



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE



JOSIAS PEREIRA CAVALCANTE JUNIOR

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA IMUNOGLOBULINA G
COMERCIAL UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS**

RECIFE

2022

JOSIAS PEREIRA CAVALCANTE JUNIOR

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA IMUNOGLOBULINA G
COMERCIAL UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Attilio Converti

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Cavalcante Junior, Josias Pereira

Extração e avaliação do comportamento da imunoglobulina G comercial utilizando sistemas de duas fases aquosas/ Josias Pereira Cavalcante Junior– 2022.

61 f. : il., fig., tab.

Orientador: Attilio Converti

Coorientadores: Ana Lúcia Figueiredo Porto e Thiago Pajeú Nascimento

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndice.

1. Imunoglobulina G 2. Extração (química) 3. Vírus da Zika I. Converti, Attilio (orient.) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (coorient.) III. Nascimento, Thiago Pajeú (coorient.) IV. Título

615.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -192

JOSIAS PEREIRA CAVALCANTE JUNIOR

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA IMUNOGLOBULINA G
COMERCIAL UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Aprovado em: 28/10/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Attilio Converti (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco
Universita' Degli Studi Di Genova

Prof^a. Dr^a Ana Cristina Lima Leite (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Claudecy e Josias Cavalcante , por todo amor e dedicação dispensados a mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu criador e pai por ter me dado a graça e a oportunidade de alcançar este dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Attilio Converti, que gentilmente aceitou ser meu orientador apesar da distância intercontinental entre nós, meu muito obrigado pela oportunidade que mudou a minha vida.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Ana Porto, pessoa a qual admiro muito por todo o legado que construiu, e que aprendi muito seja nas disciplinas da pós-graduação, nas reuniões de acompanhamento ou nos seminários promovidos pelo LABTECBIO.

Ao meu Co-orientador e amigo, Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento, que aceitou a difícil missão de me coorientar, minha eterna gratidão por toda dedicação e disponibilidade, você é um exemplo para todos os jovens cientistas.

À minha amiga Milena Tereza Torres do Couto, que foi um Porto seguro para mim durante esses dois anos de mestrado, sem você em não teria conseguido.

Aos meus professores da pós-graduação. Sou extremamente grato por todos os ensinamentos.

À banca avaliadora: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite, Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Dra. Juanize Matias da Silva Batista. Muito obrigado pela disponibilidade.

À todos os integrantes do LBHEMO, laboratório maravilhoso que tem contribuído e vai contribuir muito ainda para a ciência no Brasil.

Ao meu tio e padrinho, Joabe Cavalcanti que me deu todo suporte. Agradeço imensamente toda dedicação e carinho e por todos os ensinamentos preciosos que me deu.

À minha irmã Rebeka Mikaelly, que me ajudou e me incentivou durante esse período. Te amo irmã!

À todos os membros da minha família que sempre se fizeram presentes nesse árduo período me incentivando.

Aos meus amigos que a vida me deu: Lucineide Maria, Jeová Silva, Rafaella Cristine, Leilane Pereira, Tairine Pimentel, Edileide Gomes, Millena Cavalcanti, Luiz Fernando, Maria Eduarda Galdino, Izabelle Janes, Fernanda Ribeiro e Cristiany Carboni.

Aos amigos de Graduação e que se eternizaram pra vida: Cláudio Henrique, Wilma Andreza, Débora Cristina, Ninho Sena, Joalen Monte e Alice Gabriela.

A Lucas Fagundes, pessoa maravilhosa que eu tenho muito orgulho de poder chamar de amigo. Obrigado por todo carinho e apoio ao longo desses anos.

À Prof.^a. Dr.^a. Ana Durce da Paixão, que me iniciou na pesquisa científica e pessoa que me inspirou na arte de ensinar. Sou eternamente grato pelos enormes ensinamentos.

As fundações de amparo à pesquisa científica as quais deram todo o suporte para o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal de Pernambuco, que foi minha segunda casa, talvez até a primeira por longos 7 anos. Me orgulho em fazer parte dessa instituição tão bem conceituada e que continua sendo sinônimo de resistência apesar das más forças políticas que tentam sucatear o ensino superior público de qualidade.

“Faça o seu pouco de bem onde você está; são
esses pequenos pedaços de bem juntos que
inundam o mundo.”
(Desmond Tutu)

RESUMO

As imunoglobulinas (Igs) é hoje o produto que direciona a indústria de hemoderivados. Atualmente no Brasil, a procura pelas Igs vem aumentando bastante devido ao aumento de casos de distúrbios autoimunes, sendo o uso dessas Igs fundamental ao seu tratamento. A imunoglobulina G comercial (IgGc), usada largamente em tratamentos, ainda apresenta um pequeno grau de impureza. A principal metodologia de obtenção dessas proteínas plasmáticas é conhecida como "fracionamento do plasma com etanol frio", entretanto devido a sua alta concentração de etanol e baixo pH, essa provoca a desnaturação das proteínas. Nesse sentido, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) vem como uma alternativa de metodologia que permite um ambiente aquoso (85% - 99% de água) que acarreta a obtenção e purificação de biomoléculas em condições não desnaturantes. Extrair e purificar imunoglobulina G comercial (IgGc) por SDFA e estudar a recuperação e o particionamento da biomolécula foi um dos objetivos do estudo, além de verificar a presença de anticorpos contra o vírus da Zika nas preparações de IgGc. As Igs utilizadas na presente pesquisa foram oriundas da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRÁS). Para o SDFA foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 onde foram avaliadas a concentração do polietilenoglicol (PEG) de 4000 g/mol e a concentração do sal (fosfato de potássio) sobre a extração das imunoglobulinas, tendo como variáveis de resposta: o coeficiente de partição (K) e a recuperação (Y) das imunoglobulinas extraídas. Os resultados mostraram que o comportamento de partição das Igs dependeu diretamente da concentração de PEG e da concentração do sal utilizado. O ensaio que promoveu a maior recuperação da biomolécula (Y=96,79%) foi obtido com o sistema PEG 4000 (12,5%) com uma concentração de fosfato de potássio de 10%, tendo as imunoglobulinas uma partição preferencial para a fase sal (K=0,15). O perfil eletroforético das proteínas também demonstrou que após o particionamento a IgGc ficou mais pura. Dessa forma o SDFA se mostrou uma técnica eficiente na extração e purificação de imunoglobulinas, com um baixo custo e um alto rendimento.

Palavras-Chave: Imunoglobulina; SDFA; Extração; Purificação.

ABSTRACT

Immunoglobulins (Igs) are today the product that drives the blood products industry. Currently in Brazil, the use of Igs has been increasing a lot due to the increase in cases of autoimmune disorders, and the use of these Igs is fundamental to their treatment. Commercial immunoglobulin G (IgGc), widely used in treatments, still has a small degree of impurity. The main protein methodology of these proteins is known as "cold ethanol plasma fractionation", due to its high concentration of ethanol and low pH, which can cause a denaturation of the proteins. In this sense, the Aqueous two-phase system (ATPS) comes as an alternative methodology that allows an aqueous environment (85% - 99% water) that entails obtaining and purifying biomolecules under non-denaturing conditions. Extracting and purifying commercial immunoglobulin G (IgGc) by ATPS and studying the recovery and partitioning of the biomolecule was one of the objectives of the study, in addition to verifying the presence of antibodies against the Zika virus in the IgGc preparations. As for the Igs used in the present research, they came from the Brazilian Company of Blood Products and Biotechnology (HEMOBRÁS). For ATPS, a 2² factorial design was used, through which the effects of concentration of 4000 g/mol polyethyleneglycol (PEG) and concentration of salt (potassium phosphate) on the extraction of immunoglobulins were evaluated, using the following response variables: the partition coefficient (K) and recovery (Y) of the extracted immunoglobulins. The results showed that the behavior of Igs partitioning depended directly on the concentration of PEG and the concentration of the salt used. The system that allowed for the greatest recovery of the biomolecule (Y=96.79%) was the one using PEG 4000 (12.5%) with a concentration of potassium phosphate of 10%, with immunoglobulins having a preferential partition for the phase salt (K=0.15). The electrophoretic profile of the proteins also showed that after partitioning the IgGc became purer. Thus, the ATPS proved to be an efficient technique in the extraction and purification of immunoglobulins, with a low cost and a high yield.

Keywords: Immunoglobulin; ATPS; Extraction; Purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Separação do sangue total em camadas após a centrifugação.....	17
Figura 2 – Resumo dos principais hemoderivados que podem ser fracionados a partir do plasma fresco congelado.....	19
Figura 3 – Estrutura esquemática de uma molécula de Imunoglobulina.....	20
Figura 4 – Imagem da Imunoglobulina humana liofilizada.....	25

Figuras do Artigo

Figura 1 – Aspectos macroscópicos da partição da IgG pura no SDFA.....	46
Figura 2 – Diagrama de representação geométrica da interação entre as variáveis concentração de sal e concentração de PEG no parâmetro coeficiente de partição (K) da IgGc por SDFA (PEG/Fosfato).....	49
Figura 3 – Análise da influência das Variáveis PEG/SAL de Fosfato na partição da Imunoglobulina comercial.....	51
Figura 4 – Gráfico de Pareto na Recuperação da IgGc na fase sal.....	52
Figura 5 – Quadrado da Interação 1x2 do Y.....	53
Figura 6 - Scatterplot Y sal	54
Figura 7 - Gel de Eletroforese SDS Page.....	55
Figura 8 - Ensaio de imunoabsorção Enzimática para IgG para Zika.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^2 para extração da imunoglobulina comercial (IgG) com PEG 4000 g/mol e fosfato de potássio.....	44
Tabela 2 - Partição da IgGc por SDFA (PEG/Fosfato) por planejamento fatorial 2^2	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Fc – Fragmento cristalizável do anticorpo

HIV – Vírus da imunodeficiência Humana

IgGc – Imunoglobulina G Comercial

IGIV – Imunoglobulina Intravenosa

Igs – Imunoglobulinas

K – Coeficiente de Partição

kDa – Quilodaltons

MS – Ministério da Saúde

Off Label – Uso para um fim que não consta na bula

PCDTs – Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas

PEG – Polietilenoglicol

PT – Plasmaférese Terapêutica

SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas

SGB – Síndrome de Guillain Barré

Y – Índice de recuperação

ZIKV – Zika Vírus

LISTA DE SIMBOLOS

°C - graus celsius

KH_2PO_4 - fosfato monopotássico

K_2HPO_4 - fosfato dipotássico

NaCl – Cloreto de Sódio

Na_2SO_4 – Sulfato de Sódio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

g - grama

% - percentagem

pH - potencial hidrogeniônico

μL - microlitros

M - molar

nm - nanômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 HEMODERIVADOS	17
2.2 IMUNOGLOBULINAS	20
2.2.1 Subclasses de Imunoglobulinas G	23
2.3 IMUNOGLOBULINA HUMANA	23
2.4 A SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ	26
2.5 ZIKA VÍRUS	27
2.5.1 Infecção pelo Zika vírus e a SBG	28
2.6 METODOLOGIAS ATUAIS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
2.6.1 Método de Cohn	29
2.6.2 Cromatografia de Troca Iônica	30
2.7 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE A – ARTIGO - EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA IMUNOGLOBULINA G COMERCIAL UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS	40

1 INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas, ou também chamados anticorpos, são proteínas produzidas e pertencentes ao sistema imunológico adaptativo. Elas têm como funções conhecidas a opsonização e neutralização de agentes invasores. Além de serem responsáveis por ativar outras células do sistema imune para debelar os patógenos responsáveis pela infecção (SUN et al., 2020).

As preparações de imunoglobulinas (Igs) comerciais são medicamentos derivados do sangue, usadas como terapia de reposição e também utilizadas como agente imunomodulador para o tratamento de diversas enfermidades (PLEGUEZUEL, SÁNCHEZ-RAMÓN, 2016). Apresentam boa tolerância quando administradas por via intravenosa ou subcutânea com raros efeitos adversos (RAMUS, 2019).

Atualmente, a busca por imunoglobulinas vem aumentando exponencialmente em todo o mundo, mas principalmente nos países tropicais do Hemisfério Sul, devido ao aumento dos Casos de Síndromes e sintomas persistentes decorrentes da infecção por arboviroses, como por exemplo a síndrome de Guillain-Barré causada secundariamente pela infecção pelo vírus da Zika e da Chikungunya (DIDIER et al., 2016; MAHTO et al., 2018). Tais síndromes autoimunes engatilhadas pelas infecções por arboviroses têm um alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS) com medicamentos e o tratamento com a IgGc.

Além disso, as imunoglobulinas comerciais são amplamente utilizadas para tratamento de diversas outras patologias como: leucemia linfocítica crônica e HIV em neonatos (PEREZ et al., 2017), terapia da Sepsé (JARCZAK; KLUGE; NIERHAUS, 2020), distúrbios dermatológicos (FORBAT; ALI; AL-NIAIMI, 2018), pneumonia viral aguda (LIU; CAO; LI, 2020), várias doenças autoimunes (PLEGUEZUEL; SÁNCHEZ-RAMÓN, 2016) e COVID-19 (SCHWAIGER et al., 2020).

A metodologia principal para a purificação e obtenção dessas proteínas é o conhecido método de Cohn desenvolvido na década de 1940 (COHN, 1946), e

posteriormente atualizado (BORNOUF, 2007; OFOSU; FREEDMAN; SEMPLE, 2008). O Método consiste no "fracionamento do plasma com etanol frio", entretanto, devido à alta concentração de etanol e ao baixo pH ao qual a amostra é submetida, essa metodologia pode provocar a desnaturação dos anticorpos (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Essa atual metodologia tem sido uma problemática para a indústria de hemoderivados, pois além da necessidade de passar por diversas operações unitárias, a taxa de recuperação da proteína se torna pouco rentável frente aos gastos aplicados.

Em alternativa a esse método, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) apresenta-se como uma metodologia que permite um ambiente aquoso (85% - 99% de água) que permite separar biomoléculas em condições não desnaturantes, com isso oferecendo à indústria uma recuperação dessas imunoglobulinas em melhores condições e em maior quantidade. Assim, com uma metodologia de extração e purificação que possa apresentar à indústria de hemoderivados um maior rendimento, melhor será a viabilidade e rentabilidade para a indústria do segmento (SILVA e FRANCO, 2000; CHOW et al., 2016).

Nesse aspecto o SDFA é uma tecnologia de altas perspectivas pois oferece à indústria de medicamentos imunobiológicos a possibilidade de extrair, clarificar e concentrar proteínas em uma só etapa de fracionamento.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HEMODERIVADOS

Os hemoderivados são medicamentos imunobiológicos que procedem da metodologia de fracionamento industrial do plasma humano. Esses derivados do sangue passam pelos processos de industrialização e normatização para garantir qualidade, estabilidade e especificidade dos mesmos (BRASIL, ANVISA, 2015). O plasma humano contém muitas proteínas que após extração, purificação e formulação em medicamentos, são de grande importância médica. Atualmente mais de 20 proteínas podem ser extraídas do plasma com a finalidade de tratar alguma patologia. As mais comumente utilizadas na fabricação dos medicamentos hemoderivados são: Albumina, Imunoglobulinas, Fator VIII da Coagulação, Fator de von Willebrand, Fator IX da Coagulação e o Complexo Protrobinico (CALIZZANI et al, 2013; Bertolini et al., 2013; Kasper et al., 2015)

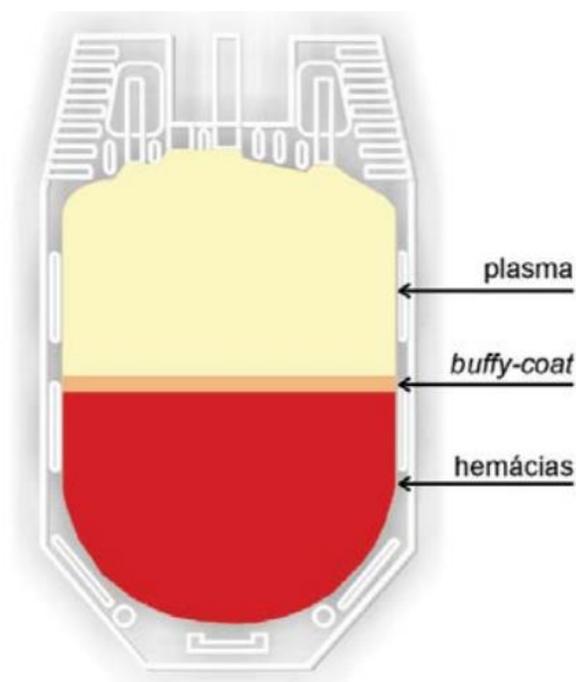


Figura 1. Separação do sangue total em camadas após a centrifugação. Fonte: BRASIL, 2015.

Inicialmente, cada bolsa de sangue total (ST) é submetida ao primeiro processo de centrifugação, logo após é separada, em três produtos: a) o concentrado de hemácias (CH), b) a porção de plasma, que corresponde ao plasma em seu estado natural (bruto), e c) buffy-coat, uma porção de sangue formada por leucócitos e plaquetas (Figura 1). Em seguida, após um novo processo de centrifugação em alta rotação, a porção de plasma é separada em dois produtos: o concentrado de plaquetas e o plasma fresco congelado (PFC) (BRASIL, 2015).

Por sua vez, o PFC (Figura 2) passa pelo processo de extração de um de seus componentes, o crioprecipitado, assim formando dois hemocomponentes: o crioprecipitado, que possui outros hemoderivados (fibrinogênio, fator Von Willebrand, fator VIII e fator XIII), e o plasma livre de crioprecipitado. Do plasma fresco congelado ainda é possível separar mais dois hemoderivados: a albumina e as Imunoglobulinas. Em nível industrial, os medicamentos derivados do plasma são produzidos por meio do fracionamento de grandes “pools” de plasma, que podem ser obtidos por separação de ST ou aférese. “Pools” de plasma humano são preparações estéreis, congeladas e não pirogênicas obtidas de plasma humano de doadores do mesmo grupo sanguíneo ABO. Descongelar as doações de plasma é o primeiro passo no processo de fracionamento do plasma, onde ele é agrupado em um recipiente para formar "pools". A quantidade de doação individual de plasma depende do método de coleta e varia de 250mL de plasma coletado (obtido do ST) a 700-800mL de plasma fonte, obtido por plasmaférese (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013; CONCIL OF EUROPE, 2020).

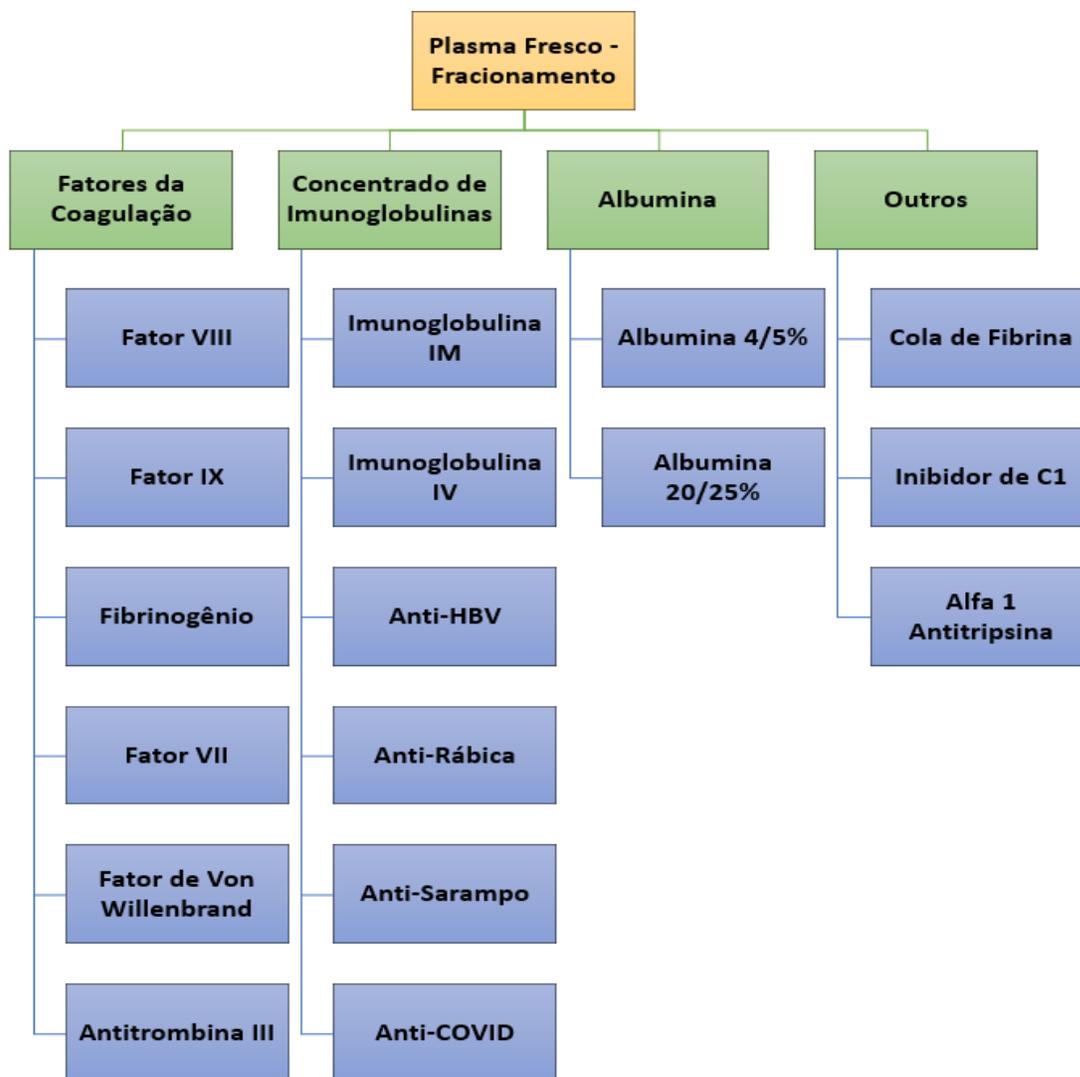


Figura 2. Resumo dos principais hemoderivados que podem ser fracionados a partir do plasma fresco congelado. Adaptado de COVAS, 2014.

No Brasil, foi nos anos 1970 que teve início a produção de hemoderivados com a produção de uma Fábrica de albumina na cidade de Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro. Na década seguinte mais duas indústrias foram instaladas no país, o HEMOPE (Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco) em 1985, no Recife, em Pernambuco, e o Instituto Catarina no Rio de Janeiro, essa última já encerrando suas atividades em 1996. Logo após nos anos 90 chegava para se somar ao rol, a Fundação Hemocentro de Brasília. E em 2 de dezembro de 2004, a Lei 10.972 autorizou o poder executivo a criar a HEMOBRAS (Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia) (SARAIVA, 2005).

Foi planejado que, em posse de cerca de 250.000 litros de plasma por ano no Brasil, a HEMOBRÁS poderia atender 15% da demanda anual do Concentrado de Fator VIII; 40% da demanda anual do concentrado de Fator IX e 48% da demanda de Imunoglobulina Humana. Destaca-se que atualmente a Empresa ainda se encontra sem capacidade de produção, necessitando exportar o plasma e importar os hemoderivados de empresas parceiras do exterior (BRASIL, 2019).

2.2 IMUNOGLOBULINAS

As imunoglobulinas, também chamadas de anticorpos, são glicoproteínas que possuem determinadas características na sua estrutura, as quais lhes conferem funções específicas. Didaticamente, os anticorpos podem participar na defesa do corpo humano de três maneiras: se ligando e neutralizando as toxinas e os agentes invasores, realizando a opsonização dos mesmos para posterior fagocitose pelo macrófago e ativando o sistema complemento para destruição dos agentes invasores (MURPHY, 2014; NEZLIN, 2019).

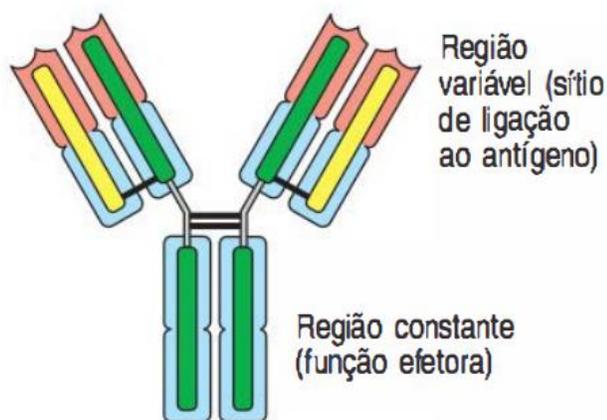


Figura 3. Estrutura esquemática de uma molécula de Imunoglobulina. Fonte: Murphy, 2014.

As células do sistema imunológico que secretam os anticorpos intactos são os plasmócitos. A imunoglobulina tem um formato de “Y” e é composta por duas cadeias leves (23kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (50 - 70kDa). Pontes dissulfeto intercadeia e interações não covalentes são a forma em que as cadeias pesadas e leve e as duas cadeias pesadas são mantidas unidas. São conhecidos 5 tipos de cadeias pesadas que retratam às classes amplamente conhecidas de imunoglobulinas: mu (IgM), delta (IgD), gama (IgG), alfa (IgA) e IgE (épsilon) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MAIBOM-THOMSEN, et al., 2019).

Como anteriormente citado, a estrutura de cada molécula determina suas funções específicas. Sabendo que as cadeias pesadas determinam os tipos de imunoglobulinas, podemos então caracteriza-las e explicar suas respectivas funções no sistema imune.

A IgMs na maioria das vezes se apresenta no organismo como um pentâmero, podendo as vezes aparecer como monômero. É a terceira imunoglobulina mais comumente encontrada no sangue humano, a primeira a ser formada pelo feto e também é a primeira a ser fabricada pelas células B virgens quando são estimuladas por antígenos (LI et al., 2020).

A IgM tem uma participação ótima na degradação de microrganismos por conta de sua estrutura pentamérica e atua ativamente como fixadora do sistema complemento. As IgMs existentes na forma de monômeros, geralmente funcionam como superfícies de células B e como receptores para antígenos (GONG; RUPRECHT, 2020).

Anticorpos do tipo IgAs se apresentam como monômeros no soro humano, mas quando encontrados nas secreções como por exemplo o leite materno, saliva, muco e lágrimas, são achados na forma de dímeros. A IgA das secreções é conjugada a uma proteína produzida nas células epiteliais que é agregada a imunoglobulina à medida que ela passa através das secreções. Essa proteína conjugada à IgA é a responsável pelo auxílio do transporte através da mucosa e a torna mais resistente à degradação nas secreções (BHARATHKAR et al., 2020). É a segunda imunoglobulina mais encontrada no organismo e tem a função de

oferecer imunidade local, principalmente nas mucosas dos recém nascidos (YANG; PALM, 2020).

A IgD tem a sua estrutura apresentada como um monômero e é encontrada em baixa concentração na circulação sanguínea. Suas funções ainda não estão totalmente elucidadas, mas sabe-se que atualmente ela é encontrada em superfícies de células B nas quais funciona como receptor para antígenos. Existem também evidências de participação da IgD nas ligações do sistema complemento (WAN; ZHAO; SUN, 2021).

Os Anticorpos IgEs são também monômeros e são a imunoglobulina que tem menor concentração sérica, já que se liga com bastante avidéz e afinidade à basófilos e mastócitos, mesmo antes de entrar em contato com o antígeno. É a IgE que está relacionada com as reações alérgicas. Sua ligação ao alérgeno resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios que resulta nos sintomas de alergia. Também é possível encontrar altos títulos séricos de IgE quando há infecção por helmintos. Os eosinófilos têm receptores de Fc (Fragmento Cristalizável) para IgE e a ligação de eosinófilos a helmintos vai culminar na morte do parasita (GLUCK, 2015; RIBATTI, 2016).

IgGs são todas encontradas na forma monomérica. É o tipo mais versátil de imunoglobulina, pois é capaz de realizar as funções de todas as outras moléculas de anticorpos. É a mais encontrada na circulação sanguínea e corresponde a cerca de 75% de todas as imunoglobulinas do soro. Fica alocada principalmente nos espaços extravasculares, o que lhe confere a rapidez na resposta imunológica à neutralização e opsonização de patógenos (SERIA et al., 2021). É importante salientar também que é a única classe de imunoglobulina que atravessa a barreira placentária. As IgGs têm também uma importante função na ligação às células do sistema imunológico como macrófagos, monócitos e linfócitos (YAGI;YANAKA; KATO, 2018; LIU; LIU, 2021).

A IgG demonstra ser a mais importante dentre todas as imunoglobulinas, por ser a que está em maior concentração na circulação sanguínea de mamíferos, além de ter a maior participação na resposta imunológica. Também se conhecem na literatura quatro subclasses da IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), cada uma delas podendo desempenhar funções diferentes (PORTO et al.,2022).

A possível explicação para se achar quatro isotipos de IgG é que suas regiões Fab (Fragmento de Ligação ao Antígeno) são bastante flexíveis e têm uma maior tendência a reagir com outras moléculas e entre regiões dela mesma. Por exemplo: usando a técnica de Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS/GISAXS) foi constatado que os fragmentos da porção Fc das IgG1 e IgG2 diferem entre si. Enquanto IgG1 se apresenta ao longo de um único plano, IgG2, em contraste, se move em vários planos perpendiculares (REMESH et al., 2018).

A importância do estudo das subclasses das IgGs está relacionada à premissa de que a estrutura é responsável pela função da proteína. A IgG2 difere dos outros isotipos no que se refere a capacidade de ultrapassar a barreira placentária. A afinidade da IgG2 pela barreira placentária é muito baixa. A IgG4 por sua vez não se fixa para ativação do sistema complemento. Além disso, a IgG2 e IgG4 não se ligam a receptores de Fc o que acarreta diretamente num prejuízo à internalização de um antígeno pelas células fagocitárias (DAVIES; SUTTON, 2015; NEZLIN, 2019).

2.3 IMUNOGLOBULINA HUMANA

A Imunoglobulina humana está no rol de medicamentos do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica, que é conduzido pelo Ministério da Saúde (MS), sob a portaria de Nº 1.554, publicada em de 30 de julho de 2013. Essa legislação atende a política de acesso a medicamentos do SUS, reconhecido por proporcionar a garantia da integralidade do tratamento medicamentoso no nível

ambulatorial. As normativas do cuidado estão listadas em protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas (PCDTs), publicados pelo MS (BRASIL, 2013).

Os PCDTs brasileiros norteiam o uso da imunoglobulina humana intravenosa para 8 patologias clínicas comprovadamente: anemia hemolítica autoimune, aplasia pura adquirida crônica da série vermelha, dermatomiosite e poliomiosite, imunodeficiência primária com predominância de defeitos de anticorpos, imunossupressão no transplante renal, miastenia gravis, púrpura trombocitopenia idiopática e Síndrome de Guillain-Barré (BRASIL, 2015; GOUDOURIS, 2017).

Os primeiros relatos de uso de imunoglobulina humana por via intravenosa ocorreram nos anos de 1950, sendo utilizada como terapia de substituição em pacientes que apresentavam déficits imunológicos. Atualmente as IgGs são largamente usadas para tratar doenças inflamatórias e distúrbios autoimunes além dos descritos nos PCDTs nacionais. A listagem de recomendações de uso da imunoglobulina humana, porém, não impede o uso *off label* da mesma. É provado clinicamente que na Síndrome de Kawasaki, uma vasculite que afeta crianças e adolescentes, a associação da imunoglobulina G com Aspirina produz uma resposta clínica bastante efetiva. Na literatura é possível encontrar usos de forma *off label* da imunoglobulina G humana, para mais de 90 diferentes patologias (SILVERGLEID; BALLOW, 2016; SPACIL; BUENO, 2017).



Figura 4. Imagem da Imunoglobulina humana liofilizada. Fonte: Autor.

A imunoglobulina humana para transfusão (Figura 4) é um produto composto de Igs policlonais normais, oriunda de “pools” de plasma de milhares de bolsas de doadores saudáveis. A preparação atualmente distribuída pelo SUS (Sistema Único de Saúde) consiste principalmente em IgG, com um tempo de meia-vida de 21 a 28 dias. A imunoglobulina contém anticorpos contra antígenos exógenos e autoantígenos, ou seja endógenos. O mecanismo de ação do tratamento imunomodulador das IgG é multifatorial, implicando na imunidade humoral e celular. As quatro subclasses de IgG estão presentes na preparação intravenosa, sendo a IgG1 encontrada em maiores quantidades e a IgG4 em menores (IgG1 = 58,8% / IgG2 = 34,1% / IgG3 = 5,4% / IgG4 = 1,7%). É importante ressaltar que muito embora a imunoglobulina humana tenha um alto grau de pureza para IgG, há cerca de 3% de outras proteínas da formulação (ANVISA, 2016).

2.4 A SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ

A síndrome de Guillain-Barré (SGB), classificada de acordo com a CID G 61.0, é uma patologia autoimune que afeta gravemente o sistema nervoso, principalmente a mielinização dos nervos periféricos. Portanto, a SGB é a principal condição médica responsável pela paralisia flácida generalizada em todo o mundo. Globalmente, a incidência anual é atualmente estimada em 1 por 100.000 habitantes na faixa etária de 20 a 40 anos, com uma taxa de mortalidade de 5% a 7% (nessa faixa etária) devido a arritmias cardíacas, sepse e insuficiência respiratória. O grupo de maior risco são as pessoas com mais de 50 anos que têm início súbito de emagrecimento e fraqueza grave dentro de 7 dias após o início dos sintomas. Estes são claramente fatores de risco para um prognóstico ruim da doença (WILLISON; JACOBS; VAN-DOORN, 2016).

De acordo com as diretrizes baseadas em evidências da Academia Americana de Neurologia, as duas opções de tratamento recomendadas para pacientes gravemente afetados pela SGB são a plasmaférese terapêutica (PT) e a imunoglobulina intravenosa (IGIV). Ambos os tratamentos demonstraram-se eficazes e superiores ao tratamento conservador para recuperação de incapacidades (ZUKIĆ et al., 2017; LIU; DONG; UBOGU, 2018) Embora a PT tenha se mostrado segura e menos dispendiosa quando administrada por médicos, a IGIV é preferida pela maioria devido à sua facilidade de administração e menor probabilidade de complicações. No entanto, estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes com SGB podem ter incapacidade grave e 4-15% podem ir a óbito apesar do monitoramento rigoroso e administração de tratamentos imunoterapêuticos, incluindo PT ou IVIG (AHAMMED et al., 2017; BEYDOUN et al., 2020).

2.5 ZIKA VÍRUS

O vírus Zika (ZIKV), assim chamado em referência à floresta de Uganda, foi isolado pela primeira vez em 1947 em macacos rhesus (*Macaco mulatta*). Foi descoberto graças a um estudo que tinha como alvo a febre amarela (DICK, 1952). É um flavivírus intimamente relacionado com a dengue. Foi inicialmente reconhecido como causador de infecção assintomática ou produtor de doença febril em humanos e, por décadas, não expressou grandes preocupações de saúde pública (MACNAMARA, 1954; PETERSEN et al., 2016).

No mês de dezembro de 2014, são relatados os primeiros casos de surto no Brasil. A confirmação da transmissão comunitária foi obtida em maio de 2015 nos estados do Nordeste e, em seguida, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste (FARIA et al., 2016; FARIA et al., 2017). Vários casos de microcefalia foram inicialmente ligados ao vírus. Médicos que atuam na região Nordeste do Brasil detectaram um aumento significativo na incidência de crianças nascidas com microcefalia após a identificação da entrada do vírus no país (DIDIER et al., 2016).

A descoberta da possível transmissão do vírus por contato sexual ou secreções (saliva, urina) e a ausência de vacinas ou tratamentos específicos têm sido determinantes para um alto nível de preocupação mundial (MEAD; HILLS; BROOKS, 2018). No entanto, a confirmação diagnóstica tem sido difícil devido à falta de marcadores ou testes que tenham real capacidade diagnóstica, levando a constantes casos falso-positivos. Estudos associaram a infecção pelo ZIKV à microcefalia fetal, que foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (WHO) em 2016 como “emergência de saúde pública de interesse internacional”. No entanto, a relação entre infecção intrauterina pelo ZIKV e casos recentes de microcefalia tem sido preocupante para muitas mulheres em qualquer idade gestacional. Além disso, durante o surto na Polinésia Francesa, observou-se que 42 pacientes com sintomas de infecção pelo ZIKV apresentavam síndrome de Guillain-Barré, o que representou um aumento considerável no número de casos. Essas observações já haviam sido

relacionadas ao flavivírus em outro momento, mas não à infecção pelo ZIKV (PIELNAA et al., 2020).

2.5.1 Infecção pelo Zika vírus e a SGB

Os surtos causados pelo ZIKV têm graves impactos sociais e econômicos, principalmente pelo aumento de doenças em consequência à infecção pelo vírus. , principalmente a síndrome congênita e a SGB. Os impactos econômicos e sociais dos surtos e epidemias afetam principalmente áreas pobres e grupos mais frágeis, aprofundando as desigualdades e promovendo um círculo vicioso entre doenças e deterioração do estilo das condições de vida dessas pessoas.

A SGB é uma reação autoimune que afeta gravemente o sistema nervoso, principalmente o periférico. Essa patologia geralmente surge após uma infecção viral na maioria dos casos, e atualmente tem sido largamente associada à pós-infecção por ZIKV ou pelo vírus da Chikungunya. Como se trata de uma reação autoimune, pode-se então concluir que essa patologia faz com que o sistema imune destrua seus próprios nervos provocando uma inflamação gravíssima. A maioria dos pacientes apresenta sintomas de fraqueza muscular que pode levar a uma paralisia dos músculos respiratórios, seguidos de arritmias cardíacas. A taxa de mortalidade geral é de 3 a 7% e os sobreviventes vivem todo o resto da vida com sequelas apresentando déficits motores e sensoriais e necessitando de medicamentos e fisioterapia com fins de reabilitação (SHAHORIZAILA, N; LEHMANN; KUWABARA, 2021).

No ano de 2016, o ministério da saúde brasileiro recebeu a notificação de 215.319 casos de ZIKV, que levaram a um aumento de 970 internações por SGB em relação à média de casos do país, onde não tinha havido registro de casos de ZIKV entre 2008 e 2014. Neste caso, podemos mensurar o custo da SGB associado ao ZIKV no país levando em consideração não somente os gastos com o SUS, mas também do ponto de vista da perspectiva social. Levando em conta a perda da

produtividade por adoecimento, morte precoce e benefícios para pacientes e seus acompanhantes o custo chega em média a U\$ 7.732.504,08 por ano. Entre os diversos itens considerados, merecem destaque o custo anual do tratamento com imunoglobulina humana, cerca de US\$ 3.263.210,50 (PEIXOTO, 2019).

2.6 METODOLOGIAS ATUAIS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A tecnologia de fracionamento atual baseia-se fortemente em dois métodos: a crioprecipitação, que é um método físico, e a precipitação fracionada com etanol frio, um método físico-químico. A crioprecipitação é o método de precipitação físico primordial na produção de concentrados de FVIII, FvW e fibrinogénio. A purificação destes fatores é feita num outro momento através de técnicas de precipitação, adsorção dos restantes fatores de coagulação, separação cromatográfica e inativação viral, obtendo-se assim o produto final. Já os métodos físico-químicos são baseados no fracionamento com etanol, o qual deriva do método desenvolvido por Cohn, utilizado principalmente na obtenção de albumina e imunoglobulinas (BERTOLINI ET AL., 2013; EMA, 2011).

2.6.1 Método de Cohn

O fracionamento de proteínas plasmáticas foi primeiro realizado por E. J. Cohn, a partir da necessidade de suprir a demanda de produtos hemoderivados durante os períodos de guerra. Assim, estabeleceu-se um processo onde as proteínas plasmáticas podem ser isoladas com base em diferentes características de solubilidade de cada uma, sendo manipuladas condições como pH, concentração de proteína, temperatura, força iônica, e concentração de etanol (BERTOLINI ET AL., 2013).

Este trabalho pioneiro foi a base para o desenvolvimento de todos os processos de fracionamento atuais, que hoje em dia incluem novas técnicas como a abordagem cromatográfica para uma maior pureza e recuperação das proteínas terapêuticas derivadas do plasma. Este método envolve várias etapas de processamento sucessivas em concentrações de etanol bem definidas, associadas a mudanças de pH, temperatura, e osmolaridade que resultam na precipitação

seletiva dos diferentes derivados plasmáticos. Entretanto, devido à alta concentração de etanol e baixo pH, essa metodologia pode provocar a desnaturação dos hemoderivados (BERTOLINI ET AL., 2013; BURNOUF, 2007; EMA, 2011).

2.6.2 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia é um processo que propicia a obtenção de um produto de alta pureza assegurando uma extração segura de proteínas lábeis, otimizando a recuperação proteica e remoção dos agentes utilizados na inativação viral, como no caso do solvente/detergente. Outros procedimentos cromatográficos estão disponíveis para serem usados na purificação e produção de produtos medicinais derivados do plasma, sendo que a escolha do método mais eficaz deve ser feita em função da seletividade e do rendimento do processo. Os fatores que determinam essa escolha dependem da capacidade da coluna, da natureza e concentração das proteínas alvo, qualidade das resinas cromatográficas, força iônica, pH dos tampões, temperatura do processo e tempo de contato (BURNOUF, 2007; EMA, 2011).

Atualmente a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de afinidade são os métodos mais utilizados pela indústria para capturar as proteínas de forma a melhor preservar as suas atividades funcionais. A cromatografia de troca iônica utiliza resinas com grande capacidade de ligação proteica, cujo poder de ligação e de eluição de proteínas pode ser controlado de forma precisa, simplesmente ajustando o pH e a condutividade. Já a cromatografia por afinidade é uma tecnologia que utiliza grupos de ligantes específicos numa fase estacionária, que promovem a adsorção de proteínas presentes na fração utilizada, através de ligações moleculares reversíveis. Podem ser usados anticorpos monoclonais assim como enzimas ou hormônios (BURNOUF, 2007; BERTOLINI ET AL., 2013).

2.7 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

A extração aquosa em duas fases, utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma alternativa não cromatográfica potencial e promissora, que pode combinar alta recuperação, seletividade e biocompatibilidade com um modo de operação contínua e de fácil ampliação. Apesar de o comportamento da partição envolvida no método ser complexo e difícil de prever, é capaz de fornecer alto rendimento de recuperação (Y) e é facilmente escalável. Também é um método muito econômico e favorável ao meio ambiente (IQBAL et al., 2016).

Os sistemas de duas fases mais comuns são formados por dois polímeros, geralmente polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou um polímero e um sal como por exemplo fosfato, sulfato ou citrato. SDFA tradicionais de polímero-sal têm sido utilizados para a recuperação e purificação de bioprodutos de alto valor. Atualmente sistemas polímero-polímero são estudados mais extensivamente na tentativa de aumentar a afinidade do sistema com os produtos; por isso há números reduzidos de estudos sobre os sistemas polímero-sal e suas aplicações parecem focadas na purificação de proteínas comerciais (ASENJO; ANDREWS, 2000; GRILO et al., 2016; IQBAL et al., 2016).

A água é o componente principal de ambas as fases do SDFA formando um ambiente suave para a separação das biomoléculas e os polímeros estabilizam sua estrutura e atividades biológicas, enquanto outros métodos de extração líquido-líquido podem danificar os produtos biológicos por causa das condições do processo e solventes orgânicos (IQBAL et al., 2016). Já a separação de fases é influenciada por diferentes fatores como concentração e peso molecular do polímero, concentração e composição do sal. Sistemas de duas fases aquosas surgem espontaneamente da mistura entre diferentes polímeros solúveis em água ou um polímero e um sal específico. Quando dois polímeros específicos são misturados em água dentro de certas concentrações, a mistura separa-se em duas camadas (fases) aquosas imiscíveis (MAZZOLA, et al. 2007).

No SDFA, cada fase proporciona um ambiente distinto para proteínas e outros solutos. Diferenças nas interações entre solutos e solventes podem levar a

uma distribuição desigual que é marcadamente quantificada pelo coeficiente de partição, designado como K , que pode também ser explorado para detectar mudanças na estrutura dos solutos. O coeficiente de partição de uma proteína é definido como a razão da concentração da proteína ou da atividade enzimática entre as duas fases (SALES, 2015).

PEGs de diferentes pesos moleculares são polímeros amplamente utilizados em SDFA devido a sua baixa toxicidade, seu baixo preço e sua natureza pouco volátil. O uso de certos sais no SFDA aumenta a partição de moléculas alvo abaixo de certos limites, mas acima das concentrações críticas, um padrão de solubilidade diminuído para proteínas e produtos pode ser observado. Ocorrem, portanto, mudanças importantes na força iônica das soluções, reduzindo as interações iônicas essenciais entre moléculas alvo e os ligantes de afinidade propostos (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2012; IQBAL et al., 2016).

Essa tecnologia de extração líquido-líquido foi relatada com sucesso nos últimos tempos como uma operação de unidade de estágio primário no *downstream* de vários produtos biológicos, incluindo proteínas terapêuticas, como anticorpos. Sua aplicação a anticorpos monoclonais foi relatada em poucos estudos de pesquisa que datam da década de 1990. Zijlstra e colaboradores (1996) utilizaram um sistema PEG/Dextrana funcionalizado para recuperar IgG de células de hibridoma cultivadas na fase rica em dextrana (ZIJLSTRA et al., 1996). Ao mesmo tempo, o grupo de Asenjo usou um ATPS de polímero/sal para recuperar com sucesso IgG de sobrenadantes de células de hibridoma (ANDREWS et al., 1996). A viabilidade do uso de SDFA para a purificação de anticorpos humanos a partir de uma mistura de proteínas contendo albumina sérica humana e mioglobina foi demonstrada anteriormente por Rosa e colaboradores em 2007.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extração de imunoglobulina G comercial por sistema de duas fases aquosas utilizando um planejamento fatorial para maximizar a recuperação e o particionamento da proteína.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração de imunoglobulina G comercial por sistema bifásico aquoso composto por PEG 4000mg/mol e Fosfato de Potássio com planejamento fatorial de 2^2 ;
- Estudo do comportamento da partição da biomolécula entre as duas fases do sistema;
- Avaliação da recuperação da imunoglobulina em cada fase em diferentes combinações de PEG e Sal;
- Verificação da presença de anticorpos contra o Zika vírus nas preparações comerciais de IgG.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dos achados dessa pesquisa serão apresentados em formato de artigo:

Apêndice A - Extração e avaliação do comportamento da imunoglobulina g comercial utilizando sistemas de duas fases aquosas, a ser submetido ao **Journal of Molecular Liquids**, e que descreve os resultados de comportamento do particionamento da imunoglobulina comercial quando submetida a SDFA em diferentes concentrações de PEG 4000g/mol e Sal de Fosfato.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª Edição. Elsevier, 2015

AHAMMED, O. T. Et al. Plasmapheresis: A retrospective audit of procedures from a tertiary care center in Southern India. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 21, n. 12, p. 857–860, 2017.

ANDREWS, B.A., NIELSEN, S., ASENJO, J.A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. **Bioseparations**, v.6, p.303–313, 1996.

ANVISA, Bula da Tegeline. **Imunoglobulina humana intravenosa**, Brasília – DF, 2016.

ASENJO J.A., ANDREWS B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **J Chromatogr A**. v. 35, p. 1218-8826, 2011.

BERTOLINI, J.; GOSS, N.; CURLING, J. **Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use**, 1th Edition. JohnWiley & Sons, New Jersey - USA, 2013.

BEYDOUN, H. A. Et al. Nationwide study of therapeutic plasma exchange vs intravenous immunoglobulin in Guillain-Barré syndrome. **Muscle and Nerve**, v. 61, n. 5, p. 608–615, 2020.

BHARATHKAR, S. K. et al. The structures of secretory and dimeric immunoglobulin a. **eLife**, v. 9, p. 1–29, 2020.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.

BRASIL. Advocacia Geral da União. Coordenação geral de assuntos de saúde e atos normativos. **Consulta acerca da viabilidade legal para a realização de parceria entre a Hemobrás e a empresa Hemogam SAGL para a doação de plasma humano**. Brasília – DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Documentos e exames necessários para solicitação administrativa de medicamentos do componente especializado da assistência farmacêutica V, jun, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Guia para uso de hemocomponentes**. 2ª edição – Brasília-DF, 2015.

- BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfusion medicine reviews**, v.21, n.2, p.101–117, 2007.
- CALIZZANI, G. et al. Plasma and plasma-derived medicinal product self-sufficiency: The Italian case. **Blood Transfusion**, v. 11, n. 4, 2013.
- COUNCIL OF EUROPE. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare **Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components**, 20th Edition. Strasbourg - France, 2020.
- COVAS., D.T. Hemoderivados no Brasil. Assembleia legislativa de São Paulo, 2014. Disponível em:https://www.al.sp.gov.br/spl/2017/07/Acessorio/1000050996_1000084539_Acessorio.pdf. Acesso em: 01 de Out de 2022.
- DAVIES, A. M.; SUTTON, B. J. Human IgG4: A structural perspective. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 139–159, 2015.
- DICK, G. Zika isolation and serological specificity. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**, 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DIDIER M. et al. City of New Orleans Zika Virus Plan. **Nature**, v. 11, n. 1, p. 10–20, 2016.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Plasma-derived medicinal products. 2011. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/plasma-derived-medicinal-products#current-effective-version-section>
- FARIA, N. R et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v352, n. 6283, p. 345–349, 2016.
- FARIA, N.R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v.546, n.7658, p.406–410, 2017.
- GLUCK, M. E. IgE, what is it good for? **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2015.
- GONG, S.; RUPRECHT, R. M. Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon – Rediscovered. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–9, 2020.
- GOUDOURIS, E.S. et al. II Brazilian Consensus on the use of human immunoglobulin in patients with primary immunodeficiencies. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2017.

GRILO A.L., AIRES-BARROS M. R., AZEVEDO A.M. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. **Sep Purif Rev.** v. 45, p. 68–80, 2016.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 18, 2016.

LI, Y. et al. Structural insights into immunoglobulin M. **Science**, v. 367, n. 6481, p. 1014–1017, 2020.

LIU, S.; DONG, C.; UBOGU, E. E. Immunotherapy of Guillain-Barré syndrome. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 11, p. 2568–2579, 2018.

LIU, S.; LIU, X. IgG N-glycans. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 105, p. 1–47, 2021.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MAIBOM-THOMSEN, S. et al. Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–28, 2019.

MAZZOLA P.G. et al. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **J Chem Technol Biot.** v. 83, p.143–157, 2007.

MEAD, P. S.; HILLS, S. L.; BROOKS, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 39–44, 2018.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway** – 8ª edição – Ed. Artmed. Porto Alegre 2014.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1025, p. 16–24, 2016.

NEZLIN, R. Dynamic Aspects of the Immunoglobulin Structure. **Immunological Investigations**, v. 48, n. 8, p. 771–780, 2019.

PEIXOTO, H. M. et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Brazil: A cost-of-illness study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 5, p. 252–258, 2019.

PEIXOTO, H.M. et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection in Brazil: a cost-of-illness study. **Journal of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n.5, p.252-258, 2019.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus Review Article. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, n. February, p. 34–42, 2020.

PORTO, A.L.F. et al. – Métodos de separação e purificação de imunoglobulina g: uma breve revisão. **Biotecnologia na Saúde** – Volume 2. RFB Editora, Belém-PA, 2022.

REMESH S.G. et al. Conformational Plasticity of the Immunoglobulin Fc Domain in Solution. **Structure**, v.26, n.7, p. 1007-1014, 2018.

RIBATTI, D. The discovery of immunoglobulin E. **Immunology Letters**, v. 171, p. 1–4, 2016.

ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. **Journal of Chromatography**, v. 1141, p. 50–60, 2007.

SALES, A. E. Protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 : produção, purificação, caracterização bioquímica e estrutural. 157 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2015.

SARAIVA, J.C.P. Brazilian Hemotherapy History. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 2, n.3, p. 153-158, 2005.

SERIA, E. et al. Immunoglobulin G in Platelet-Derived Wound Healing Factors. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

SHAHORIZAILA, N.; LEHMANN, H. C.; KUWABARA, S. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 397, n. 10280, p. 1214–1228, 2021.

SPACIL, C. R.; BUENO, D. Análise de prescrições de imunoglobulina humana endovenosa para situações clínicas não referendadas nos protocolos clínicos nacionais. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 3, p. 293–298, 2017.

WAN, Z.; ZHAO, Y.; SUN, Y. Immunoglobulin D and its encoding genes: An updated review. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 124, n. June, p. 104198, 2021.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717–727, 2016.

YAGI, H.; YANAKA, S.; KATO, K. Structure and dynamics of immunoglobulin G glycoproteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1104, p. 219–235, 2018.

YANG, Y.; PALM, N. W. Immunoglobulin A and the microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 56, p. 89–96, 2020.

ZAFARANI-MOATTAR M.T., HAMZEHZADEH S., NASIRI S. A new aqueous biphasic system containing polypropylene glycol and a water-miscible ionic liquid. **Biotechnol Progr.** v. 28, p.146–156, 2012.

ZIJLSTRA, G.M. et al. Separation of hybridoma cells from their IgG product using aqueous two- phase systems. **Bioseparations**, v.6, n.10, p. 201, 1996-

ZUKIĆ, S. et al. Plasmapheresis in neurological disorders: Six years experience from University Clinical center Tuzla. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 1–7, 2017.

EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA IMUNOGLOBULINA G COMERCIAL UTILIZANDO SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Josias Pereira Cavalcante Junior¹, Milena Tereza Torres do Couto¹, Renata Vitória Da Silva Sobral², Thiers Araújo Campos², Thiago Pajeú Nascimento³, Márcia Nieves Carneiro da Cunha¹, Antônio Edson de Souza Lucena⁴, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Ana Cristina Lima Leite², Attilio Converti^{5*}

¹Laboratory of Bioactive Products and Technology, Department of Morphology and Animal Physiology Animal, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Laboratory in Biotechnology and Hemoderivatives, Department of Pharmaceutics Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Campus Professora Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, BR 135, km 3 - 64900-000, Bom Jesus, Piauí, Brazil.

⁴Brazilian Company of Blood Products and Biotechnology (HEMOBRAS), Unnamed Road, 55900-000, Goiana, Pernambuco, Brazil.

⁵ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, University of Genoa, Via Opera Pia 15, I-16145 Genoa, Italy.

(*) Corresponding author, E-mail address: converti@unige.it

Resumo

As imunoglobulinas (Igs) são os hemoderivados de maior consumo no mundo, sendo hoje o produto que direciona a indústria de hemoderivados. Atualmente no Brasil, a procura pelas Igs vem aumentando bastante devido ao aumento de casos de distúrbios autoimunes, principalmente os associados às infecções pelas arbovirose, sendo o uso dessas Igs fundamental ao seu tratamento. Muito embora a imunoglobulina G comercial seja usada largamente em tratamentos, ainda apresenta um grau de impureza que corresponde em média a 2,4% da solução comercial importada. A principal metodologia de obtenção dessas proteínas plasmáticas é o método conhecido como "fracionamento do plasma com etanol frio"; entretanto, devido à alta concentração de etanol e ao baixo pH, essa metodologia pode provocar a desnaturação dos hemoderivados. Nesse sentido, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) vem como uma alternativa de metodologia que permite um ambiente aquoso (85% - 99% de água) que acarreta a obtenção e purificação de biomoléculas em condições não desnaturantes. Extrair e purificar imunoglobulina G comercial (IgGc) por sistema de duas fases aquosas e estudar a recuperação e o particionamento da biomolécula foi um dos objetivos do estudo, além de verificar a presença de anticorpos contra o vírus da Zika nas preparações de IgGc. As Igs utilizadas na presente pesquisa foram oriundas da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRÁS). Para o SDFA foi utilizado um planejamento fatorial 2² que permitiu avaliar os efeitos da concentração do polietilenoglicol (PEG) de 4000g/mol e a concentração do sal (fosfato de potássio) sobre a extração das imunoglobulinas, tendo como variáveis respostas o coeficiente de partição (K) e a recuperação (Y) das imunoglobulinas extraídas. Os resultados mostraram que o comportamento de partição das Igs dependeu diretamente da concentração de PEG e da concentração do sal utilizado. O ensaio que promoveu a maior recuperação da biomolécula (Y=96,79%) foi aquele realizado com o sistema PEG 4000 (12,5%) com uma concentração de fosfato de potássio de 10%, no qual as imunoglobulinas tiveram partição preferencial para a fase sal (K=0,15). O perfil eletroforetico das proteínas também demonstrou que a partição realizada nessas condições conseguiu remover ainda mais as impurezas da solução comercial de Igs. Adicionalmente, o estudo conseguiu detectar a presença de anticorpos contra o Zika Vírus nas soluções de IgG. Dessa forma o SDFA se mostrou uma técnica eficiente na extração e purificação de imunoglobulinas, com um baixo custo e um alto rendimento.

Palavras-Chave: Imunoglobulina; SDFA; Extração; Purificação.

1. Introdução

As imunoglobulinas, chamadas também de anticorpos, são proteínas produzidas e pertencentes ao sistema imunológico adaptativo. Elas têm como funções conhecidas a opsonização e neutralização de agentes invasores no organismo humano, além de serem responsáveis por ativar outras células do sistema imune para debelar os patógenos responsáveis pela infecção (SUN et al., 2020). As preparações de imunoglobulinas (Igs) comerciais são medicamentos derivados do sangue, usados como terapia de reposição e também utilizados como agente imunomodulador para o tratamento de diversas enfermidades (PLEGUEZUEL, SÁNCHEZ-RAMÓN, 2017). Apresentam boa tolerância quando administradas por via intravenosa ou subcutânea com raros efeitos adversos (RAMUS, 2019).

Atualmente, a busca por imunoglobulinas vem aumentando exponencialmente em todo o mundo, mas principalmente nos países tropicais do Hemisfério Sul, devido ao aumento dos Casos de Síndromes e sintomas persistentes decorrentes da infecção por arboviroses, como por exemplo a síndrome de Guillain-Barré causada secundariamente pela infecção pelo vírus da Zika e da Chikungunya (MAHTO et al., 2018; SHAHRIZAILA, N; LEHMANN; KUWABARA, 2021). Além disso, as imunoglobulinas comerciais são amplamente utilizadas para tratamento de diversas outras patologias como: leucemia linfocítica crônica e HIV em neonatos (PEREZ et al., 2017; MARTINS; MEDRONHO; CUNHA, 2021), terapia da Sepsis (JARCZAK; KLUGE; NIERHAUS, 2020), distúrbios dermatológicos (FORBAT; ALI; AL-NIAIMI, 2018), pneumonia viral aguda (LIU; CAO; LI, 2020), várias doenças autoimunes (PLEGUEZUEL; SÁNCHEZ-RAMÓN, 2017) e COVID-19 (SCHWAIGER et al., 2020).

A metodologia principal para a purificação e obtenção dessas proteínas é o conhecido método de Cohn desenvolvido na década de 1940 (COHN; STRONG, 1946) e posteriormente atualizado (BORNOUF, 2007; OFOSU; FREEDMAN; SEMPLE, 2008). O Método consiste no "fracionamento do plasma com etanol frio"; entretanto, devido à alta concentração de etanol e ao baixo pH ao qual a amostra é submetida, essa metodologia pode provocar a desnaturação dos anticorpos (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Essa metodologia tem sido problemática para a indústria de hemoderivados, pois além da

necessidade de passar por diversas operações unitárias, a taxa de recuperação da proteína se torna pouco rentável frente aos gastos aplicados. Em alternativa a esse método, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) se apresenta como uma metodologia alternativa que permite um ambiente aquoso (85% - 99% de água) que acarreta a obtenção de biomoléculas em condições não desnaturantes, com isso oferecendo à indústria uma recuperação dessas imunoglobulinas em melhores condições e em maior quantidade (SILVA; FRANCO, 2000; CHOW et al., 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas para a recuperação/purificação da imunoglobulina comercial por SDFA de Polietilenoglicol (PEG)/fosfato usando um planejamento fatorial bem como avaliar sua imunoabsorção enzimática para anticorpos contra o Zika vírus.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reconstituição da Imunoglobulina humana

Para realização dos ensaios foi utilizada a imunoglobulina comercial (Tegeline, Lote: 16L13549) fabricada por LFB Biomedicaments (Lille, França) que se apresenta na Forma Farmacêutica de um pó liofilizado. Após reconstituição em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com o diluente recomendado pelo fabricante (água para injetáveis), foi realizada uma leve homogeneização para evitar a formação de bolhas na solução até a completa dissolução do pó. Conforme sugerido pelo fabricante, foi de extrema importância a verificação visual após a reconstituição para avaliar se não houve existência de partículas em suspensão. Após confirmação da correta homogeneização, a solução foi utilizada para as posteriores análises.

2.2 Preparação do sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O SDFA foi preparado em um tubo graduado de vidro adicionando, na temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2$, soluções da mistura de sais de fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) em concentrações diferentes, 50% de soluções de Polietilenoglicol (PEG) 4000g/mol e água deionizada para complementar o sistema. As concentrações de sal e PEG foram selecionadas de acordo com o planejamento fatorial 2^2 mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^2 para extração da imunoglobulina comercial (IgG) com PEG 4000 g/mol e fosfato de potássio.

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Concentração de PEG (%)	12,5	15,0	17,5
Concentração de Sal (%)	10,0	12,5	15,0

Após a montagem do SDFA, foi adicionado 1g da amostra, ou seja, da Imunoglobulina Comercial ao sistema e, após 5 minutos de agitação em vórtex, os tubos foram deixados em superfície plana para particionar durante 1 hora na temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Depois de uma hora de particionamento, a fase PEG foi separada da fase sal de forma manual com auxílio de pipeta automática.

2.3 Definição das equações do SDFA

Após a preparação do sistema, foi investigado o efeito das duas variáveis independentes, nomeadamente a concentração de fosfato de potássio e a concentração de PEG, sobre o coeficiente de partição (K) e a recuperação (Y), selecionadas como variáveis resposta, com quatro repetições nos pontos centrais.

O coeficiente de partição (K) foi definido como a razão da concentração da Imunoglobulina (IgG, mg/mL) na fase superior sobre aquela na fase inferior:

$$K = \frac{IgGs}{IgGi}$$

onde os índices “s” e “i” representam as fases superior (fase rica em PEG) e inferior (fase rica em fosfato), respectivamente.

O rendimento (Y), expresso como porcentagem, foi definido de acordo com a seguinte equação:

$$Y = \frac{IgGs.Vs/IgGi.Vi}{IgGb.Vb}$$

onde Vs e Vi são os volumes da fase superior e inferior, respectivamente, V_b o volume do extrato bruto e IgG_b a concentração da imunoglobulina na extrato bruto.

2.4 Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada usando um gel de corrida de poliacrilamida em concentração de 12% de acordo com o método de Laemmli (1970). As bandas de proteína foram detectadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250.

2.5 Determinação do conteúdo total de proteínas

O conteúdo total de proteínas das amostras foi determinado de acordo com método desenvolvido por Bradford (1976), usando o Coomassie Brilliant Blue G-250 como corante. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados, após correção contra amostras em branco, foram expressos como valores médios.

2.6 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática para IgG

A validação da imunoglobulina comercial contendo altos títulos de IgG para Dengue foi realizado através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), teste usado para medir e verificar a ausência de anticorpos específicos.

O teste EILSA IgG foi realizado conforme instruções do “kit” Panbio® ZIKA IgG INDIRECT ELISA (Panbio® ZIKA IgG Indirect ELISA, Austrália). Resumidamente, 20 µL de amostras da imunoglobulina comercial, controles positivo e negativo e calibrador, diluídos a 1:9 em diluente de amostra, foram adicionados em microplaca contendo 96 micropoços revestidos com anti-imunoglobulinas para ZIKA. A microplaca foi incubada durante 30 min a 37 °C. Após sucessivas lavagens com solução salina tamponada com fosfato contendo

Tween 20 e conservante (Proclin 0,1%), foram adicionados 100 μ L de anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase e incubou-se durante mais 30 min a 37 °C. Após lavagens com a solução salina de fosfato contendo Tween 20, foram adicionados 100 μ L de tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB) como substrato e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 100 μ L de ácido fosfórico 1 M (Solução de parada). A absorbância de cada poço foi medida utilizando um leitor de microplacas (Accuris SmartReader UV-Vis - modelo MR9600) a um comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram considerados reagentes, não reagentes ou inconclusivos segundo cálculo do “cut off” fornecido pelo “kit” e pelos valores de absorbância de cada amostra. O ensaio foi realizado tanto com a IgG comercial, quanto após o seu particionamento pelo SDFA, sendo analisadas tanto a fase Peg quanto a fase sal.

3. Resultados e Discussão

3.1 Planejamento fatorial 2²

Foram preparados sistemas contendo PEG 4000 e solução de fosfato de potássio em pH 7,0. Os ensaios evidenciaram a formação no SDFA de uma fase superior maior e uma fase inferior identificadas com base em seu aspecto macroscópico (Figura 1).

Figura 1. Aspectos macroscópicos das fases decorrentes da partição da IgG comercial no SDFA



O objetivo deste trabalho, além de determinar as condições ideais para a recuperação/purificação da imunoglobulina comercial por SDFA e avaliar sua Imunoabsorção enzimática, foi de também identificar o SDFA capaz de garantir o maior grau de purificação uma vez que a imunoglobulina comercial tem um percentual de impureza em média de 2,4% (ANVISA, 2016).

Foram avaliadas diferentes técnicas para recuperação de Imunoglobulinas (FISHMAN; BERG, 2019; ALMEIDA et al., 2022), mas nenhuma delas apresentou maiores quantidades e menor custo que o SDFA (ASENJO; ANDREWS, 2011; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Por isso, o SDFA PEG-fosfato foi escolhido como método alternativo de recuperação e purificação da IgG comercial. Para otimizar as condições de partição foi usado um planejamento fatorial completo 2^2 usando a concentração de PEG (C_{PEG}) e a concentração de sal (C_{SAL}) como variáveis independentes e o coeficiente de partição da IgG (K) e o rendimento ($Y\%$) como variáveis de resposta. A Tabela 2 mostra os resultados dos 6 ensaios relativos ao planejamento fatorial 2^2 .

Tabela 2. Resultados da partição da IgGc por SDFA (PEG/Fosfato) obtidos em ensaios realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	C_{PEG}^1	C_{SAL}^2	K^3	Y_{PEG}^4	Y_{SAL}^5	BM^6
1	12,5	10	0,15	3,20	96,79	103,65
2	17,5	10	0,33	71,88	19,38	74,67
3	12,5	15	0,84	62,44	37,56	91,05
4	17,5	15	1,19	47,96	52,03	104,90
5(C)	15	12,5	0,58	43,63	56,36	75,99
6 (C)	15	12,5	0,58	43,88	56,11	77,99

¹ Concentração de PEG (%)

² Concentração de fosfato de potássio (%)

³ Coeficiente de partição

⁴ Rendimento na fase superior rica em PEG (%)

⁵ Rendimento na fase inferior rica em SAL. (%)

⁶ Balanço de massa

(C) - Pontos centrais

Negrito – melhor ensaio

Em todos os ensaios foi observada a separação das fases (Figura 1), sendo quantificado o volume de cada fase posteriormente ao período de repouso. Em geral, a IgG comercial particionou preferencialmente para a fase rica em sal como confirmado por valores de K inferiores a 1 ($K < 1$), com exceção do ensaio 4 onde a proteína migrou para a fase PEG ($K= 1,19$). Em particular, o ensaio 1, realizado usando PEG 4000 em concentração de 12,5% e fosfato de sódio em concentração de 10%, foi aquele que garantiu a maior recuperação da IgG ($Y=96,79\%$) com partição preferencial da biomolécula para a fase sal ($K=0,15$).

Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Chow e colaboradores em 2016, no qual foi observado que a IgG particionou para a fase rica em Sal do SDFA, quando foi utilizado PEG com peso molar acima de 1450g/mol. É possível que o PEG de alto peso molecular tenha criado na fase superior (PEG) uma mais extensa rede hidrofóbica intramolecular, quando comparado a soluções com PEG de peso molecular inferior. O que pode ter levado a uma redução do espaço livre disponível para acomodar as grandes moléculas como a IgG (150 kDa), devido ao efeito chamado de volume excluído.

3.1 Efeito das variáveis independentes na extração da Imunoglobulina (IgGc) por SDFA.

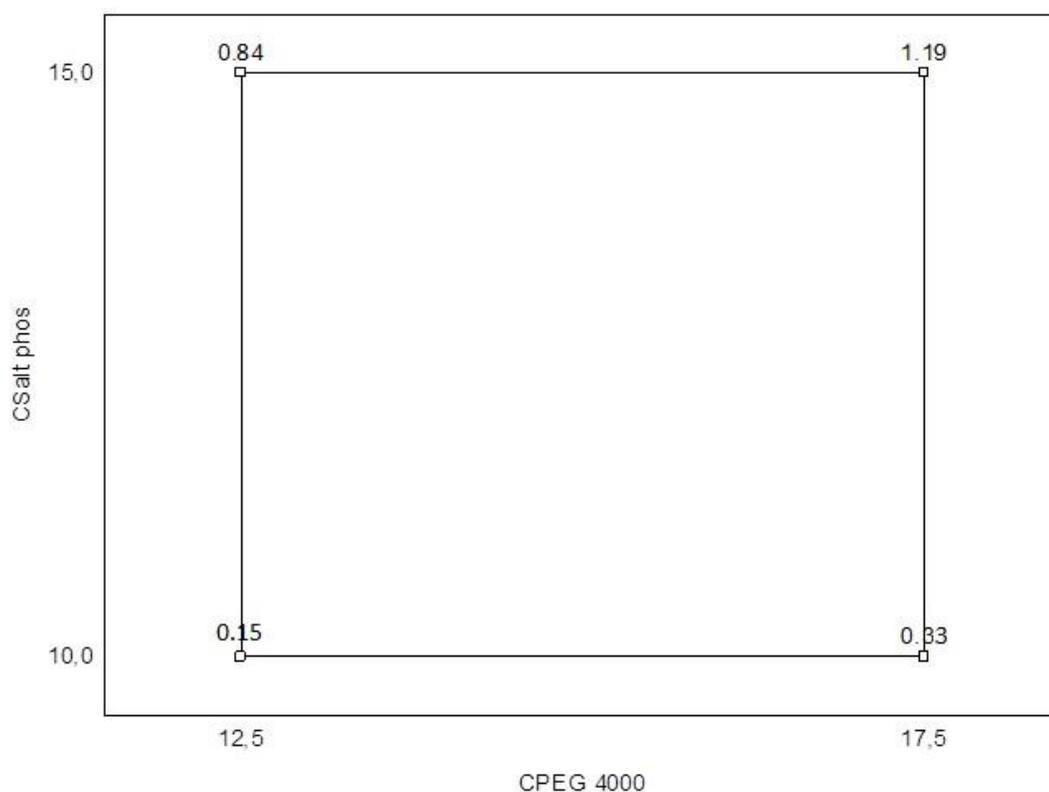
3.1.1 Coeficiente de Partição (K)

Segundo Malpiedi e colaboradores (2015), a partição de uma determinada proteína para uma fase específica é resultante dos efeitos impostos pelos componentes dessa fase, ou seja, do volume livre que há no mesmo para a migração das moléculas. Como já foi mencionado, quase todos os ensaios promoveram a partição da IgGc para a fase sal. O único ensaio em que houve um particionamento para a fase levemente rica em PEG ($K=1,19$) foi o ensaio 4 (Tabela 2) realizado com as maiores concentrações tanto de PEG (17,5 %) como de sal (15%) no mesmo ensaio. Este comportamento da IgGc particionando preferencialmente para a fase PEG em alta concentração de sal é chamado de *salting out*, o que significa uma diminuição na solubilidade das moléculas que as empurra para a fase PEG (XU, 2019; BATISTA et al., 2021). Num estudo realizado por Nascimento et al. (2016) sobre a extração de protease fibrinolítica utilizando SDFA (PEG/SAL) de acordo com um planejamento

fatorial 2^3 foi possível observar, em todos os ensaios realizados com PEG 4000g/moL em concentrações de sal elevadas, o mesmo tipo de comportamento, ou seja, a proteína migrou para a fase PEG pelo efeito de *salting out*.

Fenômeno oposto ocorreu no ensaio 1 realizado nas menores concentrações tanto de PEG quanto de sal, que levaram a um menor coeficiente de partição. Pode-se observar na Figura 2 que houve interação sinérgica significativa entre as duas concentrações de PEG e sal estudadas, indicando que a diminuição simultânea de ambas as variáveis resultou no particionamento preferencialmente para a fase SAL.

Figura 2. Diagrama de representação geométrica do efeito da interação entre as variáveis independentes (concentração de sal e concentração de PEG) sobre o coeficiente de partição (K) da IgGc por SDFa (PEG/Fosfato).



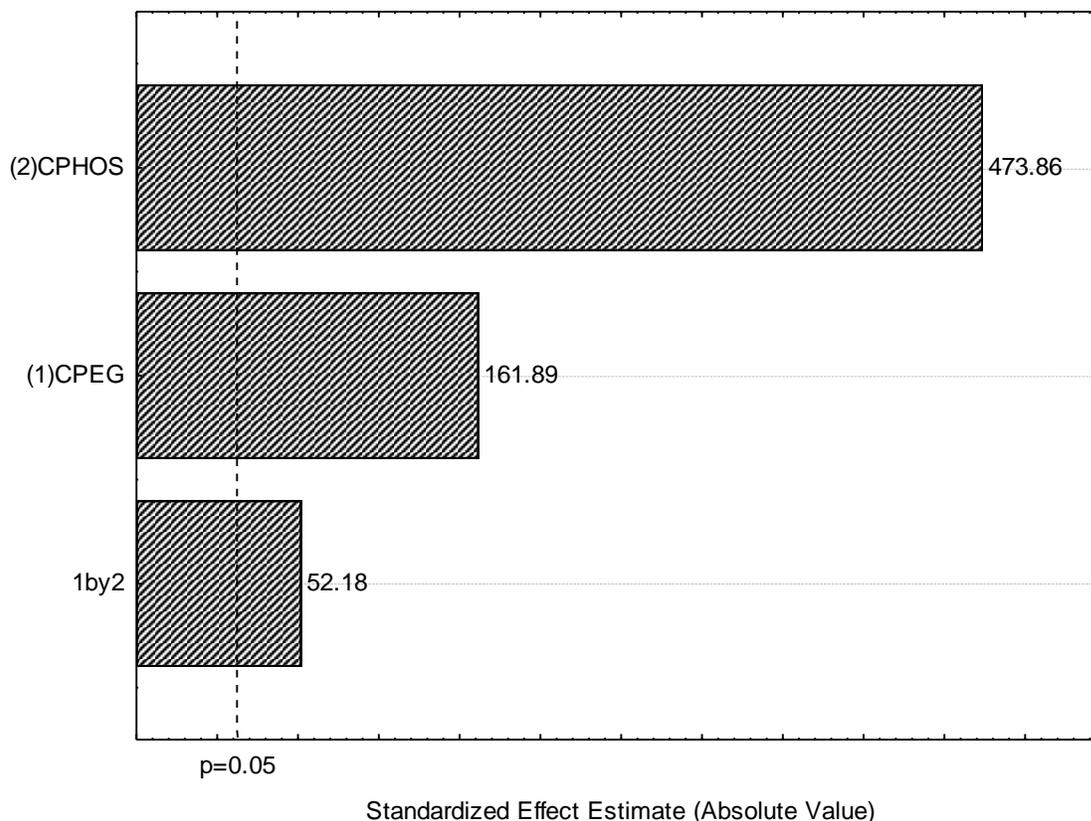
$C_{PEG\ 4000}$: Concentração de PEG 4000 g/moL

$C_{salt\ PHOS}$: Concentração de Sal fosfato.

O gráfico de Pareto ilustrado na Figura 3 mostra os efeitos das duas variáveis independentes e de suas interações sobre o coeficiente de partição. É possível observar que a C_{sal} foi a variável que mais influenciou a partição da IgG para a fase rica em sal. Seu sinal positivo sugere que altas concentrações de fosfato favoreceram o efeito de salga predominantemente. A concentração de PEG também teve um efeito positivo (161.89), enquanto a interação entre as suas variáveis ($C_{peg} \times C_{sal}$) teve um efeito positivo menos significativo (52.18).

Em SDFA a presença sais influencia a partição de moléculas agindo sobre a carga das proteínas. Os sais fosfato de potássio induzem elevados coeficientes de partição de biomoléculas em relação a outros sais, tais como, NaCl e Na_2SO_4 , atuando principalmente sobre a carga de proteína (ALBERTSSON, 1971). Johansson (1970) e Lu et al. (2010) sugeriram que altas concentrações desse sal podem levar a problemas no equilíbrio do SDFA devido ao seu maior efeito de *salting-out* em comparação com outros sais que podem ser utilizados no sistema, como por exemplo sais de citrato. No entanto, em nosso estudo, mesmo utilizando concentração de 15% todos os sistemas formaram fases.

Figura 3. Gráfico de Pareto da influência das concentrações de PEG e sal de fosfato sobre o coeficiente de partição da Imunoglobulina comercial.



C_{PEG}: Concentração PEG

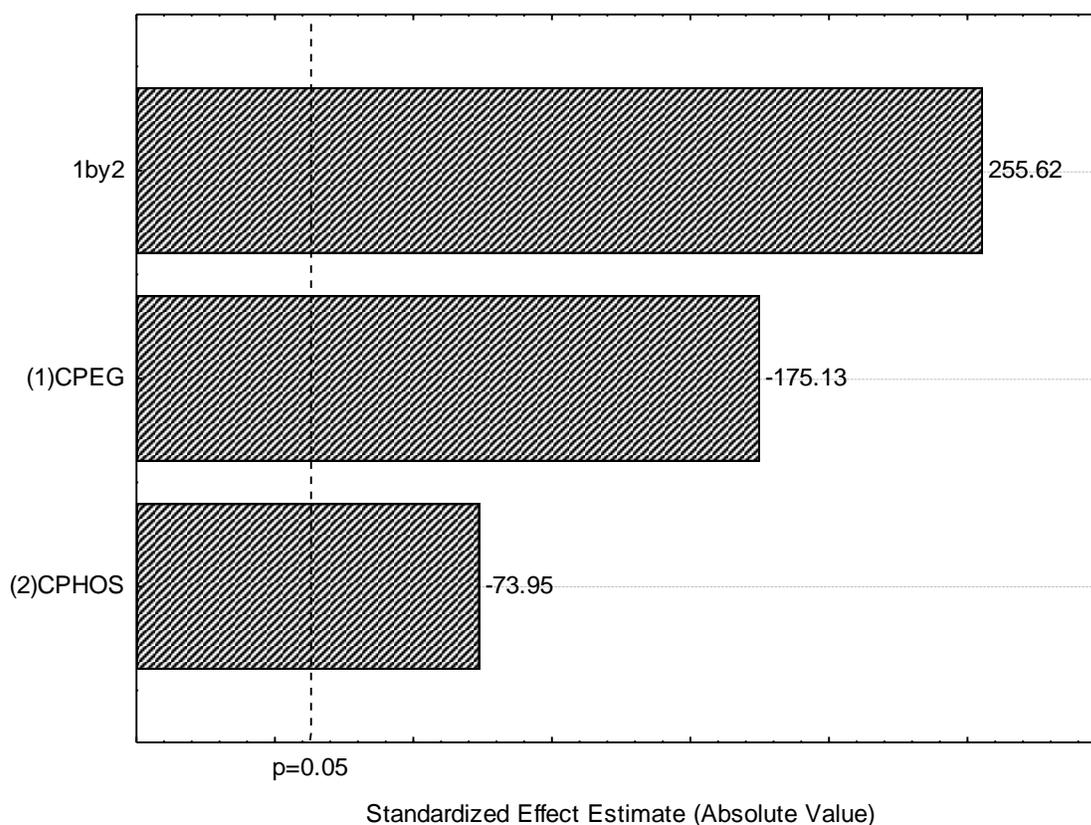
C_{PHOS}: Concentração do Sal

3.2 Efeito das variáveis independentes no rendimento (Y) da partição da Imunoglobulina (IgG) por SDFA.

O correspondente gráfico de Pareto aplicado à recuperação de IgG na fase sal (Figura 4) mostra que tanto a concentração de PEG (-175,13) como a do sal de fosfato (-73,95) isoladamente tiveram uma influência negativa sobre esta resposta. Entretanto a combinação delas teve um efeito positivo (255,62), ou seja, quanto menores a concentração de PEG e a concentração de sal, maior é a recuperação da IgG. Isso ficou bem claro para o ensaio 1 em que as menores concentrações de ambos os componentes permitiram uma recuperação da

proteína extremamente elevada (96,79%). De acordo com o estudo de Barros et al. (2014), a purificação de produtos biotecnológicos pode ser considerada viável quando o rendimento final é acima de 80%, assim sendo considerado esse Y ideal para experimentos. A rentabilidade de uma fábrica de hemoderivados depende muito do número de produtos que são extraídos do plasma, sendo óbvio que quanto maior o rendimento de uma metodologia de extração e de purificação, maior será a viabilidade econômico-financeira da empresa.

Figura 4. Gráfico de Pareto da influência das concentrações de PEG e sal de fosfato sobre a recuperação da IgGc na fase sal.



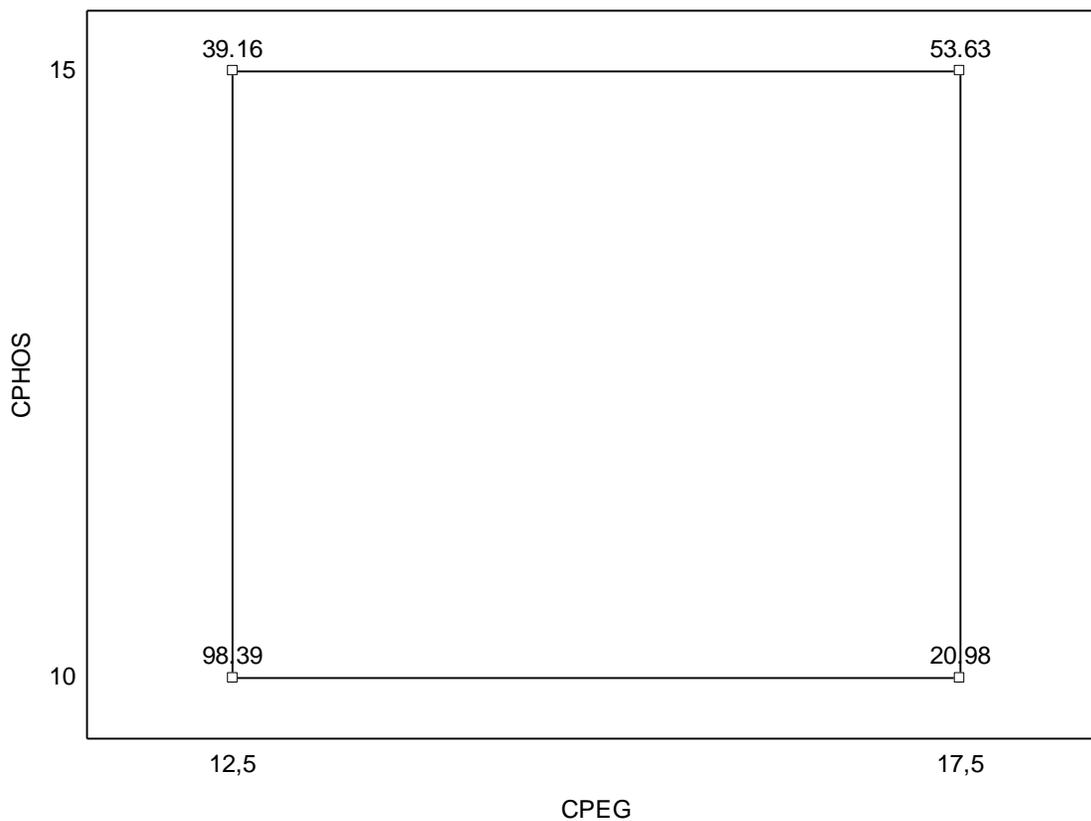
C_{PEG} : Concentração PEG

C_{PHOS} : Concentração do Sal

Olhando para a Figura 5 representando o efeito da interação entre as concentrações do PEG e do sal de Fosfato sobre a recuperação na fase sal, podemos tirar como conclusão

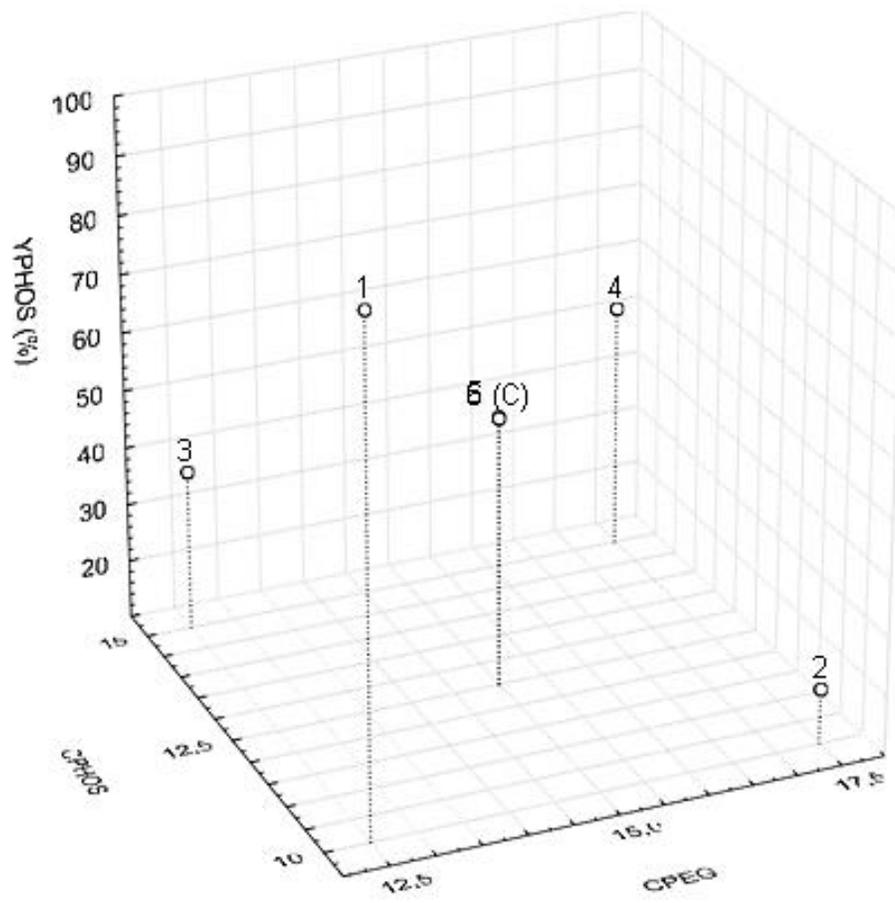
de que a combinação mais favorável para esta resposta ($Y=96,79\%$) foi a de C_{PHOS} 10% e C_{PEG} 12,5%.

Figura 5. Diagrama de representação geométrica do efeito da interação entre as variáveis independentes (concentração de sal e concentração de PEG) sobre o recuperação (Y) da IgGc na fase sal por SDFA (PEG/Fosfato)



O gráfico 3D ilustrado na Figura 6 mostra de forma ainda mais clara o particionamento para a fase sal. Dentre dos 6 ensaios, os ensaios 1 e 2 foram aqueles que levaram ao maior e ao menor valor de recuperação, respectivamente.

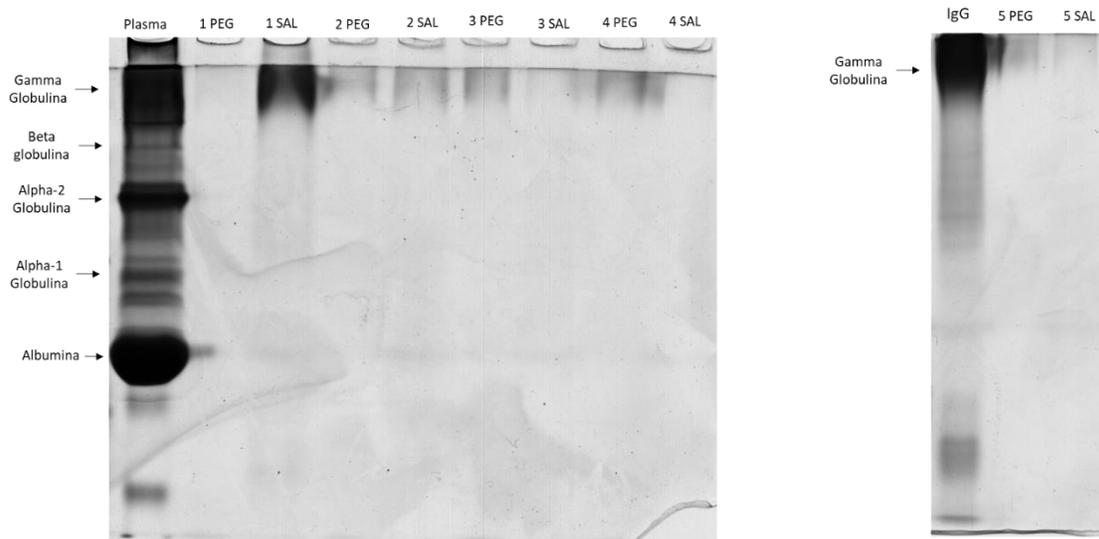
Figura 6. Scatterplot Y sal. Gráfico de Dispersão de representação gráfica entre variáveis numéricas.



3.3 SDS PAGE

A Figura 7 mostra o perfil eletroforético das amostras de cada fase dos sistemas de duas fases preparados com PEG 4000 e a solução de fosfato de potássio em pH 7,0.

Figura 7. Gel de Eletroforese SDS Page



O plasma humano, cujo perfil de separação eletroforética consta na primeira coluna da Figura 7, é uma mistura complexa de hemoderivados e proteínas representado em sua maioria por Albumina, Imunoglobulinas, Fator VIII da Coagulação (FVIII), Fator de von Willebrand (FvW), Fator IX da Coagulação (FIX) e Complexo Protrobinico (GRAZZINI et al, 2013; JAMESON et al., 2015).

A metodologia para separação da IgG objetiva à obtenção de formulações com alto grau de pureza, no mínimo de 90% e não ultrapassando 110%, com abundância proteica média de 70g/L (30 a 180g/L) e moléculas íntegras (formação de polímeros e agregados abaixo de 4%), que possam garantir terapias mais eficazes (GOUVEIA, 2013; FERREIRA et al., 2016). Para a preparação da IgG, é necessário um grande número de doadores para que o produto final contenha adequada quantidade de anticorpos desejados. A preparação deve

conter no mínimo 90% de IgG (JOLLES; SEWELL; MISBAH, 2005) e não mais que 10% de polímeros e agregados (WHO, 1994).

A Tegeline, utilizada para a análise no nosso estudo apresenta 97,6% de grau de pureza (ANVISA, 2016). Pode-se ver no perfil eletroforético da imunoglobulina comercial que, além da IgG presente em maior quantidade, há bandas de alfa-globulina, beta-globulina e albumina representando 2,4% de impureza. Entretanto, após particionamento pelo SDFA PEG-Fosfato (3ª coluna, 1 Sal), o grau de pureza aumentou em relação à IgGc não submetida ao SDFA. Certamente, quanto mais pura a preparação da imunoglobulina, melhor para a indústria de medicamentos imunobiológicos a fim de tratar especificamente determinadas patologias.

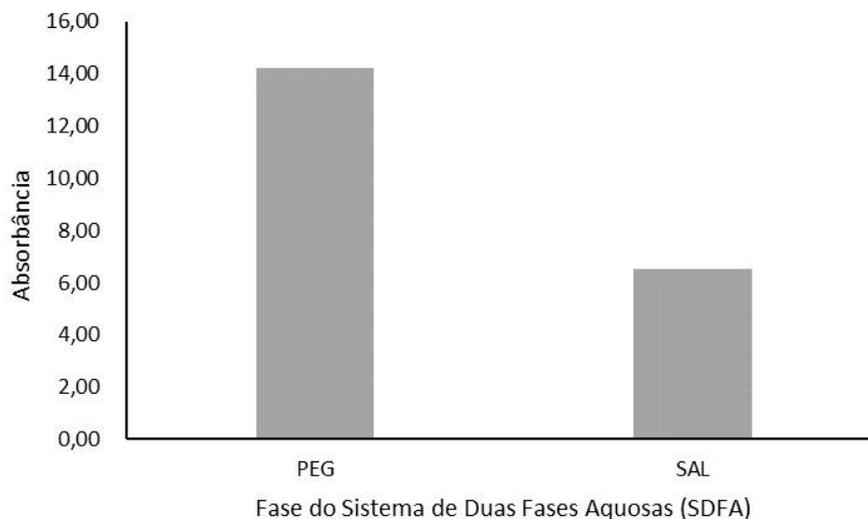
3.4 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para IgG para Zika

Segundo as instruções do fabricante, a presença de anticorpos IgG somente é positiva quando o indexador for maior que 11, negativa quando o indexador for menor que 9 e duvidosa entre 9 e 11.

A quantificação de anticorpos do Zika vírus na IgG comercial antes de ser particionada no SDFA apresentou resultado positivo, significando que a Tegeline tem anticorpos específicos para o vírus da Zika.

Entretanto, após o particionamento, o resultado foi negativo na fase sal e positivo na fase PEG, enquanto para a o vírus da dengue o título de anticorpos foi duvidoso. Com isso, percebe-se que a imunoglobulina comercial é um pool de proteínas no qual cada IgG específica possui afinidade por uma fase do sistema. Isso foi comprovado pelo teste ELISA, que resultou em títulos de anticorpos negativo para o Zika vírus na fase sal e positivo na fase PEG (Figura 8). Possivelmente, a grande quantidade de Imunoglobulina evidenciada na eletroforese da fase sal após partição seja específica para outros patógenos, como por exemplo o Vírus da Chikungunya.

Figura 8. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) da IgG para Zika



Apesar de não ter sido realizada a quantificação de anticorpos para o vírus da Chikungunya, outros estudos demonstraram que a preparação da Imunoglobulina comercial é utilizada com alta eficácia para tratar doenças secundárias à infecção pelo vírus (MAHTO et al., 2018).

4. Conclusão

O Sistema de Duas Fases Aquosas mostrou-se uma técnica eficiente na extração de imunoglobulinas, de baixo custo e alto rendimento, que poderia possibilitar um maior grau de pureza à imunoglobulina comercial. Pode ser considerada uma tecnologia ideal pois é capaz de concentrar e purificar proteínas numa mesma etapa. O ensaio 1, realizado utilizando concentrações de PEG 4000g/mol de 12,5% e fosfato de potássio de 10%, garantiu a maior recuperação (96,79%) da biomolécula com partição preferencial para a fase sal. Os resultados obtidos demonstraram que quanto menores forem as concentrações de PEG e de SAL, maior será a recuperação da proteína.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Reyes, J., Navarro, E., Herrera, M. J., Goenaga, E., Ospina, M. L., Parra, E., Mercado, M., Chaparro, P., Beltran, M., Gunturiz, M. L., Pardo, L., Valencia, C., Huertas, S., Rodríguez, J., Ruiz, G., Valencia, D., Haddad, L. B., Tinker, S. C., Moore, C. A., & Baquero, H. (2017). Severe Neurologic Disorders in 2 Fetuses with Zika Virus Infection, Colombia. *Emerging infectious diseases*, 23(6), 982–984. <https://doi.org/10.3201/eid2306.161702>
- Albertsson, P.-Å., *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 1st ed. Wiley Interscience, New York (1971).
- ANVISA, Bula da Tegeline. *Imunoglobulina humana intravenosa*, Brasília – DF, 2016.
- Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal of chromatography. A*, 1218(49), 8826–8835. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.051>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Burnouf T. (2007). Modern plasma fractionation. *Transfusion medicine reviews*, 21(2), 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.11.001>
- Chow, Y. H., Yap, Y. J., Show, P. L., Juan, J. C., Anuar, M. S., Ng, E. P., Ooi, C. W., & Ling, T. C. (2016). Characterization of partitioning behaviors of immunoglobulin G in polymer-salt aqueous two-phase systems. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(5), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.04.0>
- Cohn, E. J., & Strong, L. E. (1946). Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal of the American Chemical Society*, 68, 459–475. <https://doi.org/10.1021/ja01207a034>
- da Silva, M. E., & Franco, T. T. (2000). Purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 743(1-2), 287–294. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00172-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00172-9)
- Dalakas M. C. (2021). Update on Intravenous Immunoglobulin in Neurology: Modulating Neuro-autoimmunity, Evolving Factors on Efficacy and Dosing and Challenges on Stopping Chronic IVIg Therapy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(4), 2397–2418. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01108-4>

Ferreira, A. M., Faustino, V., Mondal, D., Coutinho, J., & Freire, M. G. (2016). Improving the extraction and purification of immunoglobulin G by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems. *Journal of biotechnology*, 236, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.015>

Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2019). *Antibody Purification and Storage*. Cold Spring Harbor protocols, 2019(5), 10.1101/pdb.top099101. <https://doi.org/10.1101/pdb.top099101>

Forbat, E., Ali, F. R., & Al-Niaimi, F. (2018). Intravenous immunoglobulins in dermatology. Part 1: biological mechanisms and methods of administration. *Clinical and experimental dermatology*, 43(5), 513–517. <https://doi.org/10.1111/ced.13553>

Gouveia, F. L., Oliveira, R. M. B. de, Lucena, A. E. de S., Cordeiro, M. T., & Leite, A. C. L. (2013). Production of intravenous human dengue immunoglobulin from Brazilian-blood donors. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 821–829. doi:10.1590/s1984-82502013000400022

Grazzini, G., Mannucci, P. M., & Oleari, F. (2013). Plasma-derived medicinal products: demand and clinical use. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 11 Suppl 4(Suppl 4), s2–s5. <https://doi.org/10.2450/2013.002s>

Jameson J. Larry, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser Dan L. Longo, Joseph Loscalzo (eds.). *Medicina Interna de Harrison*. New York, McGraw-Hill. 20^a ed. 2019.

Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2020). Use of Intravenous Immunoglobulins in Sepsis Therapy-A Clinical View. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5543. <https://doi.org/10.3390/ijms21155543>

Johansson, G., 1970. Partition of salts and their effects on partition of proteins in a dextran-poly(ethylene glycol)-water two-phase system. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* 221, 387–390. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(70\)90283-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(70)90283-7).

Jolles, S., Sewell, W. A., & Misbah, S. A. (2005). Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and experimental immunology*, 142(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02834.x>

Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Liu, X., Cao, W., & Li, T. (2020). High-Dose Intravenous Immunoglobulins in the Treatment of Severe Acute Viral Pneumonia: The Known Mechanisms and Clinical Effects. *Frontiers in immunology*, 11, 1660. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01660>

Lu, Y.-M., Yang, Y.-Z., Zhao, X.-D., Xia, C.-B., 2010. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food Bioprod. Process.* 88, 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2009.12.00>.

Mahto, S. K., Gupta, P. K., Singh, A., & Meena, R. C. (2018). Atypical Neurological Manifestations of Chikungunya Fever: Two Case Reports. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 22(4), 306–308. https://doi.org/10.4103/ijccm.IJCCM_459_17

Malpiedi, L. P., Nerli, B. B., Taqueda, M. E., Abdalla, D. S., & Pessoa, A., Jr (2015). Optimized extraction of a single-chain variable fragment of antibody by using aqueous micellar two-phase systems. *Protein expression and purification*, 111, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.014>

Martins, M. M., Medronho, R. A., & Cunha, A. (2021). Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. *Paediatrics and international child health*, 41(1), 28–35. <https://doi.org/10.1080/20469047.2020.1776044>

Matias da Silva Batista, J., Pedrosa Brandão-Costa, R. M., Barbosa Cardoso, K. B., Nascimento, T. P., Albuquerque, W. W. C., Carneiro da Cunha, M. N., ... Figueiredo Porto, A. L. (2021). Biotechnological purification of a β -fructofuranosidase (β -FFase) from *Aspergillus tamarii* kita: Aqueous two-phase system (PEG/Citrate) and biochemical characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102070. doi:10.1016/j.bcab.2021.102070

Nadar, S. S., Pawar, R. G., & Rathod, V. K. (2017). Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*, 101, 931–957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>

Nascimento, T. P., Sales, A. E., Porto, C. S., Brandão, R. M. P., de Campos-Takaki, G. M., Teixeira, J. A. C., ... Converti, A. (2016). Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *Journal of Chromatography B*, 1025, 16–24. doi:10.1016/j.jchromb.2016.04.04

Ofosu, F. A., Freedman, J., & Semple, J. W. (2008). Plasma-derived biological medicines used to promote haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 99(5), 851–862. <https://doi.org/10.1160/TH07-10-0592>

Perez, E. E., Orange, J. S., Bonilla, F., Chinen, J., Chinn, I. K., Dorsey, M., El-Gamal, Y., Harville, T. O., Hossny, E., Mazer, B., Nelson, R., Secord, E., Jordan, S. C., Stiehm, E. R., Vo, A. A., & Ballow, M. (2017). Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139(3S), S1–S46. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.023>

- Pleguezuelo, D. E., & Sánchez-Ramón, S. (2017). New choices for treatment with subcutaneous immunoglobulins. Nuevas posibilidades de tratamiento con inmunoglobulinas subcutáneas. *Medicina clínica*, 148(2), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.09.037>.
- Ramus, B., Benbrahim, O., & Chérin, P. (2019). Utilisation des immunoglobulines humaines intraveineuses et sous-cutanées [Use of intravenous and subcutaneous human immunoglobulins]. *Soins; la revue de reference infirmiere*, 64(833), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.soin.2019.01.016>
- Schwaiger, J., Karbiener, M., Aberham, C., Farcet, M. R., & Kreil, T. R. (2020). No SARS-CoV-2 Neutralization by Intravenous Immunoglobulins Produced From Plasma Collected Before the 2020 Pandemic. *The Journal of infectious diseases*, 222(12), 1960–1964. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa593>
- Shahrizaila, N., Lehmann, H. C., & Kuwabara, S. (2021). Guillain-Barré syndrome. *Lancet* (London, England), 397(10280), 1214–1228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00517-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00517-1)
- Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. *Annu Rev Anim Biosci*. 2020;8:145-169. doi:10.1146/annurev-animal-021419-083720.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). Technical Report Series n° 840, Requirements for the Collection, Processing and Quality Control of Blood, (Requirements for Biological Substances, n° 27, revised 1992), p. 99, 1994.
- Xu, L., Zhao, Y., Xu, M., Yao, Y., Wu, N., Du, H., & Tu, Y. (2019). Changes in physico-chemical properties, microstructure, protein structures and intermolecular force of egg yolk, plasma and granule gels during salting. *Food chemistry*, 275, 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.078>
- Xu, Q., Zheng, X., Huang, M., Wu, M., Yan, Y., Pan, J., Yan, Q., Duan, C.J., Liu, J.L., Feng, J.X., 2015. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. *Process Biochem*. 50, 1237–1246. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.020>