

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Paulo Anselmo Nunes Felipe

**“PESQUISA DE ANTICORPOS REATIVOS COM ANTÍGENOS VIRAIS
DA DENGUE E DA FEBRE AMARELA EM SANGUE DE SÍMIOS DE
ÁREAS URBANAS”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Imunologia.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>PAULO ANSELMO NUNES FELIPE</u> e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>[Assinatura]</u>

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

Campinas
2005

Felippe, Paulo Anselmo Nunes

Pesquisa de anticorpos reativos com antígenos virais da dengue e da febre amarela em sangue de símios de áreas urbanas/Paulo Anselmo Nunes

Felippe. Campinas, SP:[s.n.], 2005.

67fls:ilus

Orientador: Paulo Maria Ferreira de Araújo

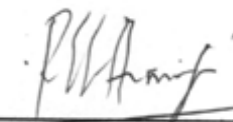
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. dengue. 2. febre amarela. 3. *Cebus apella*. 4. anticorpos naturais. I. Araújo, Paulo Maria Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 15 de setembro de 2005

Banca Examinadora

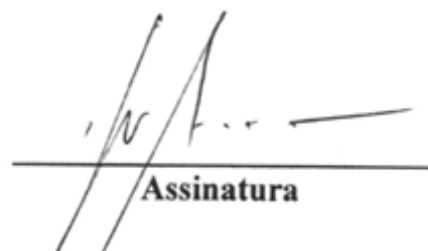
Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo


Assinatura

Profa. Dra. Clarice Weis Arns


Assinatura

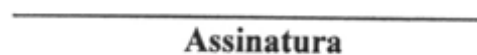
Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'ana


Assinatura

Prof. Dr. Rovilson Gilioli


Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado


Assinatura

RESUMO

Com o objetivo de verificar a existência de anticorpos reativos aos antígenos virais da dengue e da febre amarela no sangue de macacos prego (*Cebus apella*) cativos no Brasil, procedeu-se a coleta de sangue de 227 animais, oriundos de 17 cidades, (concentradas nas regiões sul e sudeste) de 4 estados do Brasil, no período compreendido entre os anos de 2000 e 2001. Para tanto realizamos o teste de inibição da hemaglutinação e também padronizamos um ELISA indireto utilizando um conjugado comercial. O teste de Inibição da Hemaglutinação não detectou nenhuma reatividade dos soros estudados frente aos antígenos da dengue (DEN I, DEN II). Encontramos, no teste de ELISA, uma reatividade de cerca de 97 % das amostras ao DEN I; 68% ao DII, 74% ao DEN III e 81% a febre amarela (FA). Não observamos diferenças estatisticamente significativas de reatividade entre machos e fêmeas, porém a observamos entre animais adultos e velhos para DEN I e FA. Os soros previamente tratados com a extração pela acetona, utilizada no teste de inibição da hemaglutinação apresentaram uma significativa perda de reatividade quando testados de forma pareada com amostras não tratadas ao ELISA indireto. Os resultados encontrados não são compatíveis com a epidemiologia da dengue e da febre amarela no Brasil, uma vez que primatas oriundos de dois estados da federação onde sabidamente não havia a transmissão por ocasião da coleta apresentaram uma reatividade importante, o que sugere a existência de anticorpos naturais reagentes aos antígenos virais pesquisados e aponta no sentido de que estes possam ter alguma importância na resistência destes primatas a estas enfermidades.

ABSTRACT

With the objective to verify the existence of reactive antibodies to viral antigens to dengue and yellow fever in the blood of capuccin monkeys (*Cebus apella*) captive in Brazil, it was proceeded collection from blood of 227 deriving animals of 17 cities (concentrate in south and southeast regions) of 4 states of the federacy in the understood period enters the years of 2000 and 2001. For in such a way we carry through the test of Hemagglutination Inhibition and also we standardize an indirect ELISA using one commercial conjugate. The test of Hemagglutination Inhibition did not detect reactivity of the studied seruns front to studied antigens of the dengue (DENI, DEN II). We find, in the test of ELISA, a reactivity of about 97 % of the samples to DEN I; 68% to the DII, 74% to DEN III and 81% the yellow fever (FA). We do not observe statistical significant differences of reactivity between males and females, however we observe it between adult and old animals for DEN I and FA. The seruns previously treated with the extraction for acetone, used in the test of Hemagglutination Inhibition had presented a significant loss of reactivity when tested bodily with samples not treated to the indirect ELISA. The results are not compatible with the epidemiology of the dengue and of the yellow fever in Brazil, a time that deriving primates of two states of the federacy where knew did not have the transmission for occasion of the collection had presented an important reactivity, what it suggests the existence of reacting natural antibodies to viral antigens searched and points in the direction of that these can have some importance in the resistance of these primates to these diseases.

**Ao meu filho Felipe por ter
me ensinado tanto nestes 11
anos em que somos amigos.**

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Paulo Maria Ferreira Araújo meu orientador e amigo não só pela paciência e pelo tempo gasto comigo, mas também pela sua dedicação em ensinar e preocupação com a ética na ciência e utilização do recurso público.
- A Organização Panamericana de Saúde/Ministério da Saúde, através do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*, pelo financiamento para realização deste trabalho.
- A amiga Célia Aparecida Almeida Chaves Garcia pela ajuda, paciência e apoio irrestrito em todas as fases desta pesquisa.
- A minha amiga e companheira de trabalho Eliana Ferraz Santos, pelo apoio, estímulo e ajuda em todas as etapas da consecução deste estudo.
- Ao Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos pelo valioso fornecimento dos antígenos necessários para este trabalho.
- Aos dirigentes, responsáveis e funcionários dos Zoológicos, Parques ou Bosques das diferentes cidades que abrigam os macacos prego (*Cebus apella*) envolvidos neste trabalho: Brusque/SC - Cachoeira do Sul/RS - Camboriú/SC - Campinas/SP - Itatiba/SP - João Pessoa/PB - Jundiaí/SP - Leme/SP - Paulínia/SP - Piracicaba/SP - Pomerode/SC - Santa Bárbara D'Oeste/SP - São José do Rio Preto/SP - São Paulo/SP - São Vicente/SP - Sapucaia do Sul/RS - Sumaré/SP.
- Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos - SVTA do Instituto Adolfo Lutz.
- Ao Adolfo Lutz Campinas, na pessoa da Dra. Vânia Del'Guercio, pelo fornecimento de alguns controles.
- Aos colegas de laboratório Marcelo (bolinho) e Thomas pela ajuda e apoio.
- Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, José Raimundo, Rose, Dirce e Lúcia que montam uma rede de ajuda viabilizando de forma simples e eficiente vários dos trabalhos de pesquisa do Departamento, representando uma fonte de integração entre os vários laboratórios.
- Ao Sr. Antônio e Dna. Sônia pela paciência e pelo sorriso.
- Para todos os animais que fizeram parte deste estudo, meus votos de extremo respeito e consideração.

SUMÁRIO

1- Introdução	1-15
2- Objetivos	16
3- Materiais e Métodos.....	17-24
2.1- Levantamento Populacional e Autorizações.....	17
2.2 – Primata.....	17
2.2.1 – Área de Estudo.....	17
2.2.2 – Contenção Química dos Animais.....	19
2.2.3 – Coleta de Sangue e Obtenção do Soro.....	20
2.3 – Exames Prévios dos Soros de <i>Cebus apella</i>	21
2.3.1 – Prova de Inibição da Hemaglutinação.....	21
2.4 – Padronização do Teste de ELISA para <i>Cebus apella</i>	21
2.4.1 – Imunização dos Macacos Prego.....	21
2.4.2 – Teste dos antisoros obtidos na imunização.....	22
2.4.3 – Determinações das concentrações protéicas.....	22
2.4.4 – Padronização do Teste de ELISA para um conjugado comercial.....	22
2.5 – Teste imunenzimático (ELISA).....	23
2.5.1 – Roteiro Técnico.....	23
2.5.2 – Protocolo de teste das amostras.....	24
4- Resultados.....	25-40
3.1 – Teste de Inibição da Hemaglutinação.....	25
3.2 – Controle das Imunizações dos Macacos Prego.....	25
3.3- Viabilidade de utilização de Conjugado Comercial.....	25
3.4- Teste Imunoenzimático das 256 Amostras de Macacos Prego.....	26
5- Discussão.....	41-47
6- Conclusões.....	48
7- Referências Bibliográficas.....	49-60
8- Apêndice.....	61-66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Macaco prego sendo contido antes do procedimento anestésico, para a coleta do tecido sangüíneo e tatuagem.....	19
Figura 2 - Macaco prego (<i>Cebus apella</i>) anestesiado e tatuado.....	20
Figura 3 - Densidades ópticas obtidas com os controles positivos (soros de macacos imunizados) contra a soroalbumina bovina, revelados com o conjugado <i>Anti-monkey</i> e dos controles negativos.....	26
Figura 4 - Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macaco prego e os respectivos controles negativos, para DEN I no teste de ELISA.....	27
Figura 5 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macaco prego e seus respectivos controles negativos, para DEN I, no teste de ELISA.....	27
Figura 6 - Distribuição de freqüência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN I.....	28
Figura 7 - Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macacos prego e os respectivos controles negativos, para DEN II no teste de ELISA.....	28
Figura 8 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para DEN II, no teste de ELISA.....	29
Figura 9 - Distribuição de freqüência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN II.....	29
Figura 10 - Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macaco prego e os respectivos controles negativos, para DEN III no teste de ELISA.....	30
Figura 11 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para DEN III, no teste de ELISA.....	30
Figura 12 - Distribuição de freqüência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN III.....	31
Figura 13 - Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macacos prego e os respectivos controles negativos, para FA no teste de ELISA.....	31
Figura 14 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para FA, no teste de ELISA.....	32

Figura 15 - Distribuição de freqüência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para FA.....	32
Figura 16 - Freqüências de reatividade frente aos antígenos pesquisados dentre os soros de macacos prego jovens, adultos e senis, frente ao teste imunoenzimático.....	34
Figura 17 - Média das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros reativos de macacos prego oriundos de áreas com transmissão e sem de dengue e febre amarela.....	35
Figura 18 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN I.....	36
Figura 19 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN II.....	36
Figura 20 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN III.....	37
Figura 21 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para FA.....	37
Figura 22 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da DEN I.....	38
Figura 23 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno DEN II.....	39
Figura 24 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da DEN III.....	39
Figura 25 - Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da FA.....	40

1- INTRODUÇÃO

A interação do homem com os microrganismos foi possivelmente um fator chave na evolução, cultura e civilização humana. Evidências do efeito das doenças desde os primórdios da humanidade, da pré-história, até o presente sugerem que os tipos de vírus associados com o homem mudaram com o tempo; a população humana progrediu tecnologicamente, aumentou em número e densidade e como consequência um grande número destes microrganismos encontraram condições para estabelecer associações com esta. A doença como castigo das divindades prevaleceu durante séculos na crença das populações. Dos gravames e afrontas provocados pelo homem originavam-se as iras dos Deuses que, no seu desforço, dizimavam as massas com epidemias. A Ilíada deixou-nos uma imagem plena de objetividade dos danos nos acampamentos gregos exterminados pela peste. Homero salientou o valor da punição desferida pelos gênios, relacionou causa e efeito e profetizou a indispensabilidade da humildade e contrição humana como condição primeira e imprescindível à quietação dos Deuses (ANDERSON & MAY, 1979 a,b, 1991; BRAZ, 1980; ZANOTO & LEAL, 2000).

Embora nem todos os vírus causem doença, com a presente situação de superpopulação, pobreza e desequilíbrio ecológico, estes podem ter efeitos devastadores no progresso humano. Recentemente doenças emergentes e reemergentes causam pandemias massivas como, por exemplo, a AIDS e a dengue e tem promovido mudanças formidáveis podendo, até mesmo, provocar um impacto direto na continuidade de nossa espécie (LEAL & ZANOTO, 2000).

As questões relacionadas com as viroses, emergentes e reemergentes são complexas, porém pode-se reconhecer que, em sua maioria, essas doenças são desencadeadas por atividades humanas que modificam o meio ambiente, em especial, pela pressão demográfica. A necessidade de vetores para a transmissão, de várias destas, introduz fatores ecológicos de importância na discussão que se efetiva nos países de clima tropical, além disso, observamos que os mecanismos de mutação e recombinação genéticas, em particular, dos vírus RNA, são conhecidos de longa data como forma de geração de novos padrões genômicos para estes agentes (SCHATZMAYR, 2001).

O gênero *Flavivirus*, da família de mesmo nome tem como precursor o vírus da febre amarela (*flavus* = amarelo); possui cerca de 70 vírus sendo estes, em sua maioria, relacionados à transmissão por artrópodes (arbovírus), onde podemos citar alguns conhecidos como agentes etiológicos de importantes agravos à saúde no homem, tais como a Dengue, *West Nile*, Rocio e encefalite São Luis (WHO, 1998a; VASCONCELOS, 2002).

O vírus da Febre Amarela possui um genoma composto por RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade positiva, com cerca de onze kilobases de comprimento e 10.800 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos. O vírion mede cerca de 25 a 30 nm de diâmetro e está envolvido por um envelope que tem por origem a célula hospedeira. A partícula íntegra (vírion e envelope) mede cerca de 40 nm. O RNA viral expressa sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) e três proteínas estruturais, prM (*membrane protein*), C (*core protein*) e E (*envelope protein*) (VASCONCELOS, 2002, 2003).

Estudos filogenéticos mostraram a existência de sete genótipos do vírus, sendo cinco deles encontrados na África e dois nas Américas. Até recentemente desconhecia-se a sua origem, persistindo a dúvida referente ao seu surgimento na África ou nas Américas, porém, pesquisas utilizando ferramentas moleculares indicaram a procedência africana, uma vez que os vírus americanos perderam parte de uma seqüência repetitiva na região não codante 3' do genoma, o que não ocorre nas cepas africanas, inclusive na 17D (utilizada na vacina); o que de certa forma encerra a polêmica sobre a origem deste vírus (WHO, 1998b, 1999; VASCONCELOS, 2002, 2003).

A Febre Amarela é uma doença infecciosa, não contagiosa transmitida ao homem mediante a picada de insetos hematófagos, após um período de incubação extrínseco (para que o vírus reproduza em seus tecidos). A enfermidade ocorre sobre duas modalidades epidemiológicas: silvestre e urbana, com uma forma de transição dentre elas. A diferença entre as mesmas está na natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados. A letalidade global, deste agravo à saúde está compreendida entre 5 a 10%, porém dentre os casos que evoluem para as formas graves da doença (síndrome íctero-hemorrágica e hepato-renal) esta pode chegar a 50%. A Febre Amarela urbana foi eliminada do Continente Americano desde 1942, mas ainda hoje é reportada na África, sendo estes os dois continentes endêmicos para a arbovirose em epígrafe. Entre os anos de 1970 e 2001

foram notificados 4.543 casos da enfermidade na América do Sul, sendo destes 51,5% no Peru, 20,1% na Bolívia e 18,7% no Brasil. No mundo, estima-se que cerca de 200.000 pessoas são acometidas pela febre amarela ao ano, com cerca de 30.000 óbitos. Esta zoonose não pode ser erradicada, mas segundo a Organização Mundial de Saúde pode ser prevenida através da vacinação deca-anual pela cepa 17D do vírus causador da febre amarela (WHO, 1998a; VASCONCELOS, 2003).

O agente etiológico da dengue possui uma estrutura esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro, dotado de um RNA de fita simples dentro de um nucleocapsídeo envolto por um envelope lipoprotéico. São conhecidos quatro sorotipos: DEN I, II, III e IV. Seu RNA tem aproximadamente 10.700 bases em extensão, que contém uma simples região de *open reading frame* (ORF), que codifica três proteínas estruturais; designadas C (*core protein*), M (*membrane protein*) e E (*envelope protein*); e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que por sua vez são flanqueadas por uma região não codante (NTR – *nontranslated region*) (CHAMBERS et al, 1990, LINDENBACH & RICE, 2001). A prevalência de todos os 4 sorotipos tem aumentado dramaticamente nestes últimos anos, e está acompanhada por um aumento de diversidade genética dentro de cada um deles (TWIDDY et al, 2003).

O sequenciamento parcial de várias regiões do genoma do vírus da dengue tem sido empregado para determinar a variação genética e para caracterizar o genótipo de cada sorotipo, este tem representado uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos moleculares que acabam por monitorar a distribuição dos genótipos circulantes em áreas endêmicas (SANTOS et al, 2002).

A dengue é uma das mais comuns doenças virais transmitidas por vetor no mundo, infectando mais de 50 milhões de pessoas por ano, nas regiões tropical e subtropical do globo. A infecção pode resultar em três formas clínicas: a dengue clássica, a dengue hemorrágica e a síndrome de choque da dengue, que representa o quadro de maior gravidade e pode acumular uma letalidade da ordem de 5% (MONATH, 1994; WHO, 1999, 2001). A dengue somente pode ser tratada com cuidados paliativos e é prevenida através do controle da transmissão, que inclui o conhecimento acerca dos hospedeiros do vírus, bem como pelo controle dos vetores, que são mosquitos da família *Culicidae*, representado no Brasil, principalmente, pelo *Aedes aegypti*, dentre outras atividades (DEOPE, 1996;

HALSTED, 1997; WHO, 1999). Foram notificados em nosso país mais de um milhão de casos nos últimos anos, desde a epidemia de 1981/1982, em Roraima, e a primeira grande epidemia de 1986, no Rio de Janeiro. A partir de então, a doença, vem acompanhando a expansão do *Aedes aegypti*, que se implantou igualmente em praticamente todo o Brasil, transmitindo os sorotipos virais I, II e III; além disso, existe ainda o risco da entrada do sorotipo IV, presente em países limítrofes, como a Colômbia e Venezuela, bem como no México e Caribe (SCHATZMAYR, 2001).

A análise filogenética do sorotipo DEN II inicialmente identificou cinco genótipos, incluindo dois de origem do sudeste asiático (Asiático e Americo-asiático) (LEWIS et al, 1997 apud SANTOS, 2002). Análises detalhadas, da sequência de 240 pares de bases da junção E/NS1, em coleções de cepas da América Latina, demonstraram que as variantes Asiático e Americo-asiático foram introduzidas nas Américas e tem se espalhado pela região nas últimas duas décadas, substituindo o genótipo natural deste continente (RICO-HESSE et al, 1997 apud SANTOS et al, 2002). Estes genótipos (Asiático/Americano-asiático) estão associados aos casos da síndrome hemorrágica da dengue enquanto o genótipo nativo está associado apenas à febre da dengue (SANTOS et al, 2002), assim sendo, a introdução desta variante do DEN II no Brasil resultou em um incremento da severidade clínica da doença (NOGUEIRA et al, 1990; ZAGNE et al, 1994; SOUZA et al, 1995; VASCONCELOS et al, 1995, SANTOS et al, 2002).

Twiddy et al (2003) analisando sequências disponíveis no *GenBank* do gene E (codifica a lipoproteína da cápsula viral), sugerem que o vírus da dengue surgiu a cerca de 1.000 anos atrás na Ásia, o que de certa forma coincide com o primeiro relato histórico da doença semelhante a dengue, na China no ano de 992 (GUBLER, 1997), e se estabilizou na espécie humana, a partir de um ciclo silvático em primatas, num período compreendido entre 125 e 300 anos atrás. Certifica ainda, que os quatro sorotipos surgiram entre o final do século IX e o início do XX, devido à expansão humana e conseqüente urbanização.

Os vetores urbanos da febre amarela e da dengue são as fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* a mais importante espécie na transmissão destas doenças no Brasil (em 1942, foi o último relato de transmissão urbana da febre amarela no país); a competência vetorial urbana das fêmeas de *Aedes albopictus*, neste país, é ainda discutida (DEGALLIER et al, 2001). A área de distribuição geográfica da espécie (*Aedes*

aegypti) está compreendida entre as latitudes de 40°N e 40°S, principalmente na faixa litorânea atlântica. Pode ser facilmente disseminada e levada a lugares distantes por meio de transporte em geral (WHO, 1986).

A disseminação do *Aedes aegypti* e inicialmente da febre amarela, em nosso país, ocorreu através dos navios que atracavam em portos brasileiros, originando diversas epidemias, tendo sido a primeira delas reportada no século XVI, em Recife; pelo mesmo mecanismo, e talvez ainda pelo transporte aéreo, o *Aedes albopictus* espalhou-se do Sudeste Asiático para todo o mundo tropical nos últimos anos, sendo identificado no Brasil em 1987, nas proximidades do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR, 2001). Atualmente a ocorrência de mosquitos do gênero *Aedes* é registrada em praticamente todos os estados brasileiros (DEOPE, 1996; SUCEN 1997).

A transmissão destas enfermidades (dengue e febre amarela) se dá pela picada da fêmea do mosquito infectada, de tal modo que o vírus persiste no meio urbano mediante o ciclo de transmissão: homem - *Aedes aegypti* - homem. O inseto faz repasto sangüíneo durante o dia, em seu período de maior atividade e está bem adaptado ao ambiente urbano. Na sua fase larvária, vive em água limpa e parada, por exemplo, na água armazenada para uso doméstico, em vasos e entulhos. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções para uma pessoa sadia, nem através de fontes de água e alimento (WHO, 1986; DEOPE, 1996).

Os mosquitos responsáveis pelo ciclo silvático da febre amarela nas Américas diferem dos da África onde, várias espécies do gênero *Aedes*, são encontradas contaminadas com o vírus (*A. africanus*, *A. furcifer*, *A. simpsoni*), além disso, estes artrópodes acabam por assumir um papel de reservatórios, uma vez que permanecem infectados por toda sua vida; ao contrário dos macacos que como o homem, no caso da febre amarela, ou se curam (adquirindo uma imunidade duradoura) ou mesmo morrem. Na África os artrópodes responsáveis pela transmissão da febre amarela (nada sabemos sobre a dengue) são mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (*H. Janthinomys*, *H. albomaculatus*, etc) e *Sabethes* (*S. chloropterus*, *S. soperi*, etc). De forma distinta do que ocorre no continente africano onde o *Aedes simpsoni* faz a ponte entre os ambientes silvestre e urbano, nas Américas o vetor com maior distribuição geográfica é o *Haemagogus janthinomys* que possui hábitos estritamente silváticos (WHO, 1998a,b; VASCONCELOS, 2002, 2003).

Enquanto na Ásia e Américas a transmissão da dengue de humano para humano via mosquitos é a forma freqüente de disseminação do vírus, no oeste africano a forma de circulação predominante da dengue é a silvática. Embora nestas regiões haja a circulação dos 4 sorotipos virais apenas o DEN II foi identificado em primatas e portanto no ciclo silvático (DIALLO et al; 2003).

Na África Diallo et al (2003) observaram que vários espécimes dos mosquitos *Aedes furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae vittatus*, além do *Aedes aegypti*, capturados em ambientes de mata, encontravam-se contaminados com o vírus da dengue, sendo considerados enquanto os prováveis responsáveis pelo ciclo silvático desta doença, neste continente. Rosen et al (1983) observaram ainda a transmissão vertical e horizontal do vírus da dengue em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* o que, sem dúvidas agrega importância ao gênero, também, enquanto reservatório do vírus no ambiente. No que tange a América do Sul não se tem informações disponíveis sobre a existência de um ciclo silvestre de dengue, e mesmo, se os primatas deste continente teriam algum papel neste; ou quais vetores seriam os transmissores deste vírus.

No reino animal, os símios ocupam um lugar de importância em relação ao homem (SUNTS et al, 1987; DUMBAR, 1988; DINIZ, 1997). Seu parentesco evolutivo com este é evidente, tanto por sua extraordinária semelhança anatômica e comportamental como por semelhanças bioquímicas específicas. Por isso os símios são utilizados para estudos comparativos particularmente pertinentes, para as enfermidades do homem (LAPIN et al, 1963; LARRAT et al, 1971; OPAS, 1977; KINDLOVTIS, 1999).

Alguns autores estudando episódios epidêmicos e endêmicos de dengue, febre amarela e outras arboviroses, no Continente Africano observaram anticorpos reativos a antígenos de dengue do sorotipo I e II em primatas (*Cercopithecus aethiops*, *Cercopithecus mona*, *Cercopithecus nictitans*, *Papio aethiops*) e a febre amarela (*Macacus rhesus*) capturados nas áreas de expansão urbana na Nigéria e Kenya, demonstrando, desta forma, um ciclo silvático da dengue e febre amarela (MONATH et al, 1974; FAGBAMI et al, 1977; REITER et al, 1998; LEE et al, 2000). Wolfe et al (2001) encontraram no sul do continente Asiático (próximo a Austrália), em Orangotangos (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) cativos e de vida livre, evidências sorológicas de infecção por Dengue do sorotipo II. Rudinick (1965), na Malásia, coletando soro de primatas (223 soros) capturados próximos a

áreas de habitação humana, verificou que 62,8% dos animais eram positivos às provas de soroneutralização para dengue. Reiter et al (1998) estudando a presença do vírus em vetores no Kenia sugeriu, também a existência de um ciclo silvático da dengue entre os primatas com episódios de urbanização (transmissão primata-humano) iniciando-se então, a transmissão, humano-humano, infere ainda sobre a pequena possibilidade (tendo por base o perfil de vetores encontrados no ambiente de mata e urbano) da transmissão humano-primata, na área de estudo, porém considera a possibilidade, como um episódio importante na introdução da doença na América do Sul, como no caso da febre amarela.

Enquanto na África os símios apresentam uma resistência à infecção pelo vírus da febre amarela, raramente sucumbindo a doença, nas Américas esta é de alta letalidade para as espécies de primatas neotropicais. Esta sensibilidade ao vírus, vem servindo, inclusive como um importante indicador para surtos enzoóticos da doença em ambientes de mata (WOLFE et al, 2001, VASCONCELOS, 2002, 2003). Acusamos, no entanto, uma exceção, feita para uma espécie o *Cebus apella* (macaco prego – alvo deste estudo) e que pode estar intimamente relacionado à manutenção do ciclo silvestre neste continente. Devido a estas particularidades epizootiológicas existe ainda a suspeita do envolvimento de outros grupos de animais neste ciclo, tais como os marsupiais e as preguiças (VASCONCELOS, 2002, 2003).

Havemos ainda de dar destaque a uma outra particularidade, que é a da inexistência de casos de febre amarela no continente Asiático, mesmo tendo este uma população de macacos (inclusive o *Macacus rhesus* – importante na transmissão da febre amarela na África), vetores transmissores (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, etc), relacionamento comercial com continentes endêmicos, além de episódios epidêmicos de transmissão da dengue (WHO, 1998 a,b). Theiler & Anderson (1975) tentando explicar este fato observaram que macacos rhesus (*Macacus rhesus*) que haviam sido previamente desafiados com o vírus da dengue apresentaram reduzidos níveis de viremia à inoculação subsequente pelo da febre amarela; inferem, então, sobre a possibilidade da existência de uma imunidade cruzada nos primatas (entre a dengue e febre amarela), o que, segundo os autores, poderia ter sido um fator da não introdução do vírus amarílico no Continente Asiático, assertiva corroborada também por Monath (1989) *apud* Wolfe et al (2001).

Garcia et al (2003) estudando um grupo de primatas (*Macaca fascicularis*) verificaram semelhanças entre os padrões de resposta humoral e celular aos dos casos humanos de dengue, principalmente no que tange a resposta linfoproliferativa predominantemente sorotipo específica, e com alguma reatividade cruzada.

A presença de macacos, enquanto hospedeiros secundários da dengue, não foi ainda demonstrada no continente americano, suspeitando-se da possibilidade da existência de um ciclo silvestre de transmissão da doença (ACHA e SZYFRES, 1992; DEOPE, 1996). Na verdade sabemos muito pouco acerca das enfermidades virais que se apresentam de uma maneira natural nas populações autóctones de símios do novo mundo.

O *Cebus apella* (macaco prego) trata-se de um primata sul-americano pertencente à Infra Ordem dos *Platirrinos* (primatas sul-americanos), ocorrem exclusivamente nas Américas do Sul e Central, mas sua distribuição fóssil atinge até as Antilhas; sua presença no novo mundo é geralmente considerada como sendo o resultado de uma dispersão simples, ocorrida próximo ao final do Eoceno, a partir do velho mundo (SUNTS, 1987; ROSSIE, 2003). Palmero et al (1988) através de estudos envolvendo imunoeletroforese de proteínas séricas, verificaram uma reação cruzada entre as imunoglobulinas humanas e as de *Cebus apella* através de imunoprecipitação, ELISA e imunofluorescência indireta; observaram, ainda, que esta espécie animal possui pelo menos três imunoglobulinas com padrões de migração à eletroforese correspondentes a IgG, IgA e IgM. Estudos imunoquímicos de caracterização de anticorpos da espécie em tela, também indicam para importantes semelhanças destes isotipos com aqueles da espécie humana (MACHADO, 1980).

Acompanhado os avanços da biologia molecular o conhecimento sobre o sistema imune, num passado recente, foi surpreendente, observamos grandes descobertas que nos propiciaram avanços em nosso entendimento e conseqüentemente a formulação de várias novas perguntas. Os estudos envolvendo animais domésticos, principalmente aqueles de interesse econômico, fazem parte deste cenário, onde várias vacinas recombinantes foram criadas, processos imunológicos foram compreendidos, novos modelos experimentais se desenvolveram, dentre outros (TIZARD, 2002). Mesma sorte parece não ter atingido aqueles envolvendo os animais silvestres, que permanecem como inexistentes para ciência, principalmente dentre os pertencentes a fauna brasileira, para os quais não dispomos de

informações básicas inerentes ao sistema imune, a vacinas ou mesmo revista científica especializada.

Acreditar que toda uma diversidade de animais se relaciona de forma semelhante com o mundo microbiano parece ser inocente e desprovido de sustentabilidade, dentro de um contexto em que se sabe, como por exemplo, que os *Camelídeos* do velho e do novo mundo (camelos, dromedários, lhamas, alpacas) possuem a IgG2 e a IgG3 compostas apenas por cadeias pesadas e, mesmo assim, se conjugam com antígenos (HAMETS-CASTERMAN et al, 1993) ou mesmo que marsupiais como o *Didelphis marsupialis* (gambá de orelha preta) podem fabricar anticorpos específicos após 5 dias de nascidos (TIZARD, 2002). Estas e outras importantes diferenças, que são encontradas de forma esparsa na literatura, podem dar uma idéia da diversidade dos padrões de resposta aos parasitas, além de poderem contribuir para a solução de perguntas relacionadas ao nosso próprio sistema imunológico.

A utilização de algumas provas sorológicas, de maior sensibilidade como base para levantamentos da existência de anticorpos reativos a determinados antígenos, encontra-se comprometida para muitos animais silvestres, uma vez que não conhecemos os seus perfis de anticorpos, não dispomos de conjugados comerciais, nem, tão pouco, sabemos sobre seus padrões de resposta celular; outrossim, estes e outros problemas inviabilizam a certificação de forma segura, da reatividade de um soro a um antígeno específico (HIETALA & GARDNER, 1999; KENNEDY-STOSKOPF, 1999).

A designação de anticorpo natural é dada àqueles que circulam em indivíduos normais, sem que haja uma prévia estimulação antigênica específica externa. Os auto-anticorpos naturais são normalmente considerados como pertencendo a vários isotipos de imunoglobulinas, mostrando na maioria das vezes, mas nem sempre, uma multireatividade, porém baixa afinidade a uma ampla variedade de antígenos próprios do organismo (COUTINHO et al, 1995).

Dois artigos de revisão da década de 60 (BOYDEN, 1965 e MICHAEL, 1969 apud AVRAMEAS & TERNYNCK, 1995) faziam menção ao fato de que apesar de vários trabalhos externarem a importância dos anticorpos naturais, estes continuavam a ser entendidos mais como uma curiosidade, do que como um tópico da imunologia. Acusamos com interesse a cena proposta, porque, por algum motivo esta acaba por não mudar de

forma importante nos dias de hoje, sendo que o assunto não consta ou mesmo é citado rapidamente, nos livros didáticos de imunologia. Quando fazemos um levantamento bibliográfico sobre o tema, encontramos soluções de continuidade temporais de trabalhos e normalmente ligados a poucos pesquisadores, instituições de pesquisa e países. Sabemos ainda que não representa um assunto novo, pois Metalnikoff (1900 apud AVRAMEAS & TERNYNK, 1995) e Besredka (1901 apud AVRAMEAS & TERNYNK, 1995) já relatavam a existência de anticorpos naturais “tóxicos” a espermatozóides, ou mesmo que anticorpos, que inibiam a ação hemolítica de outros destinados a este fim, eram encontrados de forma natural em várias espécies animais. Apesar de técnicas sorológicas mais sensíveis (ex: ELISA), da tecnologia de hibridomas e da produção de modelos experimentais transgênicos terem sido agregadas aos estudos imunológicos; revelando uma série de particularidades intrigantes, temos a impressão de que o assunto em tela, em detrimento de sua importância, insiste em permanecer enquanto curiosidade.

De acordo com a visão clássica, a teoria imunológica se baseia na assertiva de que o sistema imune é composto por clones de linfócitos independentes que são gerados ao acaso; a atividade imunológica consiste na expansão destes clones específicos em resposta ao contato com antígenos estranhos e externos; a memória imunológica seria, portanto, gerada pelo mesmo processo e, também, que a resposta aos componentes do próprio organismo seria inibida (VAZ et al, 2003). Porém este modelo não é suficiente para explicar como ratos *germ-free* apresentam um número de linfócitos ativos no baço e um nível de IgM no soro similares ao dos animais SPF (*Specific Pathogen Free*) e normais (HOOIJKAAS et al, 1984; PEREIRA et al, 1986). Vários trabalhos demonstraram que os anticorpos naturais apresentam uma dinâmica complexa de atividade entre si e com os antígenos do próprio indivíduo, mesmo na ausência de estimulação antigênica externa (LUNDKVIST et al, 1989; ADIB et al, 1990; VARELA et al, 1991; BERNEMAN et al, 1992; WOLF-LEVIN et al, 1993; CARLAN et al, 1997; MIESCHER et al, 2001; CUKROWSKA & TLASKALOVA, 2001; KOSTRIKIN et al, 2002; OPPEZZO & DIGHIRO, 2003; SHAW, 2004; BOFFEY et al, 2004; QUINTANA et al, 2004). Observações feitas em roedores, que expressam anticorpos transgênicos na maioria dos linfócitos B que, portanto, não selecionam os repertórios de auto-anticorpos e apresentam estes muito similares ao de animais normais, tem demonstrado que a produção de auto-anticorpos não se trata de um

acontecimento não específico independente da participação de um antígeno, mas sim representa um processo de seleção dependente da região variável da imunoglobulina. O fato de compararmos os repertórios destes auto-anticorpos com aqueles de linfócitos B em descanso e encontrarmos diferenças significativas entre eles, de certa forma, ratifica a idéia de que o modelo clássico merece algumas considerações (AVRAMEAS & TERNYNCK, 1993; GRANDIEN et al, 1994; COUTINHO, 1995).

A literatura mais recente mostra que no soro normal de humanos e de outros animais observamos anticorpos naturais dos isotipos IgM, IgG e IgA, reativos com uma imensa variedade de antígenos próprios (*self*) e estranhos (*non self*), tais como: proteínas circulantes, intra e extracelulares; carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e haptenos (ADIB et al, 1990; AVRAMEAS & TERNYNCK, 1993; BERNEMAN et al, 1993; GRANDIEN et al, 1994; COUTINHO, 1995; HORN et al, 1999; TUNG et al, 2001; MIESCHER et al, 2001; KOSTRIKIN et al, 2002; OPPEZZO & DIGHIERO, 2003; FERNVIK et al, 2004; BOFFEY et al, 2004; SHAW, 2004; TSOKOS & FLEMING, 2004; QUINTANA et al, 2004; FUST et al, 2005).

Basicamente dois tipos de anticorpos naturais podem ser isolados de um soro normal; aqueles que reagem com mais de um tipo de antígeno, aparentemente não relacionados, e os que apresentam reatividade a um único tipo. Muitos estudos demonstraram que um número importante de linfócitos B produzem estes tipos de anticorpos, e que na dependência do tecido linfóide estudado 5 a 100% dos anticorpos monoclonais preparados reconhecem antígenos próprios do organismo e entre 2,5 a 55% destes reagem com dois ou mais antígenos próprios (*self*) ou estranhos (*non self*). Trabalhos envolvendo a utilização de uma grande quantidade de clones de linfócitos B obtidos a partir de tecidos linfóides de vários ratos, mostraram que na dependência do estágio de desenvolvimento e do órgão linfóide, existe uma variação de 2 a 50% de linfócitos que produzem auto-anticorpos (quando considerados todos os clones), dentre estes 20 a 100% reagem com mais de dois antígenos. Estudos envolvendo estes anticorpos mostram que o conjunto das IgM e IgG circulantes em camundongos normais representam o resultado final de um enorme processo seletivo, direcionado a proteínas próprias e resultando na formação de uma importante rede de interações (NOBREGA et al, 1993; HAURY et al, 1994, CARLAN et al, 1997).

A teoria da rede idiotípica postula que a diversidade de paratopos e idiótipos, num sistema imune normal, esta envolvida em uma série de interações e considera, também, a existência de uma relevante afinidade funcional entre estes; o que conseqüentemente aponta na direção de que esta rede tenha um papel central na organização e regulação do sistema imune (ARAÚJO et al, 1987).

Anticorpos naturais, reagentes com bactérias e vírus, são amplamente encontrados e descritos na literatura, em várias espécies animais e possuindo uma ação bactericida direta (alguns reagindo tanto com bactérias Gram ⁺ como Gram ⁻), provocando uma neutralização de partículas virais, ou mesmo, ligando-se a estes patógenos de forma a facilitar a fagocitose por macrófagos e polimorfonucleares. Anticorpos naturais contra eritrócitos promovem a sua opsonização e participam de forma importante na renovação destas células, enquanto aqueles reativos a antígenos de tecidos apresentam importância na limpeza por ocasião de danos teciduais, outros que reagem com citocinas são importantes na regulação da resposta imune a este nível. Anti-IgGs naturais se ligam a imunocplexos facilitando a sua remoção pelas células fagocíticas; já anticorpos contra a região Fab , além de importantes na regulação da resposta imune e formação de uma rede idiotípica podem restabelecer a capacidade de um determinado anticorpo de fixar complemento. Além do acima exposto estes anticorpos são capazes de realizar outras funções biológicas tais como: transportadores de constituintes próprios do organismo (envolvidos nos processos metabólicos), participam no *feed back* de alguns hormônios, no controle da pressão sangüínea, controle de proteínas do choque térmico, dentre outras (AVRAMEAS & TERNYNCK, 1995; QUAN et al, 1997; RITTER et al, 1997; WARD et al, 1997; CHENG & SUNDRAM, 1998; HORM et al, 1999; RONDA et al, 1999; DEPRAETERE et al, 2000; GILLES et al, 2000; VAZ et al, 2003; BOFFEY et al, 2004; SHAW, 2004; QUINTANA et al, 2004).

Podemos observar na literatura vários trabalhos envolvendo várias das funções acima descritas, tais como: imunoregulação, através de interações idiotípicas (SUNDBLAD et al, 1989; ADIB et al, 1990; BENERMAN et al, 1993; GILLES et al, 2000), pela modulação da ação de citocinas (HANSEN et al, 1995, MEAGER, 1997; DEPRAETERE et al, 2000), pela interação com linfócitos B e T (ARAÚJO, et al, 1987; COUTINHO et al, 1987; BERNEMAN et al, 1992; WOLF-LEVIN et al, 1993; KISS et al, 1994); modulação e

tratamento de tumores (CHOW & BENNET, 1989; FOON, et al, 1995); apresentação de antígenos (KANOST & McCLUSKEY, 1994; THORNTON et al, 1994); eliminação de constituintes próprios (*self*) alterados (LUTZ et al, 1993; SATA & WALSH, 1998); atividades catalíticas (PAUL et al, 1990; GOLOLOBOV et al, 1995; LI et al, 1995); atividades reguladoras de outros sistemas (CASTEDO et al, 1993; CHENG & SUNDRAM, 1998; WU et al, 1999; PASHOV et al, 2002), dentre várias outras.

Forsdyke (2005) discute sobre complexidade que poderia ser conferida a discussão da seleção negativa dos linfócitos T e B ao próprio, uma vez que, assim sendo, seria dada uma significativa vantagem evolutiva para aqueles microrganismos que tivessem a capacidade de mimetizar ou mesmo apresentar estruturas moleculares muito próximas as do hospedeiro, o que provocaria uma conversão adaptativa neste sentido. Podemos observar, no entanto, que isto não ocorreu de forma tão intensa, assim sendo, este autor destaca a importância da existência de uma seleção positiva dos linfócitos aos antígenos próprios (*self*) ou mesmo próximos a estes, o que chama de *near-self* ou *altered-self*.

As IgMs, enquanto anticorpos naturais comumente citados na literatura, apresentam características que as permitem reagirem com microrganismos invasores e ativarem o sistema complemento, apresentando uma polireatividade com muita avidez (COUTINHO et al, 1995; FEARON & LOCKSLEY, 1996). Modelos experimentais envolvendo ratos transgênicos (não produzem IgM) e a produção artificial de uma bacteremia, mostraram uma mortalidade de 70% destes animais nas primeiras 32 horas contra 20% dos normais no mesmo período. Este aumento na susceptibilidade esteve associado a níveis reduzidos de TNF α , queda no recrutamento de neutrófilos e a um aumento da quantidade de bactérias no peritônio. Outro aspecto a ser considerado é o da ação destas IgMs naturais frente a infecção viral, evitando que estas partículas atinjam seus órgãos alvo e promovendo a limpeza da infecção por basicamente dois mecanismos: confinamento do complexo IgM-partícula viral nos linfonodos e baço, facilitando a ação de macrófagos e através da fixação do complexo IgM-vírus – C3 (sistema complemento) às células dendríticas (receptores CD21/CD35 camundongos) promovendo, desta forma, um incremento da resposta imune (BOES, 2000).

Os linfócitos B CD5 (linfócitos B1) são conhecidos como produtores de anticorpos naturais e são comumente encontrados habitando o tecido linfóide associado às mucosas

(CARLAN et al, 1997). Vaz et al (2003) mostraram que animais mantidos através de dietas desprovidas de proteínas (apenas com aminoácidos) apresentaram diferenças importantes no sistema imune, como a contração celular no tecido linfóide associado a mucosas e dos linfonodos relacionados e não, além de modificações importantes no timo. A produção de IgA e IgG, mas não a da IgM, é severamente comprometida, nestes casos, de forma similar ao observado nos ratos *antigen-free* (HASHIMOTO et al, 1978); assim sendo, os teores de proteína da dieta assim como a flora microbiana seriam responsáveis pela manutenção de um “tônus” imunológico. Sumarizando não existiria uma falta de reatividade do sistema imune aos componentes próprios do organismo, às proteínas da dieta ou mesmo a microbiota da flora intestinal, mas sim a ausência de uma resposta progressiva (VAZ et al, 2003).

De acordo com Maturana & Varela (1980, *apud* VAZ et al, 2003) “um sistema é uma coleção de elementos que através de suas interações preferenciais (entre eles) criam uma barreira que os separa de outros elementos com os quais ele pode também interagir, o que configura o meio no qual esta coleção de elementos opera na sua totalidade, assim sendo um sistema existe na sua totalidade no meio com o qual interage, e existe também em outro domínio: o estrutural, o espaço gerado pelas interações entre os componentes. Um sistema não existe por si só, e sim em um meio em interação que estimula mudanças estruturais neste”. Por esta razão um sistema dinâmico só pode existir em um meio que o estimula nestas mudanças estruturais através das quais podemos identificá-lo como um sistema conservado. Desta forma o sistema imune não poderia somente ser definido ou mesmo visto como a existência de linfócitos atuando de forma independente, mas também pelas mudanças provocadas pelas interações entre eles e entre estes e o organismo; forma pela qual um sistema opera (VAZ et al, 2003).

Podemos observar no Brasil uma grande quantidade de zoológicos, criadouros científicos e comerciais, dentre outras coleções de animais selvagens espalhadas pelos principais municípios, em praticamente todos os estados da federação, onde percebemos o macaco prego (*Cebus apella*) como sendo uma das principais espécies, em termos numéricos, dentre os animais expostos. Saber se estes animais possuem em seu soro anticorpos reativos aos antígenos virais da dengue e da febre amarela poderia identificar um

importante hospedeiro secundário urbano, ou mesmo mostrar a existência de anticorpos naturais que poderiam conferir à espécie alguma resistência a estas enfermidades.

A amostragem destas criações urbanas de primatas silvestres se mostra interessante, uma vez que nelas podemos encontrar animais das mais diversas procedências; desde aqueles que nasceram nestes cativeiros, até animais oriundos de matas próximas ou não do logradouro, vítimas do tráfico de animais; ou mesmo de cativeiros particulares. A dimensão continental do país aliado a uma situação epidemiológica, na qual os estados do sul não teriam, na época da coleta, a transmissão autóctone dos vírus em epígrafe, adicionaria mais uma qualidade a intervenção amostral sugerida.

2- OBJETIVOS

- Verificar se a população de macacos prego (*Cebus apella*) cativos no Brasil apresenta anticorpos reativos com os antígenos associados aos vírus causadores da dengue e da febre amarela, avaliando-se sua compatibilidade com a epidemiologia destes agravos e valendo-se de duas técnicas sorológicas: a inibição da hemaglutinação (HI) e o teste imunoenzimático (ELISA).
- Avaliar a viabilidade de utilização, para a revelação de reação imunoenzimática, de dois conjugados comerciais o *anti-monkey* (Sigma) e um anti-IgG humana (Sigma), assim como padronizar um teste imunoenzimático para soros de *Cebus apella*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Levantamento populacional e autorizações:

Realizamos um levantamento das populações cativas do primata, alvo do estudo, através de censos fornecidos pela Sociedade de Zoológicos do Brasil, Sociedade Paulista de Zoológicos e IBAMA. Os pedidos de autorização foram enviados para todos os Zoológicos envolvidos, assim como para o IBAMA. Todas as instituições contatadas concordaram com o estudo e disponibilizaram seus técnicos no sentido de auxiliarem nas atividades de contenção e sangria dos animais.

2.2- Primata – *Cebus apella*:

2.2.1- Área de estudo:

Foram coletadas 256 amostras de tecido sangüíneo de 227 animais em 17 cidades (concentradas nas regiões sul e sudeste do Brasil) e em 4 estados da federação, no período compreendido entre o final do ano de 2000 (a partir de outubro) e início de 2001 (Tabela 1).

Destes animais 132 indivíduos eram do sexo masculino e 95 do feminino; 40 jovens (entre 0 e 2 anos de idade), 114 adultos (entre 2 e 10 anos de idade) e 41 senis (acima de 10 anos de idade), não obtivemos informações sobre a idade de 32 dos animais estudados.

Tabela 1 - Quadro qualitativo dos primatas utilizados neste estudo, contendo os municípios, quantidade de animais, tipo de instituição, região do país e tipo de recinto.

MUNICÍPIO	NÚMERO DE ANIMAIS	INSTITUIÇÃO	REGIÃO DO BRASIL	TIPO DE RECINTO
Campinas-SP	16	Bosque dos Jequitibás	sudeste	Fora de visitação
Sumaré-SP	9	Zoológico de Sumaré	sudeste	Recinto de visitação
Itatiba-SP	5	Zooparque Paraíso das aves	sudeste	Fora de visitação
Jundiaí-SP	4	Fundação Mata Ciliar	sudeste	Sem visitação pública
Paulínea-SP	4	Parque Ecológico de Paulínea	sudeste	Fora de visitação
Piracicaba-SP	13	Zoológico de Piracicaba	sudeste	Fora de visitação
Santa Bárbara-SP	3	Zoológico de Santa-Bárbara	sudeste	Fora de visitação - Zoo fechado
Leme-SP	8	Parque Ecológico Mourão	sudeste	Recinto de visitação
São Vicente-SP	9	Parque Ecológico de São Vicente	sudeste	Recinto de visitação
São Paulo-SP	63	Fundação Zoológico de São Paulo	sudeste	Fora de visitação
São José do Rio Preto-SP	11	Zoológico de São José do Rio Preto	sudeste	Recinto de visitação
TOTAL SUDESTE	145			
Brusque-SC	7	Zoológico de Brusque	sul	Recinto de visitação
Camburiú-SC	22	Zoológico de Camburiú	sul	Recinto de visitação
Pomerode-SC	19	Zoológico de Pomerode	sul	Recinto de visitação – ilha
Cachoeira do Sul-RS	7	Zoológico de Cachoeira do Sul	sul	Recinto de visitação
Sapucaia do Sul-RS	18	Parque Ecológico	sul	Recinto de visitação e Setor Extra
TOTAL SUL	73			
João Pessoa-PB	9	Zoológico de João Pessoa	nordeste	Recinto de visitação – ilha
TOTAL NORDESTE	9			
<u>TOTAL GERAL</u>	<u>227</u>			

2.2.2 – Contenção química dos animais:

Inicialmente o grupo de primatas era avaliado com o objetivo de se localizar o líder, (normalmente este toma a iniciativa de defender os outros membros do grupo) que era inicialmente anestesiado por intermédio de dardo (confeccionado através de seringas de 5 ml) propulsionado por ar via zarabatana (DINIZ, 1997; KINDLOVTIS, 1999; FOWLER & CUBAS, 2001) (cano de alumínio). Os demais membros do grupo passaram por uma contenção física, inicial, por intermédio de puçá (aro com cabo de material metálico) com rede de *nylon*-seda (Figura 1), visando preservar a integridade física dos animais; posteriormente recebiam uma injeção intra-muscular de cloridrato de cetamina (Frangotar[®]) na dosagem de 20 mg/Kg (MASSONE, 1994; DINIZ, 1997; KINDLOVTIS, 1999; CROW, 2000; FOWLER & CUBAS, 2001). O período de efeito deste anestésico dissociativo foi de, em média 35 minutos, tempo este suficiente para a tatuagem, implantação de microchip, exame clínico, limpeza de tártaro, dentre outros procedimentos que se fizeram necessários (Figura 2). Todos os animais foram acompanhados até a sua plena recuperação e parâmetros, como frequência cardíaca, respiratória, temperatura corporal e tempo de preenchimento capilar foram avaliados. Os macacos depois de recuperados eram novamente recolocados no recinto e observados quanto a possíveis surtos de agressividade.



Figura 1: Macaco prego sendo contido antes do procedimento anestésico, para a coleta do tecido sangüíneo e tatuagem.



Figura 2: Macaco prego (*Cebus apella*) anestesiado e tatuado.

2.2.3- Coleta de Sangue e Obtenção do Soro:

A coleta do sangue foi feita através da venopunção poplítea, após garroteamento (DINIZ, 1997; KINDLOVTIS, 1999; CROW, 2000), coletando-se em média um volume de 5ml (na dependência do porte do animal). As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio, identificadas e deixados em repouso, sob baixa temperatura. Após a coagulação do sangue, o material foi centrifugado a 1.500 rpm, e a seguir o soro foi removido e acondicionado em tubos próprios identificados e congelados a - 80° C.

2.3- Exames prévios dos soros de *Cebus apella*:

2.3.1- Prova de Inibição da Hemaglutinação:

O teste foi realizado no laboratório do Instituto Adolfo Lutz (SP) mediante protocolo, adaptado por este, que constitui a principal prova de referência para o diagnóstico da dengue humana no estado. Fundamenta-se inicialmente na capacidade de determinados vírus aglutinarem de maneira específica e seletiva as hemácias de espécies animais diferentes: a propriedade hemaglutinante (CLARK & CASALS, 1958).

Foram utilizadas para o teste placas multitestes de 96 orifícios com fundo cônico (em V), solução tampão de hemaglutinação (PBS), suspensão de glóbulos vermelhos de galinha com 8 unidades hemaglutinantes (HA), antígenos: dengue tipo 1 (A-2121), dengue tipo 2 (A-2106) e o vírus controle (AN 14723-A-2086 - encefalite eqüina do leste- EEE). A prova foi realizada a temperatura ambiente onde uma série de diluições, na base dois, do vírus (25 µL) em tampão fosfato (PH 7,2), foi misturada com uma suspensão de hemácias de galinha a 0,5%. Os títulos de hemaglutinação foram verificados após um período de 1 hora. Consideramos como hemaglutinação total (reação NEGATIVA) quando se formou uma fina camada de hemácias aglutinadas na superfície do fundo do orifício (INSTITUTO ADOLFO LUTZ – SP)

As sobras dos soros tratados, com extração pela acetona, foram identificadas e armazenadas a -80⁰C, para posterior comparação com os soros não tratados quando da utilização do teste imunoenzimático.

2.4- Padronização do teste de ELISA para *Cebus apella*:

2.4.1- Imunização dos Macacos prego – Produção de um soro para controle positivo:

Quatro indivíduos da espécie, previamente identificados por intermédio de tatuagens, foram anestesiados seguindo os procedimentos descritos (obtenção das amostras de tecido sangüíneo), e inoculados na face externa de ambas as coxas, por via intradérmica, com 1 ml de uma emulsão contendo 0,5 ml de adjuvante completo de Freud e 0,5 ml de solução contendo 1mg de soroalbumina bovina diluída em tampão fosfato (PH 7,2). Antes da imunização inicial realizou-se a sangria destes animais e as amostras colhidas foram identificadas individualmente e citadas, então, como “soro de primeira coleta” (coleta 1).

O processo de imunização teve consequência por uma nova exposição dos animais ao inóculo (seguindo os procedimentos e padrões descritos acima), precedida por uma sangria, então designada como “soro de segunda coleta” (coleta 2). Após um período de 20 dias os animais foram novamente anestesiados (segundo o mesmo protocolo) quando o tecido sangüíneo foi novamente obtido e denominado como “amostra de terceira coleta” (coleta 3).

Em todos os procedimentos anestésicos utilizados para as imunizações e obtenção de amostras, os animais foram monitorados (monitorização cardíaca, pulso-oximetria, temperatura, etc), obteve-se ainda registro eletrocardiográfico, para avaliação da atividade elétrica cardíaca durante o procedimento. Procedeu-se exame clínico e os dados obtidos foram apontados em planilhas próprias, assim como registro fotográfico, das alterações externas (aumento em volume de linfonodos periféricos).

2.4.2 – Teste dos antisoros obtidos na imunização:

Realizamos a imunodifusão dupla em agar a 1% sob lâmina de microscopia, segundo técnica de Ouchterlony (1958). Concentrações de antígeno (soroalbumina bovina) de 125, 250 e 500 µg/ml foram colocadas contra os anti-soros (Coleta 2 e Coleta 3) dos primatas imunizados em várias diluições (1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 e 1/32). Os soros de primeira coleta (onde os animais ainda não haviam recebido o antígeno) foram utilizados enquanto controle no sentido de sabermos se o processo de imunização havia gerado a produção de anticorpos reativos a soroalbumina bovina (BSA).

2.4.3- Determinações das concentrações protéicas:

As determinações das concentrações protéicas foram realizadas através do método de Lowry, modificado segundo Hartree (1972). Utilizamos a soroalbumina bovina enquanto proteína padrão.

2.4.4- Teste e padronização do teste imunoenzimático (ELISA) para o conjugado comercial “anti-monkey”(Sigma):

Para que fosse possível avaliar a viabilidade da utilização dos conjugados comerciais *anti-monkey* e anti-IgG humana, para a espécie em tela, realizamos séries de

testes de ELISA, com os soros dos animais controle positivos e dos de animais não imunizados (previamente testados na imunodifusão), variando-se as concentrações de soroalbumina bovina (utilizadas na sensibilização das placas), as dos conjugados, os tampões, o tempo de cada etapa, assim como os períodos de incubação para cada fase do teste. Conseguiu-se adaptar o protocolo e os conjugados para utilização em soros de *Cebus apella*.

2.5- Teste imunoenzimático (ELISA):

2.5.1 - Roteiro técnico:

Para realização do teste utilizamos placas para microtitulação, marca CORNING®, antígenos dengue I, II e III e febre amarela (fornecidos pela Fundação Evandro Chagas), tampão carbonato bicarbonato PH 9,6; gelatina (2%), solução de PBS, pH 7,2; micropipetas multicanal, tampão citrato PH 5,6; OPD, anticorpo anti IgG de macaco (*Anti-monkey* – Sigma) , H_2O_2 , H_2SO_4 . Soros de macaco prego, controle positivo e negativo e soros humanos positivos para dengue, obtidos do banco de soros do Instituto Adolfo Lutz e previamente testados para a revelação com o conjugado *anti-monkey* (etapa de padronização).

Realizamos o teste imunenzimático (ELISA) através de técnica descrita por Voller et al (1986), onde sensibilizamos a placa com 100 µl dos antígenos (5 µg/ml). As placas foram incubadas *over night* sob temperatura de 4 °C e posteriormente lavadas por três vezes com solução de PBS. Os *wells* foram então bloqueados com 200 µl de uma solução de gelatina; após um período de incubação de 1 hora a temperatura de 37 °C, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS e posteriormente colocamos os soros a serem pesquisados. Após um período de incubação de 1 hora a temperatura de 37 °C, as placas foram novamente lavadas com PBS quando a reação foi revelada por intermédio do conjugado *anti monkey* e da solução reveladora composta por OPD (10 mg) e H_2O_2 (10µl) em tampão citrato. Após o período de 30 minutos, ao abrigo da luz, a reação foi bloqueada pela adição de 50 µl de H_2SO_4 . Procedemos a leitura do teste por intermédio de um leitor de ELISA com filtro de 492 nm.

2.5.2- Protocolo de teste das amostras:

Todas as 256 amostras foram testadas frente aos quatro antígenos acima descritos; aquelas consideradas reativas foram novamente avaliadas de forma pareada com aquelas tratadas com extração pela acetona (Instituto Adolfo Lutz). Os soros que apresentaram alta reatividade com os quatro antígenos foram adsorvidos nos mesmos e novamente testados (prova de inibição do ELISA).

Considerou-se o soro como reativo quando este apresentou leitura superior a três desvios padrões adidos da média dos controles negativos como em Figueiredo *et al*, (1987; 1989), que trabalharam com o teste imunoenzimático diretamente em cultura de células C6/36 de *Aedes aegypti* (apresentando o corte mais restritivo encontrado na literatura) e altamente reagentes quando este esteve a pelo menos um desvio padrão dos controles positivos (soros de macaco imunizados e soros positivos humanos). Os testes de significância estatística foram realizados através do teste t de *student* considerando-se a diferença significativa quando $p \leq 0,01$. Os testes de significância de reatividade foram feitos pelo método do Qui-quadrado por intermédio de tabelas de contingência de $2 \times n$ ($n=3$), e sendo considerado enquanto significativo o $p \leq 0,01$.

4- RESULTADOS

3.1- Teste de Inibição da Hemaglutinação:

As provas de inibição da hemaglutinação com as 256 amostras de macacos prego (*Cebus apella*) frente aos antígenos da dengue tipos 1 e 2 foram negativas. Os resultados controle frente aos antígenos de outro vírus do mesmo grupo, o da encefalite eqüina do leste, também foram negativos.

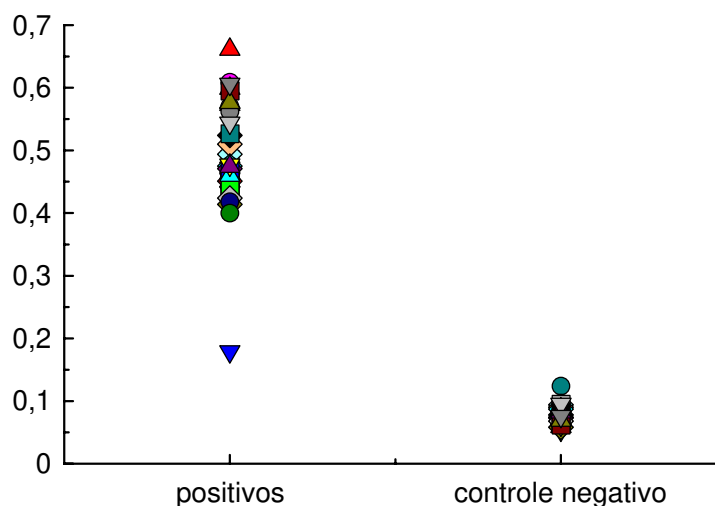
3.2- Controle da imunização dos macacos prego (controle positivo):

Os soros de terceira coleta, obtidos dos 4 animais, apresentaram precipitação frente ao antígeno imunizante (soroalbumina bovina) até a diluição de 1/8, mostrando que no soro destes animais, após o processo de imunização, existiam anticorpos contra o inóculo em quantidades suficientes para precipitarem em gel de agar. Assim sendo estes soros foram utilizados enquanto controles positivos na padronização do teste imunoenzimático.

3.3- Viabilidade de utilização do conjugado comercial *anti-monkey* e anti IgG humana :

Os testes de ELISA, a partir da sensibilização da placa com soroalbumina bovina e utilização dos soros dos animais imunizados, apresentaram densidades ópticas significativamente superiores a dos controles negativos ($p < 0,01$) para todas as diferentes diluições de antígenos e de soro (Figura 3), mostrando que os conjugados em epígrafe seriam suficientes para a realização do teste em soros de macacos prego. O melhor protocolo encontrado foi aquele utilizado no teste contra os antígenos virais da dengue (DEN I, DEN II, DEN III) e de febre amarela (FA), descritos em “materiais e métodos”.

Figura 3: Densidades ópticas obtidas com os controles positivos (soros de macacos imunizados) contra a soroalbumina bovina, revelados com o conjugado *Anti-monkey* e dos controles negativos.



3.4- Teste Imunoenzimático das 256 amostras contra os antígenos virais da dengue e da febre amarela:

Das 256 amostras 250 (96,53%) obedeceram aos padrões necessários para serem consideradas enquanto reativas ao antígeno DEN I; ao DEN II, 173 (67,58%); ao DEN III, 190 (74,22%) e finalmente 207 (80,86%) ao antígeno viral da febre amarela (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Dentre as amostras reagentes classificamos enquanto altamente reagentes 76 (29,68% do total e 30,4% das classificadas enquanto reagentes) para DEN I; 45 (17,58% do total e 26,01% das classificadas enquanto reagentes) para DEN II; 74 (28,91% do total e 38,95% das reagentes) para DEN III e 11 (4,3% do total de amostras e 5,31% dentre as reagentes). Aquelas amostras que se apresentaram altamente reativas para pelo menos dois dos quatro antígenos utilizados neste estudo, representaram 8,98% do total das testadas (23 amostras); sumarizadas na tabela 2.

Figura 4: Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macaco prego e os respectivos controles negativos, para DEN I no teste de ELISA.

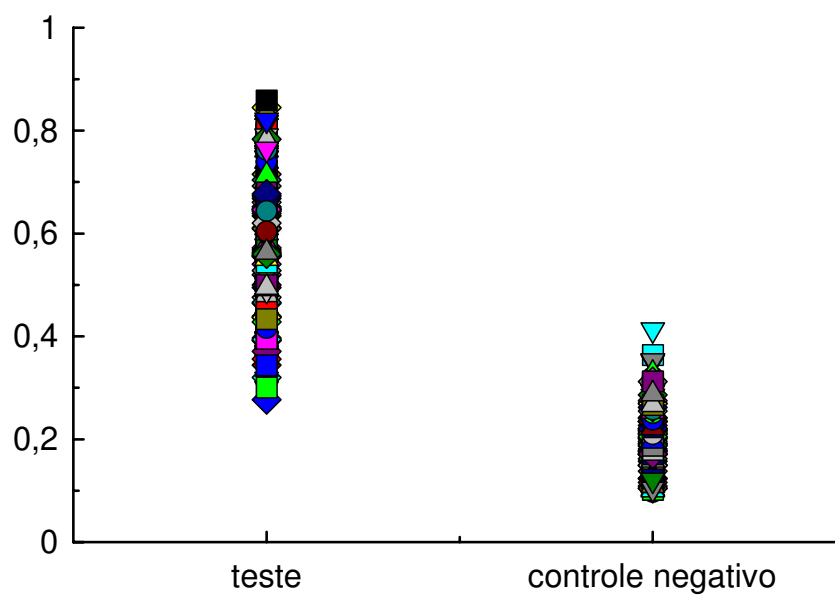


Figura 5: Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macaco prego e seus respectivos controles negativos, para DEN I, no teste de ELISA.

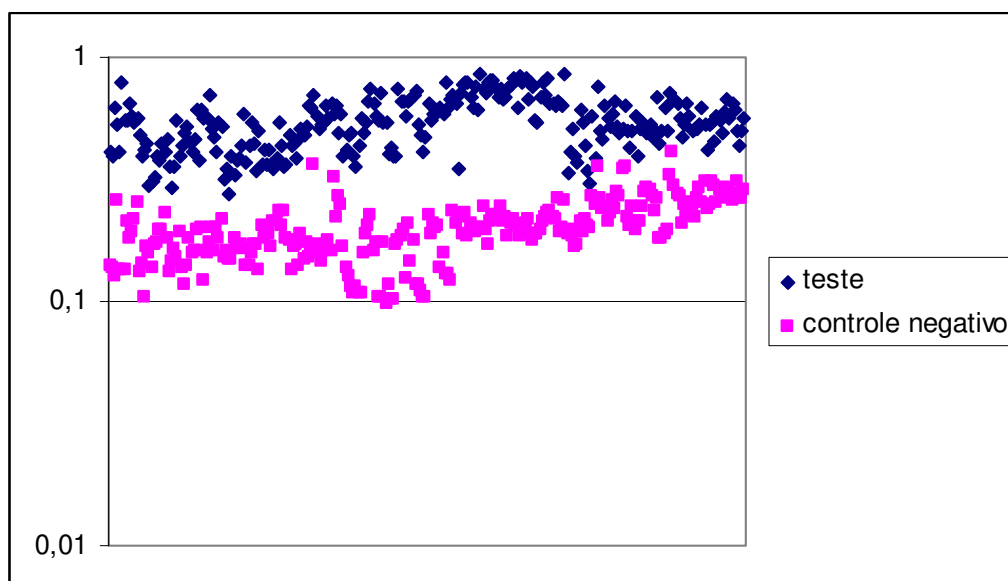


Figura 6: Distribuição de frequência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN I.

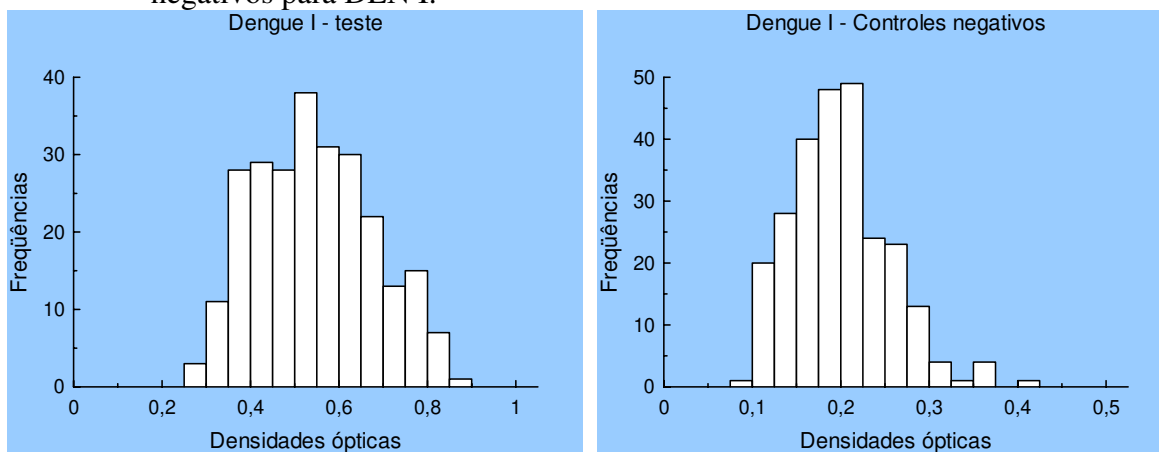


Figura 7: Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macacos prego e os respectivos controles negativos, para DEN II no teste de ELISA.

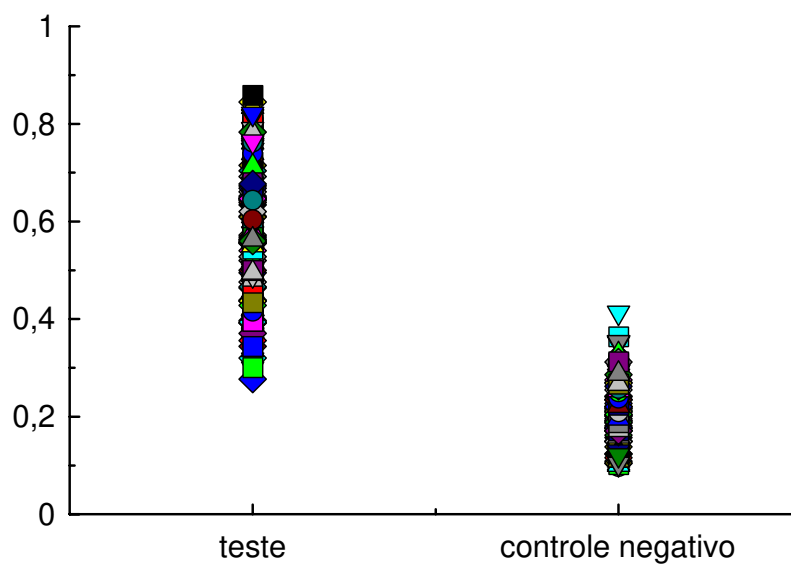


Figura 8: Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para DEN II, no teste de ELISA.

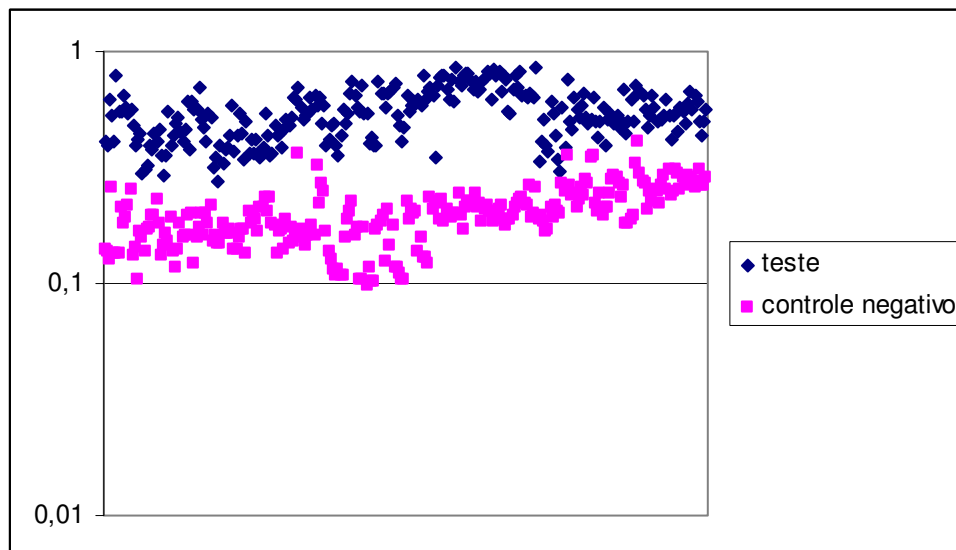


Figura 9: Distribuição de frequência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN II.

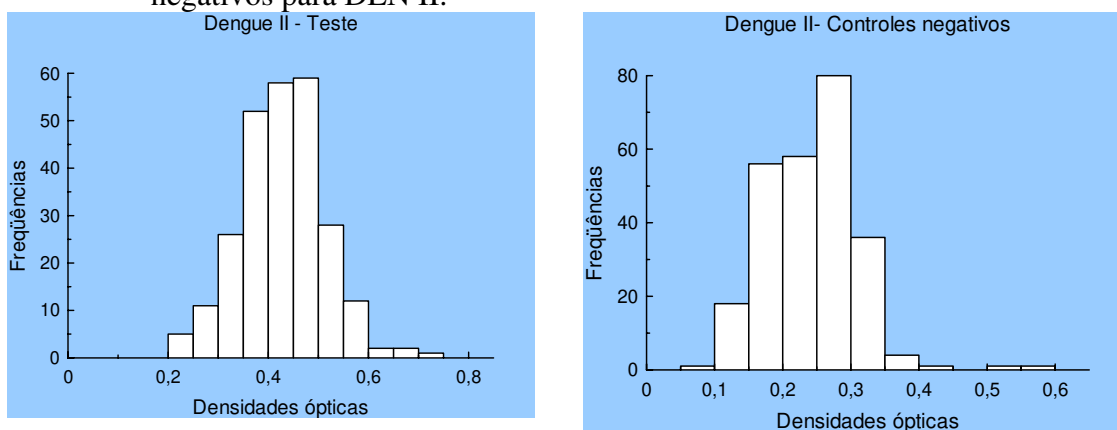


Figura 10: Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macaco prego e os respectivos controles negativos, para DEN III no teste de ELISA.

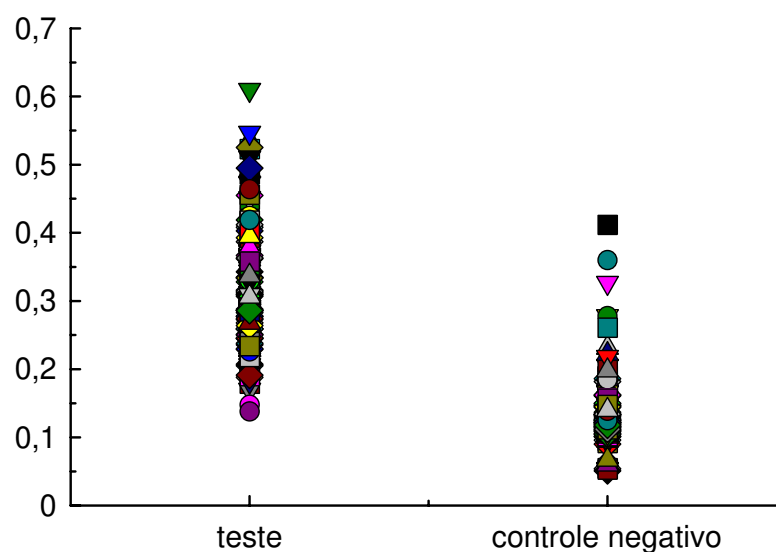


Figura 11: Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para DEN III, no teste de ELISA.

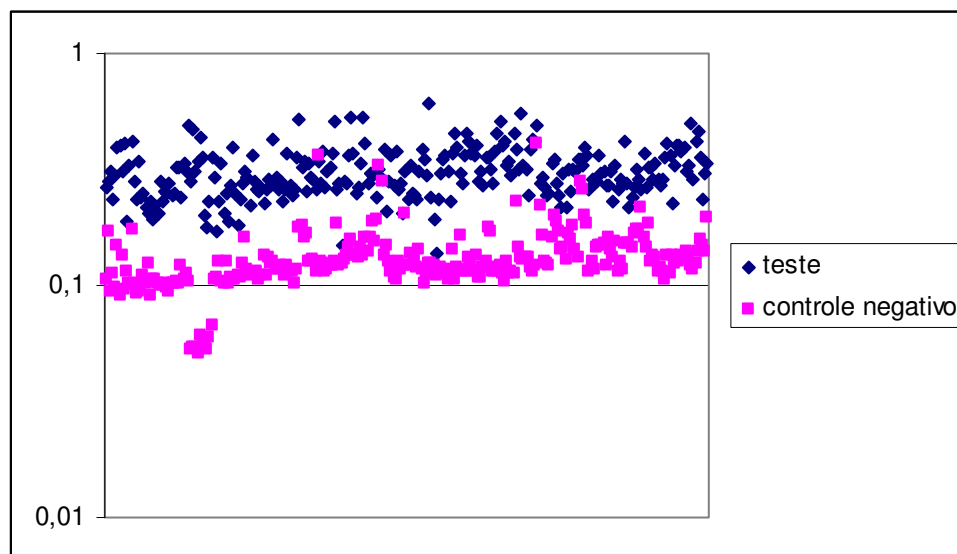


Figura 12: Distribuição de frequência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para DEN III.

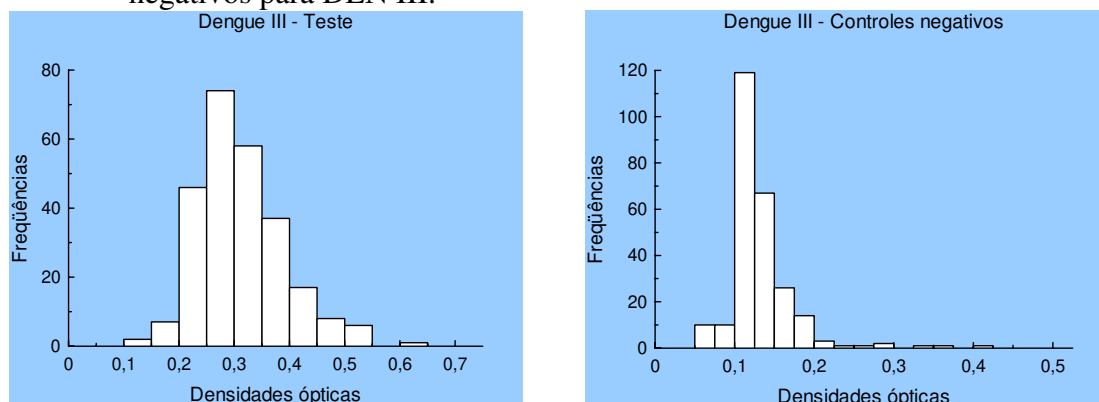


Figura 13: Comparação das densidades ópticas obtidas entre os soros de macacos prego e os respectivos controles negativos, para FA no teste de ELISA.

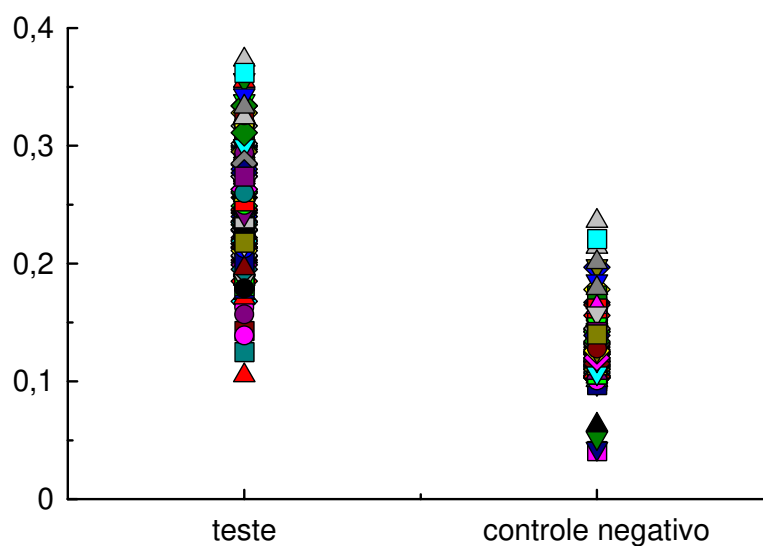


Figura 14: Dispersão logarítmica das densidades ópticas encontradas para os soros de macacos prego e seus respectivos controles negativos, para FA, no teste de ELISA.

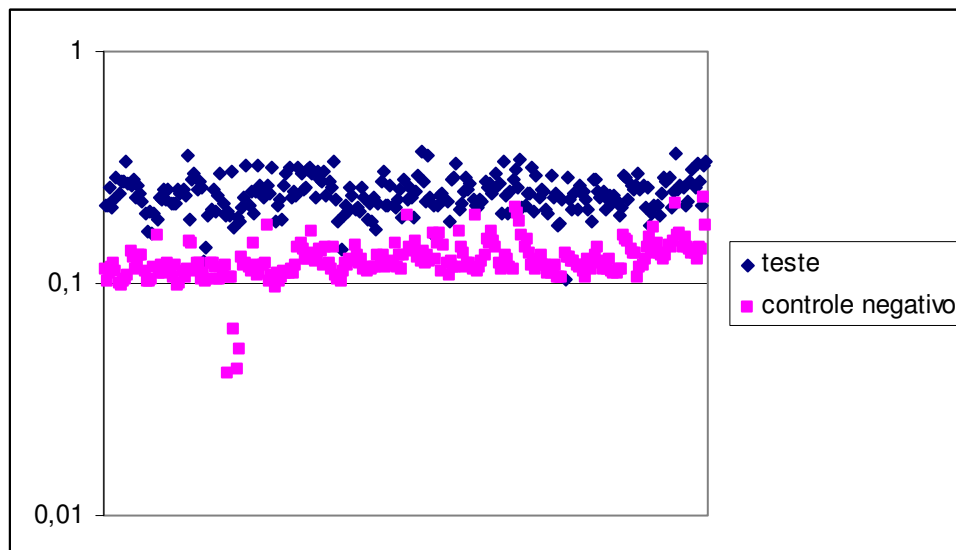


Figura 15: Distribuição de frequência das densidades ópticas observadas no teste imunoenzimático, dos soros de macacos prego testados e dos controles negativos para FA.

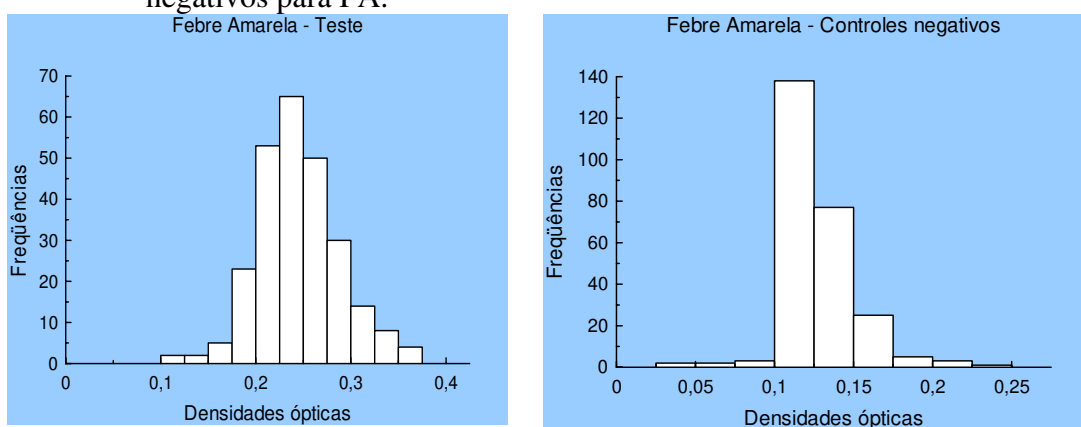


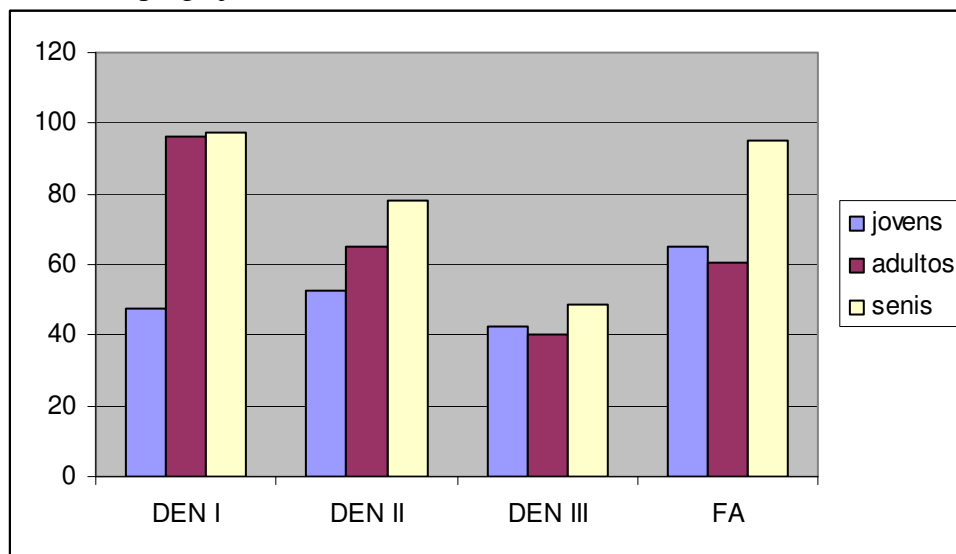
Tabela 2: Origem dos soros que compõem as amostras consideradas como altamente reagentes aos quatro antígenos estudados.

NÚMERO DA AMOSTRA	CIDADE DE PROCEDÊNCIA	ORIGEM DO ANIMAL
6	Sumaré – SP	Externa – origem desconhecida
10	Sumaré – SP	Sem informações
11	Sumaré – SP	Externa – origem desconhecida
36	São José do Rio Preto - SP	Nascido no zoológico
38	São José do Rio Preto - SP	Externa – origem desconhecida
61	São Paulo - SP	Externa – origem desconhecida
66	São Paulo – SP	Externa – origem desconhecida
72	São Paulo – SP	Sem informações
79	São Paulo – SP	Externa – origem desconhecida
83	São Paulo – SP	Sem informações
98	São Paulo – SP	Sem informações
110	São Paulo – SP	Externa – origem desconhecida
135	Campinas – SP	Nascido no zoológico
138	João Pessoa – PB	Nascido no zoológico
150	São Vicente – SP	Sem informações
168	Camburiú – SC	Externa – praça de Florianópolis
170	Camburiú – SC	Externa – praça de Florianópolis
177	Brusque – SC	Sem informações
182	Brusque – SC	Sem informações
204	Sapucaia do Sul – RS	Externa – Alvorada – RS
221	Cachoeira do Sul – RS	Sem informações
227	Cachoeira do Sul – RS	Externa – Candelária - RS
249	Pool de soros São Paulo	
23 soros	10 cidades diferentes	

Não observamos diferença, estatisticamente significativa, quando comparamos as densidades ópticas obtidas (para os antígenos pesquisados) entre machos e fêmeas, assim como, para animais jovens, adultos e senis ($p > 0,01$). A frequência de reatividade encontrada para as fêmeas foi de 95,75 e de 97,71% para os machos quando utilizado o antígeno DEN I; para DEN II foi de 64,89% e 71,28%; para DEN III, 43,51% e 43,62% e finalmente de 60,31% e 60,64% respectivamente para o da febre amarela. Já as frequências de reatividade encontradas, respectivamente para DEN I, DEN II, DEN III e FA foram de 47,5%, 52,5%, 42,5% e 65% para os animais jovens, de 96,49%, 64,91%, 40,35% e 60,53% para os animais adultos e de 97,56%, 78,05%, 48,78% e 95,12% para os animais

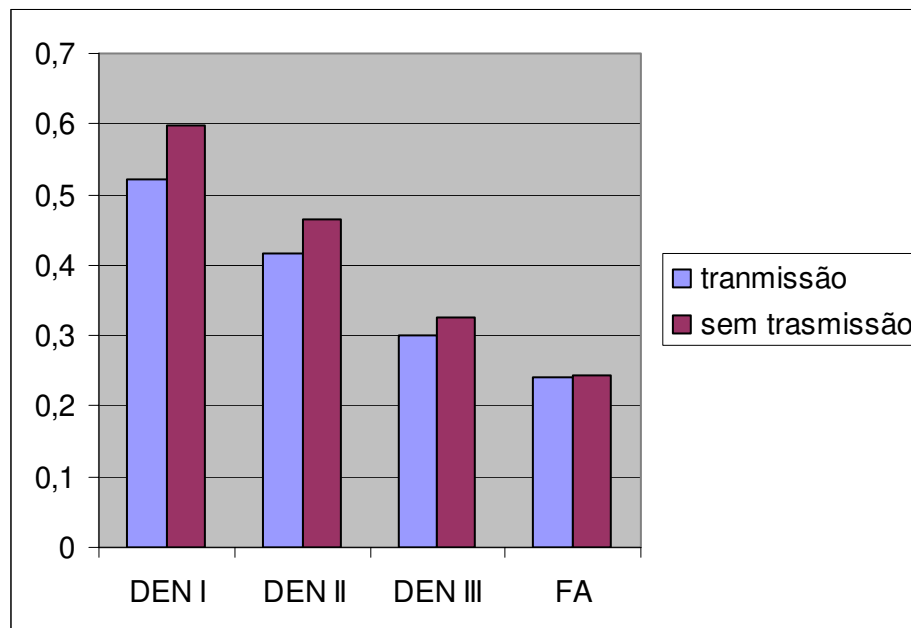
senis As diferenças foram significativas para DEN I e FA ($p < 0,01$), onde os animais senis apresentaram uma maior frequência de reatividade (Figura 16).

Figura 16: Frequências de reatividade frente aos antígenos pesquisados dentre os soros de macacos prego jovens, adultos e senis, frente ao teste imunoenzimático.



Os testes imunoenzimáticos de soros de animais, mantidos em cativeiros em regiões onde não existia a transmissão da dengue e da febre amarela por ocasião da coleta, apresentaram densidades ópticas maiores do que os daqueles de áreas com transmissão, sendo estas diferenças significativas para os antígenos DEN I e DEN II ($P < 0,01$) e no limite para DEN III (Figura 17).

Figura 17: Média das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros reativos de macacos prego oriundos de áreas com transmissão e sem de dengue e febre amarela.



Daqueles testes imunoenzimáticos envolvendo soros pareados, normais e os que passaram pela extração com acetona (preparação para prova de inibição da hemaglutinação) observamos uma concordância quanto à reatividade (soros tratados e não) de 45,45% (25 em 55 soros reavaliados) sendo que os soros tratados perderam a reatividade em uma frequência de 49,09% (27 soros) para o antígeno da dengue 1. Para o DEN II e DEN III estes valores foram respectivamente de 69,57% (concordância) e 30,44% (perda da reatividade). No que tange a prova envolvendo o antígeno da Febre Amarela, a concordância foi de 73,91% (17 soros em 23 reavaliados) e a perda da reatividade ocorreu na frequência de 21,74% (5 soros). Observamos, ainda uma diminuição nos valores de densidade óptica dos soros tratados frente aos normais que foram estatisticamente significativa ($p < 0,01$) para DEN I, DEN II e Febre Amarela ($p < 0,01$), não atingindo significância para DEN III (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Figura 18: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN I.

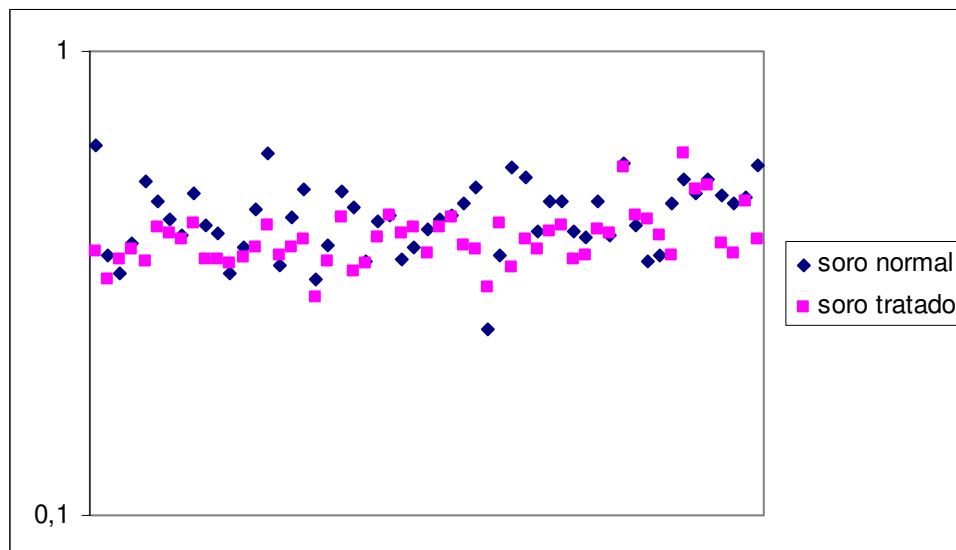


Figura 19: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN II.

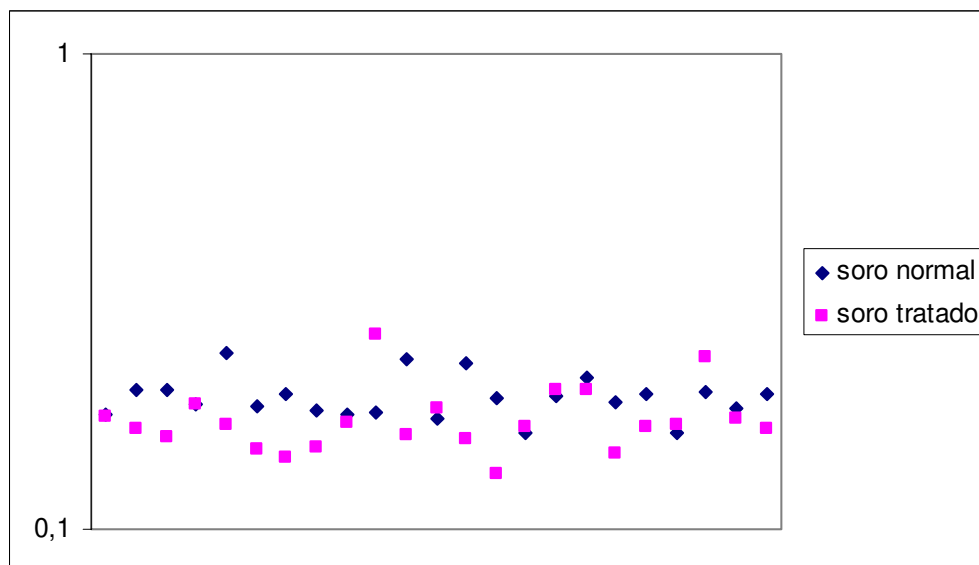


Figura 20: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para DEN III.

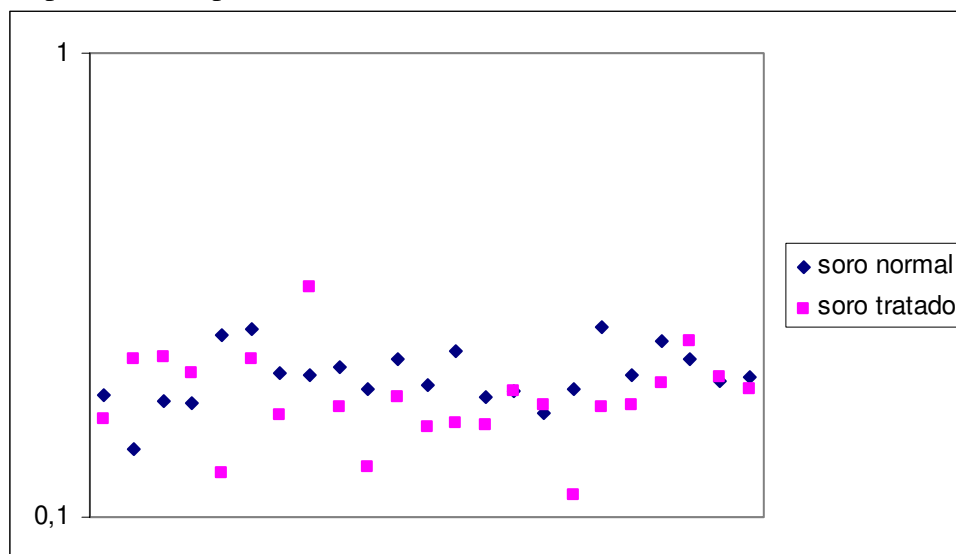
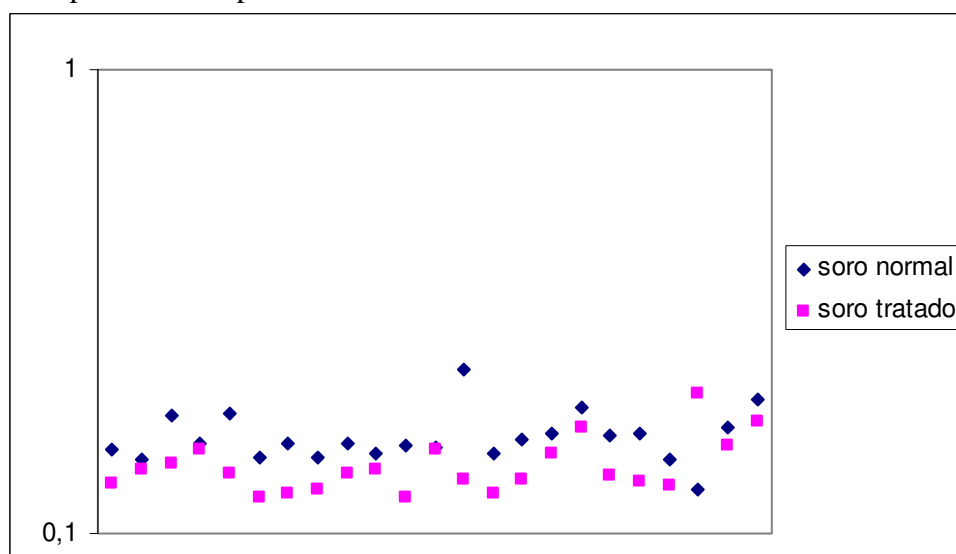


Figura 21: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático dos soros normais comparados aos tratados com a extração pela acetona para FA.



Dos 11 soros que foram adsorvidos com DEN I, II, III e FA, 1 apresentou inibição da reação imunoenzimática mediante 3 antígenos distintos (DEN I, DEN II e FA), 2 para 2 antígenos DEN I e DEN II e restante para pelo menos um dos pesquisados. O DEN II inibiu 7 (63,64%) dos soros; DEN I, 4 (36,36%) e FA 3 (27,28%%). A adsorção com DIII, não inibiu a reação imunoenzimática para nenhum dos soros testados (Figuras 22, 23, 24 e 25). A tabela 3 mostra a procedência das amostras em epígrafe.

Figura 22: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da DEN I.

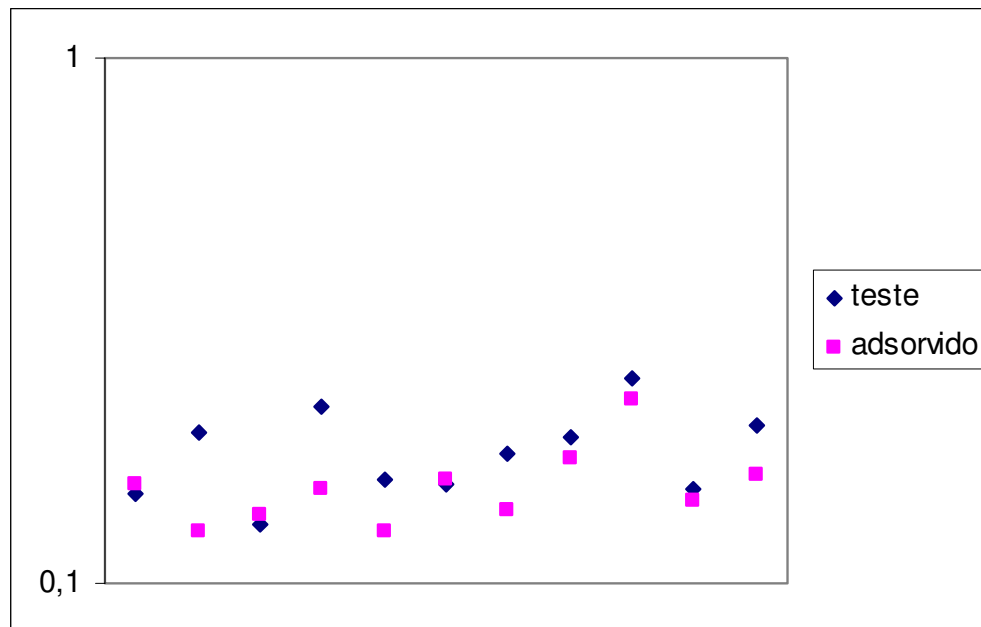


Figura 23: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da DEN II.

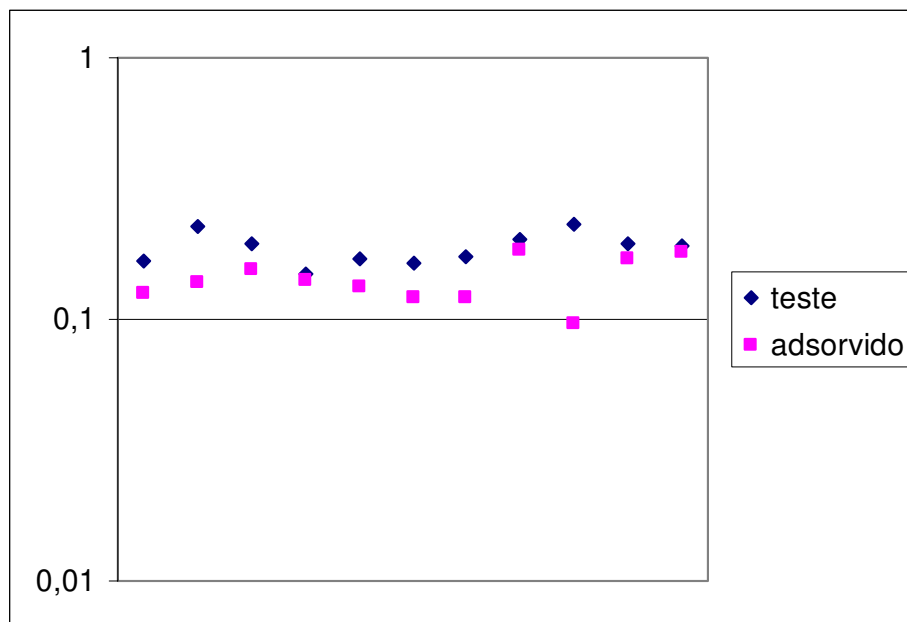


Figura 24: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da DEN III.

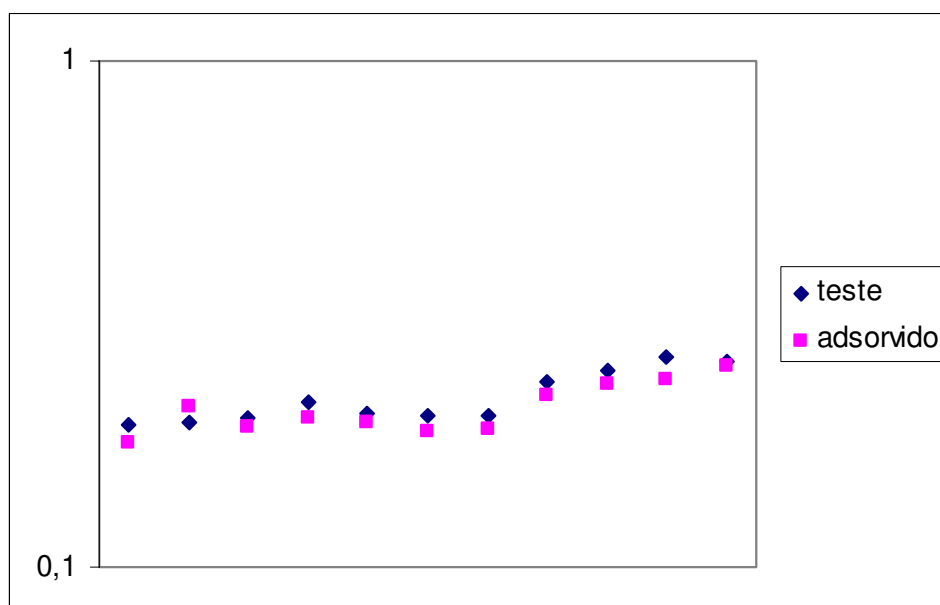


Figura 25: Dispersão logarítmica das densidades ópticas obtidas no teste imunoenzimático dos soros de macacos prego, normais e adsorvidos frente ao antígeno da FA.

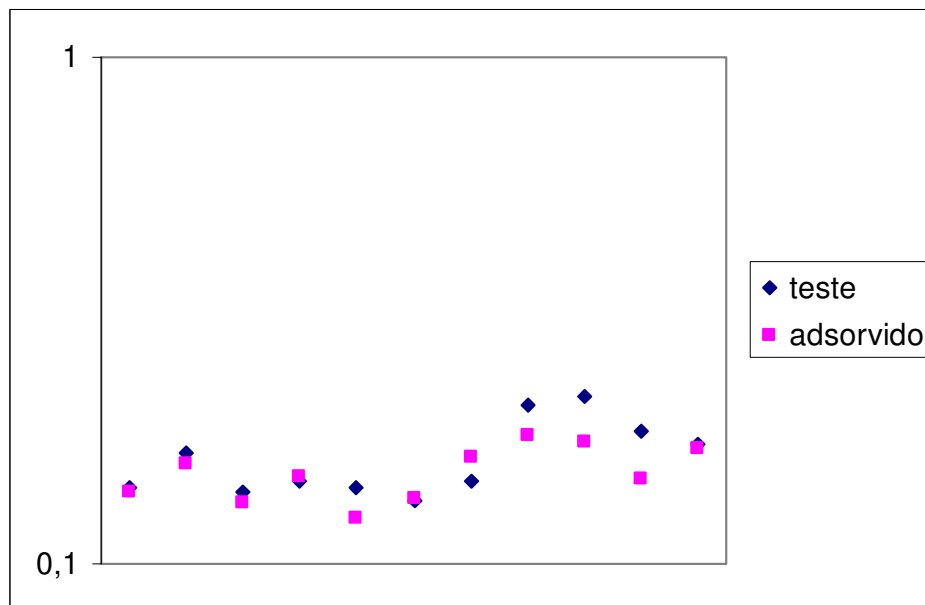


Tabela 3: Procedência das amostras utilizadas na prova de inibição do ELISA para os quatro antígenos pesquisados.

NÚMEROS DAS AMOSTRAS	CIDADE DE PROCEDÊNCIA	ORIGEM DO ANIMAL	ANTIGENOS INIBIDORES
6	Sumaré – SP	Externa – origem desconhecida	DEN I
9	Sumaré - SP	Externa – origem desconhecida	DEN I e II
11	Sumaré – SP	Externa – origem desconhecida	DEN II
36	São José do Rio Preto - SP	Nascido no zoológico	DEN I
38	São José do Rio Preto - SP	Externa – origem desconhecida	DEN I,II e FA
41	São José do Rio Preto - SP	Nascido no zoológico	DEN II
42	Piracicaba - SP	Externa – origem desconhecida	DEN I, II
55	Santa Bárbara – SP	Sem informações	FA
98	São Paulo – SP	Sem informações	DII
110	São Paulo – SP	Externa – origem desconhecida	FA
138	João Pessoa – PB	Nascido no zoológico	DEN I
11 soros	6 cidades diferentes		

5- DISCUSSÃO

Humanos e camundongos saudáveis apresentam em seu soro anticorpos naturais, ou seja, imunoglobulinas reativas com moléculas estranhas (*non self*) ou não (*self*), que são detectadas na ausência de contato com antígenos externos. Como visto anteriormente estes apresentam várias funções incluindo o controle da autoreatividade e a homeostase do sistema imune em indivíduos sadios; podem ainda ser encontrados no sangue do cordão umbilical de recém nascidos sugerindo que sua síntese independe de antígenos exógenos, entretanto, os mecanismos pelos quais são regulados os seus repertórios ainda não são totalmente compreendidos (QUINTANA et al, 2004).

A sorologia é importante no diagnóstico das infecções por *Flavivirus* e na diferenciação entre infecções primária e secundária. Tradicionalmente a IH tem sido usada para classificar as respostas imunológicas em primárias (aumento gradual de anticorpos a um título moderado) ou secundárias (aumento rápido a títulos elevados), visto que detecta imunoglobulinas totais, principalmente IgG (que perduram por um longo período de tempo), constituindo um teste útil para estudos soros-epidemiológicos. Por outro lado, o teste de ELISA-IgM (MaC-ELISA) é muito importante no diagnóstico rápido das infecções correntes e/ou recentes, pois usualmente a IgM surge na primeira semana após o início dos sintomas, atinge um pico na segunda semana e perdura por 2 a 3 meses (MANCINI et al, 1965; WHO, 1986, 1998 a,b, 1999, 2001; ARAÚJO et al, 2002; VASCONCELOS, 2002, 2003). Existe uma reação cruzada substancial entre os *Flavivírus*, como os vírus da febre amarela e da dengue, devido à presença de determinantes antigênicos comuns, assim como entre os quatro sorotipos da dengue; apesar de existir apenas um único determinante para cada sorotipo (BEASLEY, 1994; LAM & DEVINE, 1996; DEOPE, 1996), este padrão de reação também foi observado neste trabalho, uma vez que vários dos soros estudados reagiram com todos os antígenos pesquisados.

A imunização dos primatas com soroalbumina bovina se mostrou eficiente, uma vez que os soros hiperimunes, de todos os animais desafiados com este antígeno, apresentaram linhas de precipitação, à imunodifusão em gel, visíveis até mesmo antes da coloração das lâminas. A utilização de soros sabidamente positivos a um antígeno conhecido foi de

grande valia na padronização do teste imunoenzimático para imunoglobulinas de *Cebus apella*, assim como na certificação da viabilidade do uso de distintos tipos de conjugado. Seria ainda interessante darmos foco à importância do método no sentido da viabilidade de sua utilização em outros animais silvestres, uma vez que não causa danos à saúde e produz um controle positivo, normalmente, inexistente para estes tipos de animais, pois como destaca Hietala & Gardner (1999), uma das grandes dificuldades no diagnóstico de reatividade de anticorpos de animais selvagens a antígenos específicos, por testes de grande sensibilidade, residiria na inexistência de conjugados espécie específicos e de padronização destes.

O conjugado comercial anti IgG de macacos genérico (*anti-monkey*) e o anti IgG humana (Sigma) foram suficientes para revelação da reação dos soros de *Cebus apella* aos antígenos da dengue e da febre amarela no teste imunoenzimático, corroborando com informações da literatura sobre a existência de importantes similaridades (inclusive a existência de reação cruzada) entre as imunoglobulinas de macaco prego e as humanas (MACHADO, 1980; PALMERO et al, 1988). O fato de o conjugado ser destinado a IgG não impede a sua ligação às cadeias leves do pentâmero da IgM, (não o torna monoespecífico) permitindo, também, a detecção deste isotipo de anticorpo.

Em detrimento de existirem na literatura uma infinidade de testes visando dirimir alguns problemas práticos das técnicas tradicionalmente empregadas (KUNO & WEIL, 1985; RAMUDO et al, 1986; FIGUEIREDO et al, 1987, 1989; KUNO et al, 1991) e de haverem testes comerciais de fácil utilização (GROEN et al, 2000; SATISH et al, 2003), no Brasil os laboratórios oficiais utilizam os testes de IH e o MaC-ELISA para o diagnóstico sorológico da dengue e febre amarela (WHO, 1998, VASCONCELOS, 2002, 2003). O teste de inibição da hemaglutinação, apesar de ser uma das provas indicadas para o diagnóstico destes agravos pela Organização Mundial de Saúde, apresenta problemas que foram observados neste estudo, uma vez que a extração pela acetona (necessária para a retirada de outros hemaglutinantes do soro) estaria desnaturando de forma definitiva uma grande quantidade de anticorpos passíveis de serem detectados em outros testes imunológicos como o ELISA.

O teste imunoenzimático com amostras pareadas (tratadas e não pela acetona) apresentou perda na reatividade dos soros tratados, aos antígenos virais pesquisados, da

ordem de 49,09% (DEN I); 69,57% (DEN II e III) e 21,74% (FA). Quando levamos em conta as diferenças de densidades ópticas entre os soros normais e tratados, observamos diferença significativa ($p < 0,01$) para os antígenos DEN I, II e FA, indicando que além da perda da reatividade (segundo os critérios estabelecidos) de alguns soros, existe uma diminuição nos valores das densidades ópticas daqueles tratados (exceção feita ao DEN III, onde a diferença não foi significativa – $p = 0,08$). Havemos de considerar ainda a possibilidade de uma maior instabilidade espécie específica, ao tratamento pela extração com acetona, das imunoglobulinas de *Cebus apella*. Certamente esta etapa do procedimento laboratorial não estaria indicada para soros oriundos de primatas desta espécie, e no que tange a sua utilização em soros humanos, talvez merecesse uma maior investigação. Outros inconvenientes deste teste, tais como o tempo e a complexidade de elaboração, dificuldade na padronização dos resultados entre diferentes laboratórios, alto índice de reações cruzadas e necessidade da utilização de amostras pareadas (no caso do diagnóstico da doença em curso) tem influenciado seu abandono enquanto teste de rotina para o diagnóstico de dengue e de febre amarela. A prova de fixação do complemento não tem sido utilizada devido à necessidade de um pessoal treinado (quando consideramos a sua utilização fora de laboratórios de referência) para sua consecução e também pelo alto índice de reações cruzadas observadas, que muitas vezes são iguais ou até mesmo maiores do que as para o *flavivírus* realmente infectante (SATISH et al, 2003).

Devido às dificuldades encontradas podemos observar na literatura um esforço no sentido de buscar um método rápido, sensível e suficiente para detectar a infecção primária através da revelação de IgMs reativas aos antígenos virais, o que tem sido solucionado pela padronização de um teste de ELISA de captura de IgM (Mac-ELISA). Existe, hoje no mercado uma grande quantidade de testes comerciais direcionados a detecção de antígenos virais de *flavivírus* destinados a soros humanos e baseados no ELISA (WHO, 1998 a, b; GROEN et al, 2000; SATISH et al, 2003).

Como o objetivo deste trabalho não era o de oferecer um diagnóstico da infecção primária, e sim o de revelar a existência de anticorpos reativos aos antígenos virais da dengue e da febre amarela, optamos pelo teste de ELISA indireto, anteriormente descrito, uma vez que poderíamos detectar outros isotipos de imunoglobulinas (VOLLER & BIDWELL, 1986).

Observamos uma alta frequência de reatividade, dos soros testados frente aos antígenos da dengue e da febre amarela, atingindo uma frequência de 97% para DEN I, por exemplo. Certamente seria muito difícil tentar explicar estes níveis de anticorpos do ponto de vista da epidemiologia das enfermidades em epígrafe, uma vez que dentre os animais estudados muitos não se encontravam em áreas endêmicas para estes agravos por ocasião da coleta de sangue, como é o caso dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SCHATZMAYR, 2000; FIGUEIREDO et al, 2004). Caso consideremos que muitos animais vieram de fora do cativeiro (poderiam ter vindo de áreas endêmicas), haveríamos de levar em conta que, outros tantos apresentando soros reativos, nasceram nestes.

Quando compiladas, as médias de densidades ópticas (obtidas no teste imunoenzimático) dos soros de animais oriundos de regiões com transmissão e sem, das doenças estudadas, observamos uma maior leitura para esta última, significativa para os antígenos DEN I e DEN II (no limite para DEN III $p=0,019$), contrariando o que seria epidemiologicamente esperado no caso de uma infecção natural. Outra particularidade interessante é a do traçado, próximo à distribuição gaussiana, do compilado de frequências de densidades ópticas dos soros estudados frente aos quatro antígenos, mostrando não haverem grandes desvios na curva de normalidade.

Diante do exposto acima a idéia de se discutir a existência de anticorpos naturais na espécie estudada é, sem dúvidas, inevitável uma vez que seria capaz de explicar várias das particularidades da inserção desta espécie na epidemiologia da dengue e da febre amarela. Poderíamos sugerir que a resistência do *Cebus apella* a febre amarela silvestre (VASCONCELOS, 2002, 2003) no Brasil seria em decorrência da existência de anticorpos naturais que neutralizariam a partícula viral, fato apontado, porém em sentido contrário, por Theiler & Anderson (1975) quando estudavam o *Macacus rhesus* na Ásia e tentavam explicar a inexistência de um ciclo silvestre da febre amarela neste continente.

Trabalhos feitos com outras espécies de primatas (nenhum com macaco prego), que envolveram a inoculação dos vírus da dengue, mostraram uma baixa viremia e título de anticorpos, além de ausência de sintomatologia clínica (SCHERER et al, 1978; MARCHETTE & HALSTEAD, 1973; KRAISELBURG et al, 1985). Quando consideramos, a semelhança filogenética de primatas como os chimpanzés (estudados, também) com a espécie humana e a falta de sensibilidade destes a dengue havemos de levar

em conta, a possibilidade da existência de alguma particularidade no sistema imune deles que pudesse ser responsabilizada por este padrão de sensibilidade diferenciada.

Ochsenbein et al (1999) observaram que os soros, de ratos não imunizados apresentavam IgMs naturais, reativas aos vírus da coriomeningite linfocítica, vacinia e estomatite vesicular, que conferiam proteção contra estes microrganismos. Outros autores como Baumgarth et al (2000) que também observaram um efeito de proteção por parte de anticorpos naturais ao vírus da influenza, engrossam a idéia da ação destas imunoglobulinas na infecção viral, em detrimento da idéia clássica centrada no envolvimento do eixo linfócitos CD4 - CD8 e resposta citotóxica. Hahn et al (2001) conseguiram baixar, de forma significativa, o nível de viremia do vírus da dengue em primatas mediante a inoculação de anticorpos biespecíficos (heterodímeros) para estes vírus e para proteína E do complemento (de símios), conseguindo *in vitro*, uma limpeza viral da ordem de 90% (em 5 minutos) e resultados similares *in vivo* utilizando macacos. Outros autores observaram que estes anticorpos (naturais) também possuíam uma ação semelhante frente às infecções por *Tripanossoma cruzi* (ALMEIDA et al, 1991) e Rotavírus (ROTHER et al, 1995).

Hayashi et al (2004) pesquisando a resistência de primatas do velho mundo (incluindo a espécie humana) ao vírus da pseudoraiwa (*herpesviridae* - que normalmente infecta culturas de células humanas), verificaram a ação neutralizante de anticorpos naturais, existentes nas espécies estudadas, que também eram reativos a Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (epítipo α Gal). Gostaríamos de ressaltar que estas espécies de primatas, em detrimento de outros mamíferos, não apresentam este epítipo em suas células, sendo os anticorpos naturais contra estes, existentes no soro normal, atribuídos a um “tônus”, mantido pela microflora intestinal, através de reações cruzadas com epítopos semelhantes ao α -galactosil (GALILI et al, 1988).

Os dados da literatura embasam, de certa forma a hipótese de que os anticorpos naturais detectados neste estudo apresentariam algum papel na infecção viral da dengue e da febre amarela e que poderiam reagir com outros tipos de antígenos, ou mesmo serem mantidos mediante uma estimulação permanente da microflora bacteriana. Curiosamente a única diferença, estatisticamente significativa, em reatividade frente aos antígenos DEN I e FA, que encontramos foi aquela dos macacos prego velhos (maior reatividade que jovens e adultos). Embora a dieta destes animais, nos diversos zoológicos visitados, seja muito

semelhante, existe uma priorização social para a alimentação (os animais dominantes se alimentam antes e dos alimentos mais palatáveis, mais energéticos e protéicos) que, de certa forma, distancia os animais velhos dos itens com maior teor nutricional, devido à perda do *status* social (observação pessoal). Esta particularidade poderia alterar qualitativamente as floras intestinais destes animais, mudando o tipo de estimulação dos linfócitos B CD5. Podemos, no entanto, visualizar uma série de outras tentativas especulativas de explicação, porém havemos de nos concentrar no fato de que o assunto convida a realização de novos estudos.

Seria ainda interessante darmos nota à possibilidade da geração de auto-anticorpos naturais envolvendo estímulos constantes dados pelos autoantígenos, o que poderia também ser uma parte da explicação desta alta reatividade encontrada aos antígenos pesquisados, uma vez que o envelope viral dos *flavivírus* é formado por partes da unidade de membrana das células hospedeiras (CHAMBERS et al, 1990; LINDENBACH & RICE, 2001; VASCONCELOS, 2002, 2003).

A perda parcial da reatividade dos soros, pelo tratamento com acetona, sugere que, em sua grande maioria, estes anticorpos pertenceriam a isotipos de estrutura molecular mais complexa, como é o caso da IgM, o que corrobora com os dados da literatura que apontam esta classe de imunoglobulina como a principal constituinte dos anticorpos naturais. Por outro lado a manutenção de níveis de reatividade para alguns soros (mesmo após do tratamento pela extração com acetona) indicaria a presença de IgGs, destacando também a importância deste isotipo enquanto anticorpo natural (AVRAMEAS & TERNYNCK, 1995; COUTINHO et al, 1995; DEPRAETERE et al, 2000; BOES, 2000).

O teste de inibição realizado através da adsorção dos soros com os antígenos estudados mostrou uma inibição cruzada, normalmente a mais de um sorotipo, ratificando de certa forma as reações positivas encontradas (ARAÚJO et al, 1987). Uma variação da inibição encontrada poderia ser explicada pelo fato dos soros empregados serem policlonais e também conterem uma quantidade de anticorpos muito variável.

A alta reatividade obtida neste estudo, associada ao “estado da arte” do conhecimento dos autoanticorpos e anticorpos naturais, provoca a consecução de novas investigações, direcionadas a entender aspectos deste perfil de imunoglobulinas detectadas pelo teste de ELISA, a que isotipos pertencem, sua autoreatividade, seu poder de

neutralização ou mesmo ação de proteção direcionada às partículas virais, dentre outras tantas perguntas que insistem em se fazerem presentes.

Entendemos que as investigações envolvendo o estudo da imunofisiologia comparada em animais silvestres, apesar de muitas vezes negligenciada, poderia expor aspectos muito importantes para o entendimento de particularidades nesta área do conhecimento, para as quais os modelos de estudo tradicionais não tenham suficiência. Soluções evolutivas encontradas para a homeostase e mesmo diferentes formas que representaram uma vantagem evolutiva para este relacionamento, com o mundo microbiano poderiam apresentar-nos alternativas interessantes ao modelo clássico de funcionamento do sistema imune. Entendemos que seria pouco provável que uma grande diversidade de animais adaptados aos mais diversos ambientes, com importantes diferenças anatômicas e fisiológicas, fizessem uso de um sistema imune exatamente igual ao das poucas espécies animais estudadas.

6- CONCLUSÕES

- Os conjugados comerciais *anti-monkey* e *anti-humano* são suficientes para revelação das reações dos anticorpos de *Cebus apella* ao teste de ELISA indireto.
- Existe reatividade dos soros de macacos prego (*Cebus apella*) estudados a três dos antígenos virais da dengue e ao da febre amarela.
- A reatividade encontrada dos soros de *Cebus apella* frente aos antígenos virais da dengue e da febre amarela não pode ser explicada com base na epidemiologia destas doenças, por ocasião da obtenção dos soros.
- Etapas necessárias para a elaboração do teste de Inibição da Hemaglutinação, segundo o protocolo utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz, inviabilizam alguns dos anticorpos detectados pelo teste de ELISA indireto, para os soros de *Cebus apella*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, P; Szafires, Organization Panamericana de la Salud; *Zoonosis Y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre Y a Los Animales*, 2^a Edição, Publicación Científica N° 503, 1986.
- Adib, M; Ragimbeu, J; Avrameas, S; Ternynck, T. *IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM*. J. Immunol. 145, 3807-3813, 1990.
- Almeida, I.C; Milani, S.R; Corin, A.J; Travassos, L.R. *Complement mediated lysis of Trypanosoma cruzi trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies*. J. Immunol; 156, 2394-2400, 1991.
- Anderson R.M; May R.M. Population biology of infectious diseases: part I. *Nature* 280: 361-367, 1979a.
- Anderson R.M; May R.M. 1979b. Population biology of infectious diseases: part II. *Nature* 280: 455-460, 1979b.
- Araújo, P.M.F; Holmberg, D; Martines-A, C; Coutinho, A. *Idiotypic Multireactivity of "Natural" Antibodies: Natural Anti-Idiotypes Also Inhibit Helper Cells with Cross-Reactive Clonotypes*. Scand. J. Immunol. 25, 497-505, 1987.
- Araújo, T.P; Rodrigues, S.G; Costa, M.I.W; Vasconcelos, P.F.C; Rosa, A.P.A.T. *Diagnóstico sorológico de infecções por dengue e febre amarela em casos suspeitos no Estado do Pará, Brasil, 1999*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.35 no.6, Nov./Dec, 2002.
- Avrameas, S; Ternynck, T. *The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts*. Mol. Immunol; 30:1133-1142, 1993.
- Avrameas, S; Ternynck, T. *Natural autoantibodies: the other side of the immune system*. Res. Immunol; 146, 235-248, 1995.
- Baumgarth, N; Herman, O.C; Jager, G.C; Brown, L.E; Herzenberg, L.A; Chen, J. *B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection*. J. Exp. Med.; 192, 271-280, 2000.
- Beasley, D. - *The Life Site* - webpage: <http://life.sei.qut.edu.au/david/litrev>, 1994.
- Berneman, A; Ternynck, T; Avrameas, S. *Natural mouse IgG reacts with self antigens including molecules involved in the immune response*. Eur. J. Immunol; 22:625-633, 1992.

- Berneman, A; Guilbert, B; Eschrich, S; Avrameas, S. *IgG auto- and polyreactivities of normal human sera*; Molecular Immunology, V30, n16, 1499-1510, 1993.
- Boes, M. *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Molecular Immunology, 37, 1141-1149, 2000.
- Boffey, J; Nicholl, D; Wagner, E; Townson, K; Goodyear, C; Furukawa, K; Conner, J; Willison, H.J. *Innate murine B cells produce anti-disialosyl antibodies reactive with Campylobacter jejuni LPS and gangliosides that are polyreactive and encoded by a restricted set of unmutated V genes*. Journal of Neuroimmunology; 152(1-2):98-111, 2004.
- Braz, M. B., *Semiologia médica animal*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2ªed, 1980.
- Carlan, M.C; Peres, A; Nardi, N.B. *Frequency of B cells in normal mice which recognize self proteins*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30:225-230, 1997.
- Castedo, M; Pelletier, L; Pasquier, R; Guettier, C; Huygen, K; Michel, J.B; Druet, P. *Anti-renin T cells trigger normal B cells to produce anti-renin antibodies and normalize blood pressure in spontaneous hypertensive rats*. Int. Immunol. 12:1569-1576, 1993.
- Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R, Rice C. M. *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol 44: 649-688, 1990.
- Cheng, H.M; Sundram, K. *Cholesterol oxides and natural autoantibodies*. Artherosclerosis, 141:347-348, 1998.
- Chow, D.A; Bennet, R.D. *Low natural antibody and low in vivo tumor resistance, in xid-bearing B-cell deficient mice*. J. Immunol; 142, 3702-3706, 1989.
- Clarke, D. H.; Casals, J. *Technics for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropodes borne viruses*. Am. J. trop. Med. Hygiene; 7:561-573, 1958.
- Coutinho, A; Marquez, C; Araújo, P.M.F; Pereira, P; Toribio, M.L; Marcos, M.A.R; Martinez-A, C. *A functional idiotypic of T helper cells and antibodies, limited to the compartment of "naturally" activated lymphocytes in normal mice*. Eur. Journal Immunology; 17:821-825, 1987.
- Coutinho, A; Kazatchkine, M.D; Avrameas, S. *Natural antibodies*. Current Opinion in Immunology, 7:812-818, 1995.
- Crow, S. E.; Walshaw, S. O.; *Manual de Procedimentos Clínicos*. 22.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000.

- Cukrowska, B; Tlaskalova – Hogenova, H. *B-1 lymphocytes: Development, functions in the systemic and mucosal immunity, the involvement in autoimmunity*. Central European Journal of Immunology; 26(2): 93-101, 2001.
- Degallier, N; Teixeira, J.M.S; Chaib, A.J.M; Barbosa, H.F; Rios, J.A. *Estudos Experimentais sobre a Competência Vetorial de Aedes aegypti e Aedes albopictus para o vírus da dengue e da febre amarela*. Informe Epidemiológico do SUS, 10(Supl.1):9-11, 2001.
- Depraetere, H; Depla, E; Haelewyn, J; Ley, M.D; *An anti-idiotypic antibody with an internal image of human interferon- γ and human interferon- γ -like antiviral activity*. Eur. Journal Biochem, 267, 2260-2267, 2000.
- DEOPE ; Manual da Dengue - *Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente*. 2ª Edição Brasília:, 1996.
- Diallo M; Ba Y; Sall A. A; Diop O. M; Ndione J. A; Mondo M, Girault, L; Mathiot, C. *Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations*. Emerg Infect Dis [serial online] 2003 Mar [date cited]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no3/02-0219.htm>
- Diniz, L.S.M. - *Primatas em cativeiro: Manejo e Problemas Veterinários*. Ed. Ícone, 1997.
- Dumbar, R. I. M. - *Primate Social Systems* Croom Helm, 1988.
- Fagbami, A. H.; Monath, T. P.; Fabiyi, A. *Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol.71, N1, 1977.
- Fearon, D.T; Locksley, R.M. *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 272, 50-53, 1996.
- Fernvik, E.C; Ketelhuth, D.F.J; Russo, M; Gidlund, M. *The autoantibody against copper or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients*. Journal of Clinical Immunology; 24(2): 170-176, 2004
- Figueiredo, L.T.M; Shope, R. E. *An enzyme immunoassay for dengue antibody using infected cultured mosquito cells as antigen*. Journal of Virological Methods, 17, 191-198, 1987.
- Figueiredo, L.T.M; Simões, M.C; Cavalcante, S.M.B. *Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83, 702-707, 1989.

- Figueiredo, R.M.P; Thatcher, B.D; Lima, M.L; Almeida, T.C; Alecrim, W.D; Guerra, M.V.F. *Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas no período de 1998 -1999*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 37(6), 476-479, nov-dez, 2004.
- Foon, K.A; Chakraborty, M; John, WJ; Sherratt, A; Köhler, H; Bhattacharya-Chatterjee. *Immune Response to the Carcinoembryonic Antigen in Patients Treated with an Anti-idiotypic Antibody Vaccine*. J. Clin. Invest. Vol 96, July, 334,342, 1995.
- Fordsdyke, D.R. *Altered-self or near-self in the positive selection of lymphocyte repertoires*. Immunology Letters, no prelo, 2005.
- Fowler, M. E.; Cubas, Z. S.; *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa: Iowa State University, 2001.
- Fust, G; Beck, Z; Banhegyi, D; Kocsis, J; Biro, A; Prochazka, Z. *Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection*. Mol. Immunology; 42(1): 79-85, 2005.
- Galili, U; Macher, B.A; Buehler, J; Shohet, S.B; Griffis, J.M. *Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora*. Infect. Immunol; 56, 1730-1737, 1988.
- Garcia, G; Álvarez, M; Santana, E; Mertínez, J.R; Álvarez, A; Rodríguez, R; Guzmán, M.G. *Detección de respuesta linfoproliferativa em monos inoculados com vírus dengue 4*. Rev. Cubana Med. Trop. 55(1):27-9, 2003.
- Gilles, J.G; Vanzielegheem, B; Saint-Remi, J.M. *Factor VIII Inhibitors. Natural autoantibodies and anti-idiotypes*. Semin Thromb Hemost; 26(2): 152-155, 2000.
- Gololobov, G.V; Chernova, E.A; Schourov, D.V; Smironov, I.V; Kudelina, I.A; Gabibov, A.G. *Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique*. Proc. Natl. Acad. Sci; 92, 254-257, 1995.
- Grandien, A; Fucs, R; Nobrega, A; Andersson, J; Coutinho, A. *Negative selection of multireactive B cell clones in normal adult mice*. European Journal of Immunology, 24:1345-1352, 1994.
- Groen, J; Koraka, P; Velzing, J; Copra, C; Osterhaus, A.D.M.E. *Evaluation of Six Immunoassays for Detection of Dengue Virus-Specific Immunoglobulin M and G Antibodies*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol.7, N^o6, p. 867-871, 2000.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In DJ Gubler, G Kuno (eds), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, Cab International, New York, p. 1-22, 1997.

- Halstead, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In DJ Gubler, G Kuno (eds), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CAB International, New York, p. 23-44, 1997.
- Hahn, C.S; French, O.G; Foley, P; Martin, E.N; Taylor, R.P. *Bispecific Monoclonal Antibodies Mediate Binding of Dengue Virus to Erythrocytes in a Monkey Model of Passive Viremia*. The Journal of Immunology, 166:1057-1065, 2001.
- Hamets-Casteman, C; Atarhouch, T; Muyldermans, S. *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 363:446-448, 1993.
- Hansen, M.B; Svenson, M; Abell, K; Yasukawa, K; Diamant, M; Bendtzen, K. *Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors*. Eur. J. Immunol, 25, 348-354, 1995.
- Hartree, E.F. *Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Anal. Biochem; 48:422-427, 1972.
- Hashimoto, K; Handa, H; Umehara, K; Sasaki, S. *Germfree mice reared on a "antigen-free" diet*. Laboratory Animal Science, 28:38-45, 1978.
- Haury, M; Grandien, A; Sundblad, A; Coutinho, A; Nobrega, A. *Global analysis of antibody repertoires. I. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities*. Scandinavian Journal of Immunology, 39:79-87, 1994.
- Hayashi, S; Ogawa, S; Takashima, Y; Otsuka, H. *The neutralization of pseudorabies virus by anti- α -galactosyl natural antibody in normal serum*. Virus Research; 99, 1-7, 2004.
- Hietala S.K; Gardner, I.A. *Validity of Using Diagnostic Tests That Are Approved for Use in Domestic Animals for Nondomestic Species*. In: *Zoo & Wild Animal Medicine, Current Therapy*. Morris Animal Foundation, Philadelphia, 4ed, 747p, 1999.
- Hooijkaas, H; Benner, R; Pleasants, J.R; Wostman, B.S. *Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free diet*. European Journal of Immunology, 14:1127-1130, 1984.
- Horn, M.P; Gerster, T; Ochensberger, B; Derer, T; Kricek, F; Jouvin, M.H; Kinet, J.P; Tschernig, T; Vogel, M; Stadler, B.M; Miescher, S.M. *Human anti-Fc ϵ psilonR1 α autoantibodies isolated from healthy donors cross-react with tetanus toxoid*. European Journal of Immunology; 29(4): 1139-1148, 1999.
- Kanost, D; MacCluskey, J. *Anergic B-cells constitutively present self antigen: enhanced immunoglobulin receptor-mediated presentation of antigenic determinants by B cells hierarchical*. Eur. J. Immunol; 24, 1186-1193, 1994.

- Kennedy-Stoskopf, S. *Evaluating Immunodeficiency Disorders in Captive Wild Animals*. In: *Zoo & Wild Animal Medicine, Current Therapy*. Morris Animal Foundation, Philadelphia, 4ed, 747p, 1999.
- Kindlovitis, A.; *Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais*. Niteroi - RJ: 1999.
- Kiss, K; Uher, F; Gergely, J. *A natural IgM antibody does inhibit polyclonal and antigen-specific IgM but not IgG B-cell responses*. Immunol Letters; 39, 235-241, 1994.
- Kostrikin, D.S; Panchenko, O.N; Myagkova, M.A; Stanislav, M.L; Cost, O.A; Nikolskaya, I.I. *ELISA detecting of natural antibodies to angiotensin-converting enzyme in human serum blood*. Biotekhnologiya; (6): 77-82, 2002.
- Kraiselburd, E; Gubler, D.J; Kessler, M.J. *Quantity of dengue virus required to infect Rhesus monkeys*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79, 248-251, 1985.
- Kuno, G; Gomez, I; Gubler, D.J. *An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections*. Journal of Virological Methods, 33, 101-113, 1991.
- Kuno, G; Gubler, D.J; Weil, N.S. *Antigen Capture ELISA for the Identification of Dengue Viruses*. Journal of Virological Methods, 12, 93-103, 1985.
- Lam, S. K; Devine, P. L. - *Evaluation of Capture ELISA and Rapid Immunochromatographic Test for the Determination of IgM and IgG Antibodies Produced During Dengue Infection*. Clin. Diag. Virol., 1996.
- Lapin, B. A; Yakovleva, L. A. ; Davydovskiy, I. V. *Comparative Pathology in Monkeys* Thomas Books, 1963.
- Larrat, R; Pagot, J. ; Vandenbusche, J. - *Manuel Veterinaire des Agents Techniques de L'élevage Tropical* Institute d'élevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux, 1971.
- Leal, E. S; Zanutto, P. M. A., *Viral diseases and human evolution*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol.95 s.1, 2000.
- Li, L; Paul, S; Tyutyulkova, S; Kazatchkine, M.D; Kaveri, S. *Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies*. J. Immunology; 154, 3328-3332, 1995.
- Lindenbach B. D, Rice C. M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In DM Knipe, PM Howley (eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 991-1041, 2001.
- Lee, E; McLean, K.; Weir, R. C.; Dalgarno, L. *Stimulation of Dengue Virus Replication in Cultured Aedes albopictus (c6/36) Mosquito Cells by the Antifungal Imidazoles Ketoconazole and Miconazole*. Virology, 269, 1-6, 2000.

- Lundkvist, I; Coutinho, A; Varela, F; Holmberg, D. *Evidence for a functional idiotypic network among natural antibodies in normal mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86:5074-5078, 1989.
- Lutz, H.U; Nater, M; Stammler, P. *Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3*. Immunology; 80, 191-196, 1993.
- Machado, B.M.R; *Isolamento e Caracterização de Soro de Macaco Cebus sp e obtenção de soros monoespecíficos*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Grau de Mestre em Biologia (Imunologia), 1980.
- Mancini, G.; Carbonara, A.O. ; Heremans, J.F. - *Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion* Immunochemistry; 2: 235, 1965.
- Marchette, N; Halstead, S.B. *Survival of dengue virus in post mortem samples of tissues from experimentally infected Rhesus monkeys*. Am. J. Trop. Med Hyg; 22(2), 242-243, 1973.
- Massone, F. *Anestesiologia Veterinária*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- Meager, A. *Natural autoantibodies to interferons*. J. Interferon Cytokine Res; 17 Suppl, 1:s51-53, jul, 1997.
- Miescher, S.M; Horn, M.P; Pachlopnik, J.M; Baldi, L; Vogel, M; Stadler, B.M. *Natural anti-Fc epsilon RI alpha autoantibodies isolated from healthy donors and chronic idiopathic urticaria patients reveal a restricted repertoire and autoreactivity on human basophils*. Human Antibodies; 10(3-4): 119-126, 2001.
- Monath, T. P. *Dengue: the risk to developed and developing countries*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 2395-2400, 1994.
- Monath, T. P.; Lee, V. H.; Wilson, D. C.; Fagbami, A; Tomori, O. *Arbovirus Studies in Nupeko Forest, a Possible Natural Focus of Yellow Fever Virus in Nigeria*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol.68, N1, 1974.
- Nobrega, A; Haury, M; Grandien, A; Malachère, E; Sundblad; Coutinho, A. *Global analysis of antibody repertoires. II. Evidence for specificity, self-selection and the immunological "homunculus" of antibodies in normal serum*. European Journal of Immunology, 23:2851-2859, 1993.
- Nogueira R. M. R, Miagostovich M. P., Lampe E., Schatzmayr H.G. *Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro*. Mem Inst Oswaldo Cruz 85: 253, 1990.

- Ochsenbein, A.F; Fher, T; Lutz, C; Suter, M; Brombacher, F; Hengartner, H; Zinkernagel, R.M. *Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies*. Science; 286, 2156-2159, 1999.
- Oppezzo, P; Dighiero, G. *Autoanticorps, tolerance et auto-immunité*. Pathologie Biologie; 51(5): 297-307, 2003.
- Organização Panamericana de Saúde, *Primera Conferencia Interamericana Sobre La Conservación y Utilización de Primates Americanos No Humanos En Las Investigaciones Biomédicas* Publicación Científica N317, 1977.
- Ouchterlony, O. *Difusión-in-gel methods for immunological analysis*. Progr. Allergy, 5:1-78, 1958.
- Palmero, K. E.; Carbonetto, C. H.; Malchiodi, E. L.; Margni, R.A.; Falasca, C. A. *Humoral and Cellular Parameters of the Immune System of Cebus apella Monkeys. Cross reactivity between Monkey and Human Immunoglobulins*. Veterinary Immunology and Immunopathology, Elsevier, Amsterdam, 19, 341-349, 1988.
- Pashov, A; Kenderov, A; Kyurkchiev, S; Kehayov, I; Hristova, S; Lacroix-Desmazes, S; Giltiay, N; Varamballi, S; Kazatchkine, M.D; Kaveri, S.V. *Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire*. International Immunology, Vol.14 N^o 5, May, 453-461, 2002.
- Paul, S; Volle, D.J; Mei, S. *Affinity chromatography of catalytic autoantibody to vasoactive intestinal peptide*. The Journal of Immunology; V145, 1196 – 1199, august, 1990.
- Pereira, P; Forni, L; Larsson, E.L; Cooper, M.D; Heusser, C; Coutinho, A. *Autonomous activation of T and B cells in antigen-free mice*. European Journal of Immunology, 16:685-688, 1986.
- Quan, C.P; Berneman, A; Pires, R; Avrameas, S; Bouvet, J.P. *Natural Polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans*. Infect. Immun; 65(10): 3997-4004, 1997.
- Quintana, F.J; Buzas, E; Prohaszka, Z; Biro, A; Cócix, J; Fuese, G; Falus, A; Cohen, I.R. *Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural antibodies*. Journal of Autoimmunity; 22(4): 297-305, 2004.
- Ramudo, S.V; Castillo, F.V.C; Tirado, M.G.G; Llanes, R.J.F. *Comparación de la técnica de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida, para el diagnóstico serológico del dengue*. Rev. Cub. Med. Trop; 38(1): 7-14, enero-abril, 1986.
- Ritter, K; Fudickar, A; Heine, N; Thomsen, R. *Autoantibodies with a protective function: Polyreactive antibodies against alkaline phosphatase in bacterial infections*. Medical Microbiology and Immunology; 186(2-3): 109-113, 1997

- Reiter, P.; Cordellier, R.; Ouma, J. O.; Cropp, B.; Savage, H. M.; Sanders, E. J.; Marfin, A. A.; Tukei, P. M.; Agata, N. N.; Gitau, L. G.; Rapuoda, B. A.; Gubler, D. J. *First Recorded Outbreak of Yellow Fever in Kenya, 1992-1993. II. Entomologic Investigations*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59(4), pp. 650-656, 1998.
- Ronda, N; Leonardi, S; Orlandini, G; Gatti, R; Bellosta, S; Bernini F; Borghetti, A. *Natural anti-endothelial cell antibodies (AECA)*. Journal of Autoimmunity; 13(1): 121-127, 1999.
- Rosen, L; Shroyer, D.A; Tesh, R.B; Freier, J.E; Lien, J.C. *Trans-ovarial transmission of dengue by mosquitos - Aedes albopictus and Aedes aegypti*. Am. J. Trop Med Hyg 32:1108-1119, 1983.
- Rossie, J., *Cebus apella tufted capuccin*, Home page Yale University, 2003.
- Rother, R.P; Sprinhorn, W.L; Birls, C.W; Setter, S; Sandrin, M.S; Rollins, A. *A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti- α -galactosyl natural antibody*. J. Exp. Med; 182, 1345-1355, 1995.
- Rudnick, A. *Studies of the Ecology of Dengue in Malaysia*. J. Med. Ent. 2, 203-208, 1965.
- Santos, F. B.; Miagostovich, M. P.; Nogueira, R. M. R.; Edgil, D.; Schatzmayr, H. G.; Riley, L.W.; Harris, E. *Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus Type 2 Strain*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol.(97)7: 991-995, 2002.
- Sata, M; Walsh, K. *Oxidised LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis*. J. Clin. Invest, 102:1682-1689, 1998.
- Sathish, N; Wjayakumar, T.S; Abraham, P; Sridhararf, G. *Dengue Fever: Its Laboratory Diagnosis, with Special Emphasis on IgM Detection*. Dengue Bulletin, vol 27, 2003.
- Schatzmayr, H. G, *Dengue Situation in Brazil by year 2000*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.95 s.1, Rio de Janeiro, 2000.
- Schatzmayr, H. G. *Emerging and reemerging viral diseases*. Cad. de Saúde Pública. Rio de Janeiro, vol. 17, suppl. 2001.
- Scherer, W.F; Russel, P.K; Rosen, L; Casals, J; Dickerman, R.W. *Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses*. Am. J. Trop. Med Hyg; 27(3), 590-599, 1978.
- Shaw, P. *Rethinking oxidized low-density lipoprotein, its role in atherogenesis and the immune responses associated with it*. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis; 52(4): 225,239, 2004.

- Souza R. V., Cunha R. V., Miagostovich M. P., Timbó M. J., Montenegro F., Pessoa E. T. F. P., Nogueira R. M. R., Schatzmayr H. G. *An outbreak of dengue virus infection in the State of Ceará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 345-346, 1995.
- SUCEN -Dengue; Ministério da Saúde - Brasília, 1997.
- Sundblad, A; Hauser, S; Holmberg, D; Cazenave, P.A; Coutinho, A. *Supression of antibody responses to the acetylcholine receptor by natural antibodies. Eur. J. Immunol*; 19, 1425-1430, 1989.
- Sunts, B. ; Cheney, D. C. ; Seyfarth, R. M. ; Wrangham, R. W. ; Struhaker, T. T. - *Primate Societies* The Univesity of Chicago Press, 1987.
- Theiler, M; Anderson, C.R. *The relative resistance of dengue-immune monkeys to yellow fever virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol.24, N^o.1, 1975.
- Thornton, B.P; Vetvicka, V; Ross, G.D. *Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. J. Immunol*; 152, 1727-1737, 1994.
- Tsokos, G.C; Fleming, S.D. *Autoimmunity, complement activation, tissue injury and reciprocal effects. Curr. Dir Autoimmun*; 7:149-164, 2004.
- Tung, S.L; Cheng, H.M; Sam, C.K; Sundram, K. *Antibodies of all isotypes to oxysterols in normal human sera: a parameter for in vivo oxidative status? Micronutrients and health: Mol. Biol Mechan*; 321-331, 2001.
- Twiddy, S. S; Holmes, E. C; Rambaut, A. *Inferring the Rate and Time-scale of Dengue Virus Evolution. Mol. Biol. Evol.* 20(1):122-129, 2003.
- Tizard,I.R. *Imunologia Veterinária, Uma introdução*. Roca, São Paulo, 6ed, 2002.
- Varela, F.J; Anderson, A; Dietrich, G; Sundblad, A; Holmberg, B.D; Kaqzatchkine, M; Coutinho, A. *Population dynamics of natural antibodies in normal and autoimmune individuals. Proceedings of the National Academy os Sciences*, 88:5917-5921, 1991.
- Vasconcelos, P.F.C. *Febre Amarela:Reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco de reurbanização. Ver. Brasil de Epidemiologia*, vol.5, N^o2, 2002.
- Vasconcelos, P.F.C. *Febre Amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2):275-293, mar-abr, 2003.
- Vasconcelos P. F. C., Menezes D. B., Melo L. P., Paula Pessoa E. T. F., Rodrigues S. G., Travassos Da Rosa E. S., Timbó M. J., Coelho I. C. B., Montenegro F., Travassos da Rosa, J. F. S., Andrade F. M. O., Travassos da Rosa A. P. A. *A large epidemic of*

dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. Rev Inst Med Trop São Paulo 37: 252-255, 1995.

Vaz, N.M; de Faria, A.M.C; Verdolin, B.A; Silva Neto, A.F; Menezes, J.S; Carvalho, C.R. *The conservative physiology of the immune system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Vol 36(1), 13-22, 2003.*

Voller, A; Bidwell, D. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, American Society for Microbiology, p 99-109, 1986.*

Ward, F.J; Knies, J.E.G; Cunningham, C; Harris, W.J; Staines, N.A. *Natural antibodies that react with V-region peptide epitopes of DNA-binding antibodies are made by mice with systemic lupus erythematosus as disease develops. Immunology; 92(3): 354-361, 1997.*

Wolf-Levin, R; Azuma, T; Aoki, K; Yagami, Y; Okada, H. *Specific IgG Autoantibodies Are Potent Inhibitors of Autoreactive T Cell Response to Phytohemagglutinin-Activated T Cells. The Journal of Immunology; Vol 151, n10, november 15, 1993.*

Wolfe, N.D; Kilbourn, A.M; Karesh, W.B; Rahman, H.A; Bosi, E.J; Cropp, B.C; Andau, M; Apielman, A; Gubler, D.J. *Sylvatic Transmission of Arboviruses Among Bornean Orangutans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 64(5,6), pp. 310-316, 2001.*

World Health Organization, *Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1986.*

World Health Organization, *Dengue Bulletin, Vol. 22, Dec, 1998b.*

World Health Organization, *Yellow Fever. <http://www.who.ch/gpv-documents/>, 1998a.*

World Health Organization, *Strengthening implementation of the global strategy for DF/DHF prevention and control. <http://www.who.int/vaccines-diseases/research/virus2.shtml>; 1999.*

World Health Organization, *Vaccines, imunization, and biologicals: dengue and Japanese encephalitis vaccines. <http://www.who.int/vaccines-diseases/research/virus2.htm>; 2001.*

Wu, R; De Faire, U; Lemne, C; Witztum, J.L; Frostegard, J. *Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. Hypertension, 33:53-59, 1999.*

Zagne S. M. O., Alves V. G. F., Nogueira R. M. R., Miagostovich M. P., Lampe E, Tavares W. *Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. Trans R Soc Trop Med Hyg 88: 677-679, 1994.*

Zanoto PMA, Leal ES. *Viral Diseases and Human Evolution*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. vol.95s.1, Rio de Janeiro, 2000.

8- Apêndice

Anexo 1: Densidades ópticas obtidas no ensaio imunoenzimático, dos soros de *Cebus apella*, com seus respectivos controles negativos, para os antígenos DEN I, DEN II, DEN III e FA.

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
1	0,407	0,141	0,414	0,165	0,267	0,106	0,215	0,115
2	0,395	0,137	0,372	0,189	0,279	0,17	0,215	0,102
3	0,622	0,128	0,494	0,158	0,307	0,095	0,258	0,11
4	0,529	0,26	0,334	0,171	0,235	0,113	0,211	0,118
5	0,411	0,136	0,352	0,158	0,296	0,099	0,231	0,123
6	0,788	0,134	0,509	0,179	0,397	0,148	0,287	0,113
7	0,556	0,135	0,496	0,168	0,402	0,091	0,244	0,1
8	0,555	0,211	0,461	0,13	0,311	0,135	0,274	0,098
9	0,652	0,181	0,541	0,178	0,408	0,096	0,274	0,103
10	0,572	0,192	0,475	0,155	0,188	0,115	0,334	0,104
11	0,54	0,215	0,557	0,122	0,331	0,101	0,272	0,108
12	0,56	0,254	0,467	0,114	0,42	0,176	0,262	0,138
13	0,483	0,133	0,493	0,238	0,281	0,102	0,283	0,13
14	0,39	0,143	0,329	0,161	0,233	0,092	0,235	0,114
15	0,421	0,104	0,426	0,138	0,344	0,095	0,266	0,119
16	0,444	0,169	0,327	0,164	0,241	0,098	0,245	0,132
17	0,299	0,157	0,284	0,168	0,248	0,111	0,227	0,133
18	0,307	0,137	0,329	0,197	0,218	0,102	0,2	0,112
19	0,32	0,172	0,302	0,211	0,205	0,125	0,168	0,103
20	0,392	0,176	0,366	0,135	0,229	0,09	0,203	0,103
21	0,378	0,198	0,288	0,151	0,192	0,107	0,163	0,105
22	0,441	0,197	0,263	0,149	0,222	0,107	0,201	0,117
23	0,409	0,23	0,378	0,148	0,203	0,102	0,188	0,16
24	0,463	0,18	0,392	0,155	0,279	0,1	0,233	0,111
25	0,357	0,132	0,396	0,199	0,228	0,1	0,229	0,12
26	0,29	0,145	0,264	0,166	0,255	0,103	0,253	0,111
27	0,354	0,163	0,314	0,159	0,248	0,099	0,228	0,113
28	0,552	0,151	0,386	0,165	0,277	0,094	0,252	0,122
29	0,392	0,191	0,356	0,165	0,245	0,101	0,222	0,112
30	0,437	0,138	0,376	0,179	0,251	0,101	0,22	0,107
31	0,492	0,117	0,358	0,159	0,325	0,105	0,222	0,119
32	0,516	0,14	0,398	0,155	0,322	0,102	0,253	0,098
33	0,45	0,18	0,358	0,156	0,241	0,121	0,246	0,1
34	0,412	0,157	0,366	0,153	0,335	0,106	0,255	0,113
35	0,458	0,161	0,36	0,16	0,309	0,112	0,238	0,106
36	0,611	0,195	0,433	0,167	0,491	0,104	0,355	0,114
37	0,375	0,161	0,411	0,085	0,283	0,053	0,19	0,152
38	0,612	0,199	0,485	0,117	0,473	0,054	0,283	0,149
39	0,557	0,123	0,3	0,192	0,312	0,054	0,299	0,113

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
40	0,562	0,157	0,43	0,191	0,343	0,051	0,256	0,123
41	0,693	0,175	0,523	0,169	0,431	0,061	0,275	0,121
42	0,509	0,201	0,441	0,178	0,353	0,054	0,257	0,105
43	0,468	0,162	0,214	0,22	0,2	0,055	0,125	0,111
44	0,41	0,199	0,244	0,137	0,179	0,053	0,143	0,102
45	0,544	0,183	0,263	0,141	0,228	0,06	0,195	0,104
46	0,519	0,216	0,32	0,178	0,355	0,067	0,208	0,121
47	0,317	0,152	0,293	0,196	0,295	0,106	0,252	0,121
48	0,349	0,161	0,253	0,1	0,17	0,108	0,203	0,118
49	0,277	0,149	0,307	0,174	0,23	0,127	0,24	0,105
50	0,397	0,15	0,4	0,168	0,334	0,104	0,297	0,105
51	0,329	0,183	0,273	0,171	0,203	0,103	0,22	0,111
52	0,376	0,164	0,484	0,159	0,25	0,126	0,197	0,12
53	0,382	0,163	0,293	0,172	0,19	0,102	0,204	0,041
54	0,433	0,171	0,402	0,145	0,268	0,109	0,197	0,107
55	0,583	0,164	0,485	0,149	0,391	0,106	0,302	0,107
56	0,373	0,14	0,397	0,149	0,248	0,107	0,175	0,063
57	0,431	0,14	0,352	0,146	0,182	0,111	0,191	0,043
58	0,538	0,157	0,419	0,183	0,234	0,108	0,185	0,052
59	0,439	0,171	0,498	0,15	0,277	0,124	0,214	0,129
60	0,344	0,17	0,332	0,156	0,307	0,161	0,235	0,119
61	0,498	0,134	0,668	0,14	0,295	0,118	0,321	0,123
62	0,361	0,205	0,366	0,162	0,221	0,111	0,219	0,117
63	0,419	0,182	0,518	0,176	0,364	0,112	0,247	0,113
64	0,361	0,201	0,321	0,175	0,279	0,112	0,2	0,15
65	0,42	0,19	0,504	0,197	0,26	0,115	0,248	0,119
66	0,366	0,169	0,353	0,156	0,255	0,106	0,325	0,108
67	0,35	0,211	0,482	0,156	0,265	0,11	0,266	0,111
68	0,385	0,214	0,372	0,164	0,226	0,136	0,233	0,119
69	0,54	0,235	0,46	0,17	0,259	0,11	0,245	0,123
70	0,437	0,204	0,375	0,146	0,286	0,132	0,263	0,178
71	0,358	0,235	0,373	0,167	0,268	0,124	0,243	0,102
72	0,365	0,182	0,368	0,231	0,428	0,126	0,314	0,108
73	0,481	0,179	0,317	0,188	0,292	0,117	0,186	0,097
74	0,433	0,135	0,315	0,168	0,259	0,117	0,219	0,11
75	0,443	0,167	0,41	0,175	0,278	0,123	0,23	0,101
76	0,383	0,17	0,306	0,301	0,232	0,119	0,187	0,106
77	0,461	0,14	0,4	0,179	0,261	0,11	0,263	0,113
78	0,507	0,19	0,459	0,203	0,368	0,122	0,298	0,11
79	0,476	0,149	0,45	0,17	0,268	0,116	0,317	0,11
80	0,52	0,176	0,428	0,319	0,245	0,114	0,236	0,116
81	0,628	0,153	0,517	0,202	0,257	0,103	0,247	0,111
82	0,618	0,161	0,43	0,264	0,359	0,117	0,241	0,119
83	0,696	0,364	0,521	0,401	0,523	0,177	0,314	0,144
84	0,573	0,17	0,396	0,224	0,324	0,18	0,3	0,149
85	0,514	0,158	0,435	0,307	0,344	0,16	0,256	0,141
86	0,535	0,146	0,449	0,246	0,252	0,167	0,261	0,126
87	0,545	0,162	0,529	0,251	0,334	0,126	0,313	0,128

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
88	0,628	0,169	0,559	0,287	0,292	0,128	0,314	0,134
89	0,564	0,178	0,482	0,255	0,288	0,13	0,3	0,167
90	0,645	0,162	0,355	0,22	0,259	0,116	0,233	0,125
91	0,585	0,321	0,424	0,396	0,341	0,36	0,305	0,131
92	0,633	0,221	0,402	0,244	0,275	0,128	0,279	0,14
93	0,488	0,268	0,323	0,242	0,377	0,125	0,274	0,137
94	0,585	0,251	0,36	0,269	0,264	0,114	0,304	0,119
95	0,395	0,168	0,453	0,257	0,313	0,118	0,24	0,142
96	0,421	0,138	0,384	0,294	0,321	0,121	0,275	0,122
97	0,476	0,126	0,409	0,246	0,373	0,121	0,259	0,114
98	0,487	0,115	0,479	0,245	0,511	0,126	0,338	0,142
99	0,394	0,109	0,428	0,213	0,259	0,186	0,229	0,108
100	0,356	0,116	0,328	0,222	0,273	0,121	0,185	0,104
101	0,435	0,108	0,237	0,209	0,148	0,124	0,139	0,101
102	0,563	0,109	0,452	0,209	0,282	0,129	0,195	0,113
103	0,494	0,159	0,45	0,222	0,276	0,136	0,217	0,122
104	0,545	0,188	0,368	0,215	0,364	0,147	0,204	0,119
105	0,663	0,205	0,559	0,259	0,535	0,157	0,259	0,127
106	0,74	0,225	0,399	0,242	0,37	0,135	0,241	0,125
107	0,648	0,162	0,387	0,251	0,25	0,136	0,208	0,147
108	0,576	0,173	0,421	0,258	0,267	0,131	0,212	0,131
109	0,556	0,104	0,42	0,232	0,335	0,147	0,206	0,123
110	0,715	0,105	0,692	0,232	0,525	0,134	0,26	0,127
111	0,541	0,174	0,429	0,246	0,409	0,161	0,234	0,115
112	0,539	0,098	0,471	0,237	0,274	0,14	0,19	0,112
113	0,403	0,117	0,398	0,223	0,302	0,16	0,22	0,117
114	0,429	0,102	0,426	0,215	0,298	0,19	0,185	0,114
115	0,394	0,101	0,45	0,242	0,302	0,154	0,235	0,118
116	0,392	0,17	0,442	0,225	0,24	0,193	0,171	0,118
117	0,747	0,179	0,421	0,258	0,318	0,327	0,223	0,132
118	0,659	0,185	0,459	0,265	0,289	0,278	0,274	0,121
119	0,661	0,196	0,476	0,245	0,387	0,134	0,302	0,131
120	0,568	0,124	0,39	0,258	0,207	0,149	0,217	0,117
121	0,658	0,207	0,463	0,298	0,278	0,126	0,216	0,12
122	0,678	0,146	0,487	0,276	0,366	0,115	0,263	0,124
123	0,705	0,178	0,404	0,268	0,268	0,108	0,217	0,12
124	0,722	0,117	0,426	0,229	0,375	0,106	0,211	0,15
125	0,527	0,118	0,335	0,231	0,257	0,128	0,228	0,117
126	0,482	0,11	0,49	0,25	0,277	0,117	0,254	0,131
127	0,413	0,104	0,387	0,264	0,206	0,123	0,193	0,116
128	0,466	0,104	0,424	0,245	0,312	0,205	0,278	0,133
129	0,647	0,227	0,395	0,301	0,236	0,121	0,228	0,197
130	0,555	0,187	0,512	0,374	0,328	0,137	0,261	0,142
131	0,58	0,207	0,501	0,541	0,249	0,123	0,235	0,14
132	0,603	0,201	0,449	0,335	0,243	0,132	0,194	0,138
133	0,596	0,205	0,507	0,325	0,235	0,119	0,25	0,152
134	0,616	0,137	0,552	0,35	0,307	0,143	0,295	0,13
135	0,584	0,159	0,556	0,303	0,382	0,117	0,373	0,125

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
136	0,783	0,13	0,563	0,304	0,348	0,103	0,273	0,137
137	0,626	0,129	0,405	0,237	0,296	0,113	0,226	0,121
138	0,677	0,121	0,741	0,367	0,61	0,125	0,356	0,133
139	0,704	0,234	0,459	0,339	0,238	0,125	0,235	0,124
140	0,649	0,209	0,369	0,195	0,191	0,122	0,217	0,165
141	0,349	0,226	0,246	0,288	0,138	0,11	0,157	0,128
142	0,711	0,221	0,424	0,276	0,236	0,113	0,215	0,148
143	0,766	0,19	0,516	0,287	0,304	0,119	0,24	0,164
144	0,793	0,228	0,438	0,337	0,349	0,115	0,242	0,113
145	0,793	0,186	0,473	0,234	0,361	0,116	0,23	0,146
146	0,687	0,208	0,427	0,258	0,31	0,107	0,226	0,121
147	0,627	0,196	0,342	0,249	0,231	0,118	0,184	0,109
148	0,753	0,194	0,467	0,282	0,372	0,143	0,278	0,124
149	0,611	0,201	0,409	0,321	0,455	0,106	0,284	0,117
150	0,845	0,202	0,46	0,313	0,393	0,119	0,328	0,117
151	0,74	0,242	0,469	0,302	0,304	0,165	0,208	0,166
152	0,715	0,196	0,467	0,33	0,274	0,115	0,222	0,143
153	0,795	0,171	0,467	0,283	0,364	0,118	0,248	0,135
154	0,798	0,214	0,524	0,285	0,449	0,115	0,284	0,117
155	0,8	0,227	0,52	0,281	0,419	0,131	0,252	0,123
156	0,762	0,226	0,494	0,298	0,369	0,123	0,269	0,122
157	0,681	0,219	0,476	0,281	0,365	0,115	0,231	0,116
158	0,747	0,245	0,456	0,25	0,4	0,135	0,218	0,198
159	0,673	0,212	0,464	0,232	0,283	0,109	0,214	0,113
160	0,692	0,221	0,481	0,294	0,309	0,109	0,229	0,118
161	0,74	0,184	0,464	0,325	0,268	0,119	0,225	0,124
162	0,769	0,207	0,538	0,358	0,355	0,126	0,276	0,132
163	0,812	0,215	0,521	0,314	0,358	0,178	0,258	0,154
164	0,804	0,206	0,501	0,305	0,318	0,17	0,272	0,15
165	0,622	0,206	0,45	0,294	0,276	0,115	0,244	0,167
166	0,835	0,185	0,516	0,298	0,378	0,115	0,253	0,153
167	0,79	0,202	0,554	0,342	0,451	0,12	0,299	0,144
168	0,816	0,209	0,541	0,285	0,511	0,122	0,271	0,123
169	0,668	0,217	0,402	0,315	0,403	0,112	0,201	0,114
170	0,783	0,189	0,497	0,273	0,419	0,105	0,334	0,12
171	0,763	0,178	0,43	0,267	0,328	0,127	0,239	0,131
172	0,549	0,188	0,487	0,274	0,343	0,113	0,2	0,128
173	0,54	0,188	0,41	0,299	0,299	0,115	0,25	0,117
174	0,683	0,197	0,525	0,306	0,456	0,112	0,278	0,115
175	0,782	0,214	0,51	0,234	0,385	0,231	0,308	0,214
176	0,702	0,223	0,487	0,342	0,314	0,147	0,259	0,201
177	0,821	0,231	0,543	0,329	0,547	0,133	0,343	0,185
178	0,649	0,236	0,422	0,294	0,332	0,13	0,211	0,161
179	0,643	0,22	0,464	0,288	0,316	0,133	0,219	0,144
180	0,639	0,216	0,401	0,317	0,246	0,133	0,246	0,156
181	0,663	0,265	0,496	0,293	0,386	0,12	0,242	0,135
182	0,644	0,192	0,513	0,281	0,425	0,114	0,318	0,12
184	0,859	0,26	0,623	0,285	0,486	0,412	0,295	0,116

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
185	0,336	0,188	0,416	0,184	0,275	0,222	0,237	0,126
186	0,411	0,197	0,58	0,314	0,295	0,165	0,255	0,133
187	0,506	0,186	0,441	0,309	0,262	0,126	0,251	0,119
188	0,394	0,167	0,461	0,349	0,244	0,124	0,21	0,12
189	0,371	0,171	0,372	0,334	0,25	0,122	0,199	0,111
190	0,609	0,211	0,447	0,331	0,334	0,162	0,295	0,11
191	0,538	0,193	0,393	0,296	0,346	0,199	0,237	0,114
192	0,431	0,216	0,438	0,3	0,275	0,187	0,246	0,12
193	0,344	0,206	0,427	0,294	0,243	0,172	0,179	0,106
194	0,301	0,201	0,362	0,291	0,219	0,144	0,181	0,106
195	0,573	0,271	0,427	0,327	0,305	0,146	0,228	0,107
196	0,389	0,247	0,454	0,286	0,219	0,129	0,105	0,136
197	0,764	0,353	0,575	0,224	0,319	0,166	0,288	0,129
198	0,499	0,263	0,478	0,242	0,254	0,157	0,232	0,13
199	0,464	0,241	0,451	0,348	0,314	0,182	0,207	0,125
200	0,634	0,242	0,539	0,264	0,31	0,144	0,243	0,125
201	0,563	0,212	0,466	0,263	0,347	0,133	0,21	0,119
202	0,522	0,228	0,567	0,247	0,351	0,278	0,266	0,117
203	0,584	0,259	0,465	0,254	0,33	0,261	0,242	0,12
204	0,663	0,239	0,524	0,216	0,393	0,199	0,251	0,113
205	0,516	0,282	0,442	0,208	0,365	0,185	0,23	0,107
206	0,491	0,271	0,398	0,219	0,257	0,116	0,207	0,126
207	0,513	0,351	0,437	0,251	0,286	0,126	0,186	0,116
208	0,631	0,353	0,531	0,217	0,274	0,118	0,281	0,123
209	0,495	0,22	0,364	0,216	0,278	0,146	0,28	0,133
210	0,428	0,205	0,412	0,263	0,362	0,15	0,249	0,142
211	0,499	0,242	0,416	0,302	0,305	0,149	0,234	0,125
212	0,573	0,195	0,47	0,234	0,31	0,151	0,247	0,115
213	0,396	0,211	0,417	0,313	0,269	0,121	0,208	0,12
214	0,514	0,212	0,413	0,313	0,268	0,162	0,232	0,114
215	0,538	0,245	0,399	0,266	0,308	0,144	0,24	0,126
216	0,513	0,283	0,389	0,269	0,229	0,133	0,223	0,113
217	0,494	0,293	0,379	0,248	0,332	0,155	0,24	0,111
218	0,534	0,284	0,331	0,244	0,257	0,116	0,225	0,111
219	0,466	0,27	0,303	0,285	0,286	0,126	0,195	0,114
220	0,5	0,235	0,341	0,265	0,274	0,118	0,213	0,115
221	0,692	0,265	0,55	0,563	0,414	0,151	0,294	0,162
222	0,442	0,181	0,382	0,273	0,275	0,151	0,285	0,156
223	0,496	0,18	0,385	0,295	0,218	0,151	0,231	0,153
224	0,626	0,188	0,527	0,247	0,24	0,145	0,263	0,139
225	0,495	0,196	0,521	0,276	0,265	0,166	0,253	0,136
226	0,713	0,328	0,613	0,261	0,314	0,174	0,267	0,136
227	0,655	0,413	0,56	0,27	0,286	0,175	0,3	0,107
228	0,667	0,296	0,479	0,252	0,259	0,218	0,253	0,118
229	0,647	0,275	0,454	0,256	0,367	0,162	0,263	0,12
230	0,558	0,269	0,42	0,284	0,264	0,145	0,211	0,126
231	0,468	0,21	0,373	0,219	0,323	0,185	0,258	0,143
232	0,53	0,249	0,323	0,247	0,322	0,126	0,179	0,159

Amostras	DEN I		DEN II		DEN III		FA	
	teste	controle	teste	controle	teste	controle	teste	controle
233	0,652	0,224	0,249	0,255	0,285	0,134	0,201	0,135
234	0,568	0,255	0,35	0,261	0,334	0,132	0,219	0,173
235	0,504	0,248	0,309	0,245	0,288	0,114	0,217	0,15
236	0,513	0,222	0,35	0,263	0,268	0,119	0,196	0,136
237	0,512	0,267	0,333	0,211	0,286	0,114	0,242	0,131
238	0,533	0,293	0,406	0,252	0,356	0,107	0,285	0,126
239	0,62	0,255	0,422	0,232	0,412	0,134	0,274	0,132
240	0,528	0,312	0,463	0,241	0,363	0,112	0,285	0,145
241	0,416	0,238	0,289	0,246	0,226	0,134	0,213	0,142
242	0,535	0,251	0,462	0,253	0,33	0,125	0,25	0,153
243	0,544	0,31	0,383	0,263	0,399	0,133	0,362	0,221
244	0,448	0,296	0,417	0,303	0,403	0,128	0,253	0,162
245	0,578	0,254	0,429	0,267	0,378	0,136	0,262	0,163
246	0,551	0,285	0,406	0,249	0,395	0,132	0,258	0,142
247	0,49	0,273	0,383	0,257	0,309	0,139	0,216	0,158
248	0,593	0,292	0,382	0,282	0,329	0,131	0,225	0,142
249	0,677	0,262	0,47	0,262	0,495	0,122	0,277	0,139
250	0,56	0,286	0,395	0,289	0,286	0,118	0,311	0,134
251	0,644	0,258	0,479	0,252	0,419	0,125	0,26	0,135
252	0,604	0,277	0,393	0,283	0,464	0,139	0,326	0,128
253	0,5	0,313	0,431	0,264	0,358	0,157	0,274	0,142
254	0,434	0,267	0,346	0,261	0,234	0,148	0,218	0,14
255	0,495	0,267	0,37	0,262	0,306	0,14	0,324	0,236
256	0,563	0,288	0,458	0,248	0,337	0,198	0,333	0,179