

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – MG

LAURO CESAR FELIPE DA COSTA

**REATIVIDADE SOROLÓGICA DE TRÊS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS
DOS DOMÍNIOS I E II DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *DENGUE VIRUS* EM
AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DENGUE**

Alfenas/MG

2014

LAURO CESAR FELIPE DA COSTA

**REATIVIDADE SOROLÓGICA DE TRÊS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS
DOS DOMÍNIOS I E II DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *DENGUE VIRUS* EM
AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG).

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof.º Dr.º Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2014

Costa, Lauro Cesar Felipe da.

Reatividade sorológica de três peptídeos sintéticos derivados dos domínios I e II da proteína do envelope do *Dengue virus* em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue / Lauro Cesar Felipe da Costa. - 2013.

59 f. -

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Vírus da Dengue. 2. Peptídeos. 3. Proteínas do Envelope Viral. 4. Testes Sorológicos. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

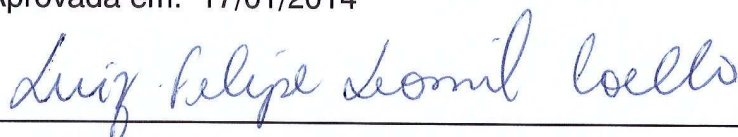
CDD: 616.91852

LAURO CESAR FELIPE DA COSTA

**REATIVIDADE SOROLÓGICA DE TRÊS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS
DOS DOMÍNIOS I E II DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *DENGUE VIRUS* EM
AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DENGUE**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG). Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 17/01/2014



Prof.º Dr.: Luiz Felipe Leomil Coelho (Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG



Prof.º Dra.: Betânia Paiva Drumond (Membro Externo)

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof.º Dr.: Jorge Kleber Chavaço (Membro Interno)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, que em sua onipotência e infinita misericórdia, tudo tem providenciado em todas as etapas da minha vida.

À minha família, José, Niva, Leila que sempre me ensinaram a dar valor à essência da vida, amando, respeitando, acolhendo e incentivando no meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, por toda dedicação e amor que transmite ao ensinar e orientar.

Aos alunos, técnicos e professores dos laboratórios de Vacinas e Microbiologia da UNIFAL-MG, em especial à Alessandra Gomes, Ana Ribeiro, Antônio Lima, Bianca Carvalho, Luis Fagundes, Luiz Almeida, Marcílio Fumagalli, Naiara Ferreira, Paola Singi, Raíssa Prado e ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, pela ajuda na elaboração deste trabalho e mais do que isto, pela amizade sincera.

Aos pacientes e voluntários que participaram deste trabalho, pela atitude altruísta e preciosa que contribui no desenvolvimento de melhorias e alternativas no campo da saúde.

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro destinado ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, alunos e demais membros do programa de pós-graduação em Biociências Aplicadas a Saúde, por todo conhecimento científico transmitido e compartilhado.

À Francini Amaro, Rômulo Melo e Luiz Prado Junior, pela agradável companhia, incentivo e acolhimento.

Ao Grupo de Oração Universitária (GOU) e a Comunidade Missionária Providência Santíssima (CMPS), pelas amizades, orações e presença nos momentos mais importantes. “Bem mais do que mil, somos um!”.

“Esperei no Senhor com toda confiança.
Ele se inclinou para mim, ouviu meus brados.
Tirou-me de uma fossa mortal, de um charco de lodo;
Assentou-me os pés numa rocha, firmou os meus passos;
Pôs-me nos lábios um novo cântico, um hino à glória de nosso Deus...”
(Salmo 39,1-3)

RESUMO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública do mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Apesar da magnitude do problema, ainda existem limitações relacionadas ao diagnóstico, devido à presença de resultados falsos negativos, muitas vezes apresentados nos laudos laboratoriais. Estudos com a proteína do envelope são extremamente importantes para o desenvolvimento de novas vacinas e testes de diagnóstico. Os métodos sorológicos são importantes para o diagnóstico das infecções por dengue, entre eles, o imunoenensaio enzimático para detecção de IgM contra o vírus da dengue. Neste estudo, 82 amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue foram classificadas como positivas ou negativas utilizando o kit comercial Panbio ELISA de Captura Dengue IgM. O desempenho do ensaio do kit comercial foi comparado com os novos ensaios ELISA indireto usando três peptídeos sintéticos derivados da proteína E como substrato. De um total de 82 amostras de soro, (52,4%) foram positivas pelo kit comercial Panbio Dengue IgM ELISA de Captura, 18 (21,9%) apresentaram reatividade contra Pep1, 40 (48,7%) contra o Pep2 e 66 (80,4%) contra Pep3. Entre as amostras de soro classificadas como positivas pelo kit comercial (42), 11 (26%), também foram classificadas como positivas usando o peptídeo Pep1. Vinte e duas (52,3%), utilizando o Pep2 e 40 (95,23%) utilizando Pep3. Entre as amostras classificadas como negativas por meio do kit comercial (40), 28 (70%) foram classificadas como negativas usando como substrato o Pep1, vinte 20 (50%) utilizando como substrato o Pep2 e 13 (32,5%), utilizando como substrato Pep3. Os resultados demonstram que os peptídeos sintéticos podem ter potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas vacinas, tratamentos e testes de diagnósticos.

Palavras-chave: *Dengue vírus*. Peptídeos. Proteína do Envelope. Testes sorológicos

ABSTRACT

Dengue is a major public health problem worldwide, especially in the tropical and subtropical regions of the world. Despite the magnitude of the problem, there are still limitations related to the diagnosis, due to the presence of false negative results often presented in the laboratory reports. Studies using the envelope protein are extremely important for the development of new vaccines and new diagnostic tests. Serological methods are important for the diagnosis of dengue infections, and among them, the enzyme linked immunoassay that detects IgM against *Dengue virus* is very employed. In this study, a panel of 82 serum samples from dengue suspected patients was classified as positive and negative using the commercial ELISA kit Panbio Capture Dengue IgM. Assay performance of the commercial kit was compared with the new indirect ELISA assays using synthetic peptides derived from E protein (Pep1, Pep2 and Pep3) as substrate. Of a total of 82 serum samples, (52.4%) were positive by the commercial ELISA kit Panbio Capture Dengue IgM, 18 (21,95%) showed reactivity against Pep1; 40 (48,78%) against Pep2 and 66 (80,48%) against Pep3. Among the serum samples classified as positive by the commercial kit (42), 11 (26%) are also classified by positive using Pep1 as substrate, 22 (52,3%) using Pep2 as substrate and 40 (95,23%) using Pep3 as substrate. Among the samples classified as negative by the commercial kit (40), 28 (70%) were also classified as negative using Pep1 as substrate, 20 (50%) using Pep2 as substrate and 13 (32.5%) using Pep3 as substrate. The results showed that the synthetic peptides can have biotechnological potential for the development of new vaccines and treatments and diagnostic tests.

Keywords: *Dengue virus*. Peptides. Envelope protein. Serologic test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma e proteínas do DENV.....	14
Figura 2 - Representação tridimensional da proteína E.....	16
Figura 3 - Ciclo de replicação do DENV.....	19
Figura 4 - Representação tridimensional da proteína E do DENV-2.....	30
Figura 5 - Resultados dos testes ELISA utilizando o teste comercial Panbio IgM e os peptídeos sintéticos.....	37
Figura 6 - Concordância e discordância entre a detecção de IgM anti-DENV pelo teste Panbio IgM e os imunoenaios que utilizaram os peptídeos sintéticos Pep1, Pep2 e Pep3.....	40
Figura 7 - Resultados do teste imunoenzimático utilizando a vacina contra febre amarela como antígeno.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização dos seis sítios identificados por Mazumder e colaboradores (2007) nos quatro sorotipos de <i>dengue virus</i>	31
Tabela 2 - Seqüência de aminoácidos dos peptídeos sintetizados.....	31
Tabela 3 - Resultados dos testes ELISA para detecção de IgM pelo kit comercial Panbio e pelos imunoensaios que utilizaram os peptídeos Pep1, Pep2 e Pep3.....	37
Tabela 4 - Concordância entre os resultados do teste Panbio e os resultados dos ensaios com os peptídeos sintéticos.....	38
Tabela 5 - Discordância entre os resultados do teste Panbio e os resultados dos ensaios com os peptídeos sintéticos.....	39
Tabela 6 - Resultados dos testes ELISA pelos imunoensaios que utilizaram os peptídeos Pep1, Pep2 e Pep3 para detecção de IgM em amostras de soro de indivíduos vacinados para febre amarela.....	41

LISTA DE SIGLAS

ADE	- Anticorpos potencializadores da infecção
C	- Capsídeo
C6	- Células de glioma de ratos
C6/36	- Células de glândula salivar de <i>Aedes albopictus</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucléico complementar
DENV	- <i>Dengue virus</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
E	- Envelope
ELISA	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FD	- Febre de dengue
FHD	- Febre hemorrágica de dengue
g	- grama
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance
IFN	- Interferon
IFI	- Imunofluorescência indireta
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
Kb	- Kilobyte
kDa	- Kilodalton
M	- Membrana
mg	- miligrama
MHC	- complexo principal de histocompatibilidade
min	- Minuto(s)
mRNA	- Ácido ribonucléico mensageiro
nm	- Nanômetro
NS	- não-estrutural
OMS	- Organização Mundial da Saúde
Pep	- Peptídeo
PI	- Piauí
PBS	- Salina fosfatada tamponada
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

PrM - Precursora de membrana
RE - Retículo endoplasmático
RER - Retículo endoplasmático rugoso
RNA - Ácido ribonucléico
RT-PCR - Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
SCD - Síndrome do choque de dengue
TNF - Fator de necrose tumoral
 μL - microlitro
 μM - micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	<i>DENGUE VIRUS</i> – GENOMA, MORFOLOGIA E PROTEÍNAS.....	13
1.2	CICLO DE REPLICAÇÃO DO <i>DENGUE VIRUS</i>	18
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE.....	22
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	25
1.5.1	Isolamento viral.....	25
1.5.2	Métodos de biologia molecular.....	26
1.5.3	Métodos sorológicos.....	27
2	OBJETIVO GERAL.....	30
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	SELEÇÃO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS.....	31
3.2	AMOSTRAS E POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	33
3.3	TESTES SOROLÓGICOS.....	33
3.3.1	Teste imunoenzimático - kit PanBio Dengue IgM Capture ELISA®	33
3.3.2	Teste imunoenzimático utilizando os peptídeos sintéticos.....	34
3.3.3	Teste imunoenzimático utilizando a vacina para febre amarela.....	35
4	RESULTADOS.....	37
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO A - SÍMBOLOS E ABREVIACÕES DOS AMINOÁCIDOS	57
	ANEXO B - TABELA DE RESULTADOS DOS TESTES ELISA..	58

1 INTRODUÇÃO

A dengue é causada pelo *Dengue virus* (DENV) e cerca de dois terços da população mundial vivem em área de risco para a doença (WILDER-SMITH et al., 2012; NUNES et al., 2013). São descritos na literatura quatro sorotipos de DENV com capacidade de infectar o ser humano. Porém alguns sorotipos podem apresentar diferenças na virulência, o que pode representar manifestações clínicas diversas. Além disto, ainda existem limitações relacionadas ao diagnóstico clínico da doença, devido às dificuldades de diferenciar as manifestações clínicas da dengue das demais flaviviroses (HALSTEAD, 2013). Com isto, o tratamento passa a ser aplicado de forma tardia e ineficaz, podendo levar o paciente infectado a óbito.

Enquanto não estiver disponível uma vacina e medicamentos específicos para o tratamento da dengue, o diagnóstico precoce permanece sendo de grande importância para a população que vive em áreas endêmicas (TANG; OOI, 2012). No Brasil, os métodos sorológicos são comumente usados no diagnóstico das infecções por dengue, dentre eles, o ensaio imunoenzimático que permite detectar IgM. Esta classe de anticorpos é mais evidente nos estágios iniciais da infecção, sendo importante no diagnóstico agudo da doença (DE PAULA; FONSECA, 2004).

Os principais alvos das pesquisas para o desenvolvimento de ensaios sorológicos são as proteínas da superfície viral. A proteína do envelope (E) é responsável por uma grande parcela da indução da resposta imune protetora contra o DENV. Regiões conservadas presentes nesta proteína podem ser potenciais candidatas no desenvolvimento de vacinas tetravalentes, tratamentos e no diagnóstico da dengue (LINDENBACH et al., 2007).

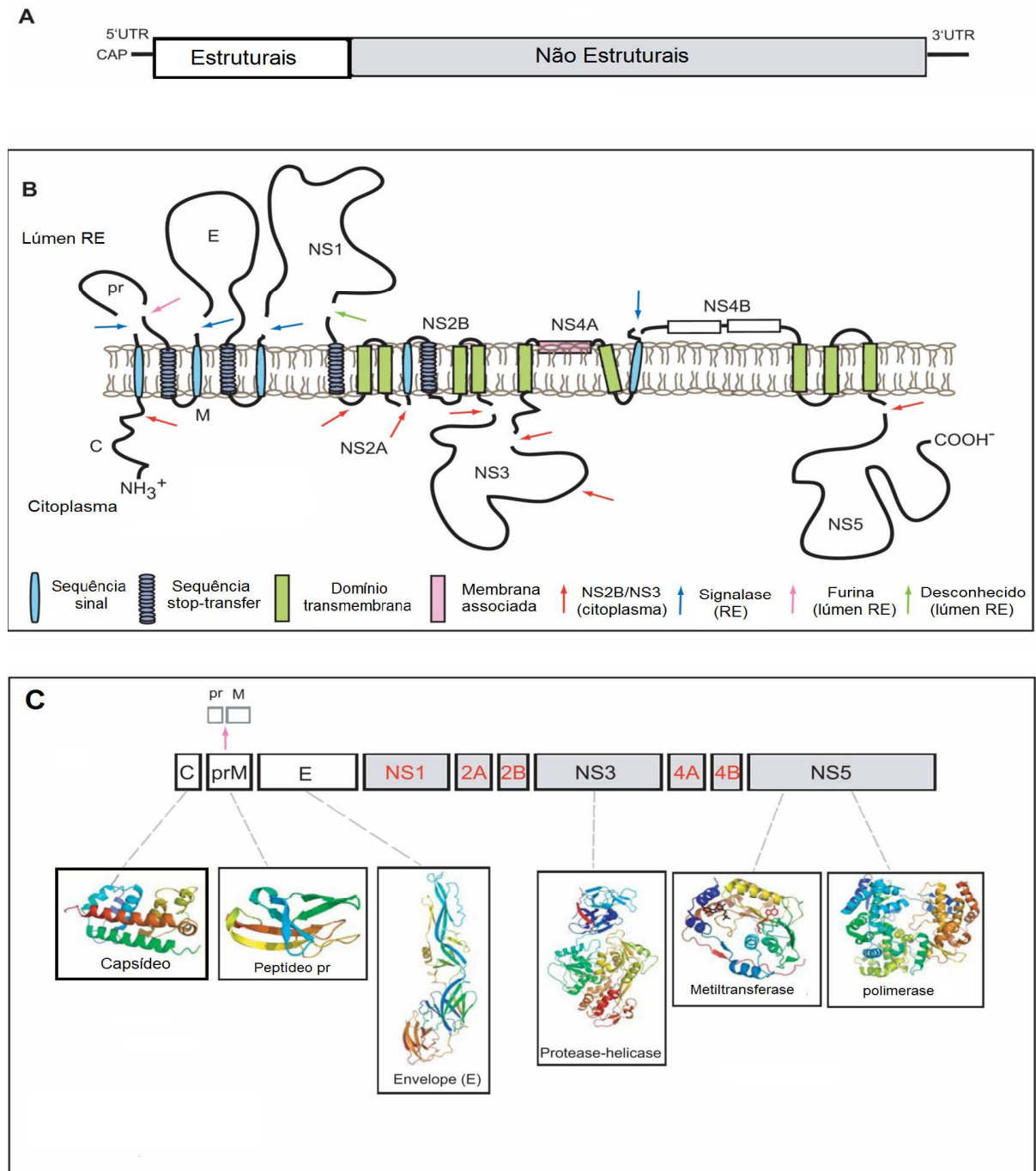
Devido à complexidade de se identificar os epítomos específicos da proteína E muitos pesquisadores utilizam as ferramentas de bioinformática para encontrar os possíveis sítios de ligação expostos na superfície da partícula viral. Os programas de predição de epítomos podem facilitar a identificação destes sítios, agilizando assim a produção de resíduos com potencial biotecnológico no desenvolvimento de novas vacinas e testes de diagnóstico (MAZUMDER et al., 2007). Este trabalho se propôs a sintetizar três peptídeos altamente conservados presentes no domínio I e II da proteína E e avaliar a reatividade dos mesmos em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue por meio da técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA).

1.1 DENGUE VIRUS – GENOMA, MORFOLOGIA E PROTEÍNAS.

A dengue é uma doença causada pelo *Dengue virus* (DENV), que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A composição genética do vírus consiste em uma fita simples de RNA com polaridade positiva (+ssRNA) de aproximadamente 11 Kb de comprimento (FIGURA 1) (CLYDE et al., 2006; LINDENBACH et al., 2007). A partícula viral é morfológicamente esférica, com tamanho de aproximadamente 40-60 nanômetros (nm) de diâmetro, possuindo um envelope lipoprotéico, sendo que a natureza lipídica é derivada das membranas das células hospedeiras. O nucleocapsídeo é icosaédrico medindo cerca de 30 nm de diâmetro (MODIS et al., 2004). O DENV apresenta quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV- 2, DENV-3 e DENV- 4, todos capazes de causar infecções em humanos (DE PAULA; FONSECA, 2004). Embora estudos recentes apontam para um novo sorotipo (NORMILE, 2013)

O genoma é diretamente traduzido em uma única poliproteína, que é processada co- e pós-traducionalmente em várias proteínas virais, por proteases do hospedeiro e também virais (LINDENBACH; RICE, 2001; RICE, 1996; GUZMÁN; KOURÍ, 2002; GUBLER, 1998). Após a clivagem da poliproteína serão produzidas as três proteínas estruturais (proteína do capsídeo (C); proteína do envelope (E) e a proteína de membrana (M)) e as sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). As proteínas estruturais C, prM e E são traduzidas na porção 5' do genoma, seguidas pelas proteínas não estruturais na porção 3'(CAHOUR et.al, 1992). Nas extremidades 5'e 3' existem regiões não codificadoras que possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que podem estar envolvidas nos processos de amplificação genômico, tradução e montagem do vírus (BOLLATI et al., 2010) (FIGURA 1).

Figura 1 – Representação esquemática do genoma e proteínas do DENV.



Legenda: A) O genoma viral consiste em uma molécula de RNA de polaridade positiva de ~ 11kb de comprimento. As proteínas estruturais (caixas abertas) são codificadas na extremidade 5' consistindo um terço do genoma, seguido pelas proteínas não estruturais (caixas cinzas). B) Topologia membranar da poliproteína viral. O RNA viral é traduzido numa poliproteína e processada por proteases celulares e virais em locais específicos (setas). As proteínas estruturais incluem a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (prM / M) e a proteína do envelope (E). As proteínas prM e E são liberados da poliproteína por clivagem no Reticulo Endoplasmático, mas continuam a ser ancoradas no lumen da membrana. C) Representação das proteínas estruturais e das principais proteínas não estruturais.

Fonte: adaptado de PERERA; KUHN, 2008.

Os principais constituintes do nucleocapsídeo são o RNA viral e a proteína do capsídeo (C), que é dentre as proteínas do polipeptídeo viral a primeira a ser sintetizada no processo de tradução do vírus. Esta proteína possui massa molecular de aproximadamente 11 KDa e apresenta caráter básico. Assim, ela se liga ao RNA, devido ao grande número de resíduos carregados positivamente situados nas porções amino-terminal e carboxi-terminal. Nesta última porção a proteína C apresenta uma âncora membranosa hidrofóbica capaz de translocar a proteína prM dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso (LINDENBACH; RICE, 2003; KIERMAYR et al., 2004). Outra função importante desta proteína é o papel de proteção do material genético (URBANOWSKI et al., 2008).

A proteína M (25 kDa) apresenta-se de duas formas (prM ou M) no grupo dos *Flavivirus*, dependendo da etapa do ciclo viral. Quando o vírion esta na forma imatura, a proteína M se apresenta na forma de glicoproteína prM (pré membrana). Nesta primeira fase, a prM se encontra associada e sobreposta à proteína E na superfície da partícula viral. Esta associação é de grande valia, pois a proteína E fica protegida da exposição ao pH baixo da via exocítica, evitando que ocorra rearranjo prematuro por catálise ácida. Porém, a partir do momento que a prM é clivada por enzimas do complexo de Golgi (ex: furina), dará origem a proteína M com peso molecular de aproximadamente 8 kDa (KOFLER et al., 2002; LORENZ et al., 2002).

Dentre as proteínas mais estudadas do gênero *Flavivirus* está a glicoproteína do envelope (proteína E). Ela apresenta o maior tamanho entre as proteínas de superfície do gênero, com massa molecular de aproximadamente 53 KDa (GUBLER, 1998). Esta proteína desempenha um papel importante na adsorção do vírus ao receptor celular, na fusão de membrana, hemaglutinação de células, montagem viral, além de ser responsável por uma grande parcela da indução da resposta imune protetora (LINDENBACH et al., 2007).

As mudanças fenotípicas que ocorrem na superfície do vírus estão relacionadas ao arranjo que a proteína E adquire com as variações do pH e ao tipo de associação com as duas formas da proteína M (seja prM-E ou M-E). Esta alteração morfológica da partícula viral expõe diferentes regiões da proteína E responsáveis pela ligação aos receptores das células do hospedeiro vertebrado (KOFLER et al., 2002; LORENZ et al., 2002; LINDENBACH; RICE, 2003).

A proteína E possui duas subunidades monoméricas antiparalelas, sendo que, cada uma destas subunidades possui três domínios, denominados de domínios

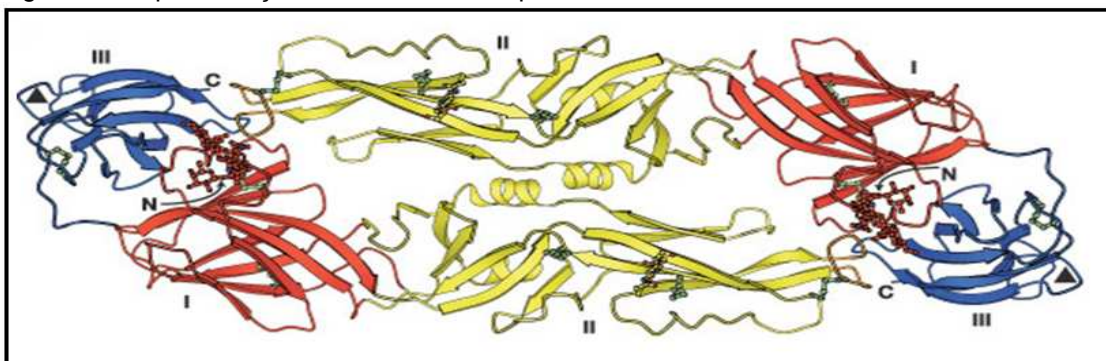
I, II e III (FIGURA 2). Estes três domínios estão conectados, porém as suas junções possibilitam tal flexibilidade que permitem as mudanças conformacionais no processo de maturação do virion e também na fusão de membrana (STIASNY; HEINZ, 2006; MODIS et al., 2005).

No domínio III encontra-se a região C-terminal da proteína, enquanto o domínio I apresenta a região N-terminal. O domínio II apresenta duas alças descontínuas a partir do domínio I, sendo que em uma destas alças (na extremidade distal) existe um peptídeo de fusão hidrofóbico, sendo esta região altamente conservada no grupo dos flavivirus. O domínio II é alongado e media a dimerização da proteína E (STIASNY; HEINZ 2006; MODIS et al., 2004).

Apesar da proteína estrutural E ser a responsável pelas principais propriedades biológicas da partícula viral, uma das funções mais relevantes desta proteína é a capacidade de ligação ao receptor celular, além de estar envolvida a uma série de determinantes de virulência. É justamente ao domínio III que são atribuídas a maioria dos epítomos envolvidos no reconhecimento de anticorpos neutralizantes e na ligação aos receptores celulares (MAZUMDER et al., 2007). Também é neste domínio que se encontram a maioria das substituições de nucleotídeos fixadas na proteína E.

A proteína E é glicosilada em determinados resíduos de aminoácidos e o domínio III encontra-se próximo a estes resíduos. Porém, nem sempre estes resíduos são conservados entre os sorotipos DENV. Então, esses carboidratos modificados podem modular a especificidade do ligante ao receptor alvo na superfície do vírus (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Figura 2 - Representação tridimensional da proteína E



Legenda: Na estrutura estão os domínios I (vermelho), II (amarelo) e III (azul escuro).
 Fonte: adaptado de STIASNY; HEINZ, 2006.

As proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 estão em geral envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (CAHOUR et al, 1992; LIU et al., 2003) .

A proteína não estrutural NS1 (46 kDa) é altamente hidrofílica e está envolvida na replicação do RNA viral, apesar de seu papel na replicação não ser completamente entendido. Ela pode ser encontrada dentro das células infectadas como também no plasma, pois é expressa na superfície das células infectadas pelo DENV e secretada na forma solúvel. (LINDENBACH et al., 2007; CHANG et al., 2002).

Por outro lado, a proteína NS2A (22 kDa) possui propriedade hidrofóbica e sugere-se que esteja envolvida no processo de montagem da partícula viral e também seja necessária para o processamento de NS1 (LIU et al., 2003; KÜMMERER; RICE 2002). Já a proteína NS2B com peso molecular de 12 KDa se encontra associada à membrana, formando um complexo estável com a NS3 numa região hidrofílica central. (FALGOUT et al., 1991).

A NS3 (70 KDa) é uma proteína não estrutural conservada no gênero dos *Flavivirus*. Alguns epítomos desta proteína são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos específicos. Esta grande proteína citoplasmática atua no processamento da poliproteína e também na replicação do RNA. A região C-terminal da proteína NS3 está envolvida na replicação do RNA (BOLLATI et al., 2010). Já o terço da região N-terminal possui características estruturais similares à família da tripsina, apresentando atividade de protease (CLYDE et al., 2006). Esta atividade pode ser vista quando associada à proteína NS2B. Juntas, estas proteínas apresentam atividade de protease na reação de catálise nas clivagens de várias proteínas não estruturais (BOLLATI et al., 2010).

As proteínas NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa) são pequenas e hidrofóbicas. Estão envolvidas na replicação do RNA e montagem do vírus. Estudos mostram que esta proteína possui alta capacidade inibitória da sinalização de interferon beta (IFN- β) e interferon gama (IFN- γ) (CLYDE et al., 2006). Enfim, a proteína NS5 de peso molecular de aproximadamente 103 kDa é a maior proteína viral e sua função está relacionada com a replicação do RNA. Ela desempenha atividade de RNA polimerase dependente de RNA. Além disto, estudos mostram que a proteína NS5 é capaz de induzir a produção de IL-8 em infecções por DENV 2 (MEDIN et al., 2005).

1.2 CICLO DE REPLICAÇÃO DO *DENGUE VIRUS*

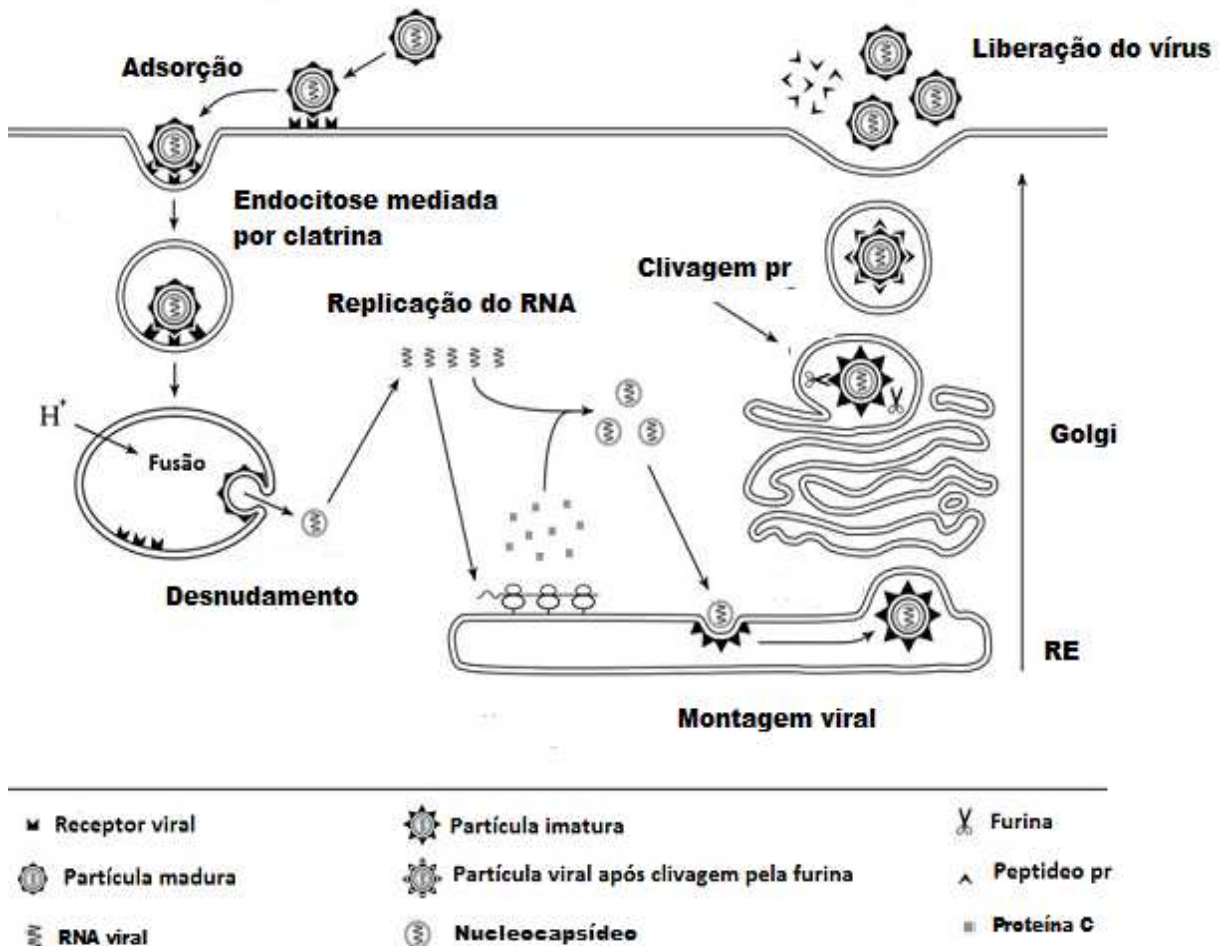
Inicialmente o DENV penetra nas células da epiderme e derme do hospedeiro humano após a picada do vetor fêmea infectada do mosquito *Aedes aegypti*. A partícula viral se adere à célula do hospedeiro por meio de ligações realizadas entre a proteína E viral aos receptores da superfície celular, principalmente dos macrófagos (receptores de manose) e células dendríticas (receptores do tipo Lectina DC-SIGN) (JOHN et al., 2013). Após adsorção da partícula viral, ocorre então a endocitose mediada pelas proteínas do tipo clatrina (FIGURA 3). Este tipo de proteína desempenha um importante papel no processo de formação de vesículas membranares no interior das células eucariotas (LOZACH et al., 2005). Após a invaginação forma-se uma vesícula endocítica no citoplasma da célula e posteriormente à acidificação do endossoma ocorre a mudança na conformação da proteína E, que passa da forma de dímero para a forma de trímero. Esta mudança facilita a liberação do RNA viral no citoplasma das células infectadas, onde ocorre a tradução e replicação do RNA (TASSANEETRITHEP et al., 2003).

O RNA viral liberado se direciona ao retículo endoplasmático rugoso, onde irá dar início à tradução do material genético do vírus em uma única cadeia com cerca de 3.400 aminoácidos. Esta proteína é traduzida e clivada posteriormente por proteases virais e do hospedeiro. O genoma de RNA positivo serve como RNA mensageiro para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais e também como molde para a síntese de uma fita complementar negativa. Esta fita intermediária negativa serve como molde para síntese de novas fitas positivas (5'-3') que serão utilizadas na montagem de outras partículas virais (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000). O RNA intermediário interage com a proteína C para a montagem do nucleocapsídeo viral. No processo de envelopamento do nucleocapsídeo ocorrerá a incorporação das proteínas E e prM que se encontram junto à membrana do retículo endoplasmático rugoso (CLYDE et al., 2006).

Uma vez montada, a partícula viral seguirá até ao complexo de Golgi para receber a adição de açúcar e favorecer a maturação da partícula viral. Neste momento a prM é clivada pela enzima furina do complexo de Golgi e dará origem a proteína M. Assim, a partícula viral converte-se em madura, e o vírus é liberado para o meio extracelular onde ocorrerá a reorganização das proteínas M e E da superfície

do vírus. Nesta reorganização a proteína E fica exposta ao domínio de ligação do receptor E, assim a partícula viral vai para o meio extracelular na forma de virion (KOFLEER et al., 2002; LORENZ et al., 2002; LINDENBACH; RICE, 2003). O vírus maduro é transportado por vesículas secretoras até ser liberado por exocitose na superfície celular (HEINZ; ALLISON, 2003). As células infectadas migram para os linfonodos, consequentemente a infecção é amplificada já que o vírus é disseminado pelo sistema linfático, onde os monócitos, macrófagos e outras células da linhagem mononuclear do baço e do fígado passam a ser os novos alvos da infecção (MARTINA et al., 2009).

Figura 3 – Ciclo de replicação do DENV.



Legenda: H⁺ - Acidificação do endossoma; RE-Retículo endoplasmático ; RNA - Ácido ribonucléico.
 Fonte: Adaptado de Rodenhuis-Zybert, 2010.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A dengue é uma doença viral atualmente endêmica em diversas regiões da África, Américas, Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Pacífico Oeste. São estimados cerca de 100 milhões de casos por ano, com maior incidência de casos no verão, já que este vírus é transmitido por mosquitos *Aedes* (principalmente *A. aegypti*, *A. albopictus* e o *A. polynesiensis*) que se proliferam principalmente em períodos quentes e de alta pluviosidade como no verão (UNDURRAGA, 2013). Desta forma, a dengue é uma doença sazonal classificada como arbovirose. Nesta classificação estão as doenças humanas transmitidas por artrópodes como mosquitos e carrapatos que hospedam os vírus (arthropod borne virus) e são bem distribuídos ao redor do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde é comum encontrar mosquitos capazes de transmitir vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (JEFFERY, 2012; WHO, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) nas últimas décadas houve uma expansão de áreas afetadas pela dengue, sendo que nestas áreas de risco vivem cerca de 3,6 bilhões de pessoas, além disto, houve uma expansão de casos das zonas urbanas para as zonas rurais (WILDER-SMITH et al., 2012).

O Brasil é uma das regiões mais afetadas no mundo sendo responsável por aproximadamente 60% das notificações nas Américas (WHO, 2009). Os quatro sorotipos circulam no país, entretanto, por um período de 28 anos o DENV-4 não foi detectado no país, até que no ano de 2010, este sorotipo ressurgiu, sendo registrado na cidade de Boa Vista, no Estado de Roraima. Em 1982, foi detectado no país o DENV-4 genótipo II, que foi associado às cepas encontradas no Caribe. Porém, recentemente foram encontrados no país além do genótipo II, o genótipo I (asiático) (HOLMES, 2008; NUNES et al., 2013). Cuidados devem ser tomados, já que a introdução de um novo sorotipo e um genótipo diferente pode ser uma ameaça potencial para futuros surtos de DENV-4 no país (NUNES et al., 2013).

As condições climáticas do país são favoráveis ao desenvolvimento do principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, que é bem adaptado às temperaturas elevadas e períodos chuvosos bem delimitados. As más condições sanitárias de algumas regiões, assim como a falta de informação da população quanto aos possíveis focos onde a larva do mosquito se desenvolve, podem favorecer a

transmissão do vírus (JEFFERY, 2012; WHO, 2009). Assim, as condições climáticas somadas aos fatores socioeconômicos podem potencializar o quadro epidemiológico da dengue.

Viajantes portadores do vírus da dengue desempenham um papel fundamental na epidemiologia da doença, já que estes indivíduos podem transitar por diferentes localidades onde o mosquito *A. aegypti* esteja presente. Uma vez tendo picado o viajante infectado, o vetor poderá transmitir o vírus para outras pessoas em posteriores eventos hematofágicos (WILDER-SMITH; SCHWARTZ, 2005). Desta forma o monitoramento de viagens para regiões endêmicas pode ser importante para evitar a disseminação da doença para regiões não endêmicas e também evitar o intercâmbio de diferentes sorotipos virais (WILDER-SMITH et al., 2012).

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE

O diagnóstico da dengue pode ser inicialmente complexo devido ao amplo espectro de manifestações clínicas que podem variar desde um estado clínico muito semelhante á outras doenças virais como febre, náuseas, vômito, dor abdominal e leucopenia (DEEN et al., 2006). Estes sinais podem ser úteis ao clínico que deve também associá-los com informações que sejam importantes, como a proveniência do paciente, se vive ou viajou para área endêmica, além disto, realizar o teste do laço e solicitar exames laboratoriais, já que em alguns casos, o paciente pode apresentar uma evolução da doença para formas mais graves como hemorragias, extravasamento de plasma, diminuição no número de plaquetas entre outras manifestações (WHO, 2009).

Outros agravantes referentes ao diagnóstico clínico do dengue é a variedade de manifestações clínicas. Elas podem estar relacionadas à idade, o estado nutricional e a genética do indivíduo infectado, influenciando assim nos sintomas (GUZMAN et al., 2002).

A infecção é causada por qualquer um dos quatro sorotipos e pode se manifestar por diversas formas. Em geral, a maioria dos pacientes se recupera sem evoluir para as formas mais graves da doença, enquanto outros indivíduos

apresentam complicações potencialmente fatais. Dentre as classificações existentes para a dengue podemos citar a dengue clássica (DC), a febre do dengue (FD), a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a forma mais grave de FHD conhecida como síndrome do choque da dengue (SCD) (GOULD; SOLOMON, 2008; KITTIGUL et al., 2007).

As manifestações clínicas mais evidentes da dengue além da febre que dura de 2 dias a uma semana são: cefaléia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, exantema (maculopapular) e petéquias com prova do laço positiva. Na FHD, incluem doença aguda febril com tendência a manifestações hemorrágicas, trombocitopenia e evidências do aumento da permeabilidade vascular, tais como hemoconcentração e hipoalbuminemia (SINGHI et al., 2007). Além disto, após as células endoteliais do hospedeiro serem infectadas pelo DENV ocorre uma rápida expressão de citocinas que levam ao extravasamento de plasma (OISHI et al., 2007; HALSTEAD, 2007; RIGAU-PEREZ, 1998). Estas manifestações ocorrem com mais frequência após re-infecções com o vírus, porém pode ocorrer nas infecções primárias (SINGHI et al., 2007).

A forma mais grave da FDH é a SCD, que ocorre em geral depois de 2 a 5 dias de febre e pode levar à morte em um período de 24 horas. Durante este período o indivíduo apresenta inicialmente dor abdominal intensa, posteriormente apresenta pele fria e úmida, sinais de insuficiência circulatória caracterizada por pulso rápido e fraco, diminuição da pressão de pulso (≤ 20 mmHg) e reperfusão capilar prolongada (SINGHI et al., 2007).

Em 2009, a OMS publicou determinados critérios para classificação da dengue. Nesta classificação são adotados alguns sinais de alerta que auxiliam na diferenciação dos casos quanto ao nível de severidade da doença. Os sinais adotados são: dor abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, sangramento nas mucosas, letargia, aumento do fígado e diminuição das plaquetas. O indivíduo só é considerado portador de dengue grave quando há sinais de alerta com extravasamento de plasma grave, hemorragia grave, SCD ou falência de órgãos. Em situações que o indivíduo provavelmente pode estar infectado, mas não apresenta os evidentes sinais de alerta, são notados além de febre outros dois critérios como vômito, dores, prova do laço positiva ou erupção cutânea (WHO, 2009). Esta classificação ainda é amplamente discutida no meio científico devido às dificuldades para combinar as respostas clínicas às categorias estabelecidas, o que

pode resultar em classificações divergentes (HADINEGORO, 2012; HORSTICK et al., 2012; HALSTEAD, 2013; GAN et al., 2013).

A característica que indica a presença das formas mais graves da doença (FHD e SCD) é o extravasamento de plasma, causado por um aumento da permeabilidade capilar, e manifesta-se por hemoconcentração, derrame pleural ou ascites. Alguns fatores contribuem para o aumento da permeabilidade devido a lacunas nas junções endoteliais e degradação do glicocálice. Dentre eles a ativação de várias citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-8 (IL-8) (CHUANG et al., 2013).

Existem outros fatores sugeridos para a compreensão dos casos mais graves da dengue. Entre eles, a existência de alguns genótipos virais mais virulentos, além da hipótese dos anticorpos potencializadores da infecção (antibody dependent enhancement, ADE). Nesta teoria acredita-se que numa infecção primária, são formados anticorpos neutralizantes contra o sorotipo infectante e estes anticorpos são responsáveis por manter uma imunidade protetora para este sorotipo em infecções secundárias. Porém, em uma infecção secundária por um sorotipo diferente ao da primeira infecção, os anticorpos pré-existentes com atividade não neutralizante irão opsonizar a partícula viral e facilitarão o reconhecimento por células mononucleares (principalmente macrófagos) via receptores para Imunoglobulina do tipo FC γ RII. Por não haver neutralização, o vírus internalizado irá se replicar no macrófago e conseqüentemente levará a um aumento do número de células infectadas e elevação da carga viral (OISHI et al., 2008; WHITEHEAD et al., 2007; CHUANG et al., 2013). Outro fator que contribui para o desenvolvimento da fisiopatologia da FHD é a teoria do pecado original de células T (*original antigenic sin*) (HALSTED et al., 1983). A resposta das células T formadas após a primeira infecção não é capaz de eliminar totalmente o vírus com sorotipo diferente em uma infecção secundária. Estas células quando ativadas produzem grandes quantidades de diversas citocinas que podem aumentar a permeabilidade vascular e causar disfunção endotelial (HALSTED et al., 1983; MIDGLEY et al., 2011; MONGKOLSAPAYA et al., 2003)

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Dentre os exames laboratoriais amplamente utilizados para o diagnóstico do DENV estão o isolamento do vírus, detecção de antígenos virais, detecção do genoma viral e por fim os exames sorológicos, sendo o método imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) o mais aplicado atualmente (PEELING et al., 2010; BARREIRA et al., 2010; TANG; OOI, 2012).

Enquanto não estiver disponível uma vacina e medicamentos específicos para o tratamento da dengue, o diagnóstico precoce permanece sendo de grande importância para a população que vive em áreas endêmicas. Ainda que venha a surgir no futuro uma vacina para dengue, a necessidade de se encontrar um diagnóstico cada vez mais preciso permanece sendo de suma importância para avaliar a eficácia da vacina, identificando de forma mais breve os possíveis mutantes capazes de escapar da abrangência desta imunização (TANG; OOI 2012; DE PAULA ; FONSECA, 2004).

1.5.1 Isolamento viral

Na técnica de isolamento viral, o objetivo é detectar o vírus, sendo que nesta técnica, podem ser usadas três metodologias diferentes que variam desde o tipo de amostras a serem coletadas e o tipo de isolamento. Para se isolar o DENV pode ser utilizado a técnica de inoculação intracerebral em camundongos neonatos, inoculação intratorácica em mosquitos e por fim, a infecção de linhagens de células de mosquitos (TANG; OOI 2012, SHU; HUANG, 2004; GUZMAN, 2004).

Das três técnicas citadas, a considerada mais sensível para o isolamento do vírus é a inoculação intratorácica no mosquito, em que a amostra pode ser soro ou plasma e o isolamento pode ser realizado nas espécies de mosquitos de *A. aegypti*, *A. albopictus* e *Toxorhynchites splendens*, sendo estes adultos, sem restrição de mosquitos machos ou fêmeas (WATTS et al 1982; JARMAN et al., 2011). A detecção é realizada nos tecidos do mosquito pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) por anticorpos soro-específicos. Quanto mais precoce é a coleta do soro do paciente, maior é a taxa de isolamento do vírus. (JARMAN et al., 2011).

Na técnica de inoculação intracerebral, os camundongos de 2 a 4 dias de idade ainda em período de amamentação, são inoculados com o DENV seja por

soro ou plasma e observados diariamente até que estejam moribundo e então, são sacrificados para se realizar a coleta das amostras para posterior isolamento do vírus. Entretanto, devido à baixa sensibilidade e questões técnicas como instalações para os animais, altos custos para manutenção, fazem com que esta metodologia seja pouco aplicada.

Enfim, o isolamento do vírus pelo uso de linhagens de células é a técnica mais aplicada, por apresentar maiores resultados, de forma rápida e menor custo. A linhagem celular mais utilizada é a C6/36, derivada de células de mosquito *Ae. albopictus*, porém, outras linhagens são utilizadas com menor frequência como AP-61 obtida do *A. pseudoscutellaris* e TRA-284 obtida do *Toxorhynchites amboniensis*. Linhagens celulares de mamíferos como Vero e BHK-21 podem ser utilizadas, mas apresentam menor sensibilidade (KUNO et al., 1985).

1.5.2 Métodos de biologia molecular

A detecção do genoma viral é realizada por técnicas moleculares e a mais utilizada é a reação de transcrição reversa seguida da cadeia da polimerase (RT-PCR), que uma vez bem padronizada, apresenta a vantagem de identificar o vírus na fase aguda da doença.

A reação é composta por duas etapas, na primeira ocorre a transcrição reversa, em que o RNA viral serve como molde para a conversão em DNA complementar (cDNA) pela ação da transcriptase reversa. Na segunda etapa, inicia-se a amplificação a partir do DNA complementar produzido na primeira etapa utilizando oligos iniciadores para o DENV.

A RT-PCR convencional ou em tempo real vem sendo cada vez mais aperfeiçoada com a criação de novos oligonucleotídeos iniciadores e a validação de novos protocolos. Uma das vantagens do uso da reação em cadeia da polimerase está na diversidade de amostras que podem ser usadas a partir desta técnica, que podem ser sangue, soro, plasma, tecidos, urina e até mesmo saliva, apesar destas duas últimas apresentarem menores quantidades de RNA viral (CHUA et al., 2011; HIRAYAMA et al., 2012).

1.5.3 Métodos sorológicos

Dentre os exames sorológicos usados para a dengue podem-se citar os teste de fixação do complemento; neutralização; inibição de hemaglutinação e os ensaios de imunoadsorção enzimática. Os exames sorológicos da dengue ainda continuam sendo bem difundidos, sendo os ensaios de neutralização e ELISA os mais utilizados na atualidade (DE PAULA; FONSECA, 2004; TANG; OOI, 2012).

O teste de neutralização é um diagnóstico sensível e muito específico, pois os anticorpos neutralizantes ligam-se ao DENV e este perde a capacidade de infectar a célula, distinguindo-se assim de reações cruzadas com outros Flavivírus. A interação entre o vírus e o anticorpo ocorre quando se incubam amostras de soro diluídas com o vírus. Após esta etapa, alíquotas da mistura vírus-anticorpo são utilizadas para inoculação em cultura de células, como por exemplo, células VERO, LLCMK2 ou BHK-21. Quando não há neutralização, o vírus irá infectar a cultura de células e então ocorrerá lise destas. Assim, é possível visualizar com clareza o efeito citopático. Mas quando há a neutralização, o vírus não infecta as células permissivas e desta forma, não ocorre o efeito citopático. Apesar da sensibilidade e especificidade serem relevantes neste método, os altos custos de execução e o longo tempo para realização entre outras dificuldades impedem que este teste seja amplamente utilizado (DE PAULA; FONSECA, 2004; MAEDA; MAEDA, 2012).

O teste ELISA se baseia na reação entre antígeno-anticorpo, sendo muito empregado no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas principalmente por apresentar sensibilidade elevada, tendo a vantagem de ser um ensaio com menores exigências quanto à manipulação, contaminação, devido ao uso de reagentes estáveis (GUZMÁN; KOURÍ, 2004; OLIVEIRA et al., 2011).

Existem várias metodologias aplicadas ao ensaio ELISA, entretanto o princípio básico da reação se dá pela detecção visual ou espectrofotométrica de reveladores denominados de substratos (cromogêneo, fluorescente ou luminescente), que fornecem informações da presença ou não de anticorpos ou antígenos específicos, dependendo de qual destes dois será o alvo do estudo (FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Os anticorpos IgM anti-dengue podem ser detectáveis em alguns pacientes logo no segundo dia após o início da doença nas infecções primárias. Porém, em

outros pacientes, os anticorpos IgM serão detectados no plasma ou no soro apenas a partir do oitavo dia, contados após os primeiros sintomas (como a febre). Estes anticorpos podem ser detectados por 2 a 3 meses, sendo o pico por volta da segunda semana. Entretanto, nas infecções secundárias os níveis de IgM são bem inferiores comparado aos altos níveis encontrados numa infecção primária. Por isso, estes anticorpos são procurados principalmente na fase aguda, embora os anticorpos IgG anti-dengue sejam detectáveis já nesta fase, eles serão notados mais tardiamente, entre 7 a 10 dias na infecção primária (DE PAULA; FONSECA, 2004).

Nas infecções secundárias, os níveis de IgM são mais baixos, enquanto os anticorpos IgG atingem níveis mais elevados desde a fase aguda e principalmente na fase de convalescença. Em diversos estudos, epidemiológicos, clínicos, entre outros, os níveis detectáveis nos ensaios sorológicos de IgM e IgG podem servir para diferenciar as infecções primárias das secundárias (GUZMÁN; KOURÍ, 2002, 2004; HALSTEAD, 2007; WHO, 2009; DE PAULA; FONSECA, 2004).

Alguns ensaios de ELISA de captura da proteína NS1 foram desenvolvidos e revelaram que altos níveis desta proteína são secretados antes ou a partir do início dos sintomas. A avaliação precoce destes ensaios levou ao desenvolvimento comercial de ELISA de captura de NS1 por várias empresas (YOUNG et al., 2000; MULLER; YOUNG, 2013).

Recentemente, vários estudos com o objetivo de detectar as infecções causadas por DENV e outros membros do gênero *Flavivirus* têm utilizado a bioinformática para identificar regiões de peptídeos e proteínas da superfície celular que geram respostas imunes. Uma vez identificadas, aplicam-se estes peptídeos ou proteínas (sejam eles sintéticos ou recombinantes) em ferramentas sorológicas. Dentre eles, um estudo realizado por Wicht e colaboradores (2013), com a proteína prM como alvo de identificação de infecção pelo DENV, utilizou-se das metodologias Western blot e ELISA indireto para diagnosticar a infecção.

Os estudos com o domínio III da proteína E para o desenvolvimento de terapias, vacinas e diagnóstico no grupo dos *Flavivirus* que causam danos aos humanos é de grande importância. Este domínio apresenta epítomos que podem ser reconhecidos por anticorpos neutralizantes, e por isso, tem sido alvo para o desenvolvimento de novas vacinas (BABU et al., 2008; LENG et al., 2009). Além disto, epítomos vírus-específicos de peptídeos recombinantes do domínio III podem

ser aplicados para o diagnóstico sorológico de infecções por *Flavivirus* (WAHALA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2004).

A utilização de epítopos vírus-específicos em ELISA tem auxiliado a desvendar alguns problemas de reações cruzadas que ocorrem entre alguns membros dos *Flavivirus* (SHUKLA et al., 2009; HOLBROOK et al., 2004; ZIDANE et al., 2013). Nos estudos realizados por Beasley e colaboradores (2002) com epítopos da proteína E foi possível realizar a diferenciação dos anticorpos gerados em infecções por vírus do Oeste do Nilo, de outros anticorpos produzidos por flaviviruses como o Vírus da encefalite japonesa, o Vírus da encefalite Murray Valley e o Vírus da encefalite Saint Louis. Os epítopos usados apresentaram papel discriminatório superior na resposta de anticorpos específicos quando comparado à resposta específica gerada pela utilização do vírus inteiro.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a reatividade sorológica de três peptídeos sintéticos derivados dos domínios I e II da proteína do envelope do *Dengue virus* em amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

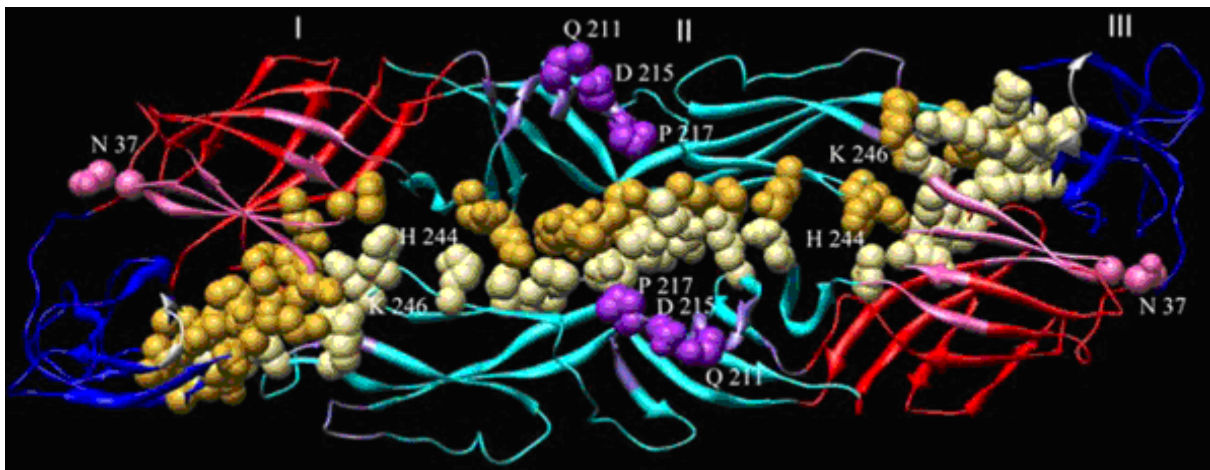
- A. Classificar as amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue como amostras IgM positivas ou negativas utilizando o kit comercial.
- B. Verificar a reatividade sorológica dos três peptídeos sintéticos derivados dos domínios I e II da proteína do envelope do DENV.
- C. Comparar os resultados obtidos pelo kit Panbio Dengue IgM Capture ELISA com os resultados obtidos nos ensaios imunoenzimáticos utilizando os peptídeos sintéticos .
- D. Verificar a reatividade sorológica dos três peptídeos sintéticos derivados dos domínios I e II da proteína do envelope do DENV com as amostras de soro IgM positivas para febre amarela.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos escolhidos estão presentes na proteína E foram desenhados de acordo com os dados descritos por Mazumder e colaboradores em 2007. Este estudo identificou através de ferramentas de bioinformática seis sítios importantes na proteína E (N37, Q211, D215, P217, H244, K246) (FIGURA 4). De acordo com os resultados obtidos, estes sítios estão presentes somente no grupo dos DENV, são extremamente conservados entre os quatro sorotipos de DENV (vários isolados mundiais), possuem alta afinidade para a ligação à MHC classe II e estão expostos quando a proteína E se encontra na forma de dímeros e/ou trímeros. Foram então, selecionadas 3 regiões peptídicas que abrangem os seis sítios identificados (TABELA 1). O alinhamento das sequências de aminoácidos indicou que existe pouca divergência de aminoácidos entre os quatro sorotipos (aminoácidos em azul).

Figura 4 - Representação tridimensional da proteína E do DENV2.



Legenda: Na estrutura estão os domínios I (vermelho), II (azul claro), III (azul escuro) e os seis sítios de aminoácidos identificados por Mazumder et al., 2007.

Fonte: Mazumder et al., 2007.

Tabela 1: Localização dos seis sítios identificados por Mazumder e colaboradores (2007) nos quatro sorotipos de *Dengue virus*.

Região 1		Região 2		Região 3	
Domínio I		Domínio II		Domínio II	
DENV-1 34	MAKDKPTLDIEL 45	DENV-1 206	WLVHKQWFLDLPLPW 220	DENV-1 237	LVTFKTAHAKKQEV 250
DENV-2 34	MAKNKPTLDIEL 45	DENV -2 206	WMVHRQWFFDLPLPW 220	DENV-2 237	LVTFKNAHAKKQEV 250
DENV-3 34	MAKNKPTLDFEL 45	DENV -3 206	WLVHRQWFLDLPLPW 220	DENV-3 237	LVTFKNPHAKKQDV 250
DENV-4 34	MAQKGKPTLDFEL 45	DENV -4 206	WLVHKQWFLDLPLPW 220	DENV-4 237	LVTFKVPHAKRQDV 250

Legenda: Os aminoácidos em vermelho correspondem aos sítios N37, Q211, D215, P217, H244, K246. Os aminoácidos marcados em azul correspondem aos peptídeos que divergem entre os quatro sorotipos.

Fonte: do autor.

As sequências de cada sorotipo de DENV foram ligadas entre si através de tetrâmeros de glicina. Os peptídeos foram denominados de Pep1; Pep2 e Pep3 (TABELA 2).

Tabela 2 - Sequência de aminoácidos dos peptídeos sintetizados

Pep1	MAKDKPTLDIELGGGGMAKMKPTLDIELGGGGMAKNKPTLDFELGGGGMAQKGKPTLDFEL
Pep2	WLVHKQWFLDLPLPWGGGGWMVHRQWFFDLPLPWGGGGWLVHRQWFLDLPLPWGGGGWLVHKQWFLDLPLW
Pep3	LVTFKTAHAKKQEVGGGGLVTFKNAHAKKQEVGGGGLVTFKNPHAKKQDVGGGGLVTFKVPHAKRQDV

Legenda: sequência de aminoácidos dos quatro sorotipos do DENV ligadas por tetrâmeros de glicina (DENV-1 em vermelho; DENV-2 em azul; DENV-3 em verde; DENV- 4 em laranja)
Fonte: do autor.

Estes peptídeos foram sintetizados em um sintetizador automático de peptídeos e purificados utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As sequências dos peptídeos foram confirmadas por espectrometria de massa. A síntese, a purificação e a análise de espectrometria de massa foram feitos pela empresa Life Technologies, USA. Os peptídeos foram suspensos em água ultra-pura para a concentração de 5mg/mL e filtrados em membrana de 0,22 µM (Macherey-Nagel, Alemanha).

3.2 AMOSTRAS E POPULAÇÃO DE ESTUDO

As 82 amostras de sangue de indivíduos suspeitos para dengue utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN, Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Piauí) ou pelo Instituto de Doenças Tropicais Dr. Nathan Portella. Estas amostras foram coletadas em Teresina-PI durante a epidemia de dengue com os sorotipos DENV-2 e DENV-3 ocorridos nos anos de 2006 a 2008. As informações demográficas (sexo, idade, endereço) e clínicas (sintomatologia) correspondentes a cada amostra também foram fornecidas nas fichas de notificação. Os procedimentos de coleta foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (SISNEP) e está registrado sob o número CAAE - 0417.0.203.000-06.

As 5 amostras de soro de indivíduos saudáveis, vacinados contra febre amarela utilizadas no teste imunoenzimático para o estudo de reação cruzada de IgM entre DENV e o *Vírus da Febre amarela*, assim como as amostras de soros de indivíduos saudáveis utilizadas como controles negativos para febre amarela e dengue foram cedidas pelo Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG.

3.3. TESTES SOROLÓGICOS

3.3.1 Teste imunoenzimático utilizando o kit “Panbio Dengue IgM Capture ELISA[®]”.

Para o teste imunoenzimático utilizando o kit comercial “Panbio Dengue IgM Capture ELISA[®]”, foram testadas 82 amostras de soros de pacientes suspeitos de dengue e 5 amostras IgM positivas para febre amarela vacinal. Os demais reagentes e a placa de microtécnica foram fornecidos no kit. As amostras de soro foram diluídas 100X em tampão diluente da amostra e o teste foi realizado conforme indicado pelo fabricante.

Resumidamente, foram adicionados 100 μ L de cada amostra diluída e dos controles positivo e negativo nos respectivos micropoços da placa. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C e depois foi lavada seis (6) vezes com o tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μ L do complexo antígeno-anticorpo

monoclonal-peroxidase nos micropoços da placa do teste e a placa incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados por seis vezes com tampão de lavagem e logo foi adicionado 100 µL de uma solução contendo 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio em tampão citrato cítrico pH 3,5 em cada poço e incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente foram adicionados 100 µL da solução de parada da reação (ácido fosfórico 1M) e então o resultado foi lido dentro de 30 minutos, usando um comprimento de onda de 450 nm. Para a classificação do resultado como positivo, duvidoso ou negativo foi usada a classificação recomendada pelo fabricante, baseando-se no cálculo do valor indexador que se dá dividindo-se a absorbância da amostra pelo valor de corte. A interpretação dos resultados foram feitas da seguinte maneira: amostras cujos valores indexadores eram menores que 0,9 foram classificadas como negativas. Entre 0,9-1,1 como duvidosas, e por fim, valores acima de 1,1 foram classificadas como positivas.

3.3.2 Teste imunoenzimático utilizando os peptídeos sintéticos.

No teste ELISA com os peptídeos sintéticos (antígenos) foram utilizadas 82 amostras de soro de indivíduos suspeitos de dengue e 5 amostras de soro IgM positivas para febre amarela vacinal. Os peptídeos Pep1, Pep2 e Pep3 foram diluídos na concentração de 20µg/mL em tampão carbonato (0,1M pH 9,6) e utilizados para a sensibilização da placa de ELISA de 96 poços (Maxisorp Nunc®, USA), sendo adicionado 100 µL da solução por orifício, e incubado overnight a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por 3 vezes com a solução de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20) e em seguida bloqueada com 200 µL de PBS contendo 5% de leite em pó Mólico® e 0,05% Tween 20 por 2 horas. Posteriormente, a placa foi lavada novamente com a solução de lavagem e depois foram acrescentados 100 µL dos soros diluídos 1:25 em solução de lavagem por poço e incubado por uma hora a temperatura ambiente.

Os poços foram lavados novamente por três vezes com solução de lavagem e depois foi acrescentado 100 µL por orifício de anti-IgM humano conjugado a peroxidase (Sigma®) diluído 1:5000 em PBS-T e incubado por uma hora a

temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem e posteriormente foi acrescentado 100 µl por orifício de uma solução de ortofenilenodiamina (Sigma®) preparada em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 4,5 acrescentado de 0,001% de H₂O₂. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em um leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) no comprimento de onda de 450 nm. Para todos os testes que realizamos com os peptídeos foi usado um ponto de corte (*cut-off*) calculado a partir da média das densidades ótica (D.O.) dos controles negativos (soros de indivíduos de áreas não endêmicas que nunca foram infectados pelo DENV) somado por 2 vezes o desvio padrão. Os valores iguais ou abaixo do ponto de corte foram classificados como negativos. Já os valores acima do ponto de corte foram classificados como positivos.

3.3.3 Teste imunoenzimático utilizando a vacina para febre.

Para o teste ELISA com o antígeno da febre amarela foram utilizados placas de ELISA de 96 poços (Maxisorp Nunc,® USA). Os 5 soros testados foram de indivíduos vacinados para febre amarela. A vacina para febre amarela foi diluída em 1:1000 em tampão carbonato (0,1M pH 9,6) e posteriormente utilizada para a sensibilização, sendo adicionado 100 µL da solução por orifício, e incubado overnight a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por 3 vezes com a solução de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween-20) e em seguida bloqueada com 200 µL de PBS contendo 5% de leite em pó Molico® e 0,05% Tween-20 por 2 horas. Após o período de incubação, a placa foi lavada com a solução de lavagem e em seguida foi acrescentado 100 µL dos soros diluídos 1:25 em solução de lavagem por poço e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Estes 5 soros foram obtidos de indivíduos saudáveis após 10-14 dias da vacinação para febre amarela. Os poços da placa foram lavados novamente por três vezes com solução de lavagem e posteriormente foi acrescentado 100 µL por orifício de anti-IgM humano conjugado a peroxidase (Sigma®) diluído 1:5000 em PBS contendo 0,05% Tween-20 e incubado por uma hora a temperatura ambiente.

A placa foi novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem e posteriormente foi acrescentado 100 µl por orifício do cromógeno ortofenilenodiamina (Sigma®) preparado em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 4,5 acrescentado de 0,001% de H₂O₂. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em um leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) no comprimento de onda de 450 nm. Para o cálculo do ponto de corte (*cut-off*) foi utilizado a média das densidades ótica (D.O.) dos controles negativos (soros de indivíduos que não vivem em área endêmica para febre amarela, que nunca foram infectados pelo *Vírus da febre amarela* ou vacinados para febre amarela) somado por 2 vezes o desvio padrão. Os valores iguais ou abaixo do ponto de corte foram classificados como negativos. Já os valores acima do ponto de corte foram classificados como positivos.

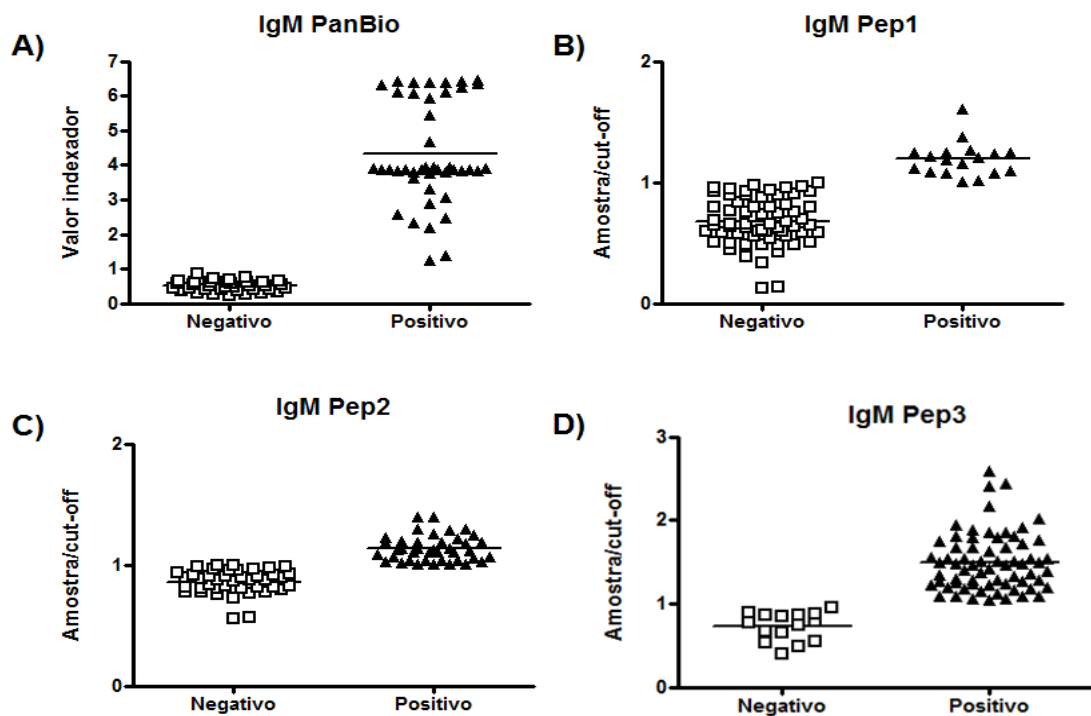
4 RESULTADOS

As 82 amostras de indivíduos suspeitos de dengue foram avaliadas pela técnica de ELISA para a detecção de IgM anti dengue pelo kit comercial Panbio, a fim de classificá-las como amostras positivas ou negativas. Desta forma, das 82 amostras testadas pelo kit Panbio, 43 (52%) amostras foram classificadas como positivas. Um total de 35 amostras (42,7%) foram classificadas como negativas e 4 amostras (4,9%) foram classificadas como duvidosas (FIGURA 5 A e TABELA 3).

Após a determinação das amostras de soro como positivas e negativas iniciou-se os ensaios imunoenzimáticos para avaliar a possível reatividade destas amostras com os peptídeos sintéticos. Entre os testes imunoenzimáticos que utilizaram os peptídeos sintéticos, o Pep1 apresentou apenas 18 resultados positivos (22%) e 64 amostras negativas (78%) (Figura 5 B e TABELA 3). Nos resultados alcançados com o Pep2 foi possível classificar 40 amostras como positivas (48,8%) e um total de 42 amostras foram classificadas como negativas (51,2%) (Figura 5 C e TABELA 3).

Por outro lado, o Pep3 apresentou maior número de resultados positivos entre todos os ensaios. Das 82 amostras utilizadas, 66 (80,5%) foram classificadas como positivas e apenas 16 amostras (19,5%) foram negativas (Figura 5 D e TABELA 3).

Figura 5 - Resultados dos testes ELISA utilizando o teste comercial Panbio IgM e os peptídeos sintéticos.



Legenda: A) Resultados do ensaio com o kit comercial Panbio IgM. Apenas as mostras classificadas como negativas (valor indexador < 0,9) e amostras positivas (valor indexador > 1,1) estão representadas na figura. As classificadas como duvidosas não foram incluídas. B) Razão D.O. da amostra/ valor de corte (cut-off), do ensaio com o peptídeo sintético Pep1. C) e D) Resultado do ensaio com Pep 2 e Pep 3 respectivamente.

Fonte: do autor.

Tabela 3 - Resultados dos testes ELISA para detecção de IgM pelo kit comercial Panbio e pelos imunoenaios que utilizaram os peptídeos Pep1, Pep2 e Pep3.

	Panbio IgM		Pep1		Pep2		Pep3	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Positivo	43	52,4	18	22	40	48,8	66	80,5
Negativo	35	42,7	64	78	42	51,2	16	19,5
Duvidoso	4	4,9	ND	-	ND	-	ND	-
Total	82	100	82	100	82	100	82	100

Legenda: N- número de amostras, ND – não determinado.

Fonte: do autor.

A concordância e discordância dos resultados positivos e negativos foram avaliadas entre os diferentes ensaios (Figura 6). Dentre as 82 amostras avaliadas pelo kit Panbio, apenas 4 amostras foram classificadas como duvidosas e desta forma foram eliminadas da análise de concordância e discordância de resultados. Assim, das 43 amostras detectadas como positivas por este teste comercial apenas 11 foram concordantes com as amostras positivas detectadas pelo Pep1, correspondendo a 25,6% (11/43) de concordância entre os dois ensaios. Mais expressivo foi o resultado entre o Pep2 e o kit Panbio chegando a uma concordância de 51,2% (22/43) entre as amostras positivas. Porém, o número de resultados positivos concordantes entre o kit Panbio e o Pep3 foi ainda maior, sendo 93% (40/43) das amostras positivas detectadas entre ambos os testes (TABELA 4).

Quanto à concordância dos resultados negativos entre os ensaios, 80% (28/35) das amostras negativas pelo kit Panbio também foram negativas para o Pep1. Os resultados negativos concordantes entre os ensaios Panbio e Pep2 foram cerca de 57% (20/35), já entre o Panbio e o Pep3 foi de 37,1% (13/35).

Tabela 4 - Concordância entre os resultados do teste Panbio e os resultados dos ensaios com os peptídeos sintéticos.

Resultados Panbio / Peptídeos	Nº de amostras concordantes	% do total ^a
Panbio ⁺ / Pep1 ⁺	11	25,6
Panbio ⁺ / Pep2 ⁺	22	51,2
Panbio ⁺ / Pep3 ⁺	40	93
Panbio ⁻ / Pep1 ⁻	28	80
Panbio ⁻ / Pep2 ⁻	20	57,1
Panbio ⁻ / Pep3 ⁻	13	37,1

Legenda: (a) classificado como positivo/negativo pelo kit Panbio.

Fonte: do autor.

A discordância entre os resultados do teste Panbio e os resultados dos ensaios com os peptídeos sintéticos também foi analisada (FIGURA 6 e TABELA 5). Das 43 amostras classificadas como positivas no ensaio Panbio, 32 foram negativas para o ensaio com o Pep1, totalizando 74,4% (32/43) de discordância dos resultados positivos entre os dois testes. Já a discordância dos resultados positivos do teste Panbio e o Pep2 foi de 48,8% (21/43). Apenas 7% (3/43) das amostras positivas

para o teste Panbio não foram classificadas como positivas para o ensaio com o Pep3.

Para os resultados classificados como negativos no teste Panbio, 20% (7/35) foram discordantes quando comparado aos resultados negativos do Pep1. Quanto ao Pep2 a discordância dos resultados negativos foi de 42,9% (15/35) e 62,9% quando comparado ao resultado negativos do ensaio com Pep3.

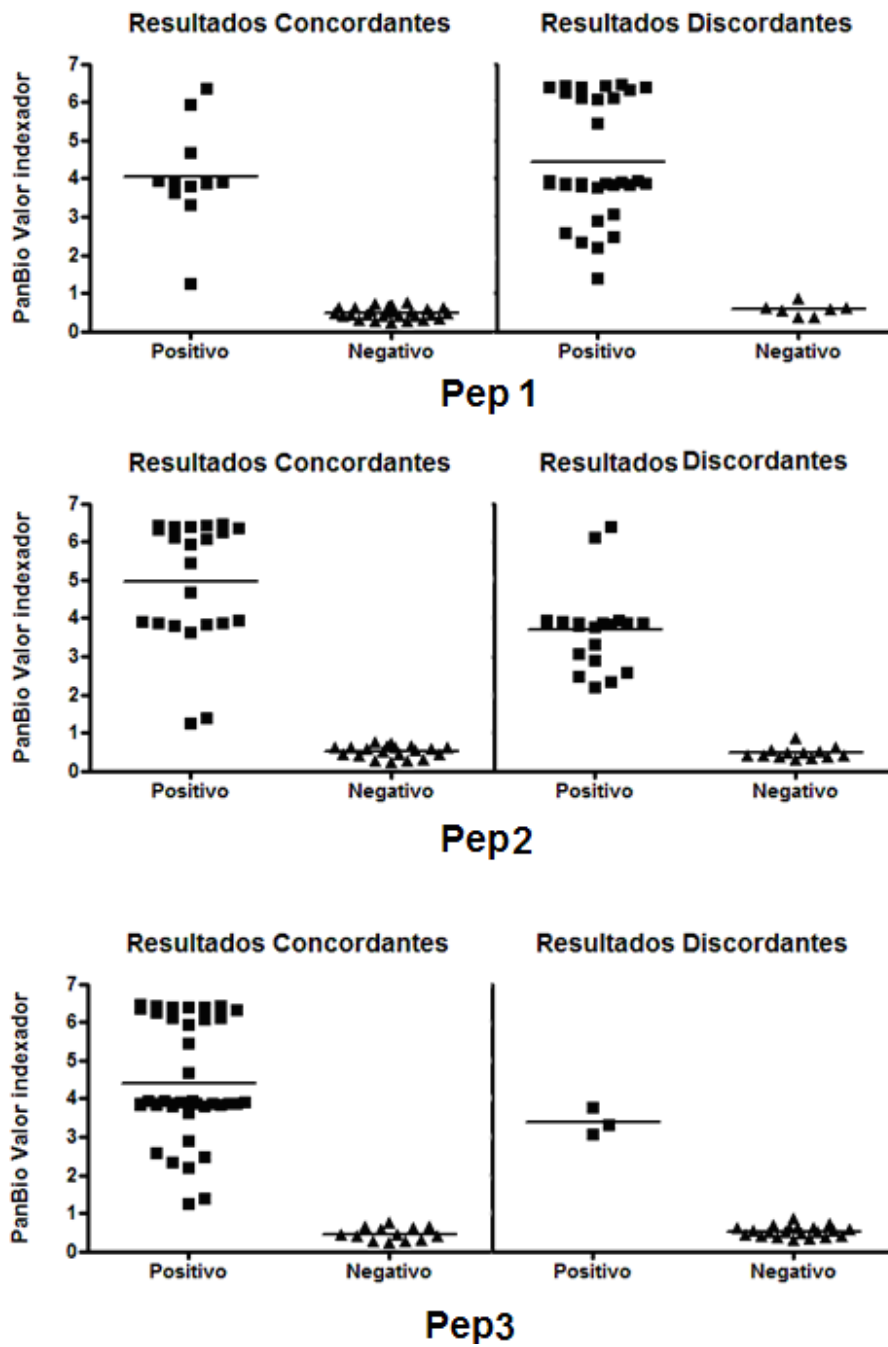
Tabela 5 - Discordância entre os resultados do teste Panbio e os resultados dos ensaios com os peptídeos sintéticos.

Resultados Panbio / Peptídeos	Nº de amostras discordantes	% do total ^a
Panbio ⁺ / Pep 1 ⁻	32	74,4
Panbio ⁺ / Pep 2 ⁻	21	48,8
Panbio ⁺ / Pep 3 ⁻	3	7
Panbio ⁻ / Pep 1 ⁺	7	20
Panbio ⁻ / Pep 2 ⁺	15	42,9
Panbio ⁻ / Pep 3 ⁺	22	62,9

Legenda: (a) classificado como positivo/negativo pelo kit Panbio.

Fonte: do autor.

Figura 6 - Concordância e discordância entre a detecção de IgM anti-DENV pelo teste PanBio IgM e os imunoenaios que utilizaram os peptídeos sintéticos Pep1; Pep2 e Pep3.



Fonte: do autor.

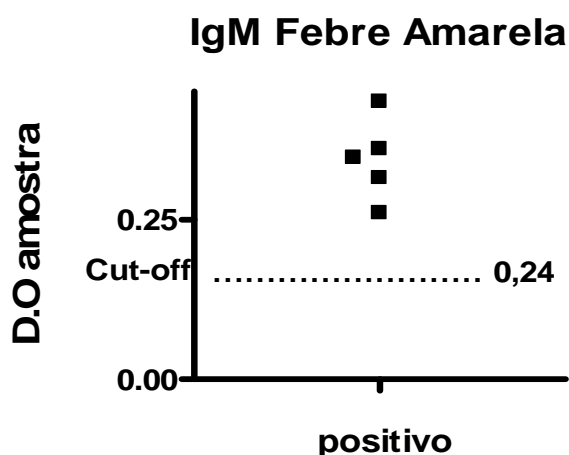
Com o objetivo de avaliar a reatividade dos peptídeos com amostras de soro positivas para outros *Flavivirus*, foram utilizadas cinco amostras IgM positivas para o *Vírus da Febre Amarela* obtidas de indivíduos saudáveis, vacinados para a febre amarela. Dentre as cinco amostras de soro de indivíduos vacinados para febre amarela, duas amostras foram classificadas como positivas para o teste imunoenzimático utilizando o Pep1, uma amostra foi positiva para Pep2 e duas amostras foram classificadas como positivas para o Pep3 (TABELA 6). O teste imunoenzimático utilizando a vacina para febre amarela como antígeno, confirmou a presença de IgM anti febre amarela em todos os cinco indivíduos vacinados (FIGURA 7).

Tabela 6 - Resultados dos testes ELISA pelos imunoenaios que utilizaram os peptídeos Pep1, Pep2 e Pep3 para detecção de IgM em amostras de soro de indivíduos vacinados para febre amarela.

	Pep1		Pep2		Pep3	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	2	40	1	20	2	40
Negativo	3	60	4	80	3	60
Total	5	100	5	100	5	100

Fonte: do autor.

Figura 7 - Resultados do testes imunoenzimático utilizando a vacina para febre amarela como antígeno



Fonte: do autor.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigado se existe reatividade entre os peptídeos sintéticos e amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue. Todas as amostras passaram por 4 ensaios imunoenzimáticos diferentes, todos estes com o objetivo de medir os níveis detectáveis de anticorpos da classe IgM anti-dengue ou IgM anti-peptídeos sintéticos.

A IgM é a classe de anticorpos mais evidente nos estágios iniciais da infecção, sendo importante no diagnóstico agudo da doença. Em geral, nos primeiros dias (entre o terceiro e o quinto dia após o início da febre), os níveis de anticorpos IgM anti-dengue já são detectáveis, diferentemente da resposta humoral da classe de anticorpo IgG que levam cerca de 9 a 10 dias para ser detectados em exames realizados com indivíduos que pela primeira vez foram infectados pelo vírus do dengue. Assim, na infecção primária a utilização de métodos que visam a detecção dos níveis de IgM é mais interessante por serem revelados mais inicialmente que os níveis de IgG, além disto, a detecção pode persistir por aproximadamente dois meses (DE PAULA; FONSECA, 2004).

O diagnóstico laboratorial deve sempre ser precedido por diagnóstico clínico para que evite ao máximo erro nos laudos, já que por mais preciso que sejam as análises e metodologias sorológicas nem sempre a especificidade e a sensibilidade do teste são capazes de detectar com exatidão os indivíduos infectados. Desta forma, todas as amostras aqui testadas foram de pacientes que vivem em áreas endêmicas, com sintomas clínicos semelhantes ao da dengue, e suspeitas de exposição.

Todos estes cuidados são de extrema importância para que haja maior segurança nos resultados, pois a reatividade sorológica cruzada pode ser vista entre os 4 sorotipos da dengue e ainda dentro do grupo Flavivírus como o *Vírus Encefalite Japonesa*, o *Vírus da encefalite do Murray Valley*, o *Vírus do Nilo Ocidental* e o *Vírus da Febre Amarela* (NODA et al., 2012).

Para evitar resultados com falsos positivos devido à reatividade cruzada com antígenos fora do grupo DENV, foi proposta a utilização de peptídeos encontrados em sítios da proteína do envelope (E) viral que são extremamente conservados entre os quatro sorotipos da DENV e ausentes nos outros Flavivirus. A proteína E é

responsável pela adesão do virion maduro à superfície celular como também pelo processo de fusão vírus-membrana celular. Esta proteína é considerada o maior alvo dos anticorpos neutralizantes anti-dengue (WHITEHEAD et al., 2007; MAZUMDER et al., 2007).

Nos estudos moleculares realizados por Mazumder e colaboradores (2007) por meio de ferramentas e métodos de bioinformática, foi possível identificar regiões específicas da proteína E conservadas dentro do grupo dos Flavivírus e principalmente entre os quatro sorotipos DENV. Além disto, a variabilidade entre os sorotipos que por meio da pressão seletiva exercida sobre o vírus, demonstrou que o DENV apresenta mutações específicas em certas regiões de seu genoma, especialmente concentradas na região que codifica a proteína E. Os resultados que estes pesquisadores obtiveram mostraram que o domínio III apresentou o maior grau de variabilidade genética. Estas informações corroboram com os estudos realizados por Modis e colaboradores (2005). Eles afirmam que os sítios de alta frequência de mutações capazes de escapar dos anticorpos neutralizantes estão localizados na superfície do domínio III da proteína E.

A identificação de regiões da proteína E que sejam conservadas entre os quatro sorotipos é imprescindível para a síntese de peptídeos que possam ser aplicados como vacinas, tratamentos e/ou usados no diagnóstico para a dengue. A vacina ideal para dengue deve induzir proteção contra os quatro sorotipos de DENV. A proteção contra somente um ou dois sorotipos é indesejável, pois pode aumentar o risco de desenvolvimento de FHD em infecções subsequentes por outros sorotipos. Assim, é indispensável que as vacinas para dengue devam conter uma mistura tetravalente de doses apropriadas de cada sorotipo, que possam induzir uma imunidade eficiente e duradoura contra os quatro sorotipos (WHITEHEAD et al., 2007). Da mesma forma, o uso de peptídeos de regiões conservadas é muito importante para o desenvolvimento de um diagnóstico sorológico, como no caso de ensaios do tipo ELISA, pois é possível identificar a presença de anticorpos anti-dengue independentemente do sorotipo infectante.

Desta forma, Mazumder e colaboradores (2007) por meio de análises computacionais conseguiram identificar algumas regiões conservadas e expostas da proteína E entre os quatro sorotipos de DENV que são prováveis candidatos ao desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e novas vacinas. Os seis principais sítios singulares da proteína E do DENV encontradas neste estudo (N37, Q211,

D215, P217, H244, K246) também são epítomos de células T, possuindo alta afinidade para a ligação à MHC classe II. O alinhamento das sequências de aminoácidos destas regiões indicou que existe pouca divergência de aminoácidos entre os quatro sorotipos. Devido às conformações que a proteína E apresenta nas diferentes etapas do ciclo viral, estas regiões podem estar expostas na forma de dímero ou trímero. Duas destas regiões (N37 e P217) estão expostas, tanto na forma de dímero quanto na de trímero. Já os dois sítios (Q211 e D215) estão expostos apenas no dímero. Enquanto os sítios (H244 e K246) são expostos apenas na forma de trímero.

Os aminoácidos enumerados de 1-52; 134-191 e 280-295 são pertencentes ao domínio I. No domínio II estão os aminoácidos 53-133, 192-394. Já o domínio III apresenta os aminoácidos que vão do 296 ao 394. Este domínio apresenta o maior número de regiões com alta variabilidade na sequência de aminoácidos. Assim, os sítios selecionados para a síntese de peptídeos são da região conservada do domínio I (N37) e principalmente do domínio II (Q211, D215, P217, H244 e K246) onde estão a maioria dos sítios conservados da proteína E.

Todos os peptídeos sintéticos usados no nosso trabalho, com base nos seis sítios altamente conservados encontrados a partir de ferramentas de bioinformática, foram capazes de reagir com os anticorpos de indivíduos naturalmente infectados pelo DENV. O peptídeo sintético Pep1 apresenta a região do sítio N37 do domínio I, enquanto o Pep2 apresenta em sua sequência a região que compreende os sítios Q211, D215 e P217, todos inseridos no domínio II. O Pep3 apresenta na sua sequência a região dos sítios H244 e K246 também pertencentes ao domínio II.

Comparando o desempenho dos ensaios ELISA realizados com os peptídeos sintéticos podemos notar que o Pep1 (representante da região do sítio N37 do domínio I) apresentou a capacidade de reagir com anticorpos IgM anti dengue de indivíduos infectados. Porém, foi o que obteve o menor número de resultados positivos entre os ensaios com os peptídeos sintetizados. Já os ensaios com os peptídeos com sítios do domínio II apresentaram melhores resultados. O ensaio com o Pep2 apresentou em números, detecção bem próxima daquela alcançada pelo teste comercial.

O ensaio com Pep3 foi o que apresentou melhor desempenho, seja pela concordância de 93% dos resultados positivos com o teste Panbio, seja pelo maior número de amostras classificadas como positivas em relação aos demais peptídeos

sintéticos e também por superar em 28% o número de resultados positivos em relação ao kit comercial Panbio.

Estas diferenças de reatividade entre o kit comercial e os peptídeos sintéticos, principalmente do Pep3, podem estar relacionadas à acessibilidade dos anticorpos aos epítomos da proteína E. Recentes estudos indicam que a resposta de anticorpos à infecção pelo DENV consiste em uma minoria de anticorpos neutralizantes e uma população mais diversa de anticorpos não neutralizantes com reatividade cruzada entre os quatro sorotipos (DE ALWIS et al., 2011; SCHIEFFELIN et al., 2010).

Apesar da alta especificidade dos antígenos usados nos testes com os peptídeos sintéticos, podem ocorrer eventuais reações inespecíficas com anticorpos IgM anti febre amarela, conforme demonstrado pelos ELISA que utilizaram amostras de soro IgM positivas para o *Vírus da febre amarela* (HOUGHTON-TRIVIÑO et al., 2008; VÁZQUEZ et al., 2003). Os resultados indicam que dentre as amostras IgM positivas para o vírus da febre amarela, apenas uma amostra reagiu com o Pep2 e duas amostras foram reagentes para o Pep1 e Pep3. Apesar de estes resultados demonstrarem a presença de reações cruzadas, deve-se levar em consideração que estas amostras são provenientes de indivíduos que vivem em área endêmica para dengue, e que podem apresentar anticorpos para esta doença, explicando assim a reação com estes peptídeos.

Assim é de se esperar que naturalmente existam anticorpos com diferentes afinidades pelo vírus ou por suas proteínas estruturais, especialmente a proteína E. Desta forma, apesar das diferenças entre os resultados obtidos com o kit comercial e os peptídeos sintéticos, é importante salientar que indivíduos naturalmente infectados com DENV possuem em seu soro, anticorpos que se ligam aos peptídeos testados, confirmando desta forma os dados descritos por Mazumder e colaboradores (2007) e reforçando o potencial de aplicação destes peptídeos para ensaios que visam o desenvolvimento de vacinas, tratamento e/ou diagnóstico da dengue.

Ainda existem dificuldades quanto à obtenção e produção em larga escala de antígenos adequados para o desenvolvimento de testes sorológicos para a dengue. Algumas dificuldades técnicas para isolar estes antígenos incluem a baixa produção em culturas de células. Um exemplo é a técnica de inoculação intracerebral em camundongos que permanece sendo utilizada apesar dos entraves quanto às

questões éticas devido ao uso de animais e também questões econômicas relativas ao alto custo deste procedimento (HONDA et al., 2012).

Atualmente, as ferramentas de bioinformática estão ganhando cada vez mais notoriedade nas pesquisas de desenvolvimento de vacinas e testes de diagnósticos das doenças infecciosas. Os programas de predição de epítomos têm apresentado importantes resultados nos estudos em que visam encontrar os determinantes antigênicos da superfície de microrganismos patogênicos, interessantes para a produção de resíduos sintéticos e expressão de peptídeos (HONDA et al., 2012). Estas regiões identificadas por estes programas podem posteriormente ser avaliadas em outros estudos quanto as suas propriedades imunogênicas e antigênicas, sendo assim, interessantes para criação de novas vacinas e a produção de antígenos com potencial uso em testes sorológicos (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2010; KHAN, 2006).

6. CONCLUSÃO

- A. Os três peptídeos sintéticos testados pela técnica de ELISA, apresentaram reatividade aos anticorpos IgM presentes no soro de pacientes naturalmente infectados.
- B. O ensaio com o Pep3 foi o que apresentou melhor desempenho, tendo 93% dos resultados positivos concordantes com o teste Panbio.
- C. Os resultados confirmam os dados obtidos por Mazumder e colaboradores.
- D. Os peptídeos sintéticos podem apresentar potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas vacinas, tratamentos e testes de diagnósticos.

REFERÊNCIAS

BABU, J. P. et al. Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 26, n. 36, p. 4655-4663, 2008.

BARREIRA, A. M. et al. Padronização e uso de um método imunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no diagnóstico rotineiro do dengue. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 268-271, 2010.

BEASLEY, D. W. C; BARRETT, A. D.T. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 13097-13100, 2002.

BOLLATI, M. et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral research**, v. 87, n. 2, p. 125-148, 2010.

CAHOUR, A.; FALGOUT, B.; LAI, C.; Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B-NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease. **Journal of Virology**, v. 66, n. 3, p. 1535-1542, 1992.

CHANG, H. H. et al. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): Arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 6, 186 p. 743-751, 2002.

CHUA K.B., et al. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. **Malaysian Journal Pathology**. V.33, n.1,p.13–20, 2011.

CHUANG, Y.C. et al. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2013.

CLYDE K, KYLE JL, HARRIS E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology** ; v.80, n.23, p11418-31, 2006.

DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 6, p. e1188, 2011.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.8,n.6,2004.

DEEN, J. L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **The Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-173, 2006.

DOS SANTOS, F. B. et al. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 2, p. 144-152, 2004.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 65, n.5, p.2467-2475, 1991.

FERREIRA, W.A. & ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

GAN, V. C. et al. Implications of Discordance in World Health Organization 1997 and 2009 Dengue Classifications in Adult Dengue. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60946, 2013.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.

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

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

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

HADINEGORO, S.R. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified?. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. s1, p. 33, 2012.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HALSTEAD, S.B. Dengue: The Syndromic Basis to Pathogenesis Research. Inutility of the 2009 WHO Case Definition. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 212, 2013.

HALSTEAD, B.; ROJANASUPHOT, S; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 1, p. 154-156, 1983.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 63-97, 2003.

HIRAYAMA T. et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2047-2052, 2012.

HOLBROOK, M. R.; SHOPE, R. E.; BARRETT, A. D. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4101-4110, 2004.

HOLMES, E C. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 307-328, 2008.

HONDA, E. R. et al. Design and heterologous expression of dengue virus envelope protein (E) peptides and their use for serological diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 186, p. 55-61, 2012.

HORSTICK, O. et al. Reviewing the development, evidence base, and application of the revised dengue case classification. **Pathogens and global health**, v. 106, n. 2, p. 94, 2012.

HOUGHTON-TRIVIN, et al. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. **Rev. salud pública, Bogotá** , v. 10, n. 2, May 2008 .

JARMAN, R. G., et al. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v.84, n.2, Feb, p.218-23, 2011.

JEFFERY, J A L et al. Water Level Flux in Household Containers in Vietnam-A Key Determinant of Aedes aegypti Population Dynamics. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39067, 2012.

JOHN, L. S; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, 2013.

KHAN, A. et al. Large-scale analysis of antigenic diversity of T-cell epitopes in dengue virus. **BMC bioinformatics**, v. 7, n. Suppl 5, p. S4, 2006.

KIERMAYR, S., et al. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. **Journal of virology**, v. 78, n. 15, p. 8078-8084, 2004.

KITTIGUL L, et al. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology** v. 39, p.76-81,2007.

KOFLER, R. M. et al. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. **Journal of virology**, v. 76, n. 7, p. 3534-3543, 2002.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, 2002.

KUNO, G. et al. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 2, p. 279, 1985.

LENG, C. et al. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 288-295, 2009.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields Virology**, v. 1, p. 991-1041, 2001.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, D.B.; THIEL; H-J.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their Replication. **Fields Virology**. p.1101-1152, 2007.

LIU, W. J.; CHEN, H. B; KHROMYKH, A. A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 77, n. 14, p. 7804-7813, 2003.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5480-5491, 2002

LOZACH, P. Y et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

MAEDA, A; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **The Veterinary Journal**, v. 195, p 33 – 40, 2012.

MARTINA, B. E; KORAKA, P; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MAZUMDER R., et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. **Virus Genes** v.35, p. 175-186, 2007.

MCBRIDE, W J; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1041-1050, 2000.

MEDIN, C. L.; FITZGERALD, K. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **Journal of virology**, v. 79, n. 17, p. 11053-11061, 2005.

MIDGLEY, C. M. et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 1, p. 410-421, 2011.

MODIS Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature** v.427, p. 313–319, 2004.

MODIS, Y., et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology** 79, 1223–1231, 2005.

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

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, 2013.

NODA, M. et al. Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against Dengue virus capsid protein among four serotypes. **Biologics: targets & therapy**, v. 6, p. 409, 2012.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415-415, 2013.

NUNES, M R T et al. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858, 2013.

OLIVEIRA, A. S. D., et al. Diagnóstico laboratorial da dengue: situação atual e perspectivas; Dengue laboratory diagnosis: actual situation and perspectives. **Revbras. anal. clin**, v. 43, n. 2, p. 125-130, 2011.

OISHI K., SAITO M., MAPUA C.A, NATIVIDAD F.F. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **J Infect Chemother**. v. 13, p.125-133, 2007.

PEELING, R W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S30-S37, 2010.

PERERA, R; KUHN, R J. Structural proteomics of dengue virus. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. **Virology**, p. 931-960, 1996

RIGAU-PEREZ J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet** v.352, p. 971-977, 1998.

RODENHUIS-ZYBERT, I A.; WILSCHUT, J; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010.

SÁNCHEZ-BURGOS, Gilma et al. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. **Virus research**, v. 153, n. 1, p. 113-120, 2010.

SCHIEFFELIN, J. S. et al. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. **Virology**, v. 7, n. 28, p. 1-11, 2010.

SHU, P.Y; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642-650, 2004.

SHUKLA, J., et al. Cloning and expression of domain III of the envelope gene of Japanese encephalitis virus: evaluation for early clinical diagnosis by IgM ELISA. **Journal of Virological Methods**, v. 158, n. 1, p. 165-170, 2009.

SINGHI, S; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. S22-S35, 2007.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of general virology**, v. 87, n. 10, p. 2755-2766, 2006.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 895-907, 2012.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A.; SHEPARD, D. S. Use of expansion factors to estimate the burden of dengue in Southeast Asia: a systematic analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 2, p. e2056, 2013.

URBANOWSKI, M. D.; ILKOW, S.; HOBMAN, T. C. Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins. **Cellular signalling**, v. 20, n. 7, p. 1227-1236, 2008.

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

WAHALA, W. M. P. B. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103-113, 2009.

WATTS D.M., et al. Evaluation of *Toxorhynchites splendens* (Diptera:Culicidae) as a bioassay host for dengue viruses . **Journal of Medical Entomology** 1v.9 p.54 – 59, 1982.

WHITEHEAD, Stephen S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WILDER-SMITH, A. K. et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Global Health Action**, v.5. 2012.

WILDER-SMITH, A; SCHWARTZ, E. Dengue in travelers. **New England journal of medicine**, v. 353, n. 9, p. 924-932, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). DENGUE: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition. WHO, Geneva, Switzerland, 2009.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

ZIDANE, N., et al. Cross-reactivities between human IgMs and the four serotypes of dengue virus as probed with artificial homodimers of domain-III from the envelope proteins. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 302, 2013.

ANEXO A – SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo	Abreviação
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr, The	T
Cisteína	Cys, Cis	C
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys, Lis	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp, Tri	W
Metionina	Met	M

ANEXO B – TABELA DE RESULTADOS DOS TESTES ELISA

Amostra Código	Panbio	Valor Indexador	Pep1	D.O	Pep2	D.O	Pep3	D.O
ANA C.	Negativa	0,641	Negativa	0,428	Negativa	0,406	Negativa	0,358
226	Positiva	2,348	Negativa	0,409	Negativa	0,341	Positiva	0,479
282	Positiva	3,911	Positiva	0,724	Positiva	0,457	Positiva	0,678
342	Positiva	3,875	Positiva	0,786	Positiva	0,533	Positiva	0,968
469	Positiva	2,197	Negativa	0,445	Negativa	0,393	Positiva	0,562
414	Positiva	3,627	Positiva	0,697	Positiva	0,443	Positiva	0,576
59	Positiva	3,845	Negativa	0,477	Negativa	0,419	Positiva	0,478
9	Positiva	3,876	Negativa	0,388	Positiva	0,440	Positiva	0,428
435	Negativa	0,627	Positiva	0,784	Positiva	0,498	Positiva	0,752
99	Negativa	0,613	Negativa	0,418	Negativa	0,387	Positiva	0,505
403	Positiva	3,945	Negativa	0,581	Negativa	0,410	Positiva	0,582
413	Positiva	3,851	Negativa	0,515	Negativa	0,399	Positiva	0,623
391	Positiva	1,263	Positiva	0,810	Positiva	0,451	Positiva	0,912
41	Positiva	3,792	Positiva	0,806	Positiva	0,614	Positiva	0,897
394	Negativa	0,549	Positiva	0,751	Positiva	0,523	Positiva	0,673
496	Positiva	3,852	Negativa	0,396	Positiva	0,547	Positiva	0,690
408	Positiva	3,936	Negativa	0,484	Negativa	0,365	Positiva	0,409
431	Negativa	0,633	Positiva	0,655	Negativa	0,397	Positiva	0,555
56	Positiva	2,889	Negativa	0,515	Negativa	0,384	Positiva	0,464
392	Negativa	0,620	Negativa	0,382	Negativa	0,333	Negativa	0,280
179	Positiva	3,941	Positiva	0,703	Positiva	0,450	Positiva	0,725
417	Positiva	3,857	Negativa	0,633	Negativa	0,431	Positiva	0,494
396	Negativa	0,727	Negativa	0,452	Negativa	0,431	Positiva	0,406
256	Positiva	2,467	Negativa	0,711	Negativa	0,394	Positiva	0,321
81	Positiva	3,329	Positiva	0,380	Negativa	0,354	Positiva	0,449
142	Positiva	3,812	Negativa	0,621	Negativa	0,393	Positiva	0,678
493	Positiva	3,873	Negativa	0,215	Negativa	0,248	Positiva	0,444
360	Negativa	0,636	Negativa	0,323	Negativa	0,341	Negativa	0,293
390	Positiva	3,869	Negativa	0,598	Negativa	0,403	Positiva	0,625
426	Negativa	0,872	Positiva	0,701	Positiva	0,455	Positiva	0,554
466	Duvidosa	0,919	Negativa	0,582	Positiva	0,486	Positiva	0,656
67	Positiva	3,784	Negativa	0,358	Negativa	0,386	Negativa	0,292
103	Positiva	3,861	Negativa	0,376	Negativa	0,352	Positiva	0,396
207	Negativa	0,612	Negativa	0,598	Negativa	0,356	Positiva	0,553
269	Positiva	3,879	Positiva	0,661	Negativa	0,379	Positiva	0,652
254	Positiva	3,917	Negativa	0,421	Negativa	0,338	Positiva	0,395
295	Positiva	3,065	Negativa	0,410	Negativa	0,343	Negativa	0,336
409	Positiva	2,581	Negativa	0,591	Negativa	0,404	Positiva	0,406
100	Negativa	0,589	Negativa	0,404	Negativa	0,317	Negativa	0,326
448	Negativa	0,584	Positiva	1,041	Negativa	0,438	Positiva	0,547

Panbio - Valor indexador: < 0,9 = negativo; 0,9 -1,1 = duvidoso; > 1,1 = positivo

Pep1 Cut-off (Ana C. ao 488): 0,648

Pep2 Cut-off (Ana C. ao 488): 0,438

Pep3 Cut-off (Ana C. ao 488) : 0,373

(Continuação)

Amostra número	Panbio	Valor Indexador	Pep1	D.O	Pep2	D.O	Pep3	D.O
13	Duvidosa	1,074	Negativa	0,496	Positiva	1,188	Positiva	0,978
19	Negativa	0,304	Negativa	0,451	Positiva	1,231	Positiva	0,688
24	Negativa	0,455	Negativa	0,4745	Negativa	0,918	Negativa	0,336
61	Positiva	4,681	Positiva	0,60975	Positiva	1,318	Positiva	1,193
65	Positiva	6,386	Negativa	0,486	Positiva	1,367	Positiva	0,932
82	Negativa	0,389	Positiva	0,64	Positiva	1,127	Positiva	0,951
86	Positiva	6,339	Negativa	0,1995	Positiva	1,175	Positiva	0,749
120	Negativa	0,410	Negativa	0,252	Negativa	0,910	Negativa	0,429
145	Positiva	6,114	Negativa	0,2595	Positiva	1,194	Positiva	1,134
161	Positiva	6,114	Negativa	0,3045	Negativa	0,923	Positiva	0,822
201	Duvidosa	0,978	Negativa	0,3905	Negativa	1,070	Positiva	0,957
203	Negativa	0,508	Negativa	0,392	Positiva	1,261	Positiva	0,881
205	Negativa	0,457	Negativa	0,2495	Negativa	0,984	Negativa	0,349
206	Negativa	0,255	Negativa	0,33625	Negativa	0,894	Negativa	0,418
207	Negativa	0,225	Negativa	0,4895	Negativa	0,915	Negativa	0,547
213	Negativa	0,255	Negativa	0,481	Negativa	1,077	Negativa	0,543
214	Duvidosa	1,037	Negativa	0,305	Positiva	1,563	Positiva	1,215
227	Negativa	0,393	Negativa	0,4105	Positiva	1,449	Positiva	1,093
290	Positiva	5,455	Negativa	0,511	Positiva	1,321	Positiva	0,800
328	Positiva	6,435	Negativa	0,2475	Positiva	1,140	Positiva	0,772
330	Positiva	6,384	Negativa	0,249	Negativa	1,088	Positiva	0,708
351	Positiva	6,433	Negativa	0,2875	Positiva	1,155	Positiva	0,807
364	Negativa	0,436	Negativa	0,3445	Negativa	1,114	Positiva	0,658
382	Positiva	5,955	Positiva	0,6365	Positiva	1,404	Positiva	0,975
385	Negativa	0,689	Negativa	0,3655	Positiva	1,324	Positiva	1,038
393	Negativa	0,500	Negativa	0,2745	Positiva	1,327	Positiva	1,061
400	Positiva	6,463	Negativa	0,419	Positiva	1,232	Positiva	0,875
406	Positiva	6,084	Negativa	0,228	Positiva	1,322	Positiva	1,179
418	Positiva	6,354	Positiva	0,647	Positiva	1,432	Positiva	1,380
427	Negativa	0,523	Negativa	0,3025	Negativa	1,017	Positiva	0,780
430	Negativa	0,421	Negativa	0,2615	Positiva	1,253	Positiva	0,901
436	Positiva	1,380	Negativa	0,3355	Positiva	1,271	Positiva	0,956
437	Negativa	0,306	Negativa	0,3045	Negativa	0,627	Negativa	0,315
441	Negativa	0,391	Negativa	0,0665	Positiva	1,234	Negativa	0,785
442	Negativa	0,472	Negativa	0,2205	Positiva	1,452	Positiva	0,866
443	Negativa	0,742	Negativa	0,4265	Negativa	0,929	Negativa	0,251
460	Negativa	0,489	Negativa	0,0685	Positiva	1,249	Positiva	0,887
492	Positiva	6,384	Negativa	0,3255	Positiva	1,161	Positiva	0,744
OS	Positiva	6,265	Negativa	0,386	Positiva	1,212	Positiva	0,742
RRA	Negativa	0,546	Negativa	0,461	Negativa	1,077	Positiva	0,813
MAF	Negativa	0,325	Negativa	0,406	Positiva	1,120	Positiva	0,807
MPBR	Negativa	0,378	Positiva	0,707	Positiva	1,272	Positiva	0,977

Panbio - Valor indexador: < 0,9 = negativo; 0,9 -1,1 = duvidoso; > 1,1 = positivo

Pep1 Cut-off (13 ao MPBR): 0,512

Pep2 Cut-off (13 ao MPBR): 1,116

Pep3 Cut-off (13 ao MPBR): 0,633

(conclusão)

