

George e colaboradores (2001) demonstraram, com uso de modelo murino de miocardite autoimune, que o uso de imunoglobulina humana venosa reduz a progressão do processo inflamatório, estando o benefício associado à modulação da resposta celular e humoral à miosina, além de redução significativa de TNF-α. Shioje e colaboradores (2004), também com uso de modelo murino, evidenciaram que uso de imunoglobulina humana leva à redução da progressão do processo inflamatório

por supressão da resposta Th1. Assim como, Gong e colaboradores (2007) demonstraram o efeito terapêutico de redução da progressão de dano ao miocárdio, assim como, redução da produção de TNF- α com uso de IGIV e vitamina C.

Em nosso trabalho observamos à histopatologia deposição de substância hialina acidófila na camada íntima dos vasos arteriais no grupo imunoglobulina, sendo que, pela análise do tecido com o uso de imunofluorescência foi observado ser este depósito de imunoglobulina. Tal observação nos levou a considerar a imunização do animal com uma dose elevada de antígeno proteico estranho (IGIV) levando à formação de anticorpos contra o antígeno. Já é estabelecido que a medida que são formados cada vez mais complexos antígeno-anticorpo alguns deles irão se depositar nos leitos vasculares, principalmente pequenas artérias, caracterizando a chamada doença do soro. Tal hipótese nos levou a questionar o uso de imunoglobulina humana em modelo murinho, porém diversos trabalhos experimentais já utilizaram esta forma de terapia em miocardite autoimune com boa resposta e, até o momento, sem registro de tal ocorrência.

Olivieri e colaboradores, em 2010, avaliaram o efeito da terapia com imunoglobulina humana em modelo murino de chagas agudo. Os autores demonstraram aumento do tempo de sobrevivência em camundongos BALB/c, tratados com imunoglobulina humana intravenosa sete dias após inoculação do parasito. Também relatam que em modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica, tratado com imunoglobulina, foi observado melhora dos eventos arrítmicos bradicárdicos, caracterizada pela redução do intervalo PR e melhora da bradicardia. Neste trabalho de fase aguda não há relato de registros eletrocardiográficos. Entretanto, como já mencionado anteriormente, em nosso trabalho, a quase totalidade dos camundongos do grupo imunoglobulina evoluiu para bloqueio atrioventricular total.

A avaliação da produção de citocinas no soro dos animais demonstrou um aumento significativo em 12 das 22 citocinas analisadas no grupo tratado com imunoglobulina, em relação ao grupo tratado com albumina. Os modelos experimentais da doença de Chagas revelaram que as citocinas são elementos importantes na geração e controle da resposta imune, que pode levar ao dano tecidual (SILVA et. al., 1992; SOARES et. al., 2001). As interleucinas IL- β e IL-6 tiveram seus níveis aumentados nos animais tratados com imunoglobulina. Diversos estudos mostram que essas interleucinas têm seus níveis aumentados

progressivamente de acordo com a severidade da doença (MANN et. al., 2002; AUKRUST et. al., 2005). Além disso, IFN- γ , uma citocina que já vem sendo apontada como importante mediador e marcador de gravidade na cardiopatia chagásica crônica (GOMES et al, 2003), também teve seus níveis aumentados nos animais tratados com IGIV. Os efeitos biológicos dessas citocinas pró-inflamatórias podem explicar diversos mecanismos de progressão da doença, como, miosite intensa, desenvolvimento de fibrose, dentre outros (MANN et. al., 2002; AUKRUST et. al., 2005).

Porém quando foi realizada a avaliação de três citocinas no coração (IFN γ , TNF α e IL-10), não foi detectada uma diferença significativa entre os dois grupos chagásicos. As dosagens no coração sugerem que, apesar de numericamente haver uma diminuição das células inflamatórias no coração, as células inflamatórias presentes no coração de camundongos chagásicos tratados com imunoglobulina encontram-se ativadas e produzindo estes fatores em grande quantidade, o que pode resultar na agressividade das lesões observadas neste grupo. É possível que o aumento destas citocinas no soro se deva à ativação de células em outros compartimentos, tais como baço, medula óssea ou mesmo de outros tecidos através da estimulação de macrófagos residentes. Conforme foi observado no coração, houve a formação de depósitos de complexos imunes, e talvez a presença de depósitos de complexos imunes cause a ativação de fagócitos com a consequente produção de mediadores solúveis, incluindo citocinas pró-inflamatórias. A análise de citocinas não evidenciou, portanto um efeito imunomodulador sistêmico ou local (no coração) após a terapia com imunoglobulina humana.

Este trabalho teve como principais limitações o modelo utilizado que, até então, não havia sido avaliado do ponto de vista ecocardiográfico, não reproduzindo, portanto, modelo de cardiomiopatia dilatada. Assim como, a avaliação dos dados da ergometria e respirometria foram prejudicados pela importante miosite evidenciada à análise histopatológica. Outra limitação foi a evidência de depósito antígeno-anticorpo no lúmen dos vasos arteriais com redução importante do calibre dos mesmos nos animais tratados com imunoglobulina, fato esse não mencionado em nenhum protocolo anterior. Estas alterações podem ter prejudicado o efeito imunomodulador da terapia com o uso da imunoglobulina. Deste modo, concluímos que a terapia com imunoglobulina humana não demonstrou eficácia anti-inflamatória nem induziu a melhora da função cardíaca no modelo murino de cardiopatia chagásica crônica.

12. CONCLUSÕES

As metodologias planejadas foram satisfatórias resultando na produção de três diferentes preparações de imunoglobulina humana. As preparações foram bioquímica e biofisicamente caracterizadas e os resultados foram condizentes com os protocolos definidos pela Farmacopeia Europeia e descritos pela Agência Regulatória Nacional

O estudo descreveu, pela primeira vez, a produção de uma preparação de imunoglobulina anti-dengue, além da produção dos seus fragmentos F(ab')₂ específicos.

Utilizando o modelo de infecção primária sistêmica pelo DENV-3 os resultados preliminares apontaram um agravamento da doença e aumento da mortalidade dos animais, após tratamento com imunoglobulina anti-dengue. Esses resultados são sugestivos de ocorrência do fenômeno ADE nos camundongos tratados com IGIV específica.

Os animais tratados com IGIV anti-dengue apresentaram intensa alteração hematológica, demonstrado pelo aumento dos níveis de hematócrito e marcante queda no número de plaquetas circulantes.

O tratamento com imunoglobulina aumentou, de modo significativo, os níveis de ALT, onde esse aumento foi condizente com a lesão hepática observada nos animais. Além disso, houve intenso acúmulo de neutrófilos nos órgãos dos animais tratados com IGIV anti-dengue.

A análise de citocinas evidenciou um aumento destas no soro dos animais tratados com a IGIV, assim como da quimiocina CXCL-1. Esses animais também apresentaram intenso aumento da carga viral, tanto no baço quanto no sangue.

Com relação à avaliação de IGIV em cardiomiopatia chagásica, o modelo utilizado neste trabalho reproduz a forma arritmica da doença de Chagas e não a forma dilatada com disfunção ventricular.

O tratamento com imunoglobulina humana não reduziu a incidência de arritmias cardíacas em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.

O tratamento com IGIV não melhorou a tolerância ao exercício mensurada através dos parâmetros de ergometria e respirometria em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.

Os animais do grupo imunoglobulina tiveram uma redução da inflamação e fibrose, porém com maior agressividade das lesões à análise histológica.

A análise de citocinas evidenciou um aumento destas no soro dos animais chagásicos tratados com IGIV em relação aos animais normais, não havendo evidências de um efeito imunossupressor sistêmico ou local (no coração) após a terapia com imunoglobulina humana.

13. REFERÊNCIAS

AADEN, L.A. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. **The Journal of Immunology**, v. 123, n. 6, p. 2928-2929, dezembro. 1979.

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

ABEL, L. C et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increase INF- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 99-107, agosto. 2001.

ACHIRON, A. et al. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis. Effect on relapses. **Neurology**, Israel, v. 50, n. 2, p. 589-593, fevereiro. 1999.

ACHIRON, A. et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenously administered polyclonal immunoglobulins. **Journal of Autoimmunity**. Israel, v. 15, n. 3, p. 323-330, novembro. 2000.

AMABIS MARTHO. **Biologia dos Organismos**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Moderna, 2004.

AMY G. A.; LYLE R. P. Human Immunoglobulin as a Treatment for West Nile Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Colorado, v. 188, n.1, p. 1–4, julho. 2003.

ANDERSON, U.; BJORK, L.; SKANSEN-SAPHIR, U. Pooled human IgG modulates cytokine production in lymphocytes and monocytes. **Annual Review of Immunology**, Suécia, v. 139, p. 21– 42, junho. 1994.

ANDRADE, L. O. et al. The *Trypanosoma cruzi* - host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**. Belo Horizonte, v. 3, n. 10, p. 819-823, outubro. 2005.

ANIS, R. J. ; ANIS, R.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402. 2010.

ARONSON, D. L.; FINLAYSON, J. S. **Historical and future therapeutic plasma derivatives** (Epilogue). Seminars in Thrombosis and Hemostasis VI, p. 1231–9. 1980.

ASSUNÇÃO, M. I. et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. **FASEB Journal**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 218–228, janeiro. 2010.

ATKINS, J. T. et al. 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. **The Pediatric Infectious Disease**, USA, v.19, n. 2, p. 138-143, fevereiro. 2000.

ATRASHEUSKAYA, A. et al. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Rússia, v. 35, n. 1, p.33–42, janeiro. 2003.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9.000 year record of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA , v. 101, n. 7, p. 2034-2039, fevereiro. 2004.

AUKRUST, P.; FRØLAND, S. S.; LIABAKK, N. K. Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. **Blood**, Noruega, v. 84, n. 7, p. 2136 –2143, outubro. 1994.

AUKRUST, P. et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. **American Journal of Cardiology**, Noruega, v. 83, n. 3, p. 376-382, fevereiro. 1999.

AUKRUST, P. et al. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. **Annals of Medicine**, Norway , v. 37, n.2, p. 74-85, outubro. 2005.

BALLOW, M. J Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, USA, v. 100, n. 2, p. 151–157, agosto. 1997.

BALSITIS, S. J. et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. **PLoS Pathogens**, Califórnia, v. 6, n. 2, e1000790, fevereiro. 2010.

BARBOSA, P. R. B. et al. The oral transmission of Chagas disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 1, p. 132-133, abril. 2006.

BARANDUN, S. Intravenous administration of human gamma-globulin. **Vox Sanguinis**, v. 7, p. 157–174. 1962.

BARANDUN, S. et al. Clinical tolerance and catabolism of plasmin-treated gammaglobulin for intravenous application. **Vox Sanguinis**, v. 28, n. 3, p. 157–175. 1975.

BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. **Science**, v. 220, n. 4599, p.868–871, maio. 1983.

BARRET, M. P. et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, Glasgow, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, novembro. 2003.

BEAUMIER, C. M. et al. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144-155, setembro, 2013.

BEN-NATHAN, D. et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile Virus infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, Israel, v.188, n. 1, p.5-12, julho. 2003.

BENVENUTTI, L. A.; HIGUCHI, M. L.; REIS, M. M. Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardial of chronic chagasic cardiomyopathy and heart allograft rejection, but not in dilated cardiomyopathy. **Cardiovascular Pathology**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 111-117, março-abril. 2000.

BERGAMI, P. L.; SCAGLIONE, J.; LEVIN, M. J. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. **The FASEB Journal**, Buenos Aires, v. 15, n. 14, p. 2602-2612, dezembro. 2001.

BERGER, M. A history of immune globulin therapy, from the Harvard crash program to monoclonal antibodies. **Current Allergy and Asthma Reports**, Cleveland, v. 5, n. 2, p. 368-378, setembro. 2002.

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, outubro. 2000.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. **JAMA**, Géorgia, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, novembro. 2007.

BERZOFSKY, J. A.; BERKOWER, I. J. **Antigen-antibody interaction In: Fundamental immunology**. Ed. W.E. Paul: New York, 1993. p. 595-644.

BIESERT, L. Virus validation studies of immunoglobulin preparations. **Clinic and Experimental Rheumatology**, Inglaterra, v. 14, Suppl. 15, p. S47–S52, maio- junho. 1996.

BJORKANDER, J. et al. Immunoglobulin prophylaxis in patients with antibody deficiency syndromes and anti-IgA antibodies. **Journal of Clinical Immunology**, v.7, n. 1, p.8–15, janeiro. 1987.

BJÖRKANDER, J. et al. Intravenous immunoglobulin prophylaxis causing liver damage in 16 of 77 patients with hypogammaglobulinemia or IgG subclass deficiency. **American Journal of Medicine**, Suécia, v. 84, n. 1, p. 107–111, janeiro. 1988.

BOCCHI, E.; FIORELLI, A. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, São Paulo, v. 20,n. 6, p. 637-645, junho, 2001.

BORDA, E. S.; STERINI-BORDA, L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, Argentina, v. 54, n. 2, p. 149-156, maio. 1996.

BOS, O. J. et al. Virus validation of pH 4-treated human immunoglobulin products produced by the Cohn fractionation process. **Biologicals**, v.26, n. 4, Holanda, p.267–276, dezembro, 1998.

BOZKURT, B. et al. Intravenous immune globulin in the therapy of peripartum cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, Texas, v. 34, n. 1, p. 177-180, julho.1999.

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

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: isolamento do vírus DENV 4 em Roraima, Brasil. Brasília, DF, 2010**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>. Acesso em: dezembro de 2010.

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. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM. Brasília, DF, 2011a**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Belém/PA. Brasília, DF, 2011b.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim 1/2012 - Dengue: situação epidemiológica - Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012).** Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf. Acesso em: 07 de fevereiro de 2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC 46, de 18 de Maio de 2000 (DOU 19/05/00) - Normatiza os processos de produção e controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 dezembro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim 1/2012 - Dengue: situação epidemiológica - Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012).** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/6254/785/nova-edicao-do-boletim-epidemiologico-aborda-mortalidade-materna-aids-dengue-e-tuberculose.html> Acesso em: 02 de fevereiro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Aspectos epidemiológicos doença de Chagas- ano 2012.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454 Acesso em: 28 de janeiro de 2013.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta pública nº 36, de 20 de Maio de 2004 (DOU 21/05/2004) - Resolução que aprova as Diretrizes para o Uso de Imunoglobulinas.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 02 de janeiro de 2013.

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.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454 Acesso em: 03 de fevereiro de 2013.

BRENNAN, D. C. Polyclonal antibodies in immunosuppression. **Transplantation Proceedings**, Missouri, v. 33, n. 1-2, p. 1002-1004, fevereiro-março. 2001.

BROOM, A. K. et al. Immunisation with gamma globulin to Murray Valley encephalitis virus and with an inactivated Japanese encephalitis virus vaccine as prophylaxis against Australian encephalitis: evaluation in a mouse model. **Journal of Medical Virology**, Austrália, n. 61, v. 2, p. 259–265, junho. 2000.

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

BUSTAMANTE, J. M. et al. *Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac b-adrenergic receptors dysfunction in the acute phase of experimental Chagas disease. **Experimental Parasitology**, Argentina, v. 103, n. 3-4, p. 136–142, março-abril. 2003.

BUSTAMANTE, J. M. et al. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitology Research**, Córdoba, v. 100, n. 6, p.1407-1410, maio. 2007.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. In: **Fields Virology**. Philadelphia: eds. Knipe, 2001. p. 1043–1125.

BURTON, M. et al. Immunoglobulin Purification from Human Plasma Fractions, paper presented at the **Production and Economics of Biopharmaceuticals conference (IBC)**, San Diego, CA, 14–15 Novembro. 2001.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. **Haemophilia**, França, v. 9, n. 1, p. 24–37, janeiro. 2003.

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.

BURNOUF-RADOSEVICH, M. et al. Nanofiltration, a new specific virus elimination method applied to high-purity factor IX and factor XI concentrates. **Vox Sanguinis**, França, v. 67, n. 2, p. 132–138. 1994.

CAILLET-FAUQUET, P. et al. Continuous-flow UVC irradiation: a new effective, protein activity preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. **Journal of Virological Methods**, Bélgica, v. 118, n. 2, p. 131–139, junho. 2004.

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

CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. "Serum therapy" revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, USA, v. 38, n. 8, p. 1695–1702, agosto. 1994.

CASADEVALL, A. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons. **Emerging Infectious Diseases**, USA, v. 8, n. 8, p. 833–841, agosto. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Provisional public health service interagency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 34, p. 1–5. 1985.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p 159-218, 1909.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Wallingford, USA: CAB International, 1997. p. 175-98.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, Tailândia, v. 88, p. 365–375, fevereiro. 2007.

CHATURVEDI, U. C. et al. Cytokine cascade in Dengue haemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Kuwait, v. 28, n. 3, p.183–188, julho. 2000.

CHEN, L. C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Taiwan, v.74, n. 1, p. 142–147, janeiro. 2006.

CHESTNUT, R. W.; GREY, H. M. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 126, n. 3, p. 1075-1079, março. 1981.

CORDEIRO, T. M.; SILVA, M. A.; BRITO, A. A. C.; NASCIMENTO, M. J. E.; MAGALHÃES, F. C. M.; GUIMARÃES, F. G.; SILVA, L. N.; CARVALHO, F. M.E.; MARQUES, A. T. E. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, p.1128-1134, outubro. 2007.

COSTA, P. et al. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac eletrogenesis and conduction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 4, p. 439-446, abril. 2000.

COSTA, V. V. et al. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN-c in Host Resistance to Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n.5 , p.e1663, maio. 2012.

COURA, J. R. Chagas' disease: what is known and what's needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, Suppl. 1, p. 113–122, setembro. 2007.

CUNHA-NETO, E. et al. Cytocine production profile of heart infiltrating T cells in Chagas disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 133-137, janeiro. 1998.

DALAKAS, M. C. et al. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. **New England Journal of Medicine**, Bethesda, v. 329, n. 27, p. 1993-2000, dezembro. 1993.

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.

DEGOWIN, E. L.; HARDIN, R. C. A Plan for Collection, Transportation and Administration of Whole Blood and of Plasma in Warfare. **U.S. Army Medical Departament**, USA, v. 1, p. 326-341, maio. 1941.

DEROUICH, M.; BOUTAYEB, A.; TWIZELL, E. A model of dengue fever. **BioMedical Engineering OnLine**, Inglaterra, v.2, n.4, p. 1-10, fevereiro. 2003.

DIAS, J. C. P. et al. Epidemiologia. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico. **FioCruz**, cap. 3, p.33-65, Rio de Janeiro. 1997.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, supl.1, p. S13-22, Rio de janeiro. 2007.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 2, p. 193-196, março-abril. 2008.

DOBARRO, D et al. Chagas heart disease in Europe: an emergent disease? **Journal Cardiovascular Medicine**, Madri, v. 9, n. 12, p. 1263-1267, dezembro. 2008.

DWYER, J. M. Manipulating the immune system with immune globulin. **New England Journal of Medicine**, Austrália, v. 326, n. 2, p.107–116, janeiro. 1992.

EDWARDS, C. A. et al. Tri (n-butyl) phosphate/ detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives. **Vox Sanguinis**, v. 52, n. 1-2, p. 53–59. 1987.

EIBL, M. M. History of Immunoglobulin Replacement **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Áustria, v. 28, n. 4, p. 737–764, novembro. 2008.

ELLURU, S. et al. Corrigendum to “Comparative study of the anti-inflammatory effect of two intravenous immunoglobulin preparations manufactured by different processes. **Immunology Letters**, Paris, v.107, n. 2, p. 58–62, novembro. 2006.

EMMI, L.; CHIARINI, F. The role of intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune and inflammatory disorders. **Neurological Science**, Itália, v. 23, Suppl. 1, S1– S8, abril. 2002.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Tropica**, Chicago, v. 81, n. 2, p. 123-132, fevereiro. 2002.

FALKSVEDEN, L. G. Method for fractionating plasma proteins. **Patent Sweden**, n. 348942, 1970.

FAGUNDES, C. T. et al. IFN γ Production Depends on IL-12 and IL-18 Combined Action and Mediates Host Resistance to Dengue Virus Infection in a Nitric Oxide- Dependent Manner. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Minas Gerais, v. 5, n. 12, e1449, dezembro. 2011.

FALKSVEDEN, L. G.; LUNDBLAD, G. Ion exchange and polyethylene glycol precipitation of immunoglobulin G. **Methods of Plasma Protein Fractionation**. London, Academic Press, 1980.

FEDERICI, E. E.; ABELMAN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Washington, v. 13, p. 272-280, abril. 1964.

FERREIRA, R. C. et al. Increase plasma levels of Tumor Necrosis Factor in asymptomatic indeterminate and Chagas disease cardiomyopathy patients. **American Journal Pathology**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 407-411, abril. 2003.

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

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

GARCIA, S. et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Salvador, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, abril. 2005.

GELFAND, M. D. Antibody-directed therapy: past, present, and future. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, USA, v. 108, Suppl. 4, p. S111-S116, outubro. 2001.

GELFAND, E. W. Differences between IVIG products: impact on clinical outcome. **International Immunopharmacology**, USA, v.6, n. 4, p. 592-599, abril. 2006.

GEORGE, J.; BRASCHAK, I. et al. The effect of intravenous immunoglobulin on the progression of experimental autoimmune myocarditis in the rat. **Experimental and Molecular Pathology**, Israel, v.71, n.1, p. 55-62, agosto. 2001.

GONÇALVES, S.; ROSSI, M. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 990-991, 1986.

GONG, F. et al. The therapeutic effect of intravenous immunoglobulins and vitamin C on the progression of experimental autoimmune myocarditis in the mouse. **Medical science monitor**, China, v. 13, n. 11, p. 240-246, novembro. 2007.

GOLDENBERG, R. C. et al. Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. **Journal of Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 197, n.4, p. 544-547, fevereiro. 2008.

GUABIRABA, R. et al. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 12, e15680, dezembro. 2010.

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.

GUY, B. et al. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista PanAmazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, n. 2, p. 51-64, junho. 2001.

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.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Cuba, v.8, n. 2, p. 69-80, março. 2004.

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

GIRONÈS, N. et al. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology**, Madri, v.19, n.1, p. 19-22, janeiro, 2003.

GITLIN, D. JANEWAY, C. A. Agammaglobulinemia congenital, acquired, and transient forms. **Program Hematology**, v. 1, p. 318-329. 1956.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th-1 specific immune response. **Infection and Immunity**, Belo Horizonte, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, março. 2003.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. USA, v.11, n. 3, p. 480–496, julho. 1998.

GULLESTAD, L. et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Norway, v. 103, n. 2, p. 220-225, janeiro. 2001.

HALEY, M. et al. The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. **Clinical Infectious Diseases**, Maryland, v. 37, n. 6, p. 88–90, setembro. 2003.

HALSTEAD, S. B. *In vivo* enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. **Journal of Infectious Diseases**, v.140, n. 4, p.527–533, outubro. 1979.

HALSTEAD, S. B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **Rapp Trimest Statist Sanit Mond**, New York, v. 45,n. 2-3, p. 292-297, 1992.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista Panamericana de Salud Publica**, Maryland, v. 20, n. 6, p. 407-415, dezembro. 2006.

HAMAMOTO, Y. et al. Elimination of viruses (human immunodeficiency, hepatitis B, vesicular stomatitis and sindbis viruses) from an intravenous immunoglobulin preparation. **Vox Sanguinis**, Japão, v. 53, n. 2, p. 65–69. 1987.

HAMDAN, A. et al. Possible benefit of intravenous immunoglobulin therapy in a lung transplant recipient with West Nile virus encephalitis. **Transplant Infectious Disease**, Israel v. 4, n. 3, p. 160-162, setembro. 2002.

HANN, A. F. Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study. **Brain**, Canadá, v.119, n. 4, p. 1067-1077, agosto. 1996.

HANNA, K. et al. Intravenous immune globulin use in Canada. **Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, Canadá, v. 10, n.1, p. 1-16. 2003.

HARLOW, E. ; LANE, D. **Anticorps, un manuel de laboratoire**. Éditions Pradel: Paris, 1991. p. 725.

HASEMANN, C. A.; CAPRA J. D. Immunoglobulins: Structure and Function. In: **Fundamental Immunology**.2. ed. New York: Editora Raven Press, 1989. p. 209-233.

HEMMING, V. G. Use of intravenous immunoglobulins for prophylaxis or treatment of infectious diseases. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 859–863, setembro. 2001.

HÉNIN, Y. et al. Inactivation and partition of human immunodeficiency virus during Kistler and Nitschmann fractionation of human blood plasma. **Vox Sanguinis**, França, v. 54, n. 2, p. 78–83. 1988.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clinical Cardiology**, São Paulo, v. 10, n. 11, p. 665-670, novembro. 1987.

HIGUCHI, M. L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol**, São Paulo, v. 423, n. 3, p. 157-160, 1993.

HOOPER, J. A.; ALPERN, M.; MANKARIOUS, S. Immunoglobulin manufacturing procedures. **Immunoglobulins**. Amsterdam, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, p. 361–80. 1988.

HOPPE, H. et al. Production of anti-Rh gamma globulin for preventive immunization. **Munchener Medizinische Wochenschrift**, v. 109, n. 34, p. 1749–1752, agosto. 1967.

HOROWITZ, B. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combinations. **Transfusion** v. 25, n. 6, p. 516–522, novembro-dezembro.1985.

HOROWITZ, B. Preparation of virus sterilized immune globulin solutions by treatment with organic solvent/detergent mixtures. **Immunoglobulins**, Amsterdam, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, p. 285–95. 1988.

HOROWITZ, B. et al. Virus inactivation by solvent/detergent treatment and the manufacture of SD-plasma. **Vox Sanguinis**, USA, v. 74, suppl 1, p. 203–206. 1998.

HUGHES, J. B.; DAILY, G. C.; EHRLICH, P. R. Population diversity: its extent and extinction. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 689–692, outubro. 1997.

ISTÚRIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; CASTILLO, J. B. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious Disease Clinics of North America**, Venezuela, v. 14, n. 1, p. 121-40, março. 2000.

JAIN, R. K. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium - A Review. **Cancer Research**, v. 47, n. 12, p. 3039-3051, junho. 1987.

JANEWAY, C. A. et al. Metabolism of gamma globulin fragments in normal and agammaglobulinemic persons. **New England Journal of Medicine**, v. 278, n. 17, p. 919–923, abril. 1968.

KEMPF, C. et al. Virus inactivation during production of intravenous immunoglobulin. **Transfusion**, Suíça, v. 31, n. 5, p. 423–7, junho. 1991.

KIM, K. S. et al. Functional activities of various preparations of human intravenous immunoglobulin against type III group B *Streptococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 153, n. 6, p. 1092–1097, junho. 1986.

KIM, I. S. et al. Improvement of virus safety of a human intravenous immunoglobulin by low pH incubation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, República da Coréia, v. 11, n. 4, p. 619–627. 2001.

KIMURA-KURODA, J.; YASUI, K. Protection of mice against Japanese encephalitis virus by passive administration with monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, Japão, v. 141, n. 10, p. 3606–3610, novembro. 1988.

KNEZEVIC-MARAMICA, I.; KRUSKALL, M. S. Intravenous immune globulins: an update for clinicians. **Transfusion**, Massachusetts, v. 43, n. 10, p. 1460-1480, outubro. 2003.

KOFFMAN, B. M.; DALAKAS, M. C. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin on serum chemistry, hematology, and lymphocyte subpopulations: assessments based on controlled treatment trials in patients with neurological diseases. **Muscle Nerve**, Bethesda, v. 9; n. 20, p. 1102-1107, setembro. 1997.

KROEZ, M. et al. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. **Biologicals**, Alemanha, v.31, n. 4, p.277–286, dezembro. 2003.

KRAUSE, I. et al. In vitro antiviral and antibacterial activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations- a potential role for adjuvant intravenous immunoglobulin therapy in infectious diseases. **Transfusion Medicine**, Israel, v. 12, n. 2, p. 133–139, abril. 2002.

KUMAR, D. et al. Community-acquired West Nile virus infection in solidorgan transplant recipients. **Transplantation**, Canadá, v. 77, n. 3, p. 399-402, fevereiro. 2004.

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.

LAMOYI, E. Preparation of F (ab')² fragments from mouse IgG of various subclasses. **Methods in Enzymology**, v. 56, n. 2, p. 235-43, janeiro. 1986.

LANE, R. S. Non-A, non-B hepatitis from intravenous immunoglobulin. **Lancet**, v. 2, n. 8356, p. 974-975, outubro. 1983.

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

LEUNG, D. Y. Kawasaki disease. **Current Opinion in Rheumatology**, Denver, v. 5, n. 1, p.41–50, janeiro. 1993.

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.

LO PRESTI, M. S. et al. Changes in the cardiac h-adrenergic system provoked by different T. cruzi strains. **International Journal of Cardiology**, v. 111, n. 1, p. 104 – 112, julho. 2006.

LORIES, R. J. et al. The use of polyclonal intravenous immunoglobulins in the prevention and treatment of infectious diseases. **Acta Clinica Belgica**, Bélgica, v. 55, n. 3, p. 163-169. 2000.

LUO, Q. et al. High-performance affinity chromatography for characterization of human immunoglobulin G digestion with papain. **Journal Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, China, v.776, n. 2, p. 139-47, setembro. 2002.

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.

MADY, C. et al. Survival and predictor of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas cardiomyopathy. **Circulation**, São Paulo, v. 90, n. 6, p. 3098-3102, dezembro. 1994.

MACIEL, I. J. ; SIQUEIRA, J. B. JR.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 37, n.2, p.111-130, maio-junho. 2008.

MAHALINGAM, S.; LIDBURY, B. A. Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF-B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, Austrália, v. 99, n. 21, p. 13819–13824, outubro. 2002.

MANN, D. L. et al. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. **Circulation Research**, Houston, v. 91, n. 11, p. 988-998, novembro. 2002.

MANSUN, L.; LARS, H. Antibodies against viruses: passive and active immunization. **Current Opinion in Immunology**, USA, v. 20, n. 4, p. 486–492, agosto. 2008.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, São Paulo, v. 115, p. 1109-1123, 2007.

MATHEWS, J. H.; ROEHRIG, J. T. Elucidation of the topography and determination of the protective epitopes on the E glycoprotein of Saint Louis encephalitis virus by passive transfer with monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v.132, n. 3, p. 1533–1537, março. 1984.

MCCUE J. P., HEIN R. H., TENOLD R. Three generations of immunoglobulin G preparations for clinical use. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 8, Suppl. 4, p. S374–81, julho-agosto. 1986.

McNAMARA, D. M. et al. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. **Circulation**, Pittsburgh, v. 103, n. 18, p. 2254-2259, maio. 2001.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of Parasitology**, Brasil, v. 64, n. 3, p. 475-482, junho. 1978.

MENDEZ, G. F.; COWIE, M. R. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **International Journal of Cardiology**, Londres, v. 80, n. 2-3, p. 213-219, setembro-outubro. 2001.

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.

MILEI, J. et al. Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. **Cardiology**, Buenos Aires, v. 80, n. 5-6, p. 424-437, 1992.

MILENIC, D. E. Characterization of primate antibody responses to administered murine monoclonal immunoglobulin. **International journal of biological markers**, USA, v. 5, n.4, p. 177-187, outubro- dezembro. 1990.

MITRA, G. et al. Elimination of infectious retroviruses during preparation of immunoglobulin. **Transfusion**, v. 26, n. 4, p. 394–397, julho-agosto. 1986.

MOLINA, R. B. et al. Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Botucatu, v. 113, n. 2, p. 188-193, novembro. 2006.

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.

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.

MORELL, A. et al. Correlations between the concentrations of the four sub-classes of IgG and Gm Allotypes in normal human sera. **Journal of Immunology**, v.108, n. 1, p.195–206, janeiro. 1972.

MORENS, D. M. et al. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. **Journal of Clinical Microbiology**, Havaí, v.22, n. 2, p.250-254, agosto. 1985.

NGUYEN T. L.; NGUYEN T. H.; TIEU N. T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Research in virology**, Vietnam, v. 148, n. 4, p. 273–277, julho-agosto. 1997.

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.

NOUR, B. et al. Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients. **Transplantation**, USA, v. 56, n. 4, p. 835–838, outubro. 1993.

OCHS, H. D. et al. Non-A, non-B hepatitis after intravenous gammaglobulin. **Lancet**, p. 404-405. 1985.

OHLSSON, A.; LACY, J. B. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. **Cochrane Database Systematic Reviews**, Toronto, n. 2, CD000361, 2001.

OLIVEIRA, E. et al. The valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy. **International Journal of Cardiology**, Belo Horizonte, v. 82, n. 1, p. 49-54, janeiro. 2002.

OLIVIERI, B. P. et al. Intravenous immunoglobulin increases survival time in the acute phase of experimental Chagas disease. **Parasite Immunology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 464-469, junho. 2010.

OMAR, A. et al. Virus inactivation by pepsin treatment at pH 4 of IgG solutions: factors affecting the rate of virus inactivation. **Transfusion**. Inglaterra, v. 36, n. 10, p. 866–872, outubro. 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **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. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **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. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Fact sheet, n. 117. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 08 dezembro de 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses**. Geneva, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/>>. Acesso em: 08 dezembro de 2010.

PARADA, H. et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **International Journal of Cardiology**, Barinas, v. 60, n. 1, p. 49-54, junho. 1997.

PARRA, A. V. et al. Impact of socio - economic status on outcome of a Brazilian heart transplant recipients cohort. **International Journal of Cardiology**, v.125, n.1, p. 142-143, março. 2008.

PHILLOTTS, R. J.; STEPHENSON, J. R.; PORTERFIELD, J. S. Passive immunization of mice with monoclonal antibodies raised against tick-borne encephalitis virus: brief report. **Archives of Virology**, v. 93, n. 3-4, p. 295–301. 1987.

PISZKIEWICZ, D. et al. Inactivation of HTLV III/LAV during plasma fractionation. **Lancet**, v. 2, n. 8465, p. 1188-1189, novembro. 1985.

POELSLE, G. et al. A new liquid intravenous immunoglobulin with three dedicated virus reduction steps: virus and prion reduction capacity. **Vox Sanguinis**, Áustria, v. 94, n. 3, p. 184–192, abril. 2008.

POLLACK, M. Antibody activity against *Pseudomonas aeruginosa* in immune globulins prepared for intravenous use in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 147, n. 6, p. 1090–1098, junho. 1983.

PRATA, A. et al. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. **The Lancet Infectious Diseases**, Uberaba, v. 1, n. 2, p. 92-100, setembro. 2001.

PRIMUS, F. J. Circulating Immune-Complexes in Cancer Patients Receiving Goat Radiolocalizing Antibodies to Carcinoembryonic Antigen. **Cancer Research**, v. 40, n. 3, p. 497-501, março. 1980.

PRINCE, A. M. et al. Inactivation of the Hutchinson strain of non-A, non-B hepatitis virus by combined use of β -propiolactone and ultraviolet irradiation. **Journal of Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 119–125, junho. 1985.

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

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, New York, v. 115, n. 3, p. 279-283, fevereiro. 2007.

RAMOS, JR. A. N.; HEUKELBACH J. **Chagas' disease** (BMJ Point of Care - Monograph). London: British Medical Journal Group, 2010.

RASSI, A. et al. **Fase aguda in *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 231-245, 2000.

RASSI, JR., A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas heart disease. **New England Journal of Medicine**, Goiânia, v. 355, n. 8 p. 799-808, agosto. 2006.

RASSI, JR. A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, Goiânia, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, abril. 2010.

REID, K. G. et al. Potential contribution of mild pepsin treatment at pH4 to the viral safety of human immunoglobulin products. **Vox Sanguinis**, Reino Unido, v. 55, n. 2, p. 75–80. 1988.

REILLEY, B. et al. Perspective- SARS and Carlo Urbani. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1951–1952, maio. 2003.

REIS, D. D. et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Belo Horizonte, v. 49, n. 2, p. 192-200, agosto. 1993.

REIS, M. M. et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of citocines and IL-2R + in chonic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical Immunology and Immunopathology**, São Paulo, v. 83, n. 2, p. 165-172, maio. 1997.

REVELLI, S. et al. Levels of tumor necrosis alpha, gama interferon, and interleukins 4, 6, and 10 as determined in mice infected with virulent attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitololy Research**, Argentina, v. 85, n. 2, p. 147-150, fevereiro. 1999.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Belo Horizonte, v. 117, n. 1, p. 59-63, abril. 2007.

ROCHA, N. N. et al. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, Rio de Janeiro, v. 133, n. 6, p. 729-737, dezembro. 2006.

ROEHRIG, J. T. et al. Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. **New York Academy of Science**, v. 951, p. 286–297, dezembro. **2001**.

ROSSI, M. A. et al. Fibrosis and inflammatory cells en human chronic chagasic myocarditis scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. **International Journal of Cardiology**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 183-19, setembro. 1998.

ROSS L, P.; JAIN, N. Risks Associated With the Use of Intravenous Immunoglobulin. **Transfusion Medicine Reviews**, USA, v.17, n.4, p. 241-251, outubro. 2003.

ROSS, T. M. Dengue virus. **Clinical Laboratory Medicine**, USA, v.30, n. 1, p.149-160, março. 2010.

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.

SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, Bangkok, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, novembro. 2012.

SAMUELSON, A.; TOWERS, T. L.; RAVETCH, J. V. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. **Science**, v. 291, n. 5503, p. 484-486, janeiro. 2001.

SAMUDIO, M. et al. Differential expression of systemic cytokines profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. **Acta Tropica**, Asunción, v. 69, n. 2, p. 89-97, maio. 1998.

SAQUIB, R. et al. West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient: the role of intravenous immunoglobulin. **American Journal of Kidney Diseases**, USA, v.52, n. 5, p. 19-21, agosto. 2008.

SCHIFF, R. I. Intravenous gammaglobulin: pharmacology, clinical uses and mechanisms of action. **Pediatric Allergy and Immunology**, USA, v. 5, p. 63–87, maio. 1994.

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 4, p. 2805–2809, outubro. 1985.

SCHMUNIS, G. A. et al. Epidemiology of Chagas Disease in nonendemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Washington D.C., v. 102, n.8, p. 75-85, dezembro. 2007.

SENAKA, R. Intravenous immunoglobulins in the treatment of dengue illness, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Sri Lanka, v. 103, n. 9, p. 867–870, setembro. 2009.

SHIOJE, K. et al. Immunoglobulin treatment suppressed adoptively autoimmune myocarditis in severe combined immunodeficient mice. **American Journal of Physiology - Heart Physiol**, Japão, v. 287, n. 6, p. 2619–2625, dezembro. 2004.

SMITH, G. N. et al. Uptake of IgG after intramuscular and subcutaneous injection. **Lancet**, Londres, v. 299, n.7762, p. 1208–1212, junho. 1972.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10, and IFN- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal Experimental Medicine**, Washington D.C, v. 175, n. 1, p. 169–174, janeiro. 1992.

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.

SOARES, M. B. P; PONTES C. L.; RIBEIRO S. R. The pathogenesis of Chagas'disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Salvador, v.73, n. 4, p. 547-559, dezembro. 2001.

SOARES, M. B. P.et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **American Journal of Clinical Pathology**, Salvador, v.164, n. 2, p. 441-447, fevereiro. 2004.

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.

SOUZA D. G. et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , Ribeirão Preto, v. 106, p. 14138–14143, julho. 2009.

SIBER, G. A. et al. Interference of immune globulin with measles and rubella immunization. **Journal of Pediatrics**, Massachusetts, v.122, n. 2, p. 204-211, fevereiro. 1993.

SIBERIL, S. et al. Intravenous immunoglobulins in autoimmune and inflammatory diseases: A mechanistic perspective, **New York Academy of Science**, França, v. 1110 p. 497–506, setembro. 2007.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, Suppl. 2, p. 52–63. 2011.

STIEHM, E. R. Human gamma globulins as therapeutic agents. **Advances in Pediatrics**, Los Angeles, v. 35, p. 1 – 72. 1988.

STHIEM, E. R. Human intravenous immunoglobulin in primary and secondary antibody deficiencies. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, USA, v. 16, n. 7, p. 696– 707, julho. 1997.

STIEHM, E. R., KELLER, M. A., VYAS, G. N. Preparation and use of therapeutic antibodies primarily of human origin. **Biologicals**, Los Angeles, v. 36, n. 2, p. 363–374, novembro. 2008.

TALVANI, A. et al. Elevated concentration of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Belo Horizonte, v. 38, n. 7, p. 943-950, abril. 2004.

TANAKA, K. et al. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 27–30, novembro. 2000.

TEDESCHI, A. et al. High-dose intravenous immunoglobulin in the treatment of acute myocarditis. A case report and review of the literature. **Journal of Internal Medicine**, v. 251, n. 2, p. 169-173, fevereiro. 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; 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.

TESCHNER, W. et al. A new liquid intravenous gammaglobulin product (IGGIV 10%) highly by state-of-the-art process. **Vox Sanguinis**, v. 92, p. 42-5. 2007.

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.

TOSTES JR. et al. Human chronic chagasic myocarditis: quantitative study of CD4+ and CD8+ lymphocytes in inflammatory exudates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 27, n. 3, p. 127-134, julho-setembro. 1994.

UEMURA, Y. et al. Inactivation and elimination of viruses during fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation: liquid heat treatment and polyethylene glycol fractionation. **Vox Sanguinis**, Japão, v. 56, n. 3, p. 155– 161. 1989.

UNDERDOWN, B.; SCHIFF, J. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. **Annual Review of Immunology**, Canadá, v. 4, p. 389-417, abril. 1986.

URBINA, J. A.; CAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitology**, Caracas, v. 19, n. 11, p. 495-501, novembro. 2003.

VAZQUEZ, S. et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. **Journal of Virological Methods**, Cuba, v. 110, n. 2, p. 179-184, junho. 2003.

VASSILEV, T. L. et al. Inhibition of cell adhesion by antibodies to Arg-Gly-Asp (RGD) *in normal* immunoglobulin for therapeutic use (intravenous immunoglobulin IVIG). **Blood**, Paris, v. 93, n.11, p. 3624-3631, junho. 1999.

VYAS, G. N.; PERKINS, H. A.; FUDENBERG, H. H. Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. **The Lancet**, Chicago, v.2, p.312–315, agosto. 1968.

WADEI, H. et al. West Nile virus encephalitis: an emerging disease in renal transplant recipients. **Clinical Transplantation**, Detroit, v. 18, n. 6, p. 753–758, dezembro. 2004.

WALLACE, D. et al. Challenges in the clinical development of a dengue vaccine. **Current Opinion in Virology**, Singapore, v. 3, n. 3, p. 352-356, junho, 2013.

WELLS, M. A. et al. Inactivation and partition of human T-cell lymphotropic virus, type III, during ethanol fractionation of plasma. **Transfusion** v. 26, n. 2, p. 210–213, março-abril. 1986.

WERDAN, K. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. **Current Opinion in Critical Care**, Inglaterra, v. 7, n. 5, p. 354-361, outubro. 2001.

WHITEHEAD, S. S. et al. Host Response to the Dengue Virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 518-528. 2007.

WOLF, H. M.; EIBL M. M. Immunomodulatory effect of immunoglobulins. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Áustria, v.14, Suppl. 17–25, maio - junho. 1996.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas' disease (American trypanosomiasis) Fact sheet (revised in June2010)**. Disponível em:<<http://www.who.int/wer/2010/wer8534.pdf>>Acesso em: 20 de outubro de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**. Disponível: < <http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acesso em 10 de julho de 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue control support through eco-bio-social approach**. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>>. Acessado em: 2 março de 2012.

WILDER-SMITH, A.; SCHWARTZ, E. Dengue in travelers. **New England Journal of Medicine**, Singapura, v.353, n. 9, p.924–932, setembro. 2005.

YEI, S.; YU, M. W.; TANKERSLEY, D. L. Partitioning of hepatitis C virus during Cohn-Oncley fractionation of plasma. **Transfusion**, Maryland, v. 32, n. 9, p. 824–828, novembro-dezembro. 1992.

YOKOTA, T. Rapid Tumor Penetration of a Single-Chain Fv and Comparison with other Immunoglobulin Forms. **Cancer Research**, USA, v. 52, n. 12, p. 3402-3408, junho. 1992.

YOKOYAMA, T. et al. Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration. **Vox Sanguinis**, Japão, v. 86, n. 4, p. 225–229, maio. 2004.

ZELLWEGER R. M.; PRESTWOOD T. R.; SHRESTA S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. **Cell Host & Microbe**, USA, v. 7, n. 2, p. 128–139, fevereiro. 2010.

ZVI, S. et al. Treatment of West Nile Virus Encephalitis with Intravenous Immunoglobulin. **Emerging Infectious Diseases**, Israel, v. 7, n. 4, p. 759, julho-agosto. 2001.

Apêndices

ARTIGO 1

**Production of intravenous human dengue immunoglobulin from Brazilian-
blood donors**

(Publicado no periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*)

Production of intravenous human dengue immunoglobulin from Brazilian-blood donors

Frederico Leite Gouveia^{1,*}, Renata Mendes Batista de Oliveira¹, Antônio Edson de Souza Lucena²,
Marli Tenório Cordeiro³, Ana Cristina Lima Leite¹

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, ²Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia, ³Department of Virology and Experimental Therapy, Research Center Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation

Dengue represents an important health problem in Brazil and therefore there is a great need to develop a vaccine or treatment. The neutralization of the dengue virus by a specific antibody can potentially be applied to therapy. The present paper describes, for the first time, the preparation of Immunoglobulin specific for the dengue virus (anti-DENV IgG), collected from screened Brazilian blood-donations. Production was performed using the classic Cohn-Oncley process with minor modifications. The anti-DENV IgG was biochemically and biophysically characterized and fulfilled the requirements defined by the European Pharmacopoeia. The finished product was able to neutralize different virus serotypes (DENV-1, DENV-2, and DENV-3), while a commercial IgG collected from American blood donations was found to have low anti-dengue antibody titers. Overall, this anti-DENV IgG represents an important step in the study of the therapeutic potential and safety of a specific antibody that neutralizes the dengue virus in humans.

Uniterms: Viral infections. Dengue/treatment. Dengue/virus/neutralization. Immunoglobulins/preparation. Plasma fractionation. Virus neutralization.

A dengue representa um importante problema de saúde no Brasil, portanto, a identificação de vacina ou tratamento eficaz é uma necessidade urgente. A neutralização do vírus da dengue, por anticorpo específico, tem potencial aplicação terapêutica. Descrevemos aqui, pela primeira vez, a preparação de imunoglobulina específica para o vírus da dengue (IgG anti-DENV), produzida a partir do plasma selecionado de doadores brasileiros. A produção foi realizada utilizando o método clássico de Cohn-Oncley com pequenas modificações. A IgG anti-DENV foi bioquimicamente e biofisicamente caracterizada e cumpriu os requisitos definidos pela Farmacopeia Europeia. O produto final foi capaz de neutralizar diferentes sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), enquanto que a IgG comercial, produzida a partir do plasma de doadores americanos, apresentou baixos títulos de anticorpos anti-dengue. No geral, esta IgG anti-DENV representa uma importante etapa para o estudo do potencial terapêutico e segurança da neutralização, por anticorpos específicos, do vírus da dengue em humanos.

Unitermos: Infecções virais. Dengue/tratamento. Dengue/vírus/neutralização. Imunoglobulinas específicas/preparação. Fracionamento de plasma. Neutralização viral.

INTRODUCTION

There are around 2.5 billion people living in areas endemic for dengue fever and it is estimated that there are 100 million infections annually (Gubler 1998). The

burden of dengue in endemic countries weighs heaviest on children. However, there has been an increasing trend towards adult infection in certain countries (Ooi, Goh, Gubler, 2006; Cummings *et al.*, 2009). Most travelers with dengue have been adults (Wilder-Smith, Schwartz, 2005). Currently, neither cure nor vaccines are available, and new therapies are thus urgently needed. Although there have been considerable developments in medicinal chemistry, no promising small-organic compounds endowed with

*Correspondence: F. L. Gouveia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, 50670-901 - Recife - PE, Brasil. E-mail: fredgouveia@outlook.com

virus inhibition activity have emerged (Yin *et al.*, 2009). Passive transfer of specific antibodies is thus the most promising way of treating viral infections in such a way as to promote speedier patient recovery.

The dengue virus belongs to the *Flaviviridae* family and there are four known serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4. All four virus serotypes cause a spectrum of illness ranging from asymptomatic or mild febrile disease to classical dengue fever (DF) and to more severe disease manifesting as dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) (Souza *et al.*, 2009). The severity of the disease is likely to depend on various factors, including the strain and serotype of the infecting virus, the age and genetic background of the patient and the degree of viremia (Guzman, Kouri, 2002; Vaughn *et al.*, 2000). Many prospective, population-based cohort and clinical studies have established secondary infections with a heterotypic dengue virus serotype as a major risk factor for severe disease. Antibody-dependent enhancement (ADE) involves the boosting of virus replication in Fc-receptor bearing cells (especially monocytes and macrophages) by way of pre-existing, non-protective levels of cross-reactive dengue antibodies. It is postulated that ADE results in an amplified cascade of cytokines and complement activation causing endothelial dysfunction, platelet destruction, and consumption of coagulation factors, which result in plasma leakage and hemorrhage (Halstead, 1979, 2003).

DENVs have given rise to large outbreaks in Brazil in the past 25 years with more than 5 million reported cases. (Figueiredo, 2010). Given that approximately 50% of DENV-infected individuals remain asymptomatic, and that the duration of viremia prior to the onset of symptoms is estimated at 1 to 2 days, it is possible that viremic individuals donate blood and serve as a source of dissemination of the virus in the community (Mohammed *et al.*, 2008; Linnen *et al.*, 2008; Tambyah *et al.*, 2008; Chuang *et al.*, 2008; Nishiura, Halstead, 2007). The first epidemic of dengue fever in Brazil, with isolation of the virus, occurred in 1981, in the State of Roraima, where DENV-1 and DENV-4 were identified (Osani *et al.*, 1983). In 1986, DENV-1 was identified in the State of Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 1988) and subsequently spread to other States in Brazil.

Polyvalent (*i.e.* normal) intravenous immunoglobulins G (IVIGs) are collected from 1,000 to 10,000 healthy blood-donors. The first therapeutic use of polyvalent IgGs was for antibody replacement therapy (Orange *et al.*, 1949). However, many other clinical benefits of IVIGs have been demonstrated. They have been used for bone marrow and organ transplantation, to

treat chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, severe asthma, pediatric HIV, dermatomyositis, idiopathic thrombocytopenic purpura as well as 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). Different from the polyvalent IVIGs, for the production of specific IVIG (*i.e.*, hyper-immune), intact IgG are collected from the plasma of blood-donors previously identified as having high levels of a specific antibody or at least a population of similar antibodies. Examples are the Hepatitis B, tetanus, cytomegalovirus, or rabies anti-IgGs (Atkins *et al.*, 2000; Gelfand, 2001). The most classic examples of specific IVIG are the anti-D IgG (Rho) and anti-hepatitis B IgG (Okwundu, Afolabi, 2013).

Given this, it is still not known what implications might arise from a treatment based on IVIG prepared from Brazilian blood-donors (anti-dengue antibodies) for neutralizing the virus. Another question is that of whether specific anti-dengue IVIG preparation is efficient and safer for dengue treatment. To date, no anti-dengue IVIGs collected from a pool of blood-donors have been produced. To address this, the present study describes the plasma screening, fractionation and biochemical validation of anti-dengue IgG prepared from a plasma pool of Brazilian blood donors. Among the procedures available for producing specific anti-IgGs in a laboratorial scale, we choose the classic Cohn-Oncley protocol (Lucena *et al.*, 2010). The production process here also includes two dedicated virus clearance steps, being thus a combination of the currently used Cohn-Oncley protocol with modifications.

MATERIAL AND METHODS

Plasma selection

A plasma pool from blood-donations received at the Pernambuco Hematology and Hemotherapy Foundation - HEMOPE (in the State of Pernambuco, in the Northeast Region of Brazil) was collected and the plasma bags considered free of contamination were selected. Once the contamination-free plasma bags were selected, the plasma rich in anti-dengue IgG was separated. 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 adsorbs dengue antigens on the plate and ELISA reveals them using horse peroxidase in combination with anti-human IgG. This ELISA kit was also used on plasma without the anti-dengue IgG (the negative control).

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 Figure 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). In short, the frozen plasma is thawed until it reaches 4 °C, at which temperature fibrinogen and clotting factor VIII are insoluble and are precipitated out. The cryo-precipitate is then removed by centrifugation and the cryo-free plasma is treated using Method 6 from 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 the supernatants by centrifugation.

In accordance with 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, an IgG paste was obtained and collected by centrifugation. The 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 forces, the solution was filtered through ultrafiltration membranes (diafiltration) with sterile water for injection, followed by protein concentration adjustment to 5% (w/v). A 30 kD Millipore Pellicon System was used to perform diafiltration and protein level adjustment. Virus inactivation was performed using a solvent (tri-*n*-butyl phosphate; TNBP) and a detergent (Tween 80) (Horowitz *et al.*, 1985). To remove the solvent and detergent, a cation-exchange chromatography using a CM Sepharose FF stationary phase was performed. Yet to remove immunoglobulin A and other components, an anion-exchange chromatography in DEAE Sepharose FF was carried out. The flow-through was concentrated by ultrafiltration (10 KD Millipore Pellicon System) and diafiltered with 0.25 mol/L glycine using the same system. The protein level was adjusted to 5% (w/v) and pH to 4.2-4.3. Sterilizing filtration was performed and the final solution packaged aseptically. To inactivate virus particles, the final product was incubated at 23-27 °C for 21 days before stock at 2-8 °C.

Product validation

To check the functional properties of the product during the process and of the final preparation, we performed the protocols established by the European Pharmacopoeia and described in product marketing

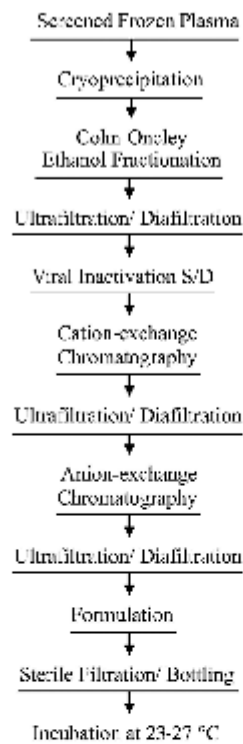


FIGURE 1 - Purification process for anti-dengue specific IgGs (Oncley *et al.*, 1949; Lucena *et al.*, 2010).

authorization dossiers approved by National Regulatory Authorities. Distribution of molecular size was analyzed using size exclusion chromatography with a Biosep SEC-S3000 (600 x 7.8 mm) column (Phenomenex). Radial immune diffusion was used to determine IgM and subclass distribution of IgG. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure IgA and IgE and check the absence of antibodies screened for blood donation, such as Human Immunodeficiency Virus (HIV₁, HIV₂), hepatitis B surface antigens (HBsAg), Hepatitis C (HCV), Human T lymphotropic virus (HTLV), Chagas disease and syphilis.

Cellulose acetate electrophoresis was used to measure γ -globulin. The methods used for the determination of pyrogen and anticomplementary activity were in accordance with European Pharmacopoeia monographs 2.6.8 and 2.6.17, respectively. A thermostability assay was performed by incubation of the preparation at 57 °C for 4 hours.

Identification of anti-dengue serotypes

To ascertain the broad neutralizing properties of the anti-dengue IgG described here, the neutralizing action of IgG was measured 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 the Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE, Brazil). In this experiment, a commercial polyvalent IVIG (Kiovig® Baxter International Inc, Deerfield, IL, USA) was also used. Anti-dengue antibodies for different dengue serotypes were measured using the Plaque-Reduction Neutralization Test (PRNT) (Morens *et al.*, 1985).

First, a two-fold serial dilution of IgG (1/20 to 1/2.560) in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen) was placed in 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 1 hour at 37 °C in 5% CO₂. Then, 50 µL of the IgG/virus mixture was collected from each dilution and transferred into a 24 well-plate containing Vero cells previously seeded at a density of 3x10⁶ cells/mL, in MEM supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO). After virus attachment (incubation for 1 hour 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 for 7 days at 37 °C in 5% CO₂. To inactivate the virus particles, the medium was removed and the monolayer cells covered with formalin (solution at 3.5 M, 2 mL 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 regions of infected cells (plaques) was counted and compared to the virus particles receiving only polyvalent IVIG and the non-treated virus particles.

Ethics statement

The study protocol was approved by the HEMOPE ethics committee (process number 002/2011). Patients were not identified and study data was analyzed anonymously.

RESULTS AND DISCUSSION

In Table I, we summarize the biochemical and biophysical properties of the anti-dengue IgG. The parameters showed in Table I are defined by European Pharmacopoeia and described in product marketing

authorization dossiers approved by National Regulatory Authorities.

Electrophoresis showed a satisfactory level of purity with 98% of proteins migrating to the gamma region. IgG subclass content in this preparation was found to be similar to naturally occurring ratios (Morell *et al.*, 1972).

The specific IVIG produced contained traces of IgA and IgM, immunoglobulins being mainly removed by cation-exchanged and anion-exchanged chromatographs respectively. Some authors have pointed out that the administration of IVIG preparations with significant amounts of IgA can cause severe anaphylactic reactions in patients with IgA deficiency (Vyas *et al.*, 1968; Bjorkander *et al.*, 1987).

The total number of aggregates present in the preparation lies within the acceptable range. IgG dimerization and aggregate formation was also associated with an increase in the risk of adverse effects (Kroez *et al.*, 2003). These aggregates bind and activate components of the complementary system and routine determination of anticomplementary activity was therefore adopted. In the IVIG produced, consumption of the complement was not greater than 50%, as required by the European Pharmacopoeia. The product was kept at pH 4.0 – 4.5, which is optimal for maintaining IgG in an unaggregated state (Gelfand, 2006). Initially developed to produce a stable IgG solution, a low pH formulation was also used to achieve a final step involving inactivation of the virus.

Two steps were taken to inactivate the virus: solvent/detergent (S/D) treatment and incubation at low pH. S/D treatment is very effective against lipid-enveloped viruses (Uemura *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2000). Low pH incubation also provides robust inactivation of lipid-enveloped viruses, including HIV (Bos *et al.*, 1998; Omar *et al.*, 1996; Biesert, 1996; Reid *et al.*, 1988). This product responds negatively (i.e. is non-reactive) to HBsAg, HCV, HIV₁ and HIV₂ antibodies, Chagas disease and syphilis. These are important biochemical characterizations, ensuring that the IgG is suitable for intravenous administration in subjects.

Completing biochemical and biophysical analysis, we examined the overall stability of this IgG preparation by way of thermo-stability. We did not observe alterations, such as gelification or flocculation. Therefore, the IVIG formulated in 0.25 mol/L glycine demonstrated appropriate osmolality.

Once the anti-dengue IgG was carefully characterized in terms of biophysical and biochemical properties, we decided to quantify the ratio of IgG serotypes for DENV-1, DENV-2, and DENV-3. DENV-4 was not tested. Table II presents these data. This product was found to have high

TABLE I – Anti-dengue IgG characterization

Test	Reference values	Results
pH ^(a)	4.0 – 7.4	4.3
Total protein ^(b)	45 – 55 mg/mL	51 mg/mL
Protein composition ^(c)	Minimum of 95% gammaglobulin	98%
Distribution of molecule size ^(c)	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
Subclass distribution	Percent	Percent
IgG ₁	65 – 70	68
IgG ₂	20 – 25	19
IgG ₃	7 – 10	7
IgG ₄	3 – 6	6
Anticomplementary activity (%)	≤ 50	39
Thermo stability (57 °C/4h)	No gelification	No gelification
Antibody to hepatitis B surface antigen ^(d)	Minimum 0.5 IU/g	1.24 IU/g
Pyrogen ^(e)	Absence	Absence

^(a) Analyzed by fluorescamine standard curve. ^(b) Determined by Kjeldahl method. ^(c) Determined by electrophoresis. ^(d) By using ELISA kit assays against hepatitis. ^(e) Determined by using detection kit and analyzed by PCR.

anti-dengue antibody titers of 1:1280 for DENV-2 and 1:160 for DENV-1 and DENV-3. This was expected, since this IVIG was prepared using blood donations from Brazil, which is an endemic area (Cordeiro *et al.*, 2007). In Brazil, three serotypes are currently in circulation, DENV-1, 2, and 3, while infection by DENV-4 is more restricted to the North Region (Roraima, Manaus and Belém) (Brazil, 2010, 2011a, 2011b). The broad neutralizing property in relation to the different virus types confirmed the functional activity of this IgG product. The commercial IVIG (prepared from American blood donations, brand Kiovig/ Baxter) was found to have low titers for DENV.

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

Sample*	antibodies		
	DENV-1	DENV-2	DENV-3
Crude plasma	1:160	1:640	1:40
Anti-dengue IgG	1:160	1:1280	1:160
Trademark (Kiovig)	1:40	1:40	< 1:20 (negative)

*Experiments were repeated at least three times independently. The data here present the mean for one single experiment.

Several preparations of IVIG are now available for therapy, however it is well known that different plasma

sources may influence the immunological composition of IVIG. In clinical practice, different preparations of IVIG or different batches may result in variable beneficial effects. For a biological study, it is therefore very important to describe the reasons for choosing a preparation of IVIG and to consider the specific characteristics of the product that are relevant to a particular clinical response (Elhuru *et al.*, 2006; Gelfand, 2006; Gürkan, Keskin, Ahmed, 2010).

The knowledge of virology gathered over the years suggests that specific IVIGs are useful for virus neutralization. This is the case for hepatitis B and for the arbovirus West Nile virus (WNV). If we compare dengue and WNV, both infections are immunologically and pathogenically similar to each other and have a similar infection course. It has also been reported that specific anti-WNV IgGs are efficient in reducing virus titers in patients severely-infected with WNV (Saqib *et al.*, 2008; Wadei *et al.*, 2004; Haley *et al.*, 2003). In pre-clinical studies, anti-WNV IgGs substantially reduced mortality in WNV-infected mice. In contrast, the mortality is observed in WNV-infected mice when a polyvalent is administered instead of specific IgG (Ben-Nathan *et al.*, 2003). In light of these findings, investigation of the potential of specific human anti-dengue IgG would appear to be a reasonable proposition.

The feasibility of a Brazilian IVIG, with anti-dengue antibody titers for treatment of dengue-patients, would

involve the same approach currently employed for patients with WNV (Saqib *et al.*, 2008; Wade *et al.*, 2004; Haley *et al.*, 2003). However, the safety of using this type of preparation in dengue-patients should be confirmed. The pre-existence of heterologous antibodies, in the presence of a new infection by a distinct serotype may cause ADE (Gubler, 2002; Guzmán, Kouri, 2004; Ross, 2010; Wilder-Smith *et al.*, 2005). Since all four serotypes exist in Brazil, further studies are necessary to confirm whether a treatment based on Brazilian IVIG is safe for dengue-patients or may cause ADE.

CONCLUSION

The present study has described, for the first time, the production and biophysical/biochemical validation of a human anti-dengue IVIG prepared using Brazilian blood donations. The product was characterized in regarding to its immunoglobulin composition, biophysical parameters, purity and capacity to neutralizing Dengue antibodies. As expected, this anti-Dengue IgG preparation exhibited higher titers of anti-dengue antibodies than a trademark product, which is produced by plasma of donors living in non-endemic Dengue areas. The anti-dengue IVIG described here is useful for investigating the effect of anti-dengue IVIG during infection and its potential therapeutic use.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study received funding from FACEPE (PPSUS Program, grant number APQ-1380-4.00/08) and the Instituto Nacional de Pesquisas em Dengue (INCT em Dengue, CNPq, grant number 573876/2008-8). The authors are deeply grateful to all the HEMOPE employees for their help during the study. F.L.G. is receiving a FACEPE scholarship for doctoral studies, while R.M.B.O. is receiving a scholarship from INCT em Dengue. A.C.L.L. receives a senior scholarship awarded by CNPq (research productivity grant program).

LIST OF ABBREVIATIONS

ADE - Antibody-Dependent Enhancement, DENV - Dengue Virus, DF - Dengue Fever, DHF - Dengue Hemorrhagic Fever, DSS - Dengue Shock Syndrome, ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, FCS - Fetal Calf Serum, HBsAg - Hepatitis B Surface Antigens, HCV - Hepatitis C Virus, HEMOPE - Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, HIV - Human Immunodeficiency Virus, HTLV - Human T Lymphotropic Virus, IVIG - Intravenous Immunoglobulins G, LACEN-

PE - Central Laboratory of Pernambuco, MEM - Minimum Essential Medium, PRNT - Plaque-Reduction Neutralization Test, Rho - Anti-D IgG, S/D - Solvent/Detergent, TNBP - Tri-*n*-Butyl Phosphate, WNV - West Nile virus.

REFERENCES

- ACHIRON, A.; GABBAY, U.; GILAD, R.; HASSIN-BAER, S.; BARAK, Y.; GORNISH, M.; ELIZUR, A.; GOLDHAMMER, Y.; SAROVA-PINHAS, I. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis: effect on relapses. *Neurology*, v.50, p.398-402, 1998.
- ACHIRON, A.; MOR, F.; MARGALIT, R.; COHEN, I.R.; LIDER, O.; MIRON, S. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenously administered polyclonal immunoglobulins. *J. Autoimmun.*, v.15, p.323-330, 2000.
- ATKINS, J.T.; KARIMI, F.; MORRIS, E.H.; DAVID, G.; SHIM, S. 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.*, v.19, p.138-143, 2000.
- BEN-NATHAN, D.; LUSTIG, S.; TAM, G.; ROBINSON, S.; SEGAL, S.; RAGER-ZISMAN, B. Prophylactic and therapeutic efficacy of human intravenous immunoglobulin in treating West Nile Virus infection in mice. *J. Infect. Dis.*, v.188, p.5-12, 2003.
- BIESERT, L. Virus validation studies of immunoglobulin preparations. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v.14, p.S47-S52, 1996.
- BOS, O.J.; SUNYE, D.G.; NIEUWEBOER, C.E.; VAN, E.F.A.; SCHUITMAKER, H.; OVER, J. Virus validation of pH 4-treated human immunoglobulin products produced by the Cohn fractionation process. *Biologicals*, v.26, p.267-276, 1998.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: isolamento do vírus DENV 4 em Roraima, Brasil. Brasília, 2010. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Accessed on: 08 Dec. 2010.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM. Brasília, 2011a. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Accessed on: 18 Jan. 2011.

- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica: isolamento do sorotipo DENV 4 em Belém/PA. Brasília, 2011b. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>>. Accessed on: 25 Feb. 2011.
- BRENNAN, D.C. Polyclonal antibodies in immunosuppression. *Transplant. Proc.*, v.33, p.1002-1004, 2001.
- BJORKANDER, J.; HAMMARSTROM, L.; SMITH, C.I.; BUCKLEY, R.H.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; HANSON, L.A. Immunoglobulin prophylaxis in patients with antibody deficiency syndromes and anti-IgA antibodies. *J. Clin. Immunol.*, v.7, p.8-15, 1987.
- CHANG, C.E.; EO, H.G.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.K.; SHIN, J.S.; LAH, Y.K.; PARK, C.W.; JUNG, J.T.; HUH, J.W.; LEE, S.M. Human intravenous immunoglobulin preparation and virus inactivation by pasteurization and solvent detergent treatment. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, v.30, p.177-197, 2000.
- CHUANG, V.W.; WONG, T.Y.; LEUNG, Y.H.; MA, E.S.; LAW, Y.L.; TSANG, O.T.; CHAN, K.M.; TSANG, I.H.; QUE, T.L.; YUNG, R.W.; LIU, S.H. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med. J.*, v.14, p.170-177, 2008.
- COHN, E.J.; STRONG, L.E.; HUGHES, W.L.J.R.; MULFORD, D.J.; ASHWORTH, J.N.; MELIN, M.; TAYLOR, H.L. 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.*, v.68, p.459-475, 1946.
- CORDEIRO, T.M.; SILVA, M.A.; BRITO, A.A.C.; NASCIMENTO, M.J.E.; MAGALHÃES, F.C.M.; GUIMARÃES, F.G.; SILVA, L.N.; CARVALHO, F.M.E.; MARQUES, A.T.E. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.77, p.1128-1134, 2007.
- CUMMINGS, D.A.T.; IAMSIRITHAWORN, S.; LESSLER, J.T.; MCDERMOTT, A.; PRASANTHONG, R.; NISALAK, A.; JARMAN, R.G.; BURKE, D.S.; GIBBONS, R.V. The impact of the demographic transition on dengue in thailand: insights from a statistical analysis and mathematical modeling. *PLoS. Med.*, v.6, p.e1000139, 2009.
- DALAKAS, M.C.; ILLIN, I.; DAMBROSIA, J.M.; SOUEIDAN, S.A.; STEIN, D.P.; OTERO, C. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N. Engl. J. Med.*, v.27, p.1993-2000, 1993.
- ELLURU, S.; HUYEN, J.D.V.; BAYRY, J.; DELIGNAT, S.; PROST, F.; EPHREM, A.; SIBERIL, S.; MISRA, N.; DESMZES, S.L.; KAZATCHKINE, M.D.; KAVERI, S.V. Comparative study of the anti-inflammatory effect of two intravenous immunoglobulin preparations manufactured by different processes. *Immunol. Lett.*, v.107, p.58-62, 2006.
- FIGUEIREDO L. Dengue in Brazil during 1999-2009: a review. *Dengue bulletin. WHO Regional Office for South-East Asia*, 2010. v.34, p.6-12.
- GELFAND, M.D.J. Antibody-directed therapy: past, present, and future. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.108, p.S111-S116, 2001.
- GELFAND, E.W. Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *Int. Immunopharmacol.*, v.6, p.592-599, 2006.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, p.480-496, 1998.
- GUBLER, D.J. Epidemic dengue/ dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.*, v.10, p.100-103, 2002.
- GÜRCAN, H.M.; KESKIN, D.B.; AHMED, A.R. Information for healthcare providers on general features of IGIV with emphasis on differences between commercially available products. *Autoimmun. Rev.*, v.9, p.553-559, 2010.
- GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.33-42, 2002.
- GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.*, v.8, p.69-80, 2004.
- HALEY, M.; RETTER, A.S.; FOWLER, D.; GEA-BANACLOCHE, J.; O'GRADY, N.P. The role for intravenous immunoglobulin in the treatment of West Nile virus encephalitis. *Clin. Infect. Dis.*, v.37, p.88-90, 2003.

- HANN, A.F.; BOLTON, C.F.; ZOCHODNE, D.; FEASBY, T.E. Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled study. *Brain*, v.119, p.1067-1077, 1996.
- HALSTEAD, S.B. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J. Infect. Dis.*, v.140, p.527-533, 1979.
- HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.*, v.60, p.421-467, 2003.
- HOROWITZ, B.; WIEBE, M.E.; LIPPIN, A.; STRYKER, M.H. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combinations. *Transfusion*, v.25, p.516-522, 1985.
- KROEZ, M.; KANZY, E.J.; GRONSKI, P.; DICKNEITE, G. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals*, v.31, p.277-286, 2003.
- LINNEN, J.M.; VINELLI, E.; SABINO, E.C.; TOBLER, L.H.; HYLAND, C.; LEE, T.H.; KOLK, D.P.; BROULIK, A.S.; COLLINS, C.S.; LANCIOTTI, R.S.; BUSCH, M.P. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*, v.48, p.1355-1362, 2008.
- LORIES, R.J.; MAERTENS, J.A.; CEUPPENS, J.L.; PEETERMANS, W.E. The use of polyclonal intravenous immunoglobulins in the prevention and treatment of infectious diseases. *Acta Clin. Belg.*, v.55, p.163-169, 2000.
- LUCENA, A.E.S.; SAMPAIO D.S.; SILVA, E.R.; DE PAIVA, V.F.; SANTIAGO, A.C.; LEITE, A.C.L. A new methodology for polyvalent intravenous immunoglobulin solution production with a two-stage process of viral inactivation. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.46, p.776-783, 2010.
- MOHAMMED, H.; LINNEN, J.M.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; TOMASHEK, K.; FOSTER, G.; BROULIK, A.S.; PETERSEN, L.; STRAMER, S.L. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*, v.48, p.1348-1354, 2008.
- MORELL, A.; SKVARIL, F.; STEINBERG, A.G.; VAN LOGHEM, E.; TERRY, W.D. Correlations between the concentrations of the four sub-classes of IgG and Gm Allotypes in normal human sera. *J. Immunol.*, v.108, p.195-206, 1972.
- MORENS, D.M.; HALSTEAD, S.B.; REPIK, P.M.; PUTVATANA, R.; RAYBOURNE, N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J. Clin. Microbiol.*, v.22, p.250-254, 1985.
- NISHIURA, H.; HALSTEAD, S.B. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J. Infect. Dis.*, v.195, p.1007-1013, 2007.
- NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FARIAS, M.F.; FARIAS FILHO, F.C. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, p.219-225, 1988.
- OHLSSON, A.; LACY, J.B. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst. Rev.*, n.2, 2001, Art. No.CD000361.
- OKWUNDU, C.I.; AFOLABI, B.B. Intramuscular versus intravenous anti-D for preventing rhesus alloimmunization during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, n.1, 2013, Art. No. CD007885.
- OMAR, A.; KEMPF, C.; IMMELMANN, A.; RENTSCH, M.; MORGENTHAUER, J.J. Virus inactivation by pepsin treatment at pH 4 of IgG solutions: factors affecting the rate of virus inactivation. *Transfusion*, v.36, p.866-872, 1996.
- ONCLEY, J.L.; MELIN, M.; RICHERT, D.A.; CAMERON, J.W.; GROSS, P.M. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and betalipoprotein into subfractions of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, v.71, p.541-550, 1949.
- OOI, E.E.; GOH, K.T.; GUBLER, D.J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.*, v.12, p.887-893, 2006.
- ORANGE, J.S.; HOSSNY, E.M.; WEILER, C.R.; BALLOW, M.; BERGER, M.; BONILLA, F.A.; BUCKLEY, R.; CHINEN, J.; EL-GAMAL, Y.; MAZER, B.D.; NELSON, R.P.; PATEL, D.D.; SECORD, E.; SORENSSEN, R.U.; WASSERMAN, R.L.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. 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.*, v.117, p.525-553, 2006.

- OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TANG, A.T.; AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D.C.; TAUIL, P.L. Surto de dengue em Boa Vista Roraima. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.25, p.53-54, 1983.
- REID, K.G.; CUTHBERTSON, B.; JONES, A.D.; MCINTOSH, R.V. Potential contribution of mild pepsin treatment at pH4 to the viral safety of human immunoglobulin products. *Vox Sang.*, v.55, p.75-80, 1988.
- ROSS, T.M. Dengue virus. *Clin. Lab. Med.*, v.30, p.149-160, 2010.
- SAQUIB, R.; RANDALL, H.; CHANDRAKANTAN, A.; SPAK, C.W.; BARRI, Y.M. West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient: the role of intravenous immunoglobulin. *Am. J. Kidney Dis.*, v.52, p.19-21, 2008.
- SOUZA, D.G.; FAGUNDES, C.T.; SOUSA, L.P.; AMARAL, F.A.; SOUZA, R.S.; SOUZA, A.L.; KROON, E.G.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M.M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.106, p.14138-14143, 2009.
- TAMBYAH, P.A.; KOAY, E.S.; POON, M.L.; LIN, R.V.; ONG, B.K. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N. Engl. J. Med.*, v.359, p.1526-1527, 2008.
- UEMURA, Y.; YANG, Y.H.; HELDEBRANT, C.M.; TAKECHI, K.; YOKOYAMA, K. Inactivation and elimination of viruses during preparation of human intravenous immunoglobulin. *Vox Sang.*, v.67, p.246-254, 1994.
- VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T.P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.2-9, 2000.
- VYAS, G.N.; PERKINS, H.A.; FUDENBERG, H.H. Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *Lancet*, v.2, p.312-315, 1968.
- WADEI, H.; ALANGADEN, G.J.; SILLIX, D.H.; EL-AMM, J.M.; GRUBER, A.S.; WEST, M.S.; GRANGER, D.K.; GARNICK, J.; CHANDRASEKAR, P.; MIGDAL, S.D.; HARIRIAN, A. West Nile virus encephalitis: an emerging disease in renal transplant recipients. *Clin. Transplant.*, v.18, p.753-758, 2004.
- WERDAN, K. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. *Curr. Opin. Crit. Care*, v.7, p.354-361, 2001.
- WILDER-SMITH, A.; YOKSAN, S.; EARNEST, A.; SUBRAMANIAM, R.; PATON, N.I. Serological evidence for the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Singapore. *Epidemiol. Infect.*, v.133, p.667-671, 2005.
- WILDER-SMITH, A.; SCHWARTZ, E. Dengue in travelers. *N. Engl. J. Med.*, v.353, p.924-932, 2005.
- WILDER-SMITH, A.; OOI, E.; VASUDEVAN, S.G.; GUBLER, D.J. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v.12, p.157-164, 2010.

Received for publication on 25th January 2013

Accepted for publication on 13th May 2013

ARTIGO 2

Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of *Dengue virus* infection induces severe disease in immunocompetent mice

(Publicado no periódico Medical Microbiology and Immunology)

Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of *Dengue virus* infection induces severe disease in immunocompetent mice

Vivian V. Costa · Caio T. Fagundes · Deborah F. Valadão · Thiago V. Ávila · Daniel Cisalpino · Rebeca F. Rocha · Lucas S. Ribeiro · Fernando R. Ascensão · Lucas M. Kangussu · Celso M. Q. Junior · Ruiz G. Astigarraga · Frederico L. Gouveia · Tarcília A. Silva · Daniela Bonaventura · Divaldo de Almeida Sampaio · Ana Cristina L. Leite · Mauro M. Teixeira · Danielle G. Souza

Received: 22 October 2013 / Accepted: 10 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Dengue is a mosquito-borne disease caused by one of four serotypes of *Dengue virus* (DENV-1–4). Epidemiologic and observational studies demonstrate that the majority of severe dengue cases, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS), occurs predominantly in either individuals with cross-reactive immunity following a secondary heterologous infection or in infants with primary DENV infections born from dengue-immune mothers, suggesting that B-cell-mediated and antibody responses impact on disease evolution. We demonstrate here that B

cells play a pivotal role in host responses against primary DENV infection in mice. After infection, $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice showed increased viral loads followed by severe disease manifestation characterized by intense thrombocytopenia, hemoconcentration, cytokine production and massive liver damage that culminated in death. In addition, we show that poly and monoclonal anti-DENV-specific antibodies can sufficiently increase viral replication through a suppression of early innate antiviral responses and enhance disease manifestation, so that a mostly non-lethal illness becomes a fatal disease resembling human DHF/DSS. Finally, treatment with intravenous immunoglobulin containing anti-DENV antibodies confirmed the potential enhancing capacity of

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00430-014-0334-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. V. Costa · C. T. Fagundes · D. F. Valadão · T. V. Ávila · D. Cisalpino · R. F. Rocha · L. S. Ribeiro · F. R. Ascensão · D. G. Souza
Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

V. V. Costa · C. T. Fagundes · D. F. Valadão · T. V. Ávila · D. Cisalpino · R. F. Rocha · L. S. Ribeiro · F. R. Ascensão · C. M. Q. Junior · T. A. Silva · M. M. Teixeira · D. G. Souza (✉)
Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
e-mail: souzadg@gmail.com; dani@ich.ufmg.br

V. V. Costa
Interdisciplinary Research Group in Infectious Diseases, Singapore-MIT Alliance for Research and Technology, Singapore, Singapore

C. T. Fagundes
Inflammation Research Group, School of Biochemistry and Immunology, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

L. M. Kangussu · D. Bonaventura
Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

C. M. Q. Junior · T. A. Silva
Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

R. G. Astigarraga
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

F. L. Gouveia · A. C. L. Leite
Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

F. L. Gouveia · D. de Almeida Sampaio · A. C. L. Leite
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE, Recife, PE, Brazil

Published online: 11 April 2014

 Springer

subneutralizing antibodies to mediate virus infection and replication and induce severe disease manifestation of DENV-infected mice. Thus, our results show that humoral responses unleashed during DENV infections can exert protective or pathological outcomes and provide insight into the pathogenesis of this important human pathogen.

Keywords *Dengue virus* · Antibody-dependent enhancement · DHF/DSS · Type I interferons · Humoral response against DENV

Introduction

Dengue is an important emerging infectious disease, consisting in a major public health concern. It is defined as an acute systemic viral infection transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes, with a wide spectrum of clinical presentations, varying from an asymptomatic or a self-limited illness, called dengue fever (DF), to the potentially lethal forms, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS) [1–3]. Bhatt and colleagues showed using updated cartographic approaches that there are approximately 390 million dengue infectious cases per year around the world, of which 96 million manifest some level of disease severity [4]. These numbers are even higher than those related previously, which suggest the occurrence of 230 million human infections annually, of which 500,000 are severe and 25,000 are fatal, across approximately 100 endemic countries [3, 5, 6]. Recently, a new dengue serotype, DENV-5, was discovered and characterized from samples collected during an outbreak in Malaysia's Sarawak state in 2007 [7]. This discovery brings even more challenges in the search for new targeted therapies and vaccines against this important human disease.

The pathogenesis of DENV infection remains poorly understood and involves a complex interplay between viral and host factors [1, 2, 8]. Severe forms of disease can be seen during primary infections [9, 10]; however, epidemiological and observational studies demonstrate that the majority of DHF/DSS cases occur predominantly in either individuals with secondary heterologous DENV infections or in infants born from DENV-immune mothers [5, 11–14]. While the exact mechanism of this phenomenon remains to be fully elucidated, several hypotheses have been raised to explain the reason for the exacerbated pathology found in these patients. The antibody-dependent enhancement of infection (ADE) theory postulates that after an initial period of cross-reactive protection, antibodies from the first infection remain cross-reactive with other DENV serotypes, but have waned to subneutralizing or non-neutralizing levels. These non-neutralizing antibodies could then lead to viral internalization via the Fc portion

of immunoglobulin G receptors (FcγRs) and increase virus replication into phagocytic cells, in which is accompanied by massive release of soluble factors that could account for the increased vascular permeability and hemostatic disorder found in severe cases [2, 15, 16].

Interestingly, it has been demonstrated that ADE does not only facilitate the process of viral entry into monocytes and macrophages but can also modify innate and adaptive intracellular antiviral mechanisms, through suppression of intracellular antiviral immune responses, a phenomenon defined as “intrinsic ADE” (iADE) [17]. These phenomena suggest that the elevated intracellular DENV production is a result of idiosyncratic Fc-receptor signaling. DENV immunocomplexes activate suppressive antiviral pathways, and the final outcome is a marked decrease in the production of type I IFNs as well as the interferon-activated antiviral molecules (e.g., ISGs). Concomitantly, there is upregulation of anti-inflammatory mediators, including the cytokine IL-10 [18, 19]. Similar responses have been observed in samples of DHF patients as compared to DF or dengue-like syndrome individuals [19, 20]. Overall, these events contribute to the elevated intracellular production of the virus.

A distinct but complementary theory of immunopathology involves reactivation of cross-reactive memory B and T cells specific for the previous rather than the current DENV infection, resulting in delayed viral clearance and/or massive production of effectors mediators, a so-called cytokine storm [21, 22]. While human T-cell responses during acute DENV infections have been largely studied [16, 23–26], much less is known about the B cell and antibody responses to *Dengue viruses* infections. Early studies of Boonpucknavig et al. [27] have demonstrated that B lymphocytes are increased during the acute phase of illness after a secondary dengue infection. Another study has also found that DHF patients had significantly higher CD19⁺ B cells than dengue-like syndrome patients on the day of defervescence and 1 day after defervescence [28]. Most recently, studies have focused on virus-specific plasmablast responses after primary and secondary DENV infections. These studies demonstrate that rapid and massive virus-specific plasmablast responses were found in patients with acute DENV infection, especially in individuals manifesting DHF [29, 30]. In experimental settings, B-cell responses were shown to be unnecessary for the control of primary DENV infection in AG129 mice [31]. However, protective cross-reactive antibodies secreted by both long-lived plasma cells and memory B cells and both cross-reactive B and T cells were shown to provide protection against a secondary heterotypic DENV infection [32]. From the later findings, it seems that B cells play negligible roles in host protection to primary DENV infection, but may be involved in protection or disease evolution during secondary infections. However, studies are still needed to pinpoint the circumstances

involved in the protective or disease-enhancing activities of B cells and their products during this important infectious disease.

In the present study, we first decided to investigate the role played by B cells and antibodies during primary and secondary *Dengue virus* infection in mice. We conducted experiments in mice infected with adapted strains of DENV-2 and DENV-3 that were previously shown to induce in immunocompetent mice a disease that resembles the severe dengue manifestations found in humans [33–35]. We demonstrate that, although B cells are pivotal for host resistance to primary DENV infection, passive transfer of anti-DENV-immune serum or subneutralizing monoclonal antibodies leads to the enhancement of DENV infection and replication as well as the occurrence of severe disease manifestations in mice. In addition, we show that these disease-enhancing activities were dependent on FcγRs activation and consequent suppression of early innate immune antiviral responses in host-infected tissues. Finally, we demonstrate the potential deleterious effects of IVIG during the course of DENV infection, once administration of IVIG containing anti-DENV antibodies to primarily infected mice led to increased lethality rates and to worsening of clinical signs of disease due to enhancement of virus replication.

Materials and methods

Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the Brazilian Government's ethical and animal experiments regulations (Law 11794/2008). The experimental protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, Permit Protocol Number 113/09). All surgeries were performed under ketamine/xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize animal suffering.

Animals

B-cell-deficient mice (congenic μMT mice, strain B6-Igh6-6^{tm1Cg}) were kindly provided by Dr. Thiago Matar Cunha and Dr. João B. Calixto (FMRP-USP, Brazil), and mice with null mutations for the IFNα/β receptors (A129^{−/−} mice) were kindly given by Dr. Adriana Aballen (UFMG, Brazil). Wild-type controls on the C57BL/6J (WT) genetic background (back-crossed at least 10 times) were provided by Centro de Bioterismo—CEBIO, UFMG, BH, Brazil, and 129/SvEv (WT129) were kindly given by Dr. Adriana Aballen (UFMG, Brazil). All mice were bred

and maintained at the Gnotobiology and Immunology Laboratory of Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG). For experiments, 7–10-week-old mice were kept under specific pathogen-free conditions, in filtered cages with autoclaved food and water available ad libitum.

Cell lines, monoclonal antibodies and viruses

Vero cells were cultured in RPMI 1640 medium (Cultilab) supplemented with 5 % inactivated fetal bovine serum (Cultilab). The hybridoma of mAb 4G2 was purchased from ATCC, grown in serum-free medium (Cultilab) and purified using the method of ammonium sulfate precipitation, followed by phosphate-buffered saline (PBS) dialysis and protein-A/G affinity chromatography as described in [36]. As control, a mouse IgG2a isotype control mAb from Acris GmbH, Germany, was used. The hybridoma of mAb clone 2.4G2 from ATCC was purchased from the Rio de Janeiro cell Bank, grown in serum-free medium (Cultilab) and purified as described previously. For in vivo experiments, DENV-2 and DENV-3 strains previously adapted to mice [34, 35], respectively, were propagated in Vero cells, and the supernatants of infected cells were harvested, filtered, titrated by plaque assay in Vero cells and stored at −70 °C until use. All in vivo studies with the infectious viruses were performed in a BSL-2 facility of the Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro—ICB-UFMG.

Experimental procedure

Infection of mice

For primary infection experiments, the virus stocks or mock control were diluted in endotoxin-free PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl) and the virus inoculum “sublethal” or “lethal” of the adapted DENV-2 or DENV-3 (100 or 1000 PFU), depending of the experiment, were injected via i.p. route. As an additional control in some experiments, the virus was heat-inactivated (56 °C, 1 h) before inoculation into mice. The results were pooled with the NI (non-infected) group just for easing representation of the data.

Generation of α-DENV-3 serum

Six- to eight-week-old C57BL/6 mice were inoculated with 100 PFU of the adapted DENV-3 i.p. Pre-infection serum was collected on day zero before the infection of mice. Blood was obtained by tail vein bleeding every 7 days until day 63 post-DENV-3 inoculation. Serum was separated from whole blood by centrifugation, heat-inactivated and frozen at −80 °C until use.

Enhancement of Dengue virus infection and FcRs blockade in vivo

Mice were injected intraperitoneally with mAbs (4G2, 15 or 400 µg per treatment) or with the anti-DENV-3 sera (obtained at 49 day post-infection) in a total volume of 200 µL on days -1, +1 and +3 after *Dengue virus* inoculation and then infected 24 h later with a sublethal inoculum of the DENV-2 or DENV-3 by i.p injection in a total volume of 100 µL. IgG2a mAb was used as an isotype control of the anti-dengue 4G2 mAb, and the Fc-blocker mAb, clone 2.4G2 from ATCC, at dose of 500 µg per/mouse given daily was used in some experiments.

IVIG therapy administration to mice

Mice were administered with different doses (30, 100 or 300 mg/kg) of the 5 % IVIG solution from pooled donors from an endemic area for *Dengue virus* circulation produced by HEMOPE, Recife, Brazil. The administration via i.v route in a final volume of 200 µL per mouse per treatment occurred on days -1, +1 and +3 after adapted DENV-3 inoculation to mice.

Titration of virus by plaque assay

Mice were assayed for viral titers in blood, spleen and liver. Blood samples (50 µL) were collected in heparinized tubes, diluted in 450 µL of endotoxin-free PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl) and stored at -70 °C. For virus recovery from spleen and liver, the organs were collected aseptically in different time points and stored at -70 °C until assayed for DENV-2 or DENV-3 presence. Tissue samples were weighed grounded using a pestle and mortar and prepared as 10 % (w/v) homogenates in RMPI 1640 medium without fetal bovine serum (FBS). Viral load in supernatants of tissue homogenates and blood samples were assessed by direct plaque assay using Vero cells as described in [35]. Results were measured as plaque-forming units (PFU) per gram of tissue weight or per mL of blood. The limit of detection of the assay was 100 PFU/g of tissue or per mL.

Plaque reduction neutralization test in Vero cells

PRNT assays were performed in duplicate based on the original protocol described by [37]. Briefly, complement was inactivated by incubating serum in a 56 °C water bath for 30 min; then, 5 serial twofold dilutions of serum were prepared, starting at 1:20, in RPMI medium (Cultilab) with 5 % fetal bovine serum (FBS; Cultilab) and 100U penicillin/100 µg streptomycin (P/S; Invitrogen). Working stocks of virus were prepared that yielded 15–30 plaques/well in a 24-well tissue culture plate. Viruses used for PRNT tests were the adapted

DENV-2 and DENV-3 [34, 35], respectively. Sixty microliters of each serum dilution was combined with 60 µL of virus and incubated for 90 min at 37 °C with 5 % CO₂. After incubation, 100 µL of the virus-serum mixture was transferred to 80 % confluent Vero cells and processed as in a standard plaque assay. Fifty percent neutralization titer (PRNT50) values was determined as the highest serum dilution capable of neutralizing 50 % virus infection, as detected by the inhibition of plaque formation in cell cultures.

Evaluation of blood parameters

Blood was obtained from the cava vein in heparin-containing syringes at the indicated time points under ketamine and xylazine anesthesia (150 mg/Kg and 10 mg/Kg, respectively). The final concentration of heparin was 50 U/mL. Serum was obtained from tail vein bleed. Platelets were counted in a Neubauer chamber. Briefly, 10 µL of solution (blood and 1 % p/v ammonium oxalate in a dilution of 1:100) was placed in the chamber, and platelets were visualized in a Nikon XP-1000 microscope, magnification of 400×, using phase-contrast. Results are presented as number of platelets per µL of blood. For the determination of the hematocrit, a sample of blood was collected into heparinized capillary tubes (Perfecta) and centrifuged for 10 min in a hematocrit centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil).

Anti-dengue IgM and IgG quantification

Antibody quantification in serum from DENV-3-infected mice was performed by an indirect ELISA assay as adapted from [38]. Briefly, the same adapted DENV-3 used in infections was UV-inactivated (60') and diluted in 0.01 M carbonate buffer (pH 9.6) in a concentration of 1×10^6 PFU per well of microtiter plates and incubated overnight. Plates were washed three times and blocked with bovine serum albumin 1 % for 2 h and subsequently washed. Then, four dilutions of each serum sample from 1:50 to 1:6,250 were plated in duplicates and incubated for 3 h. After another wash step, plates were incubated for 2 h with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or IgM (Southern Biotech). Toward, ortho-phenylenediamine was used as a substrate, and the reaction was stopped with 1 M sulfuric acid. The absorbance was measured at 492 nm. Samples of DENV-3-infected mice were considered positive in the first dilution in which mock samples were negative and were expressed as optical densities (O.D.).

Measurement of cytokines/chemokine concentrations

The concentration of cytokines TNF-α, IFN-γ in serum or IL-12p40, IL-10 and IFN-γ in spleen samples was measured using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D

Systems, Minneapolis). Results are expressed as pg/mL or pg/100 mg of tissue. The detection limit of the ELISA assays was in the range of 4–8 pg/mL.

ALT transaminase activity

The activity of the transaminase alanine aminotransferase (ALT) was measured in individual serum samples, using a commercially colorimetric available kit (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brazil). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of transaminase concentration in U/dL of plasma.

Evaluation of changes in vascular permeability

The extravasation of Evans blue dye into the tissue was used as an index of increased vascular permeability, as previously described in [39]. Briefly, Evans blue (20 mg kg⁻¹) was administered i.v. (1 mL kg⁻¹) via an eye vein 30 min prior to mice killing. The right ventricle was flushed with 10 mL of PBS to wash the intravascular Evans blue in the lungs. After that, one lobe of liver and the left lung were cut and allowed to dry in a Petri dish for 24 h at 37 °C. The dry weight of the tissue was calculated and Evans blue extracted using 1 mL of formamide (24 h at room temperature). The amount of Evans blue in the tissue was obtained by comparing the extracted absorbance with that of a standard Evans blue curve read at 620 nm in an ELISA plate reader. Results are presented as the amount of Evans blue per 100 mg of tissue.

Hemodynamic measurements

All mice were habituated to the blood pressure measurement device for 7 days. SBP was determined with tail-cuff plethysmography method in unanesthetized mice, as previously described in [40]. All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Changes in SBP from baseline are expressed as absolute values as well as areas under the BP curves.

Real-time PCR

For the evaluation of IFN- α 2, IFN- α 4 and ISG15 mRNA expression, spleens were removed 4 and 7 days after DENV-3 inoculation into mice. Total RNA was isolated from tissues using a QIAgen RNEasy RNA isolation kit. The RNA obtained was resuspended in nuclease-free water (GIBCO) and stocked at -70 °C until use. Real-time RT-PCR was performed on a Applied Biosystems 7500 sequence-detection system (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) after a reverse transcription reaction of 2 μ g of total RNA by using M-MLV reverse transcriptase (Promega) and 50 μ M of Oligo dT(15) (Promega). The relative level of gene expression was determined by the comparative threshold cycle method as described by the

manufacturer, whereby data for each sample were normalized by 18S ribosomal RNA and expressed as a fold change compared with non-infected controls. The following primer pairs were used: 18S ribosomal RNA, 5'-CGTTCCACCACTAA GAACG-3' (forward) and 5'-CTCAACACGGGAAACCTC AC-3' (reverse); and IFN- α 2 5'-GGACAGGAGGACTTTG GATT-3' (forward) 5'-GCCTTCTGGATCTGCTGGTAA 3' IFN- α 4 5'-CCACAGCCCAGAGAGTGACCAGC-3' (forward) 5'-AGGCCCTCTTGTTCCTGAGGTTA-3' (reverse) ISG15 5'-CTGCAGCAATGGCCTGGGACCT-3' (forward) 5'-AGTTTGGTGGGCCAGGCCT-3'.

Histopathological and immunohistochemistry analysis

Liver samples from adult euthanized mice were obtained at the indicated time points. Afterward, they were immediately fixed in 10 % buffered formalin for 24 h and embedded in paraffin. Tissue sections (4 μ m thicknesses) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and evaluated under a microscope Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adapted to a digital camera (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan). Histopathology score was performed according to [35] evaluating hepatocyte swelling, degeneration, necrosis and hemorrhage, added to a five-point score (0, absent; 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; 4, marked; and 5, severe) in each analysis. For easy interpretation, the overall score was taken into account and all the parameters totalized 20 points. A total of two sections for each animal were examined, and results were plotted as the media of damage values in each mouse. Immunohistochemistry analysis for detection and quantification of DENV-3-infected cells in liver was also performed as previously described in [35].

Statistical analysis

Results are shown as mean $\pm$ SEM percent inhibition was calculated by subtracting the background values obtained in non-infected animals. Differences were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls post hoc analysis. Differences between lethality curves were calculated using log-rank test (Graph Prism Software 4.0). Changes in SBP from baseline are expressed as absolute values as well as areas under the BP curves. Results with a $P < 0.05$ were considered significant.

Results

B cells are necessary for host resistance to primary Dengue virus infection

Humoral immune responses are thought to play a major role during DENV-induced disease in humans [30]. To

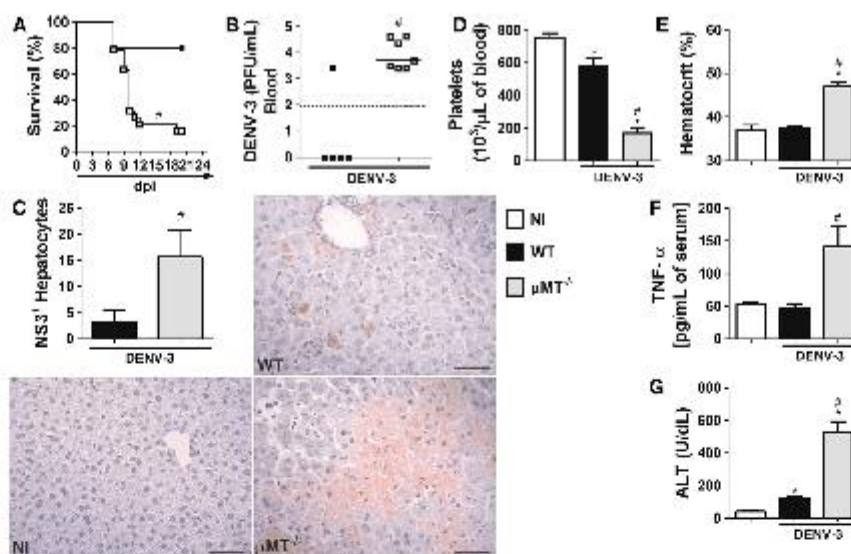


Fig. 1 B-cell-deficient ($\mu\text{MT}^{-/-}$) mice are more susceptible to primary Dengue virus infection. **a** WT and $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice ($n = 8$ mice per group) were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.), and lethality rates were evaluated every 12 h during 21 days. Results are expressed as % of survival. In **b–g**, WT ($n = 5$) and $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice ($n = 7$) were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.), and 7 days after infection, mice were culled and blood and tissue collected for the following analysis: **b** Viral loads recovered from blood by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **c** Quantification of NS3-positive hepatocytes in the liver of WT and $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype con-

trol mouse IgG2a, and multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. Positive staining for NS3 is brown, while hematoxylin counterstain is blue. **d** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu\text{L}$ of blood. **e** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **f** Concentrations of TNF- α in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **g** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/dL of plasma. All results are expressed as mean $\pm$ SEM (except for **b**, expressed as median) and are representative of at least two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. # $P < 0.05$ when compared to WT-infected mice. NI non-infected, dpi days post-infection (color figure online)

investigate in vivo the role played by B cells during DENV infection, wild-type (WT) and B-cell-deficient ($\mu\text{MT}^{-/-}$) mice were inoculated with 100 PFU of adapted DENV-3 i.p. and mortality rates and disease parameters on day 7 after DENV inoculation (peak of disease) were evaluated. After infection, about 80 % of $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice were dead at day 12 of infection, while only 20 % of WT mice had succumbed to infection after 21 days of inoculation of DENV-3 (Fig. 1a). The earlier lethality of $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice was associated with increased DENV-3 replication in the spleen (WT: 3.3×10^7 PFU/g ($n = 5$); $\mu\text{MT}^{-/-}$: 2×10^8 PFU/g of spleen ($n = 7$), $P = 0.01$) and elevated viremia as assessed on day 7 after virus inoculation (Fig. 1b). Moreover, there was enhancement of NS3⁺ staining of hepatocytes in the liver of infected $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice when compared with WT (Fig. 1c). In addition to the increased lethality rates and to the enhanced viral replication, $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice presented more severe manifestation of disease after infection

(Fig. 1d–g and S1). After DENV-3 inoculation, WT mice presented only mild disease manifestation as demonstrated by slight drop in platelets numbers (Fig. 1d), absence of hemoconcentration (Fig. 1e), no increase in TNF- α levels in serum (Fig. 1f) and only a slight increase in ALT transaminase levels in serum (Fig. 1g) when compared to non-infected (NI) mice. However, DENV-inoculated $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice had greater thrombocytopenia (Fig. 1d), increased hematocrit levels, a marker of hemoconcentration (Fig. 1e) and elevated levels of the proinflammatory cytokine TNF- α in the serum (Fig. 1f). Levels of IFN- γ were elevated to a similar extent in serum of infected $\mu\text{MT}^{-/-}$ and WT mice (NI: ND; WT: $1.851.8 \pm 493.2$; $\mu\text{MT}^{-/-}$: $2.048.7 \pm 819.3$), suggesting that the enhanced DENV replication in $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice was not due to impairment of the production of this mediator. Finally, infection of $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice resulted in significant increase in serum levels of ALT transaminase at day 7 after virus inoculation

(Fig. 1g), an indicative of liver damage. To confirm this, we performed histopathological analysis in the liver of WT and $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice after DENV-3 inoculation, and the results revealed an elevated histopathological score in $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice in comparison with the WT-infected controls (Figure S1). Thus, the data depicted here demonstrate a protective role of B cells during primary DENV infection.

Subneutralizing levels of anti-DENV antibodies enhance disease severity during *Dengue virus* infection of immunocompetent mice

We have demonstrated that B cells are necessary for host resistance against primary *Dengue virus* infection; however, it has been shown that people experiencing a secondary heterologous DENV infection have a much greater risk of developing a more severe disease manifestation (DHF/DSS), indicating that preexisting immunity could exacerbate disease [41]. Thus, B-cell activation and antibody production can exert a dual role in DENV pathogenesis, with potential to benefit or harm the host [11]. In order to evaluate whether antibodies would be involved in the protective role played by B cells during primary DENV infection, we have conducted experiments in mice injected with anti-DENV-immune serum. To this end, we have first performed a longitudinal analysis of the antibody response of mice primarily inoculated with DENV-3 starting on day 0 until day 63 after virus inoculation (Fig. 2a). WT mice ($n = 6$) were inoculated with a sublethal inoculum of DENV-3 (100 PFU) and bleeding was performed every 7 days after DENV-3 infection until day 63 post-DENV-3 inoculation. Our data demonstrated an increased DENV-specific IgM response at days 14 and 21 of infection. After day 28, the levels of IgM returned to basal values as found in day 0 of infection. Further, IgG responses raised on day 14 after DENV-3 inoculation and remained elevated until the last day evaluated (day 63 after *Dengue virus* inoculation) (Fig. 2a). These data demonstrated that WT mice inoculated with DENV-3 were capable of mounting a specific α -DENV IgM and IgG responses at the course of DENV infection.

To investigate the role of these antibodies in the context of DENV infection, WT mice were passively transferred with 200 μL of the DENV-3-immune serum (collected at day 49 of infection) at days -1 , $+1$ and $+3$ after homologous (DENV-3) (Figure S2A) or heterologous (DENV-2) inoculation (Fig. 2b–h). Figure S2A and 2B shows that mice who received the DENV-3-immune serum and were challenged with either of DENV serotypes (DENV-3 or DENV-2, respectively) presented elevated lethality rates in comparison with mice that received only serum from naïve mice (Figure S2A and 2B) or serum from $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice previously inoculated with a sublethal inoculum of

DENV-3 (data not shown). After infection, only 25–30 % of the mice that had received the naïve serum (Fig. 2b and S2A) or serum from $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice (data not shown) were dead until the day 14 of DENV-2 inoculation. However, on day 6 of infection, 75 % of the mice inoculated with the homologous serotype (DENV-3) (Figure S2A) and 100 % of the mice infected with the heterologous serotype (DENV-2) had succumbed to the infection (Fig. 2b). Of note, the remaining 25 % of mice that received the α -DENV-3 serum and were infected with the homologous serotype were protected from lethality (Figure S2A) and from disease manifestation (data not shown). Since the transference of the DENV-3-immune serum was not protective from lethality of DENV-3-infected mice, we decided to evaluate the neutralizing capacity of this α -DENV-3 serum to neutralize DENV-3 or DENV-2 infections in vitro. Heat-inactivated α -DENV-3 serum exhibited low neutralizing titers after a plaque reduction assay in Vero cells (data not shown). These data suggest the presence of non-neutralizing or subneutralizing levels of α -DENV-3 and α -DENV-2 antibodies, suggesting the occurrence of ADE after passive transfer of DENV-immune serum.

The hallmark of ADE-induced disease is an increase in systemic viral burden after infection. Hence, after DENV-2 infection of mice previously administered with α -DENV-3 serum, there was a remarkable increase in viral load in spleen (naïve serum = 2.2×10.6 PFU/g ($n = 4$) and α -DENV-3 serum = 6.1×10.7 PFU/g of spleen ($n = 5$) $P = 0.01$) and viremia (Fig. 2c) as assessed by plaque assay on the peak of disease manifestation after DENV-2 inoculation. In addition, Panel 2D shows elevated numbers of NS3⁺ hepatocytes in the liver of mice that received DENV-3-immune serum and were challenged with the DENV-2 in comparison with mice treated with naïve serum and that were equally infected with 100 PFU of DENV-2 (Fig. 2d). Corroborating these findings, the increased lethality and the enhanced viral burden found in mice that received the α -DENV-3 serum was associated with more severe disease manifestation after DENV-2 challenge as demonstrated by the occurrence of marked thrombocytopenia (Fig. 2e), intense hemoconcentration (Fig. 2f), production of elevated levels of TNF- α (Fig. 2g) and higher levels of the ALT transaminase in serum (Fig. 2h). In accordance with the elevated levels of ALT, there was heightened liver damage in the liver sections of mice that received α -DENV-3 serum (Figure S2B). These results demonstrated that homologous or heterologous α -DENV serum transference, at subneutralizing levels, can enhance the viral burden of mice inoculated with a sublethal inoculum of DENV, resulting in increased lethality and more severe disease manifestation.

To test whether the levels of anti-DENV neutralizing antibodies would directly impact on severe dengue disease evolution during infection, we conducted experiments with

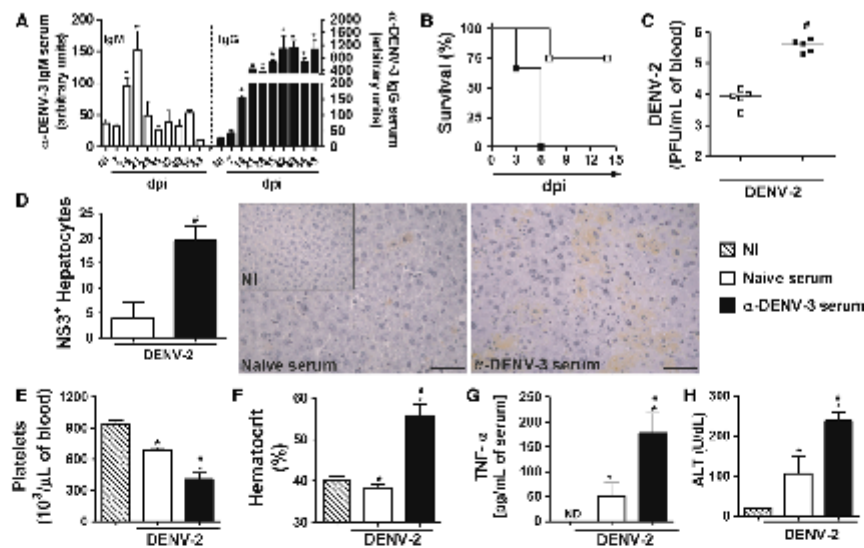


Fig. 2 Passive transference of DENV-3-immune serum decreases survival time and enhances *Dengue virus* replication and disease manifestation in DENV-2-inoculated mice. **a** WT mice ($n = 6$) were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.) and anti-dengue IgM and IgG titers of pre- and post-infection serum samples, collected on day zero and every 7 days until day 63, were measured by ELISA. Results are expressed as arbitrary units. **b** WT mice ($n = 8$ mice per group) were administered with naïve serum or anti-DENV-3 serum (collected on day 49) and inoculated with 100PFU of DENV-2 (i.p.), and lethality rates was evaluated every 12 h during 14 days. Results are expressed as % of survival. In **c–h**, WT mice ($n = 5$ per group) treated with naïve or anti-DENV-3 serum were inoculated with 100PFU of DENV-2 (i.p.), and seven days after infection, mice were culled and blood and tissue collected for the following analysis: **c** Viral loads recovered from blood by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **d** Quantification of NS3-positive

hepatocytes in the liver of WT mice administered or not with anti-DENV-3 serum. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype control mouse IgG2a, and multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. Positive staining for NS3 is brown, while hematoxylin counterstain is blue. **e** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu\text{L}$ of blood. **f** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **g** Concentrations of TNF- α in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **h** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/L of plasma. All results are expressed as mean $\pm$ SEM (except for **c**, expressed as median) and are representative of two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. $^{\#}P < 0.05$ when compared to WT-infected naïve serum treated mice. NI non-infected, dpi days post-infection (color figure online)

commercial anti-DENV mAbs, assessing whether different antibody doses would impact differently in disease manifestation. First, plaque reduction neutralizing titer assays (PRNT₅₀) were performed in Vero cells. Mice were administered with 15 or 400 μg of mouse anti-DENV monoclonal antibody clone 4G2 (IgG2a anti-Envelope protein [E], pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity at the same doses. Eighteen hours after antibody administration, mice were bled and the PRNT₅₀ titers of pre-infection serum samples were performed. Results demonstrate that serum from mice that received the low dose of 4G2 antibody (15 μg) was unable to neutralize the DENV-3 infection in vitro. However, neutralizing titers were found in the serum of mice that were administered with the high dose of 4G2 antibody (400 μg) (data not shown). To determine, in vivo, the relationship between disease

manifestation and the administered dose of anti-DENV antibody, WT mice received the mouse monoclonal antibody 4G2 at concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{treatment}$ or 400 $\mu\text{g}/\text{treatment}$ daily (day -1 , day $+1$ and day $+3$) after DENV-3 inoculation. Control mice received an IgG2a isotype antibody of irrelevant specificity at similar concentrations and treatment schedule. Figure 3a, b shows that mice that received the lower dose of 4G2 antibody and that were challenged with a sublethal inoculum of DENV-3 presented elevated viral replication as demonstrated by the presence of viremia 7 days after DENV-3 inoculation (Fig. 3a), as well intense NS3⁺ hepatocytes staining, indicative of active virus replication (Fig. 3b, c). However, opposite results were found when mice received higher 4G2 doses. These mice presented reversion of antibody enhancement of infection as demonstrated by the absence of viremia (Fig. 3a) and marked reduction in

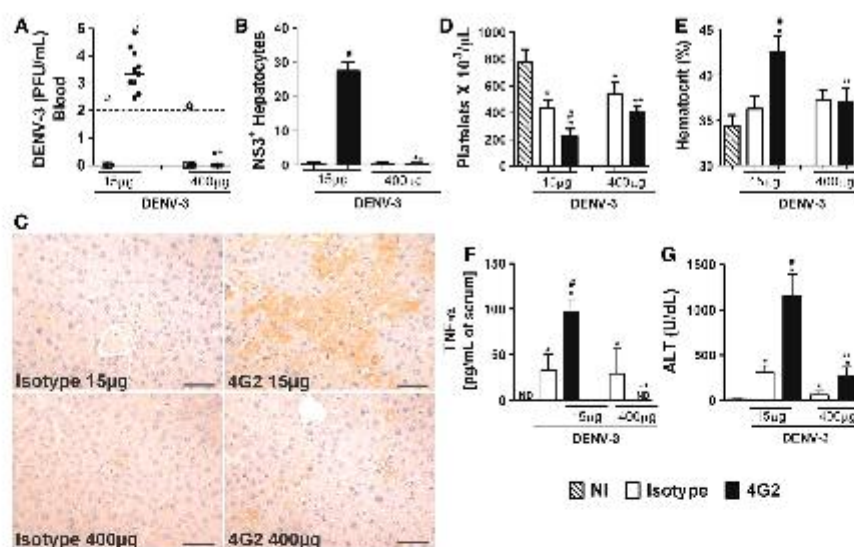


Fig. 3 Antibody-mediated enhancement of *Dengue virus* infection depends on antibody dose. WT mice ($n = 5-9$) were administered with (15 or 400 μ g) of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein, pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity followed by inoculation of 100PFU of DENV-3 (i.p.). Seven days later, mice were culled and blood and tissue collected for the following analysis: **a** Viral loads recovered from blood by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **b** Quantification of NS3-positive hepatocytes in the liver of 4G2 or isotype-control-treated mice. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype control mouse IgG2a, and

multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. **c** Representative pictures of positive staining for NS3+ cells are expressed in *brown*, while hematoxylin counterstain is *blue*. **d** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu$ L of blood. **e** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **f** Concentrations of TNF- α in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **g** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/dL of plasma. All results are expressed as mean $\pm$ SEM (except for **a**, expressed as median) and are representative of two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. ** $P < 0.05$ when compared to isotype control DENV-3-infected mice. *** $P < 0.05$ when compared to 4G2 (15 μ g) DENV-3-infected mice. NI non-infected (color figure online)

the numbers of NS3+ hepatocytes (Fig. 3b, c). As expected, no viremia (Fig. 3a) or significant NS3+ hepatocyte staining was detected in isotype-control-treated mice (15 or 400 μ g) that received a small inoculum of the DENV-3 (Fig. 3b, c). In addition to enhanced viral replication, low-dose 4G2-treated mice presented more severe disease manifestation, as demonstrated by intense thrombocytopenia (Fig. 3d), occurrence of hemoconcentration (Fig. 3e), elevated levels of TNF- α and ALT in serum (Fig. 3f, g, respectively) when compared to low-dose isotype-control-treated mice. Accordingly, low dose of 4G2 administration into mice led to marked liver injury on day 7 after DENV-3 inoculation (Figure S3). All these findings were strikingly reduced in mice that received the higher doses of 4G2 or the isotype control antibodies (Fig. 3d–g and S3). The present data demonstrate that anti-DENV antibodies can worsen the disease outcome induced by DENV-3 infection in vivo, depending on their neutralizing circulating titers.

ADE-mediated severe disease manifestation resembles severe dengue disease induced by primary infection with higher viral inoculum in immunocompetent mice

Mice that receive subneutralizing amounts of anti-DENV antibodies presented higher viral burden during the course of infection. In order to evaluate whether enhanced viral loads would be the cause behind severe disease evolution, we conducted experiments comparing anti-DENV-treated mice infected with a lower DENV inoculum and mice infected only with a higher viral inoculum. For this, WT mice were administered with 15 μ g of the 4G2 monoclonal antibody (mAb) in the previously described schedule and then inoculated with 100PFU of DENV-3 i.p. This group of mice was compared to another two groups: one inoculated only with 100PFU of DENV-3 who was called as “sublethal” and another which received an inoculum 10 times higher (1000PFU of DENV-3) that was designated

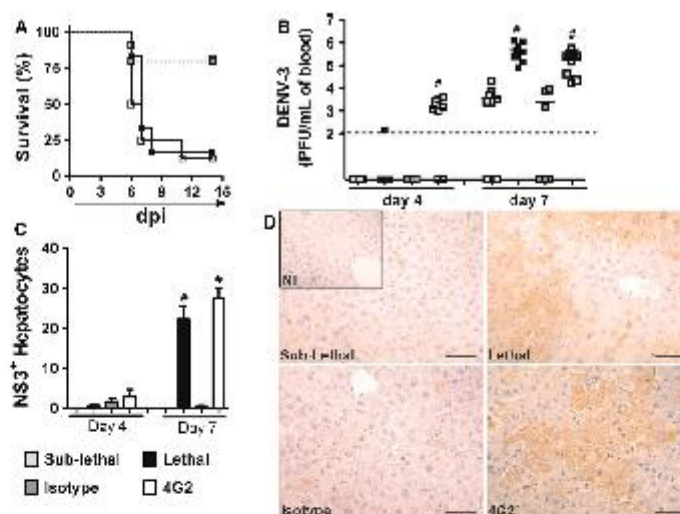


Fig. 4 Subneutralizing levels of anti-DENV mAbs increases lethality rates and viral burden to levels similar to those of mice infected with a higher viral inoculum. **a** WT mice ($n = 8$) were administered with 15 μ g of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein, pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity on days -1 , $+1$ and $+3$ and were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.). Another two groups were inoculated only with the DENV-3 (100 PFU “sublethal” or 1000PFU “lethal”), without any antibody treatment. **a** Lethality rates were evaluated every 12 h during 14 days. Results are expressed as % of survival. **b–d** WT mice ($n = 5–9$) were administered with 15 μ g of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein [E], pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity on days -1 , $+1$ and $+3$ and were inoculated with

100PFU of DENV-3 (i.p.). Four or seven days later, mice were culled and blood and tissue collected for the following analysis: **b** Viral loads recovered from blood by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **c** Quantification of NS3-positive hepatocytes in the liver of 4G2 or isotype-control-treated mice. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype control mouse IgG2a, and multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. **d** Representative pictures of positive staining for NS3+ cells are shown where NS3 signal is brown, while hematoxylin counter-stain is blue. NI non-infected, dpi days post-infection. * $P < 0.05$ when compared to sublethal or isotype control DENV-3-infected mice (color figure online)

as “lethal”. As controls, isotype-treated mice were administered with the same dose and treatment schedule of an isotype-matched control with irrelevant specificity and then inoculated with 100 PFU of DENV-3. During the experiments, euthanasia was performed at two time points after infection; day 4 and day 7. Figure 4a shows the lethality rates of mice that received or not the mAbs treatment and were inoculated with DENV-3. Results show that only 25 % of the mice treated with the isotype control mAb or those who were infected only with the sublethal inoculum of the DENV-3 were dead after 14 days of infection. In contrast, almost 90 % of mice that were inoculated with the high inoculum of the virus (lethal group) had succumbed to infection by day 8 after DENV-3 inoculation. Similar results were found in the group of mice who received the 4G2 mAbs. Almost all mice were dead at day 11 after DENV-3 inoculation (Fig. 4a). In accordance with the theory of the “antibody-dependent enhancement of infection,”

the higher lethality rates found in the 4G2-treated group was associated with an early replication of the virus as shown by the presence of viremia in almost all mice already on day 4 of infection with even higher values at day 7 of infection (Fig. 4b). Interestingly, mice that received the higher inoculum of DENV-3 showed elevated viremia only at day 7 of infection, suggesting the role of antibodies in mediating the enhancement of infection by increasing viral replication in early times after infection (Fig. 4b). As expected, mice that received the isotype control or the sublethal inoculum of the virus showed smaller viremia levels on day 7 of infection when compared to the lethal and 4G2-treated groups (Fig. 4b). In accordance with the elevated viremia, marked virus replication was found in the liver of lethal-DENV-3-inoculated or 4G2-treated mice groups, as assessed by NS3+ staining of hepatocytes (Fig. 4c). These data show that subneutralizing levels of anti-DENV antibodies enhance viral replication to similar extents found

in mice primarily infected with a higher DENV inoculum. Next, we analyzed the disease parameters on days 4 and 7 of infection using the same experimental design described before. Of note, there were no differences in any of the disease parameters evaluated among the several groups on the day 4 after DENV-3 inoculation (data not shown). On day 7 (peak of disease manifestation), our results show that mice that received only the sublethal inoculum of DENV-3 or were treated with the isotype control mAbs presented a slight reduction in the platelets counts (Fig. 5a); however, no alteration in the hematocrit levels was found after DENV-3 inoculation (Fig. 5b). Moderate plasma extravasation in liver (Fig. 5c) and lungs [NI = $4.1 \pm 0.9 \mu\text{g}$ 100 mg lungs; sublethal = $7.9 \pm 1.6 \mu\text{g}$ 100 mg lungs *; isotype control = $7.3 \pm 1.3 \mu\text{g}$ 100 mg lungs *] as well as discrete reduction on systolic blood pressure (Fig. 5d) was found in these groups of DENV-3-inoculated mice, when compared to the NI controls. Beyond the hematological parameters, there was no increase in TNF- α levels (Fig. 5e) in the serum of these mice; however, IFN- γ values (Fig. 5f) were significantly high when compared to the NI controls. Finally, discrete liver damage was found in sublethal or isotype control DENV-3-inoculated mice, as shown by moderate elevation in ALT levels in the serum (Fig. 5g) and by the low scores found after the histopathological analysis of the H&E-stained sections in the liver (Fig. 5h, i). In sharp contrast, mice inoculated with the high inoculum of DENV-3 or those who received the 4G2 antibody followed by infection with a low inoculum of DENV-3 presented severe disease manifestation as demonstrated by the presence of markedly lower platelet counts (Fig. 5a), hemoconcentration (Fig. 5b), intense plasma extravasation in liver (Fig. 5c) and lungs [NI = $4.1 \pm 0.9 \mu\text{g}$ /100 mg of lungs, lethal = $17 \pm 2.3 \mu\text{g}$ 100 mg of lungs and 4G2 = $13.3 \pm 2.5 \mu\text{g}$ 100 mg of lungs] and severe reduction in the systolic blood pressure (Fig. 5d). In addition, TNF- α (Fig. 5e) and IFN- γ (Fig. 5f) cytokine levels in serum were markedly high in comparison with NI controls. Of note, IL-10 levels in the spleen of lethal-DENV-3-inoculated and 4G2-treated mice were also markedly elevated in comparison with NI, sublethal- and isotype-control-treated mice [NI = 36 ± 72 ; sublethal = 58 ± 89 ; lethal = $187 \pm 126^{\#}$; isotype = 60 ± 85 ; 4G2 = $187 \pm 104^{\#}$ pg/100 g of spleen], but similarly as saw in IFN- γ levels, equivalent high levels of IL-12p40 were found in the spleen of all DENV-3-inoculated mice (data not shown). In addition, there was massive release of ALT transaminase in the serum of lethal- or 4G2-treated mice (Fig. 5g), and histopathological analysis in the liver of these mice revealed that WT mice inoculated with 1000PFU of DENV-3 or those that received the 4G2 mAb showed a higher score, demonstrating a significant degree of liver injury in these groups (Fig. 5h, i). Therefore,

treatment of mice with subneutralizing doses of anti-DENV monoclonal antibodies followed by challenge with a low inoculum of DENV led to an enhancement of disease manifestation in a similar way as found in mice that received an inoculum 10 times higher of the virus.

Anti-dengue immunocomplexes enhance viral replication in vivo through Fc γ R-mediated suppression of the type I IFN antiviral response

It has been proposed that interaction of DENV immunocomplexes with Fc γ R in target cells (monocytes, macrophages and DCs) enhances the access of virions to these cells and contributes to the increased titers of virus found in the blood of DHF/DSS patients [15]. To confirm the involvement of Fc γ R in mediating virus enhancement in our model of antibody-induced disease, we treated mice daily with an Fc γ R-blocking antibody (clone 2.4G2) starting on day -1 until day 5 post-DENV inoculation in mice in the presence or not of the anti-DENV (4G2) antibody. Our results show that mice administered only with the isotype control mAb or the group of mice treated with the isotype control + Fc γ R-blocking mAb that were inoculated with a low inoculum of DENV-3 presented only a mild disease manifestation as demonstrated by no detection of virus in the blood (Fig. 6a), low replication levels of virus in the liver (Fig. 6b, c), occurrence of discrete thrombocytopenia (Fig. 6d) and absence of hemoconcentration (Fig. 6e). In addition, only small levels of TNF- α (Fig. 6f) and ALT transaminase (Fig. 6g) were detected in serum of mice in these groups. Finally, histopathological scores in liver section of these mice were low (Figure S4). However, as demonstrated before in Figs. 4, 5 and here in Fig. 6a–g and S4, 4G2 treatment of mice with subneutralizing doses followed by a low DENV-3 inoculation led to an enhancement of virus replication and increase in values of all the disease parameters assessed (Fig. 6a–g and S4). In contrast, blockade of Fc γ R by Fc-blocker treatment resulted in complete reversion of 4G2-induced ADE disease in mice (Fig. 6a–h and S4 [dark gray bars]). Therefore, the present data show an essential role for Fc γ R in mediating enhanced viral burden and in inducing severe disease manifestation in DENV-infected mice that present subneutralizing levels of anti-DENV antibodies.

Evidences suggest that the mechanism of ADE-enhanced DENV infection is associated with both increase in the number of infected cells, a phenomenon called “Extrinsic ADE,” and a subversion of the intracellular innate immune host responses through suppression of a type I IFN and proinflammatory cytokines production—an event denominated as “Intrinsic ADE” [17]. The next set of experiments was conducted to evaluate whether Fc γ R activation by anti-DENV immunocomplexes would be associated with

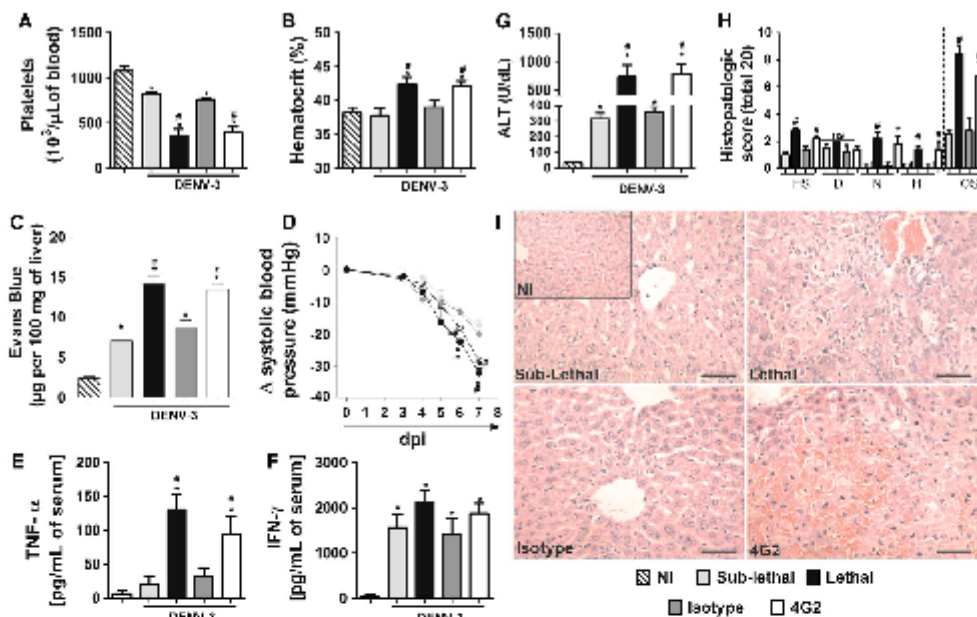


Fig. 5 Mice that received subneutralizing levels of anti-DENV mAbs develop a severe dengue disease resembling mice infected with a higher DENV inoculum. WT mice ($n = 5-9$) were administered with 15 μg of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein, pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity on days -1 , $+1$ and $+3$ and were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.). Another two groups were inoculated only with the DENV-3 (100 PFU “sublethal” or 1000PFU “lethal”), without any antibody treatment. Euthanasia was conducted on day 7 after DENV-3 inoculation, and the following parameters were evaluated: **a** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu\text{L}$ of blood. **b** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **c** Changes in vascular permeability in the liver, shown as μg of Evans blue per 100 mg of tissue. **d** changes in systolic blood pressure from baseline until day 7 after infection, expressed as Δ of blood

pressure in mmHg. **e-f** Concentration of TNF- α and IFN- γ in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **g** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/dL of plasma. **h** Liver of control and DENV-3-infected mice were collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin, and histopathological scores of each mouse were performed. **i** Representative images of each group of mice are shown (Scale Bar 400 μm). All results are expressed as mean $\pm$ SEM and are representative at least two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. * $P < 0.05$ when compared to sublethal or isotype control DENV-3-infected mice. NI non-infected, dpi days post-infection, HS hepatocyte swelling, D degeneration, N necrosis, H hemorrhage, OS overall score

impairment in host antiviral response. First, experiments conducted in mice with null mutations for the IFN α/β receptors (A129 $^{-/-}$ mice) revealed the essential role of type I IFNs in host response to primary DENV infection in the present model (Figure S5). After infection, while 50 % of WT mice had succumbed to infection until day 12 (Figure S5A), almost 90 % of the type I-IFN-deficient mice were dead by day 7 of virus inoculation (Figure S5A). The increased lethality of A129 $^{-/-}$ mice was associated with elevated virus replication in spleen already on day 5 of infection (Figure S5B) and presence of higher viremia on day 7 after DENV inoculation (Figure S5C). In addition, there was no difference in thrombocytopenia between

WT- and A129 $^{-/-}$ -infected mice (Figure S5D); however, hemoconcentration (Figure S5E), higher levels of TNF- α (Figure S5F) and more intense ALT (Figure S5G) were detected in the serum of these knockout mice in comparison with the WT-infected controls.

Next, we assessed type I IFN expression in spleen of mice allocated on the same experimental design of the one previously depicted for the Fig. 6. Results show that there was a marked increase in mRNA expression of the antiviral genes; IFN $\alpha 2$ (Fig. 7a), IFN $\alpha 4$ (Fig. 7b) and the IFN-induced ISG15 gene (Fig. 7c) in the spleen of mice that received the treatment with the isotype control mAb and were inoculated with the low inoculum of virus, in

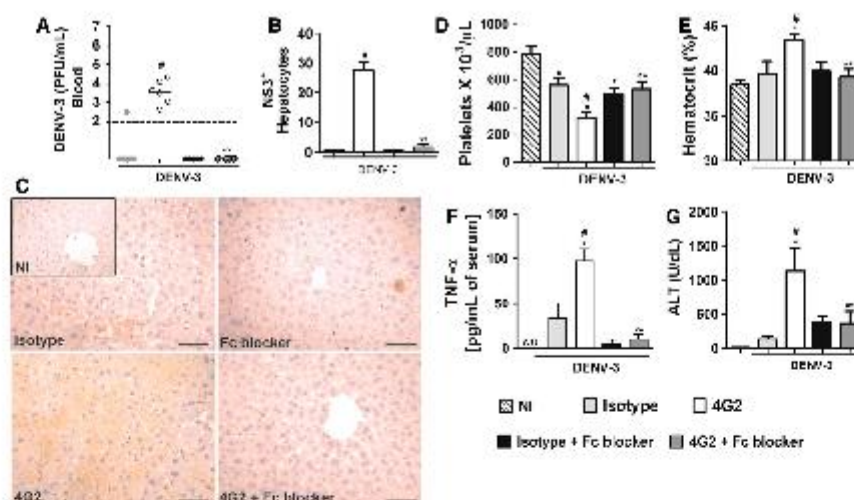


Fig. 6 Fc γ R blockade avoids ADE occurrence and dengue severe disease development in mice. WT mice ($n = 5-8$ per group) were administered with 15 μ g of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein, pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity followed by inoculation of 100PFU of DENV-3 (i.p.). Another two groups received the anti-DENV 4G2 mAb together with the Fc-blocking antibody (clone 2.4G2) or were administered with the isotype control mAb and the Fc-blocker. Seven days later, mice were culled and blood and tissues collected for the following analysis: **a** Viral loads recovered from blood by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **b** Quantification of NS3-positive hepatocytes in the liver of mice. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype control mouse

IgG2a, and multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. **c** Representative pictures of positive staining for NS3 $^{+}$ cells are shown where NS3 signal is brown, while hematoxylin counterstain is blue. **d** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu$ L of blood. **e** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **f** Concentrations of TNF- α in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **g** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/dL of plasma. All results are expressed as mean $\pm$ SEM (except for **a**, expressed as median) and are representative of two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. # $P < 0.05$ when compared to isotype control or isotype control and 2.4G2 DENV-3-infected mice. ** $P < 0.05$ when compared to 4G2 DENV-3-infected mice. NI non-infected, ND non-detected (color figure online)

both days 4 and 7 after DENV inoculation. Similar results were found in mice that received the isotype control mAb together with the Fc-blocker antibodies (Fig. 7a–c—black bars). Otherwise, in 4G2-treated mice equally infected with the same inoculum of DENV-3, a drastic suppression in the mRNA expression of all these evaluated genes was found (Fig. 7a–c). Of note, *IFN α 2* suppression in 4G2-treated mice occurred as early as the day 4 of infection, supporting the higher viral replication found previously in this group of mice (Fig. 4b). Interestingly, the blockade of Fc γ R signaling in 4G2-treated mice reversed this situation (Fig. 7a–c—dark gray bars). In addition, elevated IL-10 production [NI = 36 ± 72 ; sublethal = 58 ± 89 ; lethal = 187 ± 126 *#; isotype = 60 ± 85 ; 4G2 = 187 ± 104 *# pg/100 g of spleen] was detected in the spleen of 4G2-treated mice in comparison with isotype controls littermates. Of note, blockade of Fc γ Rs in 4G2-treated mice reverted these phenotypes [NI = 36 ± 72 ; isotype = 60 ± 85 ;

4G2 = 187 ± 104 *#; isotype + 2.4G2 = not detectable; 4G2 + 2.4G2 = 27 ± 54 #]. Therefore, the data depicted here show that type I IFN responses play an essential role during primary and secondary DENV infections and during antibody-mediated enhancement of virus replication in mice; there is an early suppression of innate antiviral immune responses that results in enhanced *Dengue virus* replication and severe disease manifestation.

Passive intravenous immunoglobulin therapy (IVIg) containing subneutralizing titers of α -DENV antibodies enhances *Dengue virus* replication and induces severe disease manifestation in mice

Specific therapeutic approaches for severe thrombocytopenia and shock syndrome during severe dengue are still lacking. Intravenous immunoglobulin G (IVIg) therapy is widely used to treat inflammatory and autoimmune diseases,

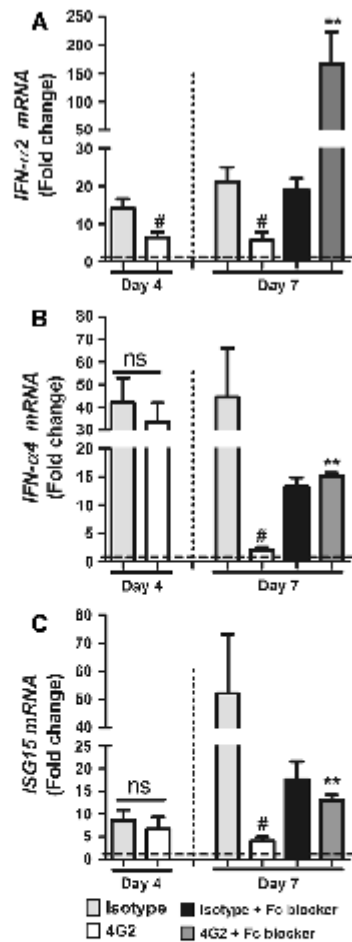


Fig. 7 Anti-dengue antibodies mediate suppression of early antiviral innate immune responses in spleen of mice infected with DENV-3 through FcγR activation. WT mice ($n = 5$ per group) were administered with 15 μ g of the mouse monoclonal antibody—4G2 (IgG2a anti-Envelope protein, pan-flavivirus-reactive) or with an isotype control antibody with irrelevant specificity followed by inoculation of 100PFU of DENV-3 (i.p.). Another two groups received the anti-DENV 4G2 mAb together with the Fc-blocking antibody (clone 2.4G2) or were administered with the isotype control mAb and the Fc-blocker and were infected with 100PFU of DENV-3. Four or seven days later, mice were culled and spleen was collected for the determination of IFN- α 2 (a), IFN- α 4 (b) and ISG15 (c) RNA expression by qPCR. Results are shown as mean $\pm$ SEM of fold increase over basal expression in naive mice. All results are representative of two experiments. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. # $P < 0.05$ when compared to isotype control or isotype control and 2.4G2 DENV-3-infected mice. ** $P < 0.05$ when compared to 4G2 DENV-3-infected mice. *NI* non-infected

Table 1 Characteristics and composition of the 5 % human immune globulin intravenous solution produced by the HEMOPE, Recife, Brazil

Analysis ^a	Standard values	IVIG α -DENV
Protein concentration	Minimum 30 mg/mL	51.1 mg/mL
Protein composition (purity)	Minimum 95 %	96.80 %
pH	4.0–7.4	4.51
Quantification of aggregates	<3 %	1.8 %
Anti-HBs	Minimum 0.5 UI/g	8.7 UI/g
Immunoglobulin concentration		
IgG	—	44.4 mg/mL
IgA	—	1.25 mg/mL
IgM	—	0.25 mg/mL
IgE	—	0.03 mg/mL
Anticomplementary (CH50)	<1	<1
Anti-HIV1 abs	Absent	Absent
Anti-HIV2 abs	Absent	Absent
Anti-HBSAg	Absent	Absent
Anti-Streptococcus abs	—	Present
Anti-measles	—	Present
Anti-DENGUE abs	—	Present
Stability at 57°/4 h	Do not freeze	Do not freeze

Formulation: 0.3M glycine

The isolation of the human immunoglobulin G (IVIG) from a pull of serum donors from an endemic region for *Dengue virus* was made by the method of Cohn-Oncley. The characteristics and composition of the IVIG are demonstrated above

^a Using the methodologies recommended in the European Pharmacopoeia, VI edition

such as immunothrombocytopenia (ITP) [42]. However, the effects of IVIG therapy during *Dengue virus* infections are controversial [42–44]. In light of the previous results, we hypothesized that the prophylactic treatment of mice with human immunoglobulin (IVIG) from pooled blood from health donors from an endemic area for *Dengue virus* circulation could worsen DENV-induced disease in mice due to the presence of subneutralizing titers of anti-DENV antibodies. Table 1 shows the composition of the IVIG used in the present study. As highlighted, anti-DENV antibodies were detected by the Pan Bio qualitative anti-DENV ELISA in the IVIG used. In addition, plaque reduction neutralization tests of the IVIG sample showed that the utilized preparation presented subneutralizing titers of anti-DENV antibodies (PRNT₅₀ against the DENV-3 strain = 1:20). To verify the role of IVIG therapy during *Dengue virus* infection, WT mice were administered intravenously with three different doses of α -DENV-containing IVIG (30, 100 and 300 mg/kg) on days –1, +1 and +3 after DENV-3 inoculation. Figure 8a shows that only 25 % of mice that received the vehicle solution succumbed to infection until day 14 of DENV-3 inoculation. Interestingly, IVIG administration

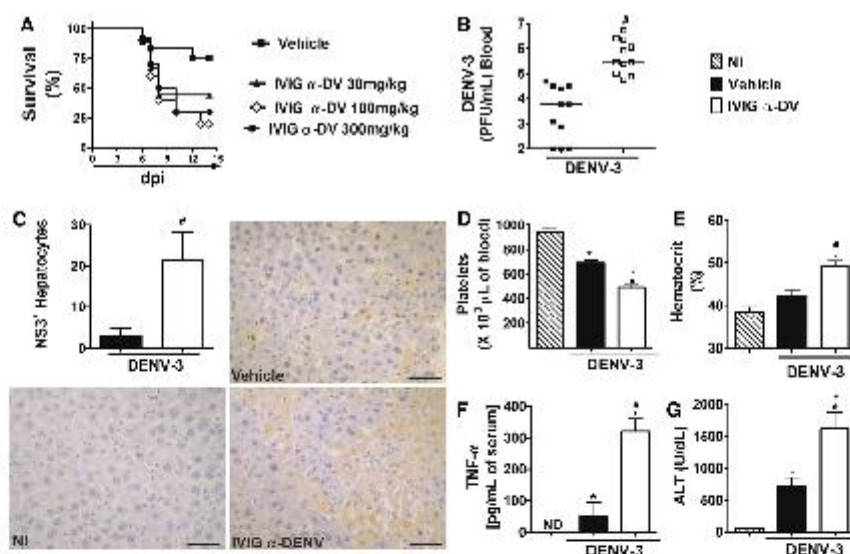


Fig. 8 Passive intravenous immunoglobulin therapy (IVIG) containing subneutralizing levels of α -DENV antibodies reduce survival rates, enhance *Dengue virus* replication and induce severe disease manifestation in DENV-3-inoculated mice. **a** WT mice ($n = 8$) were administered with different doses of the α -DENV IVIG (30, 100 or 300 mg/kg) or with the vehicle solution (i.v) on days -1 , $+1$ and $+3$ and were inoculated with 100PFU of DENV-3 (i.p.). **a** Lethality rates were evaluated every 12 h during 14 days. Results are expressed as % of survival. **b–g** WT mice ($n = 8–11$) were administered with the α -DENV IVIG (100 mg/kg) or with the vehicle solution (i.v) on days -1 , $+1$ and $+3$ and 7 days after DENV-3 infection, mice were culled and blood and tissue collected for the following analysis: **b** Viral loads recovered from blood, assayed by plaque assay in Vero cells. Results are shown as the log of PFU per mL of blood. **c** Quantification of NS3-positive hepatocytes in the liver of 4G2 or isotype-con-

trol-treated mice. Liver was collected, formalin-fixed and processed into paraffin sections. Serial sections from each tissue were stained with anti-DV NS3 antibody E1D8 (NS3) or an isotype control mouse IgG2a, and multiple sections of each tissue type were thoroughly examined for staining. Representative pictures of positive staining for NS3⁺ cells are shown, where NS3 signal is brown, while hematoxylin counterstain is blue. **d** Number of platelets, shown as platelets $\times 10^3/\mu\text{L}$ of blood. **e** Hematocrit, shown as % volume occupied by red blood cells. **f** Concentrations of TNF- α in serum, quantified by ELISA. Results are shown as pg per mL (serum). **g** ALT activity determination in plasma of control and DENV-3-infected mice is shown as U/dL of plasma. * $P < 0.05$ when compared to control uninfected mice. * $P < 0.05$ when compared to vehicle-treated and DENV-3-infected mice. NI non-infected, dpi days post-infection, ND non-detected (color figure online)

to DENV-3-inoculated mice led to an enhancement of the lethality rates varying between 50 % at dose of 30 mg/kg and 75 % at doses of 100 or 300 mg/kg per mouse/per treatment. Further analyses of disease parameters were done administering the dose of 100 mg/kg. In addition to elevated lethality rates, administration of α -DENV-containing IVIG led to severe disease manifestation and enhancement of virus replication (Fig. 8b–g). While vehicle-treated mice presented moderate viremia (Fig. 8b), viral load in blood of mice administered with α -DENV-containing IVIG was 2log higher at the same period analyzed. In accordance, the presence of NS3⁺ hepatocytes was markedly increased in IVIG-treated mice in comparison with vehicle-treated ones (Fig. 8c). Hematological parameters were also aggravated in IVIG-treated mice as demonstrated by intense drop in platelets numbers (Fig. 8d), occurrence of hemoconcentration

(Fig. 8e), heightened production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α (Fig. 8f) and hepatic damage (Fig. 8g and S6). Next, we assessed the neutralizing titers of α -DENV antibodies in the serum of IVIG-treated mice in vitro. Plaque neutralization assays from serum of mice administered with 100 mg/kg of IVIG revealed non-neutralizing titers (data not shown), and these results corroborate the findings shown before that subneutralizing doses of α -DENV antibodies can enhance *Dengue virus* replication and disease manifestation in mice.

Discussion

The major findings of the present study can be summarized as follows: (1) B cells play a protective role in the

host response to primary *Dengue virus* infection in mice; (2) subneutralizing titers of anti-dengue antibodies enhance DENV infection and replication, leading to severe disease manifestation and increased lethality rates of immunocompetent mice in a similar way as found in DHF patients; (3) enhanced DENV replication mediated by subneutralizing levels of anti-DENV antibodies involves FcγR activation and subsequent impairment of host type I interferon responses and elevated production of the anti-inflammatory cytokine IL-10; (4) IVIG replacement therapy containing subneutralizing levels of anti-DENV antibodies led to more severe disease manifestation and increased lethality rates due to an enhancement of virus replication. These studies, therefore, indicate that B cells are pivotal for host resistance to primary *Dengue virus* infections although humoral responses unleashed during secondary infections may contribute to the enhancement of virus replication and severe disease manifestation in mice due to suppression of the early antiviral innate responses.

The adaptive immune response to *Dengue viruses* is thought to contribute to the resolution of infection and to play a major role in protection from reinfection [45]. Conversely, it is also believed to have a crucial role in the enhancement of disease severity seen in patients with DHF or DSS [46]. It has been previously demonstrated that there is early B-cell activation upon DENV infection of immunocompetent mice, with detectable levels of anti-DENV antibodies as early as 3 days post-infection. However, the same group showed that B-cell-deficient mice are as resistant to DENV-induced lethality as WT mice [31] although viral replication and disease parameters were not thoroughly addressed due to limitations of the experimental model utilized. Therefore, the data obtained so far have failed to properly define the role played by B cells during the course of DENV infection. Here, we have performed experiments in B-cell-deficient mice ($\mu\text{MT}^{-/-}$) using DENV strains shown to replicate in relevant host tissues and to induce a severe disease that resembles most of the parameters found in patients with DHF/DSS when primarily inoculated into immunocompetent mice [33–35]. Our data clearly show that $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice were more susceptible to DENV infection than WT-infected controls. DENV-3-inoculated $\mu\text{MT}^{-/-}$ presented elevated lethality rates, and importantly, lethality was associated with a systemic dissemination of the virus as well as with enhanced disease manifestation, as exemplified by the presence of marked thrombocytopenia, hemoconcentration, elevated levels of TNF- α and ALT in serum as well as an intense liver damage. These findings highlight the pivotal role played by early B-cell activation in controlling viral replication and disease evolution and are divergent from previous studies utilizing animal models of infection [31]. It is important to emphasize that such discrepancies may be justified by the use of different

viral strains (serotypes/genotypes), as well as the different experimental protocols used in these studies. Thus, the reader should be cautious during the interpretation of such data. Also, the higher complexity of the human immune system in relation to the murine one should be taken into account when interpreting the current findings. But the data presented here strongly support a protective role for B cells during primary DENV infection and are in accordance with the role played by B-cell-mediated immunity during infection by other flaviviruses [47, 48].

The mechanisms involved in B-cell-mediated protection to DENV infection are still to be defined. Recently, it has been shown that B cells are important for proper innate antiviral responses by controlling macrophage maintenance and production of type I IFNs upon VSV infection [49]. Also, B cells seem to play a pivotal role during innate responses to systemic infections. Kelly-Scumpia et al. [49, 50] have demonstrated that during bacterial sepsis, type-I-IFN-mediated activation of marginal zone and follicular B cells contributed to early chemokine production and to improved survival rates. Thus, these two studies have identified a novel protective role for type I IFN and B cells during early immune responses to viral and systemic infections. Since type I IFN responses are essential during DENV infection and B-cell-deficient mice were markedly susceptible to primary DENV infection, similar mechanisms as described before could account to the severe disease manifestation observed in DENV-infected $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice. However, future studies are needed to clarify these speculations.

In the previously cited work by Diamond and colleagues, it was found that $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice developed increased viral burden and higher lethality rates upon WNV infection, similarly to what we have found in our system during the course of DENV infection [47]. Importantly, they have also shown that passive transfer of heat-inactivated serum from WT immune mice to $\mu\text{MT}^{-/-}$ mice protected them against morbidity and mortality induced by WNV inoculation, suggesting that antibodies are important for conferring protection to infection [47]. In order to evaluate whether antibodies would confer protection also to DENV infection, we have conducted experiments involving passive transfer of DENV-immune serum to mice, but we had strikingly different results. Hence, the administration of anti-DENV serum to immunocompetent mice can sufficiently increase severity of disease, so that a mostly non-lethal illness becomes a fatal disease. Similar results were found with the administration of subneutralizing titers of monoclonal anti-DENV antibodies. Of note, antibody-induced disease manifestation was completely reversed when higher doses of anti-DENV mAbs were administered to mice. These experiments suggested the occurrence of ADE phenomenon *in vivo*.

Findings in other experimental systems have previously suggested the occurrence of ADE of DENV infection in vivo. The first evidences came from experiments conducted in non-human primates [51, 52]. In vivo enhancement of *Dengue virus* infection in rhesus monkeys was detected after passive transfer of antibodies [52, 53]. However, despite the elevated viral titers detected, no signs of disease were apparent, which limits the study of *Dengue virus* pathogenesis in this system. Recently, studies conducted in AG129 mice have also brought support to this theory, showing the occurrence of many DHF/DSS signs of disease and symptoms after passive transfer of polyclonal-immune serum or anti-DENV mAbs [54, 55]. The fact that these studies were conducted in IFN receptor-deficient mice tempered further extrapolations to human situation, due to the essential role of IFN responses in both pathogenesis and protection against DENV infections. Of note, mice in the SV129 background are much more susceptible to infection by dengue than the C57BL/6 strain, which justify the difference in mortality rates found in both groups when infected with the same inoculums of dengue in this study. Our results in a immunocompetent system showed that after inoculation of a low inoculum of DENV-3 to mice treated with a low dose of the 4G2 antibody, there was increased viral burden together with marked thrombocytopenia, occurrence of hemoconcentration, increased vascular permeability, reduction in arterial blood pressure as well as elevated levels of TNF- α and hepatic transaminases in the serum, all parameters found in humans with DHF/DSS. In addition, intense liver damage was detected in anti-DENV mAbs-treated mice. The latter findings clearly show the occurrence of the ADE phenomenon in immunocompetent settings and demonstrate that ADE may impact in both viral burden and disease evolution in vivo. This system utilizing ADE-mediated DENV infection in immunocompetent mice may provide an important tool to study host-virus interactions during secondary DENV infection.

Of note, ADE-induced disease manifestation was completely reversed after the blockade of Fc γ Rs. This is in accordance with previous findings by other groups, showing that antibody-induced disease could be prevented by blockade of interaction between the virus immunocomplexes to the Fc γ Rs, through the use of anti-Fc γ R mAbs or by the administration of genetically modified antibodies that are incapable of interacting with the Fc γ Rs [54, 55]. This Fc γ R-dependent antibody-enhanced infection can also be reproduced in cell culture models. In fact, in addition to enabling viral entry into target cells, it has been suggested that Fc γ R activation by DENV-antibodies complexes may interfere in cellular antiviral responses, in a mechanism called intrinsic ADE (iADE) [17, 18, 56, 57]. Hence, it was demonstrated that DENV-antibody complexes activated negative regulators of the RIG-I and MDA-5

cascade, resulting in suppression of type I interferon production and to impairment of the interferon-mediated antiviral responses. Modhiran et al. [58] have demonstrated in THP-1 cells that interaction between DENV-antibody complexes and Fc γ Rs may also downregulate TLR gene expression and upregulate negative regulators of the NF- κ B pathway, resulting in suppression of innate responses and increased viral production. Importantly, these alterations in gene expression were also described in cells of patients experiencing secondary DHF/DSS but not in DF patients [18, 58]. In the present study, we found that there was marked suppression in expression of the *IFN α 2*, *IFN α 4* and *ISG15* genes in the spleen of anti-dengue mAb-treated mice. Importantly, these effects were attenuated by blockade of Fc γ -receptors, suggesting the occurrence of the iADE phenomenon in the current experimental settings. To our knowledge, this is the first demonstration of the iADE phenomenon in vivo. These data also suggest that iADE occurrence impacts on severe disease manifestation during secondary dengue infection.

Another event shown to occur during iADE involves the production of the suppressive cytokine IL-10. It was previously shown that after internalization of DENV-antibody complexes in THP-1 cells, there is induction of high levels of IL-10 and expression of the regulatory molecule SOCS3, culminating in the inhibition of nitric oxide production and enhanced viral replication. Interestingly, we have found elevated IL-10 levels in spleen of anti-DENV mAb-treated mice on day 7 after DENV inoculation, suggesting that this mechanism may take place in vivo. This finding, in concert with the fact that IL-10 host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of DENV infection, suggests that this pathway may be relevant to severe disease manifestation during DENV infection [59, 60]. Altogether, these findings show that there is suppression of early antiviral innate responses during antibody-mediated DENV infection, resulting in excessive virus replication and severe disease manifestation.

Specific therapeutic options for severe thrombocytopenia and shock syndrome, the main causes of mortality during severe dengue disease, are still lacking [1, 42]. The ADE phenomenon is considered a major bottleneck during the vaccine design and antibody therapeutic approaches development [15, 61, 62]. This seems to be the case for application of the IVIG therapy. This so-called intravenous immunoglobulin G therapy involves the application of pooled immunoglobulin G (IgG) preparations from thousands of donors to patients with a variety of hematological and immunological disorders [63]. Prophylactic and therapeutic efficacies of IVIG therapy have been reported during some *Flavivirus* infections, such as West Nile virus (WNV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV) [44, 64]. However, in the context of *Dengue virus* infections, trials so far

have not shown any significant benefit in terms of survival or improvement in clinical parameters of patients submitted to the IVIG therapy [42, 43]. Our data clearly showed that replacement IVIG therapy containing subneutralizing titers of anti-DENV antibodies potentiated DENV infection and replication and induced severe disease manifestation in DENV-infected mice, suggesting that ADE may impact negatively the outcome upon IVIG therapy during DENV infection. These data suggest that different formulations of the IVIG should be developed in the case of any application of this therapy during the course of DENV infection. This assertion is supported by the finding that treatment with anti-D (RhD IgG) immune globulin (Win-Rho® SDF), a preparation highly effective in producing Fc-receptor blockade, resulted in increase in platelet counts in DHF patients [65]. Therefore, proper formulations for IVIG preparations should be sought for application of this therapy to DENV-infected patients.

In conclusion, we have demonstrated that B cells play an essential role during protection of primary DENV infection in mice. However, our results also show that subneutralizing levels of anti-DENV-specific antibodies may aggravate the course of infection due to the enhancement of virus infection and replication in Fc-bearing cells through FcγR-mediated suppression of early antiviral innate responses. These data confirm the ADE phenomenon occurrence in vivo in mice with an intact immune system and highlight the great impact ADE-mediated infection exerts in severe dengue disease manifestation. Finally, we have demonstrated that these events involved in ADE occurrence may impact negatively in replacement IVIG therapy during the course of DENV infection. Therefore, the ADE phenomenon represents a major constraint for utilizing IVIG therapy in DENV-infected patients.

Acknowledgments We thank Ilma Marçal, Givânia Ferreira da Silva Santos and Franckcinéia Assis (ICB/UFMG) for technical assistance. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue (INCT-Dengue); PRONEX em Dengue (Ministério da Saúde), Brazil; Conselho Nacional de Ciência de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). VVC and CTF are supported by the "Science without Borders" program.

Conflict of interest The authors have no conflicting financial interests.

References

- Fagundes CT, Costa VV, Cisalpino D, Souza DG, Teixeira MM (2011) Therapeutic opportunities in dengue infection. *Drug Devel Res* 72:480–500. doi:10.1002/ddr.20455
- Costa VV, Fagundes CT, da Gloria de Souza D, Teixeira MM (2013) Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol* 182(6):1950–1961. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.027
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B (2012) Dengue. *N Engl J Med* 366:1423–1432. doi:10.1056/NEJMr1110265
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507. doi:10.1038/nature12060
- Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB (2013) Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 158(7):1445–1459. doi:10.1007/s00705-013-1645-3
- Wilder-Smith A, Renhorn K-E, Tissera H, Bakar SA, Alphey L, Kittayapong P, Lindsay Steve, Logan J, Hatz C, Reiter P, Rocklov J, Byass Peter, Louis VR, Tozan Y, Massad E, Tenorio A, Lagneau C, Lambert G, Brooks D, Wegerdt J, Gubler D (2012) DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. *Glob Health Action* 5:17273. doi:10.3402/gha.v5i0.17273
- Normile D (2013) Surprising new *Dengue virus* throws a spanner in disease control efforts. *Science* 342(6157):415. doi:10.1126/science.1241571
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis H, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8:S7–S16. doi:10.1038/nrmicro2460
- Balmaseda A, Hammond SN, Perez I, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, Cuadra R, Rocha J, Perez MA, Silva S, Rocha C, Harris E (2006) Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 74:449–456
- Clyde K, Kyle JL, Harris E (2006) Recent advances in deciphering viral and host determinants of *Dengue virus* replication and pathogenesis. *J Virol* 80:11418–11431. doi:10.1128/JVI.01257-06
- Wahala WM, Silva AM (2011) The human antibody response to *Dengue virus* infection. *Viruses* 3:2374–2395. doi:10.3390/v3122374
- Klitsch SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS (1988) Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 38:411–419
- Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NTP, Lien LB, Quy NT, Hieu NT, Hien TT, Hung NT, Farrar J, Simmons C (2008) Dengue in Vietnamese infants—results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis* 198:516–524. doi:10.1086/590117
- Chau TN, Hieu NT, Anders KL, Wolbers M, le Lien B, Hieu LT, Hien TT, Hung NT, Farrar J, Whitehead, Simmons CP (2009) *Dengue virus* infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants. *J Infect Dis* 200:1893–1900. doi:10.1086/648407
- Murphy BR, Whitehead SS (2011) Immune response to *Dengue virus* and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29:587–619. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101315
- Rothman AL (2011) Immunity to *Dengue virus*: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11:532–543. doi:10.1038/nri3014
- Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM (2010) Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis* 10:712–722. doi:10.1016/S1473-3099(10)70166-3

18. Chareonsirisuthikul T, Kalayanaroj S, Ubol S (2007) *Dengue virus* (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 88:365–375. doi:10.1099/vir.0.82537-0
19. Ubol S, Phuklia W, Kalayanaroj S, Modhiran N (2010) Mechanisms of immune evasion induced by a complex of *Dengue virus* and preexisting enhancing antibodies. *J Infect Dis* 201:923–935. doi:10.1086/651018
20. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanaroj S, Chareonsirisuthikul T, Kasitth J (2008) Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 197:1459–1467. doi:10.1086/587699
21. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaiskul N, Chairunsri A, Sawasdiworn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G (2003) Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9:921–927. doi:10.1038/nm887
22. Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanawathana S, Limpitkul W, Willis B, Flanagan A, Waiyayia E, Tran HB, Cowper AE, Choti-yarnwong P, Grimes JM, Yoksan S, Malasit P, Simmons CP, Mongkolsapaya J, Screaton GR (2011) An in-depth analysis of original antigenic sin in *Dengue virus* infection. *J Virol* 85:410–421. doi:10.1128/JVI.01826-10
23. Rothman AL (2010) Cellular immunology of sequential *Dengue virus* infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 338:83–98. doi:10.1007/978-3-642-02215-9_7
24. Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, Potts JA, Greenough T, Kalayanaroj S, Gibbons RV, Nisalak A, Srikiatkachorn A, Green S, Stephens HA, Rothman AL, Mathew A (2011) Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep* 1:51. doi:10.1038/srep00051
25. Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanaroj S, Endy TP, Stephens HA, Green S, Rothman AL, Mathew A (2011) Memory CD8 + T cells from naturally acquired primary *Dengue virus* infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol* 89:122–129. doi:10.1038/s41038.2010.61
26. Mangada MM, Rothman AL (2005) Altered cytokine responses of dengue-specific CD4 + T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 175:2676–2683
27. Boonpucknavig S, Lohachitranond C, Nimmanitya S (1979) The pattern and nature of the lymphocyte population response in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 28:885–889
28. Jampangern W, Vongthoung K, Jittmittraphap A, Worapongpiboon S, Limkittikul K, Jampangern W, Chuansumrit A, Turanotai U, Chongsa-nguan M (2007) Characterization of atypical lymphocytes and immunophenotypes of lymphocytes in patients with *Dengue virus* infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* 25:27–36
29. Garcia-Bates TM, Cordeiro MT, Nascimento EJ, Smith AP, Soares de Melo KM, McBurney SP, Evans JD, Marques ET Jr, Barratt-Boyes SM (2013) Association between magnitude of the virus-specific plasmablast response and disease severity in dengue patients. *J Immunol* 190:80–87. doi:10.4049/jimmunol.1103350
30. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Pemp GC, Polsrila K, Wrammert J, Chande A, Kwiss M, Pulendran B, Wilson PC, Wittawatmongkol O, Yoksan S, Angkasekwinai N, Pattanapan-yasat K, Chokephaibulkit K, Ahmed R (2012) Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute *Dengue virus* infection in humans. *J Virol* 86:2911–2918. doi:10.1128/JVI.06075-11
31. Shrestha S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E (2004) Early activation of natural killer and B cells in response to primary *Dengue virus* infection in A/J mice. *Virology* 319:262–273
32. Zompi S, Montoya M, Pohl MO, Balmaseda A, Harris E (2012) Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute *Dengue virus* infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1568. doi:10.1371/journal.pntd.0001568
33. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G (2003) Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental *Dengue virus* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35:33–42. doi:10.1111/j.1574-695X.2003.tb00646.x
34. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, Kroon EG, Sachs D, Cunha FQ, Bukin E, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM (2009) Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of *Dengue virus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14138–14143. doi:10.1073/pnas.0906467106
35. Costa VV, Fagundes CT, Valadao DF, Cisalpino D, Dias AC, Costa VV, Silveira KD, Kangussu LM, Ávila TV, Bonfim MR, Bonaventura D, Silva TA, Sousa LP, Rachid MA, Vieira LQ, Menezes GB, de Paula AM, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM, Souza DG (2012) A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN-gamma in host resistance to infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1663. doi:10.1371/journal.pntd.0001663
36. Page M, Thorpe R (1998) Purification of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol* 80:113–119
37. Russell PK, Nisalak A (1967) *Dengue virus* identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol* 99:291–296
38. Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, Tavares LP, Salgado AP, Cassali GD, Sousa LP, Machado AV, Teixeira MM (2010) Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. *PLoS Pathog* 6:e1001171. doi:10.1371/journal.ppat.1001171
39. Saria A, Lundberg JM (1983) Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods* 8:41–49
40. Krege JH, Hodgins JB, Hagaman JR, Smithies O (1995) A non-invasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25:1111–1115. doi:10.1161/01.HYP.25.5.1111
41. Halstead SB (1989) Antibody, macrophages, *Dengue virus* infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* 11(Suppl 4):S830–S839
42. Rajapakse S (2009) Intravenous immunoglobulins in the treatment of dengue illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:867–870. doi:10.1016/j.trstmh.2008.12.011
43. Dimasano EM, Saito M, Honda S, Miranda EA, Alonzo MT, Dimasano EM, Valerio MD, Mapua CA, Inoue S, Kumari A, Matias R, Natividad FF, Oishi K (2007) Lack of efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary *Dengue virus* infection. *Am J Trop Med Hyg* 77:1135–1138
44. Kreil TR, Eibl MM (1997) Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model. *J Virol* 71:2921–2927
45. Guzman MG, Vazquez S (2010) The complexity of antibody-dependent enhancement of *Dengue virus* infection. *Viruses* 2:2649–2662. doi:10.3390/v2122649
46. Halstead SB (1982) Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy* 31:301–364
47. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M (2003) B cells and antibody play critical roles in the immediate defense

- of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 77:2578–2586
48. Chambers TJ, Droll DA, Walton AH, Schwartz J, Wold WS, Nickells J (2008) West Nile 25A virus infection of B-cell-deficient ((micro)MT) mice: characterization of neuroinvasiveness and pseudoreversion of the viral envelope protein. *J Gen Virol* 89:627–635. doi:10.1099/vic.0.83297.0
 49. Moseman EA, Iannaccone M, Bosurgi L, Tonti E, Chevrier N, Moseman EA, Tumanov A, Fu YX, Hacohen N, von Andrian UH (2012) B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. *Immunity* 36:415–426. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.013
 50. Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Weinstein JS, Delano MJ, Cuenca AG, Nacionales DC, Wynn JL, Lee PY, Kumagai Y, Efron PA, Akira S, Wasserfall C, Atkinson MA, Moldawer LL (2011) B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med* 208:1673–1682. doi:10.1084/jem.20101715
 51. Marchette NJ, Halstead SB, Falkner WA Jr, Stenhouse A, Nash D (1973) Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis* 128:23–30
 52. Halstead SB (1979) In vivo enhancement of *Dengue virus* infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* 140:527–533
 53. Goncalves AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ (2007) Monoclonal antibody-mediated enhancement of *Dengue virus* infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9422–9427. doi:10.1073/pnas.0703498104
 54. Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, Harris E (2010) Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog* 6:e1000790. doi:10.1371/journal.ppat.1000790
 55. Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S (2010) Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe* 7:128–139. doi:10.1016/j.chom.2010.01.004
 56. Suhrbier A, La Linn M (2003) Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends Immunol* 24:165–168. doi:10.1016/S1471-4906(03)00065-6
 57. Ubol S, Halstead SB (2010) How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clin Vaccine Immunol* 17:1829–1835. doi:10.1128/CLVI.00316-10
 58. Modhiran N, Kalayanaraj S, Ubol S (2010) Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e924. doi:10.1371/journal.pntd.0000924
 59. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Perez AB, Alvarez M, Sanchez L, Valdes L, Volk HD, Guzman MG (2010) Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 71:1135–1140. doi:10.1016/j.humimm.2010.08.004
 60. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA (2011) Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of *Dengue virus* infection. *J Virol* 85:1671–1683. doi:10.1128/JVI.00220-10
 61. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR (2007) Prospects for a *Dengue virus* vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5:518–528. doi:10.1038/nrmicro1690
 62. Halstead SB (2007) Dengue. *Lancet* 370:1644–1652
 63. Nimmerjahn F, Ravetch JV (2008) Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 26:513–533. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232
 64. Ben-Nathan D, Lustig S, Tam G, Robinson 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. doi:10.1086/376870
 65. de Castro RA, de Castro JA, Barez MY, Frias MV, Dixit J, Genereux M (2007) Thrombocytopenia associated with dengue hemorrhagic fever responds to intravenous administration of anti-D (Rh(D)-D) immune globulin. *Am J Trop Med Hyg* 76:737–742