UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA NA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE ASPECTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS QUATRO SOROTIPOS DO VÍRUS DENGUE

IASMIN VASCONCELOS DA COSTA

Belém/PA

2025

IASMIN VASCONCELOS DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE ASPECTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS QUATRO SOROTIPOS DO VÍRUS DENGUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho

Belém/PA

2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA

Costa, Iasmin Vasconcelos da

Caracterização *in silico* de aspectos bioquímicos e imunológicos da proteína de fusão dos quatro sorotipos do vírus dengue / Iasmin Vasconcelos da Costa. – Belém: UEPA, 2025.

50f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Biologia parasitária da Amazônia, Instituto Evandro Chagas, Belém, 2025.

1. Vírus da Dengue. 2. Biologia Computacional. 3. Epítopos. I. Universidade do Estado do Pará. II. Instituto Evandro Chagas. III. Título.

CDD 22.ed. 616.921

Elaborada por Josicléia Garcia Vieira - CRB-2 /562

IASMIN VASCONCELOS DA COSTA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE ASPECTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS QUATRO SOROTIPOS DO VÍRUS DENGUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho

Universidade do Estado do Pará

Banca Examinadora: Prof. Dr. Jorge Rodrigues de Sousa (Membro Titular)

Universidade do Estado do Pará

Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz

Universidade do Estado do Pará

Profa. Dra. Eliana Vieira Pinto da Silva (Membro Titular)

Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcântara (Membro Suplente)

Universidade do Estado do Pará

Belém, 21 de maio de 2025

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, o Todo que me guarda e de onde tiro forças e motivação para seguir e conquistar os sonhos que habitam meu coração. Sou imensamente grata por ter dado mais um passo e concluído um objetivo que sempre idealizei. O encerramento desse ciclo marca uma jornada que, embora pareça breve — apenas dois anos — foi intensa em todos os sentidos, especialmente no amadurecimento mental, emocional e profissional.

Agradeço à proteção e ao apoio dos meus Guias, que nunca soltaram minha mão e estiveram presentes nos momentos mais difíceis, me ajudando a lembrar de quem eu sou. Sou grata por tanto amor e paciência.

À minha família linda, que sempre demonstrou apoio e orgulho pelas minhas escolhas, em especial à minha mãe — minha maior incentivadora, companheira em todas as minhas aventuras acadêmicas e profissionais. Sou grata pela liberdade de seguir meus próprios caminhos, algo que devo inteiramente a ela.

Ao meu querido orientador, que honra o título que carrega. Um homem de inteligência admirável, cuja orientação, acolhimento, paciência e incentivo foram fundamentais para que eu trilhasse esse caminho no mestrado. E, acima de tudo, por me apresentar à bioinformática — uma área que sempre admirei à distância.

Ao Vinnicius Elvas, meu porto seguro. Obrigada por todo o apoio, pelas conversas, pelas risadas e por estar ao meu lado em cada desafio. Sua parceria foi essencial.

Ao meu querido "Clube da Luluzinha", minhas amigas de décadas que seguem comigo em cada etapa. Gio, mesmo de longe, é uma inspiração. Gabi, com nosso pequeno afilhado, trouxe ainda mais luz. Sou grata pelo apoio, mesmo à distância.

Aos amigos e vizinhos da Marambaia, obrigada pelos pastéis noturnos, boas conversas e pelas sessões de filmes duvidosos com pipoca e Coca-Cola na sala da dona Dita. Já sinto saudades.

E, por fim, aos meus companheiros de quatro patas: Catu, Athos, Emily, Fofinho e Logan. Eles me confortam, me ensinam a desacelerar e a aproveitar os pequenos momentos — como um raio de sol. Amo vocês incondicionalmente.

A todos que fizeram parte dessa jornada: meu sincero e eterno agradecimento.

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE ASPECTOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS QUATRO SOROTIPOS DO VÍRUS DENGUE

Iasmin Vasconcelos da Costa[1]; Carlos Alberto Marques de Carvalho[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém 66095-662, PA, Brasil.

Resumo: A dengue é uma arbovirose de relevância global causada pelo *Orthoflavivirus denguei* (vírus Dengue – DENV), que possui quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a DENV-4). A proteína do envelope (E) desempenha um papel crítico na entrada viral e na indução de respostas imunes, e, apesar das semelhanças estruturais entre os sorotipos, variações na sequência aminoacídica podem impactar sua antigenicidade. Este estudo teve como objetivo comparar as propriedades bioquímicas e imunológicas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV utilizando abordagens *in silico*. As sequências de referência da proteína E foram obtidas do GenBank e analisadas com diversas ferramentas de bioinformática. O alinhamento de sequências revelou uma identidade oscilando de 63,08% a 77,69%, destacando regiões conservadas e variáveis. A análise bioquímica mostrou variação mínima no peso molecular e ponto isoelétrico; no entanto, a carga líquida da proteína E do DENV-3 foi notavelmente menor, o que pode afetar sua estabilidade e interações. As predições de estrutura secundária indicaram predominância de alfa-hélices em DENV-1 e DENV-2, enquanto DENV-3 e DENV-4 apresentaram mais folhas-beta, sugerindo dinâmicas conformacionais específicas por sorotipo. A análise de modificações pós-traducionais revelou múltiplos sítios de fosforilação, especialmente por caseína-cinase II, em todos os sorotipos, sendo que apenas o DENV-4 apresentou sítios de fosforilação por tirosina-cinase. Os aminoácidos W231/D341 no DENV-1, Q86 nos DENVs-2/4 e D87/D339 no DENV-3 apresentaram antigenicidade máxima no reconhecimento por células B, enquanto os alelos de antígeno leucocitário humano (HLA) B*08:01/B*39:01 e DRB4*01:01, reconhecidos por células T, apresentaram o maior número de epítopos preditos para os diferentes sorotipos do DENV. Esses achados demonstram que diferenças estruturais sutis influenciam o potencial imunogênico da proteína E e apoiam a identificação de epítopos conservados como alvos promissores para estratégias de vacinas de amplo espectro contra a dengue.

Palavras-chave: Vírus da Dengue, Biologia Computacional, Proteínas de Fusão Virais, Epítopos, Antígeno Leucocitário Humano.

IN SILICO CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE FUSION PROTEIN FROM ALL FOUR DENGUE VIRUS SEROTYPES

Iasmin Vasconcelos da Costa[1]; Carlos Alberto Marques de Carvalho[1].

[1]Graduate Program in Parasite Biology in the Amazon, Center for Biological and Health Sciences, University of Pará State, Belém 66095-662, PA, Brazil.

Abstract: Dengue is a globally relevant arbovirus caused by *Orthoflavivirus denguei* (Dengue virus – DENV), which has four antigenically distinct serotypes (DENV-1 to DENV-4). The envelope (E) protein plays a critical role in viral entry and induction of immune responses, and, despite structural similarities between serotypes, variations in the amino acid sequence can impact its antigenicity. This study aimed to compare the biochemical and immunological properties of the E protein of the four DENV serotypes using *in silico* approaches. The E protein reference sequences were obtained from GenBank and analyzed with several bioinformatics tools. Sequence alignment revealed an identity ranging from 63.08% to 77.69%, highlighting conserved and variable regions. Biochemical analysis showed minimal variation in molecular weight and isoelectric point; however, the net charge of the DENV-3 E protein was notably lower, which may affect its stability and interactions. Secondary structure predictions indicated a predominance of alpha-helices in DENV-1 and DENV-2, while DENV-3 and DENV-4 presented more beta-sheets, suggesting serotype-specific conformational dynamics. Post-translational modification analysis revealed multiple phosphorylation sites, especially by casein kinase II, in all serotypes, with only DENV-4 presenting phosphorylation sites by tyrosine kinase. Amino acids W231/D341 in DENV-1, Q86 in DENVs-2/4 and D87/D339 in DENV-3 showed maximum antigenicity in B cell recognition, while the human leukocyte antigen (HLA) alleles B*08:01/B*39:01 and DRB4*01:01, recognized by T cells, presented the highest number of predicted epitopes for the different DENV serotypes. These findings demonstrate that subtle structural differences influence the immunogenic potential of the E protein and support the identification of conserved epitopes as promising targets for broad-spectrum dengue vaccine strategies.

Keywords: Dengue Virus, Computational Biology, Viral Fusion Proteins, Epitopes, Human Leukocyte Antigen.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Histórico da Febre de Dengue 2

1.2. Aspectos Morfológicos e Genéticos do DENV 2

Figura 1 – Organização morfológica (à esquerda) e genômica (à direita) do DENV. 3

1.3. Ciclos de Transmissão do DENV 5

1.4. Aspectos Imunopatológicos do Vírus Dengue 7

1.5. Ativação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e a Resposta Imune contra a Dengue 9

1.6. Manifestações Clínicas da Febre da Dengue 10

1.7. Sorotipos do DENV 10

1.8. Epidemiologia do Vírus Dengue 11

1.9. Diagnóstico de Infecções por DENV 12

1.10. Vacinas contra o vírus Dengue 14

1.11. Proteínas de Fusão Virais de Classe II 15

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína E do DENV, assinalando as posições dos três domínios da porção externa (EDI, EDII e EDIII), da região de haste (*stem*) e da porção transmembranar (TM). 15

1.12. Desenvolvimento da Bioinformática 16

2. OBJETIVOS 18

2.1. Geral 18

2.2. Específicos 18

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

3.1. Tipo de Estudo e Aspectos Éticos 19

3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão 19

3.3. Coleta e Análise de Dados 19

3.3.2. Alinhamento das Sequências Aminoacídicas da Proteína E do DENV 19

3.3.3. Determinação do Peso Molecular, Carga Líquida, Ponto Isoelétrico e Polaridades Residuais da Proteína E do DENV 19

3.3.4. Verificação das Estruturas Secundárias da Proteína E do DENV 20

3.3.5. Identificação de Potenciais Sítios de Modificações Pós-Traducionais na Proteína E do DENV 20

3.3.6. Análise da Antigenicidade por Hidrofilicidade, Acessibilidade e Flexibilidade da Proteína E do DENV 20

3.3.7. Predição da Afinidade de Interação com Alelos dos HLAs-I/II de Peptídeos Derivados da Proteína E do DENV 21

4. RESULTADOS 23

4. 1 Alinhamento das Sequências Aminoacídicas da Proteína E do DENV 23

Figura 6 – Matriz de identidade percentual e alinhamento múltiplo da proteína E dos quatro sorotipos do DENV. 23

4.2 Determinação do Peso Molecular, Carga Líquida, Ponto Isoelétrico e Polaridades Residuais da Proteína E do DENV 23

Figura 4 – Polaridades residuais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV. 24

4.3 Verificação das Estruturas Secundárias da Proteína E do DENV 24

Figura 8 – Estruturas secundárias preditas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV. 25

4.4 Identificação de Potenciais Sítios de Modificações Pós-Traducionais na Proteína E do DENV 25

Figura 6 – Potenciais modificações pós-traducionais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV. 26

4.5 Análise da Antigenicidade por Hidrofilicidade, Acessibilidade e Flexibilidade da Proteína E do DENV 26

Figura 10 – Variações de antigenicidade ao longo da proteína E nos diferentes sorotipos. 27

4.6 Predição da Afinidade de Interação de Peptídeos Derivados da Proteína E do DENV com Alelos de HLAs-I/II 27

Figura 11 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I. 28

Figura 12 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I. 29

Figura 13 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II. 30
Figura 14 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II. 31
5. DISCUSSÃO 33
6. CONCLUSÃO 40
BIBLIOGRAFIA 42
FONTES DE FINANCIAMENTO 50

Lista de Figuras, Tabelas e Quadros

Figura 1 – Organização morfológica (à esquerda) e genômica (à direita) do DENV.....3

Figura 2 – Visão geral dos ciclos silvestre e urbano dos arbovírus.....6

Figura 3 – O Ciclo de vida do vírus do vírus dengue.....7

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína E do DENV, assinalando as posições dos três domínios da porção externa (EDI, EDII e EDIII), da região de haste (*stem)* e da porção transmembranar (TM).....15

Figura 5 – Fluxograma representativo das etapas metodológicas do estudo…….....22

Figura 6 – Matriz de identidade percentual e alinhamento múltiplo da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.....23

Figura 7 – Polaridades residuais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.....24

Figura 8 – Estruturas secundárias preditas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.....26

Figura 9 – Potenciais modificações pós-traducionais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.....27

Figura 10 – Variações de antigenicidade ao longo da proteína E nos diferentes sorotipos.....28

Figura 11 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I.....29

Figura 12 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I.....30

Figura 13 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II.....31

Figura 14 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II.....32

Tabela 1 – Peso molecular, carga líquida e ponto isoelétrico da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.....23

Quadro 1 - Resumo das proteínas do DENV.....5

Lista de Figuras, Tabelas e Quadros

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ADE – Antibody-Dependent Enhancement (Aprimoramento Dependente de Anticorpos)

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico (segundo mensageiro celular)

$CD4^+$ – Células T auxiliares (co-receptor CD4 positivo)

CD69 – Molécula de ativação presente em linfócitos

$CD8^+$ – Células T citotóxicas (co-receptor CD8 positivo)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cGMP – Guanosina monofosfato cíclico (segundo mensageiro celular)

CK2 – Caseína cinase II (enzima que fosforila proteínas)

COMPROTEIN – Software pioneiro em bioinformática para montagem de sequências proteicas

DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Danos)

DENV – Dengue Virus

DG – Dengue Grave

DHF – Dengue Hemorrhagic Fever (Febre Hemorrágica da Dengue)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DRB – Gene da região HLA classe II que codifica subunidades da molécula HLA-DR

DSA – Dengue com Sinais de Alarme

DSS – Dengue Shock Syndrome (Síndrome do Choque da Dengue)

EBOV – Ebola Virus (Vírus Ebola)

EDI – Envelope Domain I (Domínio I do envelope viral)

EDII – Envelope Domain II (Domínio II do envelope viral)

EDIII – Envelope Domain III (Domínio III do envelope viral)

EMBOSS – European Molecular Biology Open Software Suite

ER – Endoplasmic Reticulum (Retículo Endoplasmático)

FASTA – Formato padrão para sequências de nucleotídeos ou aminoácidos

Fcγ – Receptor para a fração constante da imunoglobulina G (Fc Gama)

FD – Febre da Dengue

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

GenBank – Banco de Dados Genético do NCBI

HBV – Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)

HCV – Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)

HLA – Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HLAs-I/II – Alelos dos complexos HLA classe I e II

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IFN – Interferon (proteína do sistema imune antiviral)

IFN-γ – Interferon Gama (citocina pró-inflamatória)

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

JEV – Japanese Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite Japonesa)

JIB – Journal of Integrative Bioinformatics (Revista de Bioinformática Integrativa)

kDa – Quilodalton (unidade de massa molecular)

LLPCs – Long-Lived Plasma Cells (Células Plasmáticas de Longa Duração)

m7GpppAmp – Tipo de "cap" na extremidade 5’ do RNA mensageiro – estrutura metilada de guanosina usada no início da tradução

MARV – Marburg Virus (Vírus Marburg)

MBCs – Memory B Cells (Células B de Memória)

MHC-I – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I

MHC-II – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NetMHCIIpan – Algoritmo para predição de ligação de peptídeos a MHC Classe II

NetMHCpan – Algoritmo para predição de ligação de peptídeos a MHC Classe I

NPS@ – Network Protein Sequence Analysis (plataforma para análise de proteínas)

NS – Non-structural (Não estrutural) – usada para nomear proteínas virais não estruturais (ex: NS1, NS2A, etc.)

NS1 – Non-Structural Protein 1 (Proteína Não Estrutural 1 do vírus)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Open Reading Frame (Quadro de Leitura Aberto)

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PCPROF – Ferramenta para análise de propriedades antigenicidade (hidrofilicidade, acessibilidade, flexibilidade)

PCR / RT-PCR – Polymerase Chain Reaction / Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase / Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)

PEPSTATS – Ferramenta da EMBOSS para análise estatística de proteínas

pH – Potencial hidrogeniônico (medida da acidez)

PREDATOR – Ferramenta para predição de estruturas secundárias de proteínas

prM/M – Pre-Membrane / Membrane (Pré-membrana / Membrana)

PRNT – Plaque Reduction Neutralization Test (Teste de Neutralização por Redução de Placa)

PROSCAN – Ferramenta para identificação de modificações pós-traducionais em proteínas

PRRs – Pattern Recognition Receptors (Receptores de Reconhecimento de Padrão)

PUO-218 e NGC – Linhagens específicas do DENV-2

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase (RNA-polimerase dependente de RNA)

RefSeq – Reference Sequence (Sequência de Referência)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

SCD – Síndrome de Choque da Dengue

SESPA – Secretaria de Saúde do Estado do Pará

SINAM – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SNC – Sistema Nervoso Central

TBE – Tick-Borne Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos)

TM – Transmembranar (região da proteína que atravessa a membrana)

UTR – Untranslated Region (Região Não Traduzida) – refere-se às extremidades 5' e 3' do RNA

VHC – Vírus da Hepatite C

WNV – West Nile Virus (Vírus do Nilo Ocidental)

YFV – Yellow Fever Virus (Vírus da Febre Amarela)

ZIKV – Zika Virus (Vírus Zika)ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ADE – Antibody-Dependent Enhancement (Aprimoramento Dependente de Anticorpos)

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico (segundo mensageiro celular)

$CD4^+$ – Células T auxiliares (co-receptor CD4 positivo)

CD69 – Molécula de ativação presente em linfócitos

$CD8^+$ – Células T citotóxicas (co-receptor CD8 positivo)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cGMP – Guanosina monofosfato cíclico (segundo mensageiro celular)

CK2 – Caseína cinase II (enzima que fosforila proteínas)

COMPROTEIN – Software pioneiro em bioinformática para montagem de sequências proteicas

DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Danos)

DENV – Dengue Virus

DG – Dengue Grave

DHF – Dengue Hemorrhagic Fever (Febre Hemorrágica da Dengue)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DRB – Gene da região HLA classe II que codifica subunidades da molécula HLA-DR

DSA – Dengue com Sinais de Alarme

DSS – Dengue Shock Syndrome (Síndrome do Choque da Dengue)

EBOV – Ebola Virus (Vírus Ebola)

EDI – Envelope Domain I (Domínio I do envelope viral)

EDII – Envelope Domain II (Domínio II do envelope viral)

EDIII – Envelope Domain III (Domínio III do envelope viral)

EMBOSS – European Molecular Biology Open Software Suite

ER – Endoplasmic Reticulum (Retículo Endoplasmático)

FASTA – Formato padrão para sequências de nucleotídeos ou aminoácidos

Fcγ – Receptor para a fração constante da imunoglobulina G (Fc Gama)

FD – Febre da Dengue

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

GenBank – Banco de Dados Genético do NCBI

HBV – Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)

HCV – Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)

HLA – Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HLAs-I/II – Alelos dos complexos HLA classe I e II

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IFN – Interferon (proteína do sistema imune antiviral)

IFN-γ – Interferon Gama (citocina pró-inflamatória)

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

JEV – Japanese Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite Japonesa)

JIB – Journal of Integrative Bioinformatics (Revista de Bioinformática Integrativa)

kDa – Quilodalton (unidade de massa molecular)

LLPCs – Long-Lived Plasma Cells (Células Plasmáticas de Longa Duração)

m7GpppAmp – Tipo de "cap" na extremidade 5’ do RNA mensageiro – estrutura metilada de guanosina usada no início da tradução

MARV – Marburg Virus (Vírus Marburg)

MBCs – Memory B Cells (Células B de Memória)

MHC-I – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I

MHC-II – Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NetMHCIIpan – Algoritmo para predição de ligação de peptídeos a MHC Classe II

NetMHCpan – Algoritmo para predição de ligação de peptídeos a MHC Classe I

NPS@ – Network Protein Sequence Analysis (plataforma para análise de proteínas)

NS – Non-structural (Não estrutural) – usada para nomear proteínas virais não estruturais (ex: NS1, NS2A, etc.)

NS1 – Non-Structural Protein 1 (Proteína Não Estrutural 1 do vírus)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Open Reading Frame (Quadro de Leitura Aberto)

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PCPROF – Ferramenta para análise de propriedades antigenicidade (hidrofilicidade, acessibilidade, flexibilidade)

PCR / RT-PCR – Polymerase Chain Reaction / Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase / Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)

PEPSTATS – Ferramenta da EMBOSS para análise estatística de proteínas

pH – Potencial hidrogeniônico (medida da acidez)

PREDATOR – Ferramenta para predição de estruturas secundárias de proteínas

prM/M – Pre-Membrane / Membrane (Pré-membrana / Membrana)

PRNT – Plaque Reduction Neutralization Test (Teste de Neutralização por Redução de Placa)

PROSCAN – Ferramenta para identificação de modificações pós-traducionais em proteínas

PRRs – Pattern Recognition Receptors (Receptores de Reconhecimento de Padrão)

PUO-218 e NGC – Linhagens específicas do DENV-2

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase (RNA-polimerase dependente de RNA)

RefSeq – Reference Sequence (Sequência de Referência)

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

SCD – Síndrome de Choque da Dengue

SESPA – Secretaria de Saúde do Estado do Pará

SINAM – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SNC – Sistema Nervoso Central

TBE – Tick-Borne Encephalitis Virus (Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos)

TM – Transmembranar (região da proteína que atravessa a membrana)

UTR – Untranslated Region (Região Não Traduzida) – refere-se às extremidades 5’ e 3’ do RNA

VHC – Vírus da Hepatite C

WNV – West Nile Virus (Vírus do Nilo Ocidental)

YFV – Yellow Fever Virus (Vírus da Febre Amarela)

ZIKV – Zika Virus (Vírus Zika)

1. INTRODUÇÃO

A dengue consiste em uma doença febril ocasionada pelo vírus Dengue (DENV), taxonomicamente denominado em nível de espécie como *Orthoflavivirus denguei*, que pertence ao gênero *Orthoflavivirus* da família *Flaviviridae* e possui quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) ("Current ICTV Taxonomy Release | ICTV", [s.d.]) (ICTV, 2022). Como outros membros desse gênero, o DENV é considerado um arbovírus pela sua capacidade de transmissão via artrópodes hematófagos para hospedeiros vertebrados. A infecção em questão pode ser tanto assintomática como ocasionar diversos quadros clínicos, apresentando desde acometimentos amenos semelhantes à gripe até manifestações letais como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque associada à dengue (HARAPAN et al., 2020) (Harapan *et al.*, 2020).

O DENV tem grande impacto sobre várias regiões tropicais e subtropicais do globo. Estimativas indicam que, por ano, ocorrem aproximadamente 390 milhões de infecções pelo vírus na população mundial e que, destas, 500 mil a 1 milhão constituem casos graves e com desfechos fatais. Com as rápidas mudanças climáticas e a crescente ação antrópica na natureza, há grande temor de que haja o agravamento de casos em regiões já endêmicas e o aumento de ocorrências em regiões que não apresentavam números expressivos de casos (LEE *et al*., 2021; NORSHIDAH; VIGNESH; LAI, 2021).

O genoma do DENV, composto por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e senso positivo, é responsável por codificar uma poliproteína que, após clivagem, dará origem a três proteínas estruturais, denominadas C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais são responsáveis pela simetria iscosaédrica do vírion e participam do processo de invasão da célula-alvo, ao passo que as proteínas não estruturais atuam na replicação viral e na evasão das respostas imunes do hospedeiro (CHAMBERS *et al*, 1990).

Como as proteínas possuem um caráter crucial em quase todos os processos biológicos realizados na infecção viral, sua caracterização estrutural é indispensável tanto para produção de medicamentos quanto para a obtenção de vacinas. Há diversos tipos de abordagens para o estudo *in vitro* de proteínas; todavia, tais abordagens podem representar um significativo dispêndio de tempo e recursos financeiros para sua execução, a exemplo da cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear. Nesse contexto, a bioinformática se apresenta como uma grande aliada, oferecendo praticidade, baixo custo e grande eficiência (LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001).

Apesar de os diferentes sorotipos de DENV apresentarem uma notável similaridade nas sequências aminoacídicas das suas respectivas proteínas, a diferença remanescente entre elas pode resultar em particularidades na indução de respostas imunes, na capacidade de invasão de diferentes células-alvo e na patogênese associada ao processo de infecção (HARAPAN *et al*., 2020). Desse modo, pesquisas que possam investigar tais diferenças podem ser de grande valia para o melhor entendimento das infecções pelo DENV e promover o desenvolvimento de contramedidas ao patógeno.

Neste projeto, abordam-se os aspectos bioquímicos e imunológicos da proteína de fusão dos quatro sorotipos de DENV, associando-se, assim, à linha de pesquisa "Morfologia e Genética de Agentes Infecciosos, Parasitos e Vetores de Endemias na Amazônia" do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA).

1.1. Histórico da Febre de Dengue

Pelo fato da dengue, na maioria dos casos, não apresentar uma sintomatologia específica, a história de sua origem não é clara. Há relatos clínicos com sintomas que se assemelham à dengue na China em períodos aC e, também, algumas centenas de anos dC. Posteriormente, ainda no século XVII, endemias com sintomas semelhantes à dengue foram descritas na África, Ásia e América do Norte, o que indica que já havia a distribuição do seu vetor nos trópicos (SALLES *et al*., 2018; SILVA; SANTOS; MARTINS, 2020).

Os primeiros isolados de todos os sorotipos do DENV foram obtidos no continente asiático. O isolado mais antigo do DENV-1 foi encontrado no Japão, em 1943; o DENV-2 foi isolado primariamente em 1944, em Papua Nova Guiné e Indonésia; e, por fim, o DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1953, nas Filipinas e Tailândia. A Malásia é considerada o berço da linhagem ancestral silvestre do DENV para todos os sorotipos e estudos apontam que o DENV-2 divergiu de seu ancestral silvestre há apenas 400-600 anos (HARAPAN *et al*., 2020).

No Brasil, o primeiro registro de dengue ocorreu no período colonial, em Recife. Anos depois, uma epidemia de dengue em Salvador ocasionou diversos óbitos; também houve surtos de dengue, em 1846, que acometeram diversos estados, como São Paulo e Rio de Janeiro. Desde então, o DENV vem ocasionando diversos surtos esporádicos entre os estados brasileiros, espalhando cada vez mais seus sorotipos (SALLES *et al*., 2018).

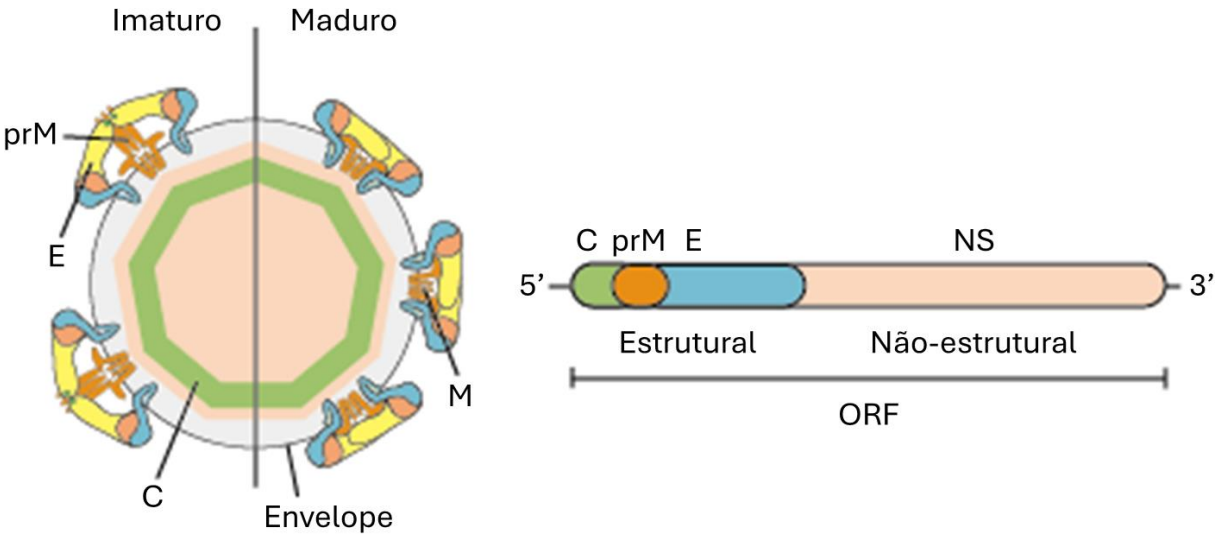
1.2. Aspectos Morfológicos e Genéticos do DENV

Imagens de microscopia eletrônica mostraram que as partículas do DENV, em estado maduro, apresentam uma superfície lisa e possuem cerca de 50 nm de diâmetro em temperatura ambiente e pH fisiológico. Em contraste, o DENV imaturo, ou exposto a variações de

temperatura e pH, tem um diâmetro de aproximadamente 55 nm, apresentando uma superfície áspera com saliências formadas pelas proteínas E e prM (Figura 1) (KUHN *et al*., 2002).

O genoma viral possui quase 11 kb e é subdividido em três porções distintas: uma região não traduzida na extremidade 5’ (5’-UTR), um quadro de leitura aberto (ORF) e uma região não traduzida na extremidade 3’ (3’-UTR). Na extremidade 5’, o genoma apresenta um *cap* do tipo m7GpppAmp; o ORF único contém as instruções para a síntese de uma poliproteína que, posteriormente, será clivada nas proteínas estruturais e não estruturais do vírus; e, na extremidade 3’ do genoma, não há uma cauda de poli(A) (ROY; BHATTACHARJEE, 2021) (Figura 1).

Figura 1 – Organização morfológica (à esquerda) e genômica (à direita) do DENV.



Fonte: Adaptado de < https://www.creative-diagnostics.com/Flavivirus.htm> (acesso em 07/03/2024).

As proteínas NS do DENV desempenham funções vitais durante a replicação viral. A NS1 atua em estágios iniciais, associando-se ao complexo de replicação viral na membrana do retículo endoplasmático (ER) e, em estágios tardios, evitando respostas celulares. A NS3 funciona como uma protease e participa na replicação do RNA viral como helicase. A NS5, altamente conservada, é responsável pela replicação propriamente dita do genoma viral, por conter atividade de RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) (ZEIDLER *et al*., 2017).

Já as proteínas transmembranares NS2A, NS2B, NS4A e NS4B possuem funções menos compreendidas. Elas parecem atuar como andaimes para o complexo de replicação, desempenhando papéis na reorganização de membranas celulares e na interação com proteínas hospedeiras. Essas funções são cruciais para diferentes estágios da replicação do vírus, desde a clivagem de proteínas até a interação com o ambiente intracelular, contribuindo para a propagação eficiente do vírus (ZEIDLER *et al*., 2017).

A NS2A é uma proteína de membrana envolvida na replicação viral, montagem do vírus e modulação da resposta imune. Ela interage com outros componentes virais, como NS3 e NS5, para facilitar a replicação do RNA viral e, em algumas linhagens, inibe a sinalização de interferon (IFN), ajudando o vírus a escapar da resposta imune do hospedeiro em algumas espécies de flavivírus (FIELDS; KNIPE, 2007).

De maneira geral, a proteína NS2B age como cofator essencial para a protease viral NS3 nos flavivírus, formando um complexo que é necessário para clivar as poliproteínas virais. Essa clivagem é crítica para a maturação das proteínas virais e, consequentemente, para a montagem e propagação do vírus (FIELDS; KNIPE, 2007).

Embora a NS4A seja a menor (~8 kD) das proteínas não estruturais dos flavivírus, ela desempenha diversas funções essenciais no ciclo viral. Atua como um cofator crucial para a protease de serina, facilitando o reconhecimento de substratos de RNA pela NS3. Além disso, a NS4A interage fisicamente com outras proteínas virais, como NS4B e NS5A, e com a versão não truncada de NS4B, desempenhando um papel fundamental na regulação da atividade da helicase da NS3, na fosforilação de NS5A e na montagem de partículas virais (FIELDS; KNIPE, 2007).

A NS4B forma oligômeros e desempenha um papel crucial na organização do complexo de replicação associado à membrana dos flavivírus. Além disso, essa proteína também foi relacionada ao processo de montagem das partículas virais, embora sua função específica nesse mecanismo ainda não esteja completamente elucidada (FIELDS; KNIPE, 2007).

A proteína C do DENV é essencial na formação do nucleocapsídeo durante o processo de replicação e montagem viral, em função de sua capacidade de ligação ao RNA viral. A associação da proteína C à membrana do ER facilita a replicação viral, sugerindo um papel crucial na interação do RNA viral com a bicamada lipídica dessa organela celular (BYK; GAMARNIK, 2016). Por sua vez, a proteína M, originada por clivagem da proteína prM, desempenha um papel-chave na transição de partículas virais imaturas para maduras. Além disso, a proteína M, localizada no ER, tem a capacidade de formar canais iônicos em membranas biológicas, atuando como uma viroporina. Essa característica a torna um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de tratamentos contra infecções por DENV (ZEBA; SEKAR; GANJIWALE, 2023).

A proteína E do DENV é responsável pelo reconhecimento de receptores na superfície celular e tem a capacidade de fundir o envelope viral com a membrana endossomal por meio de um rearranjo conformacional disparado pelo baixo pH da rota endocítica durante os eventos iniciais do ciclo de infecção. Logo, essa proteína representa um notório alvo de estudos tanto

para o melhor entendimento da reação de fusão de membranas mediada por vírus quanto para a criação de novas estratégias terapêuticas e profiláticas contra a dengue (VILLALAÍN, 2022).

O Quadro 1 sintetiza as proteínas codificadas pelo genoma do DENV, discriminando-as quanto ao tipo (estrutural ou não estrutural), à função biológica e à localização intracelular.

Quadro 1 - Resumo das proteínas do DENV.

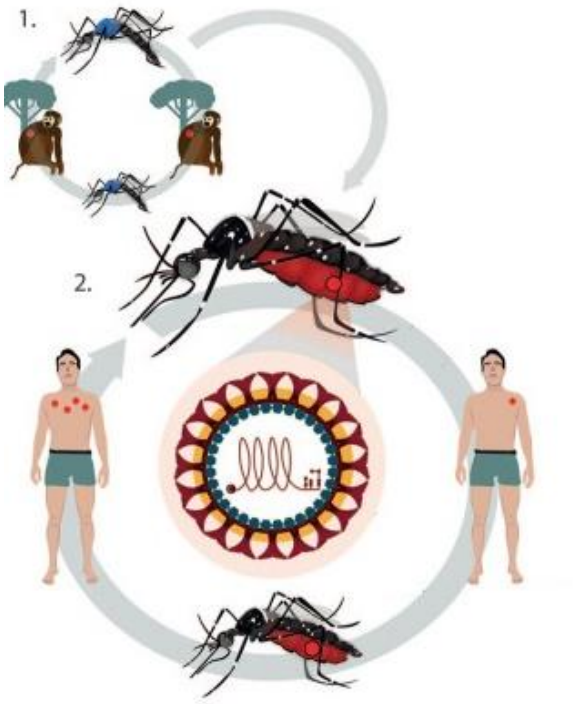
Proteína	Tipo	Função Principal	Localização
C (Capsídeo)	Estrutural	Protege o material genético viral.	Abaixo do envelope viral
prM (pré-Membrana)	Estrutural	Auxilia na formação do envelope viral.	Envelope viral (fase imatura)
E (Envelope)	Estrutural	Facilita a entrada do vírus na célula hospedeira.	Envelope viral
NS1 (Não Estrutural 1)	Não Estrutural	Envolvida na replicação viral e escape imune.	Secretada e na superfície celular
NS2A (Não Estrutural 2A)	Não Estrutural	Participa da replicação e montagem viral.	Membranas internas da célula
NS2B (Não Estrutural 2B)	Não Estrutural	Cofator da protease NS3, crucial para a clivagem viral.	Complexo com NS3
NS3 (Não Estrutural 3)	Não Estrutural	Atua como protease e helicase, essencial para a replicação.	Citoplasma
NS4A (Não Estrutural 4A)	Não Estrutural	Modifica membranas para replicação viral.	Membranas internas da célula
NS4B (Não Estrutural 4B)	Não Estrutural	Organiza o complexo de replicação viral.	Membranas internas da célula
NS5 (Não Estrutural 5)	Não Estrutural	RNA-polimerase responsável pela replicação do RNA viral.	Citoplasma

1.3. Ciclos de Transmissão do DENV

Na qualidade de arbovírus, o DENV é transmitido pela picada de um artrópode hematófago infectado para hospedeiros vertebrados, que podem ser humanos ou não. O vetor primário desse vírus é o mosquito *Aedes aegypti* e, o seu vetor secundário, o mosquito *Aedes albopictus*. Tais vetores são, preferencialmente, encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, presentes em todos os continentes (ROY; BHATTACHARJEE, 2021).

O DENV tem dois tipos de ciclo de transmissão, como descrito na figura 2, urbano e silvestre. O ciclo urbano ocorre apenas entre humanos e tem o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* como vetores (humano-mosquito-humano). Já no ciclo silvestre, a infecção ocorre principalmente entre primatas não humanos e, ocasionalmente, pode atingir humanos (primata não humano-mosquito-humano); em tal ciclo, outras espécies de *Aedes* são descritas como vetores (HARAPAN *et al.,* 2020).

Figura 2 - Visão geral dos ciclos silvestre e urbano dos arbovírus.



Legenda: (1) Ciclo silvestre envolvendo mosquitos; (2) ciclo urbano envolvendo mosquitos. Fonte: Adaptado de MAIA et al., 2023.

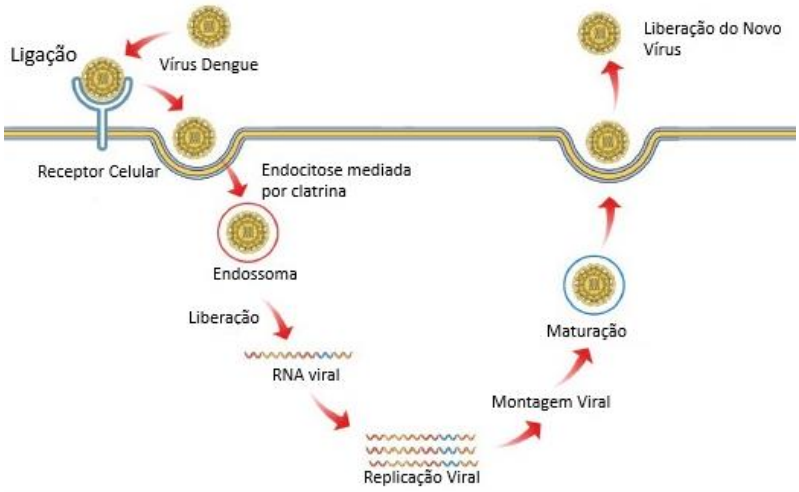
A sazonalidade da febre de dengue é conhecida e pode ser utilizada para prever possíveis surtos. Estudos apontam que o aumento da temperatura também pode estar relacionado ao aumento das taxas de picada do inseto vetor, redução do período de incubação e maior alcance populacional. Além disso, há dados que mostram o aumento de casos humanos durante períodos com altas taxas de pluviosidade (CHARETTE *et al.,* 2020). Na região Norte do Brasil, a Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA) orienta maiores cuidados com a transmissão de arbovírus, incluindo o DENV, durante os períodos chuvosos da Amazônia (AGÊNCIA DE NOTÍCIAS OFICIAL DO GOVERNO DO PARÁ, 2022).

1.4. Aspectos Imunopatológicos do Vírus Dengue

A infecção por DENV se inicia com a ligação do vírus através da proteína E a moléculas receptoras na superfície celular, seguida de internalização por meio de endocitose. Estudos voltados à análise da replicação desse vírus identificaram vários prováveis receptores em células de mamíferos, incluindo receptores de manose, proteínas de choque térmico, CD14 e lectinas do tipo C, entre outros (HARAPAN *et al,* 2020).

Após a ligação ao receptor, como ilustrado na figura 3, as partículas virais se disseminam ao longo da superfície celular em direção a uma depressão pré-existente revestida pela proteína clatrina; com o auxílio da dinamina, essa depressão evolui para uma vesícula, ainda revestida por clatrina e, então, essa vesícula é entregue aos endossomos iniciais. Após a internalização e a redução do pH desse endossomo, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana endossomal mediada por alterações conformacionais da proteína E, promovendo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma. Essa endocitose mediada por clatrina é utilizada pelo DENV tanto na infecção de células de mamíferos quanto de células de insetos (MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

Figura 3 - O ciclo de vida do vírus do vírus dengue.



Legenda: O vírus se liga ao receptor celular, entra por endocitose, libera o RNA viral, ocorre a replicação e montagem dos novos vírus, que são liberados para infectar outras células. Fonte: Adaptado de HERSHAN, 2023.

Células de Langerhans, células dérmicas e células dendríticas intersticiais são as células primariamente afetadas pelo DENV. A imunidade inata reage reconhecendo os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). O reconhecimento de PAMPs virais ativa, na célula, um estado antiviral desencadeado pela produção de citocinas, especialmente interferons (IFNs) do tipo I (UNO; ROSS, 2018) (Uno; Ross, 2018).

Com o estímulo à resposta imune adaptativa, células B virgens são ativadas. Essa ativação dá origem a células plasmáticas de longa duração secretoras de anticorpos (LLPCs), que se localizam na medula óssea, e a células B de memória (MBCs), que transitam pelo sangue e órgãos linfoides periféricos (WILKEN; RIMMELZWAAN, 2020). Além das células B, células T também apresentam um papel crucial na proteção contra o DENV. Essas células são capazes de eliminar o vírus através da indução de morte das células infectadas e aumentar a produção de uma gama de citocinas. Todavia, as células T também estão relacionadas a respostas imunes exacerbadas quando há infecção secundária heteróloga pelos sorotipos, produzindo uma alta taxa de citocinas pró-inflamatórias e, assim, gerando várias reações que aumentam a probabilidade de o indivíduo apresentar manifestações graves da febre de dengue (HARAPAN *et al*., 2020).

A proteína E é o foco principal dos anticorpos neutralizantes produzidos pela resposta imune do hospedeiro. Na infecção primária por DENV, os níveis de IgM normalmente começam a aumentar de 3 a 5 dias após o início da febre e, após duas semanas, atingem seu pico. Até 3 meses depois, os níveis de IgM caem consideravelmente, podendo ser indetectáveis, enquanto os de IgG sobem e perduram ao longo da vida do indivíduo, podendo oferecer proteção contra novas ocorrências apenas para o mesmo sorotipo. Durante uma infecção secundária, os níveis de IgM não são expressivos; em contrapartida, os níveis de IgG sobem rapidamente e atingem seu pico – essa diferença de padrão de anticorpos é utilizada, principalmente, na identificação de infecções primárias e secundárias (MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

Embora os sorotipos de DENV demonstrem elevada semelhança entre si, ainda assim apresentam um grau relevante de variabilidade genética. Como resultado disso, os anticorpos remanescentes de uma infecção por um dado sorotipo viral terminam, paradoxalmente, por facilitar a entrada de um sorotipo viral distinto nas células hospedeiras via receptores Fcγ, ao reagirem cruzadamente entre os sorotipos sem promover uma neutralização efetiva; esse evento é chamado de aprimoramento dependente de anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*) (HARAPAN *et al*., 2020). Tal fenômeno amplia o tropismo viral e aumenta a carga patogênica na célula hospedeira, intensificando, por consequência, a severidade da doença. Adicionalmente, verifica-se uma supressão do sistema imunológico que beneficia a replicação viral. A redução da imunidade, evidenciada por níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes, pode igualmente aumentar a susceptibilidade ao fenômeno de ADE (TEO *et al.,* 2023).

1.5. Ativação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e a Resposta Imune contra a Dengue

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) desempenha um papel fundamental na resposta imune contra DENV, facilitando a apresentação de antígenos e a ativação de células imunológicas. O MHC é classificado em duas classes principais, MHC-I e MHC-II, cada uma com funções distintas na imunidade adaptativa.

As moléculas do MHC de classe I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas e são responsáveis por apresentar peptídeos derivados de proteínas intracelulares, incluindo aquelas provenientes do DENV, para as células T $CD8^+$ citotóxicas. Durante a infecção, as células infectadas processam proteínas virais, que são, então, apresentadas pelo MHC-I. Essa apresentação desencadeia uma resposta citotóxica, promovendo a eliminação das células infectadas. Estudos demonstram que diferentes sorotipos do DENV podem modular a expressão de MHC-I como um mecanismo de evasão imune, reduzindo a detecção pelos linfócitos T citotóxicos e contribuindo para a persistência da infecção (CHOO, 2007).

Por outro lado, as moléculas do MHC de classe II estão expressas principalmente em células apresentadoras de antígenos profissionais, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. O MHC-II é responsável pela apresentação de peptídeos extracelulares aos linfócitos T $CD4^+$ auxiliares, que desempenham um papel essencial na coordenação da resposta imune adaptativa. Durante a infecção, proteínas virais captadas por células apresentadoras de antígenos são processadas e apresentadas via MHC-II, ativando linfócitos T $CD4^+$, que, por sua vez, estimulam a produção de citocinas inflamatórias e a ativação de linfócitos B para a produção de anticorpos neutralizantes (BASHEER *et al.,* 2023).

Há evidências de que a apresentação de antígenos pelo MHC-II pode ser crucial na indução de imunidade protetora duradoura. Estudos envolvendo vacinas experimentais demonstraram que a inserção de proteínas do DENV no compartimento MHC-II pode estimular a produção sustentada de anticorpos neutralizantes e uma resposta imune mais eficaz contra as reinfecções (BASHEER *et al.,* 2023).

A interação entre MHC-I e MHC-II na resposta imune contra os diferentes sorotipos do DENV tem sido amplamente estudada, especialmente no contexto de infecções secundárias, onde anticorpos preexistentes podem modular a apresentação de antígenos e a ativação das células imunes. Nesse cenário, os epítopos — pequenos fragmentos peptídicos derivados de proteínas virais e apresentados às células T pelo MHC-I/II — desempenham um papel essencial na identificação de regiões imunogênicas. A análise desses epítopos é fundamental para

compreender as diferenças e semelhanças entre os sorotipos do DENV, permitindo a elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos (MURPHY; RECHE; FLOWER, 2019).

1.6. Manifestações Clínicas da Febre da Dengue

A classificação tradicional definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) divide as infecções sintomáticas por DENV em febre indiferenciada, febre da dengue (FD) e febre hemorrágica da dengue (FHD), sendo que a FHD é adicionalmente subdividida em síndrome de choque da dengue (SCD) com diferentes graus (OMS, 2009). Dificuldades na aplicação dessa classificação, especialmente devido ao aumento de casos graves que não se encaixavam nos critérios rigorosos de FHD, levaram à necessidade de revisão da proposta original. Atualmente, as manifestações clínicas dessa arbovirose são classificadas como dengue, dengue com sinais de alarme (DSA) e dengue grave (DG) (OMS, 2023).

Grande parte dos indivíduos afetados pela dengue apresenta sintomas leves ou nenhum sintoma, e a recuperação geralmente ocorre dentro de 1-2 semanas. Os sintomas FD e sem sinais de alarme compreendem febre alta (40 °C), forte dor de cabeça, dor nos olhos, dores musculares e articulares, náusea, vômitos, aumento das glândulas linfáticas, erupções cutâneas e dores nas articulações. A etapa crítica, também referida como etapa de alto risco, é caracterizada pela emergência de sintomas mais severos, incluindo o extravasamento de plasma e hemorragias internas. Na etapa de convalescença, observa-se uma melhora gradativa dos sintomas e a normalização da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Os sintomas graves da infecção frequentemente se manifestam após o término da febre e podem incluir dor abdominal intensa, vômitos persistentes, respiração rápida, sangramento nas gengivas ou no nariz, fadiga, inquietude, presença de sangue no vômito ou nas fezes, polidipsia, pele pálida/fria e fraqueza (OMS, 2023).

A dengue pode também afetar o sistema nervoso central (SNC), promovendo sintomas como alteração da consciência e rigidez no pescoço, além de sinais neurológicos focais e convulsões. A complicação mais comum é a encefalopatia, desencadeada por diversas condições sistêmicas, enquanto a encefalite ocasionada pelo vírus dengue, reconhecida mais recentemente, apresenta uma ampla gama de sinais e sintomas neurológicos (TRIVEDI; CHAKRAVARTY, 2022).

1.7. Sorotipos do DENV

Os quatro sorotipos do DENV são circulantes no Brasil e ocasionam epidemias que alternam entre os sorotipos envolvidos. De 2002 a 2006, o DENV-3 liderou as notificações; entre 2007 e 2009, o sorotipo predominante foi DENV-2; e, em 2009, as notificações de DENV-1 aumentaram. O DENV-4 reemergiu no país com casos no final de 2010 e, durante a epidemia

de 2014-2015, foi o sorotipo com maior detecção no país (apesar de todos os outros sorotipos continuarem circulantes) (NUNES *et al*., 2019; SALLES *et al*., 2018).

Cada um dos quatro sorotipos do DENV possui agrupamentos de genótipos. Esses genótipos são grupos que têm mais de 6% de divergência na sequência de nucleotídeos: o DENV-1 pode ser divido em cinco genótipos (I, II, III, IV e V), o DENV-2 é dividido em seis genótipos (asiático I, asiático II, cosmopolita, americano, americano/asiático e silvestre) e o DENV-3 é dividido em quatro genótipos (I, II, III e V), assim como o DENV-4 (I, II, III e silvestre) (HARAPAN *et al*., 2020).

Apesar de todos os sorotipos apresentarem a possibilidade de manifestar complicações graves, os sorotipos 2 e 3 estão mais frequentemente relacionados a elas. Além disso, dentro da variação dos sorotipos, a proteína E apresenta regiões conservadas e variáveis, com até 37% de divergência entre os aminoácidos; essa diferença está relacionada à proteção cruzada entre os sorotipos e às intercorrências de neutralização que contribuem para a manifestação de doença grave (MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

1.8. Epidemiologia do Vírus Dengue

Em 2024, o Brasil enfrentou o maior surto de dengue já registrado no país, com um total de 6.215.201 casos prováveis da doença entre as semanas epidemiológicas 1 e 26 (iniciada em 31/12/2023 e encerrada em 29/06/2024). Esse número representa um aumento expressivo em relação ao mesmo período de 2023, evidenciando uma expansão significativa da transmissão. O coeficiente de incidência foi de 3.060,7 casos por 100 mil habitantes, com destaque para as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, que apresentaram os maiores índices (BRASIL, 2024).

Observou-se também um aumento expressivo nos casos graves da doença, com crescimento de 307,8% em relação ao mesmo período do ano anterior. O número de óbitos confirmados por dengue foi de 4.269, com uma taxa de letalidade de 5,1%. A região Sudeste concentrou a maior parte dos casos e dos óbitos confirmados, reforçando a gravidade do cenário epidemiológico nessa área (BRASIL, 2024).

Em relação ao perfil das vítimas, as maiores taxas de letalidade foram observadas entre crianças com menos de um ano de idade e indivíduos com 50 anos ou mais, confirmando a maior vulnerabilidade de crianças e idosos. Quanto ao sexo, observou-se um leve predomínio de casos entre mulheres (50,9%). A maioria das pessoas que foram a óbito apresentava comorbidades, sendo as mais prevalentes a hipertensão arterial, seguida pelo diabetes (BRASIL, 2024).

Quanto à circulação dos sorotipos virais, o Brasil apresentou em 2024 a circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV1-4). O DENV-1 foi o sorotipo mais

prevalente no país, embora tenha sido sobreposto pelo DENV-2 nas regiões Norte e Centro-Oeste. O DENV-2 também apresentou alta prevalência nacional, seguido por detecções pontuais de DENV-3 e ocorrências isoladas de DENV-4 (BRASIL, 2024).

No período da primeira a quarta semana epidemiológica do SINAM (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) de 2025 (29/12/2024 a 25/01/2025) o Brasil notificou 139.241 casos prováveis de dengue, com um coeficiente de incidência de 68,6 casos por 100 mil habitantes — representando uma redução de 57,9% em comparação ao mesmo período de 2024. As regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul registraram os maiores coeficientes de incidência, sendo que os estados do Acre, São Paulo e Mato Grosso se destacaram entre as Unidades Federativas. A maioria dos casos graves e dos 21 óbitos confirmados (com outros 160 em investigação) também se concentrou na Região Sudeste (BRASIL, 2025).

Nessas semanas, persistiu a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, com aumento expressivo do DENV-3 desde o final de 2024. Apesar da queda nos números em relação ao ano anterior, os casos prováveis de dengue ultrapassam os limites do canal endêmico, indicando uma situação fora do padrão esperado segundo o diagrama de controle. Além disso, a projeção por *nowcasting* aponta para uma tendência de alta nos casos nas próximas semanas (BRASIL, 2025).

O aumento recente da incidência de dengue no país pode estar diretamente relacionado com a presença do genótipo III do DENV-3. Essa detecção é indicativa de uma nova introdução desse sorotipo viral nas Américas a partir do subcontinente indiano. A falta de ocorrência significativa desse sorotipo no Brasil por mais de 15 anos e a ausência de transmissão recente podem ter contribuído para aumentar a suscetibilidade da população a essa infecção específica. Este cenário ressalta a importância da detecção precoce e da vigilância contínua da propagação dos diferentes sorotipos de DENV, tanto no Brasil quanto em outras nações do continente americano (NAVECA *et al*., 2023).

1.9. Diagnóstico de Infecções por DENV

O diagnóstico do vírus dengue é desafiador devido aos seus sintomas iniciais serem semelhantes a uma síndrome gripal comum, e ainda mais complicado em áreas endêmicas para outros arbovírus em função de reações cruzadas nos testes laboratoriais. Métodos diretos permitem a identificação de componentes virais e são especialmente úteis nos estágios iniciais da infecção, ao passo que métodos indiretos se voltam à detecção da resposta imune ao vírus e são realizados mais tardiamente, devido à diminuição da viremia (RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) é um método altamente sensível e específico para detecção do RNA do DENV. É particularmente útil nos primeiros 5 dias após o início dos sintomas, quando o vírus está presente na corrente sanguínea. Tal abordagem diagnóstica pode ser realizada a partir de diferentes amostras biológicas, como plasma, sangue, urina e soro, sendo importante para a diferenciação entre os quatro sorotipos do DENV, fornecendo informações cruciais para o manejo e a vigilância da doença (KABIR *et al*., 2021).

O isolamento viral é uma técnica tradicional que envolve a inoculação de amostras clínicas em linhagens celulares de insetos e mamíferos, como C6/36 (*Aedes albopictus*) e Vero (*Chlorocebus sabaeus*), respectivamente. Após a incubação, testes confirmatórios como ensaio de imunofluorescência ou RT-PCR são necessários. Apesar de sua alta especificidade, o isolamento viral é limitado pela necessidade de laboratórios especializados e pelo curto período de viremia na fase aguda da infecção (HARAPAN *et al.,* 2020).

O teste de neutralização por redução de placa (PRNT) é uma técnica usada para determinar exposições anteriores ao DENV e avaliar a imunogenicidade de vacinas. O teste mede a quantidade de anticorpos neutralizantes no soro que são necessários para reduzir a infecção viral em uma cultura de células. Esse procedimento permite calcular os títulos de anticorpos neutralizantes específicos para cada sorotipo do DENV e pode ser usado para monitorar a história de exposição ao vírus e a soroprevalência da doença em uma população, informações essenciais para orientar programas de vacinação (RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019).

Há, ainda, outros testes sorológicos, os quais detectam a presença de anticorpos IgM e IgG no soro dos pacientes. O IgM é, geralmente, detectável a partir do 5º dia após o início dos sintomas e indica uma infecção recente, enquanto o IgG, que se eleva posteriormente, sugere uma infecção anterior ou uma fase tardia da infecção atual. Esses testes são particularmente úteis para diagnóstico em estágios mais avançados da doença, quando o vírus pode não ser mais detectável (KABIR *et al.,* 2021).

Outrossim, o diagnóstico de acometimento por DENV também é possível através da detecção do antígeno viral NS1, que é liberado na corrente sanguínea dos pacientes infectados. Especialmente úteis na fase aguda da doença, os testes de NS1 fornecem resultados qualitativos e são valorizados por sua capacidade de identificar a presença do vírus mesmo quando a viremia já não é mais detectável. Embora os testes baseados em NS1 sejam práticos e rápidos, eles variam em sensibilidade e especificidade, especialmente entre diferentes sorotipos do DENV. Um resultado positivo em um teste de NS1 é indicativo de infecção pelo vírus, mas um resultado

negativo não exclui completamente tal possibilidade, sugerindo a realização subsequente de testes baseados em anticorpos para confirmação (KABIR *et al.,* 2021).

Além dos diagnósticos laboratoriais, há também o teste do torniquete ou laço, que é realizado com um manguito de pressão sanguínea inflável para avaliar a fragilidade capilar e preconizado nas diretrizes da OMS como um sinal diagnóstico para dengue. Apesar de ser rápido e fácil de executar, estudos indicam uma performance diagnóstica limitada, com sensibilidade e especificidade variáveis. Além disso, sua interpretação pode ser desafiadora em diferentes tons de pele e em um contexto de infecções por outros flavivírus (RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019).

1.10. Vacinas contra o vírus Dengue

O desenvolvimento de estratégias profiláticas para a dengue baseadas em vacinas é desafiador, principalmente pela existência de quatro sorotipos virais com características antigênicas distintas, capazes de desencadear a doença. Uma primeira exposição a qualquer sorotipo de DENV confere imunidade duradoura contra o mesmo sorotipo, mas oferece apenas uma breve proteção contra os demais. Atualmente, no Brasil, há a aprovação de duas vacinas contra a dengue: a Dengvaxia, de origem francesa, e a Qdenga, de origem japonesa (ANGELIN *et al*., 2023; FERNANDES *et al*., 2023).

A Dengvaxia, autorizada no Brasil em 2015, é uma vacina de vírus vivo atenuado e tetravalente, criada a partir de quimeras que combinam genes codificantes das proteínas prM e E dos quatro sorotipos do DENV com os genes codificantes de proteínas NS da vacina de febre amarela 17D. Desenvolvida inicialmente na Universidade de Saint Louis para a encefalite japonesa, essa plataforma quimérica foi, depois, adaptada para a dengue. Utilizando tecnologia de DNA recombinante, os quatro sorotipos de DENV foram produzidos separadamente em células Vero e, posteriormente, mesclados em uma formulação única (THOMAS; YOON, 2019).

Estudos sobre a Dengvaxia indicam que ela é 60% eficaz contra casos de dengue comprovados por exames laboratoriais. Contudo, estudos de acompanhamento observaram um aumento no risco de internações por dengue no terceiro ano pós-vacinação, especialmente entre as crianças que nunca haviam contraído a doença, quando comparadas às que receberam placebo. Atualmente, seu uso é restrito a pessoas que já tiveram dengue, e a vacina não é oferecida em regiões onde a dengue não é endêmica (ANGELIN *et al*., 2023).

A Qdenga, autorizada no Brasil em 2023, é uma vacina inovadora baseada no DENV-2 e enriquecida com proteínas de superfície dos DENVs-1/3/4. Essa formulação é projetada para desencadear uma resposta imune completa, tanto humoral quanto celular. Pessoas que já

tiveram dengue tendem a desenvolver níveis mais altos de anticorpos neutralizantes após a vacinação com Qdenga, mantendo-se protegidas por vários anos. No entanto, ainda falta um indicador claro de proteção imunológica conferida pela vacina, pois os estudos não determinaram um nível específico de anticorpos que garantam imunidade (ANGELIN *et al*., 2023).

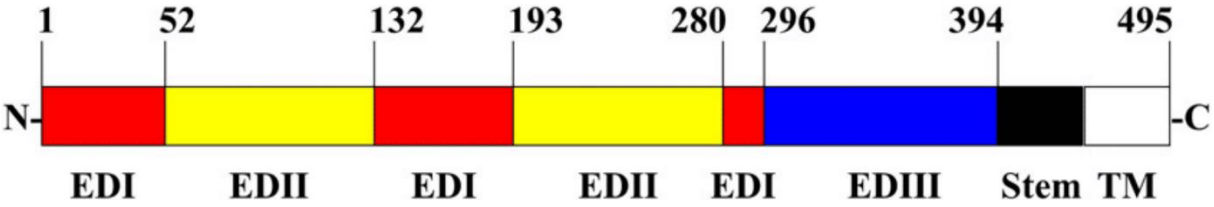
A Qdenga é administrada através de duas injeções subcutâneas, espaçadas por um intervalo de três meses. Geralmente bem tolerada, a vacina mostrou 80% de eficácia contra a dengue confirmada em laboratório e 95% na prevenção de casos graves após um ano da vacinação. A proteção foi particularmente elevada contra o DENV-2, atingindo 98%, enquanto, contra o DENV-3, a eficácia foi de 63% (ANGELIN *et al.,* 2023).

1.11. Proteínas de Fusão Virais de Classe II

As proteínas de fusão virais de classe II, cujos principais exemplos são aquelas encontradas em arbovírus das famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae*, diferentemente das outras duas classes existentes (I e III), exibem uma estrutura predominantemente composta por folhas-beta e apresentam um *loop* de fusão altamente curvado no domínio central, alinhando-se de maneira paralela ou quase paralela ao envelope viral. Notavelmente, essas proteínas não sofrem clivagem proteolítica e não formam super-hélices (*coiled coils*), destacando-se, também, por várias outras características funcionais distintivas (LOZADA *et al*., 2021).

Ainda com relação aos aspectos estruturais, essas proteínas apresentam, em sua porção externa, três domínios característicos, que se dispõem de maneira descontinuada na extensão da cadeia polipeptídica: um barril-beta (EDI), uma região alongada composta principalmente por folhas-beta que abriga o *loop* de fusão (EDII) e um módulo semelhante ao domínio constante de imunoglobulina (IgC) (EDIII) (LEAL; CARVALHO, 2023) (Figura 2).

Figura 4 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína E do DENV, assinalando as posições dos três domínios da porção externa (EDI, EDII e EDIII), da região de haste (*stem*) e da porção transmembranar (TM).



Fonte: Adaptado de Anasir; Ramanathan; Poh, 2020.

O *loop* de fusão, composto principalmente por resíduos apolares e conservados, desempenha um papel crucial no ciclo de infecção ao se inserir em membranas durante o processo de entrada viral na célula. Sua natureza delicada implica que mesmo pequenas

alterações nessa região podem acarretar significativas repercussões no desempenho funcional da proteína durante a reação de fusão de membranas (Lozada, 2021). Durante a fusão, os domínios da proteína E do DENV sofrem rotação e deslocamento, especialmente o EDIII, que se dobra em direção a EDI/EDII em um ângulo de 70° (THOMAS *et al*., 2020).

Alterações específicas na proteína E do DENV, especialmente no resíduo 390 do EDIII, têm sido associadas a diferenças na virulência entre genótipos do vírus. A presença de asparagina nessa posição da cadeia polipeptídica está ligada a cepas virais que tipicamente culminam em dengue hemorrágica, enquanto a presença de ácido aspártico nessa mesma posição está associada a cepas que resultam apenas na forma clássica da doença. Variações desse tipo na sequência aminoacídica da proteína E podem influenciar a eficiência com que diferentes genótipos do DENV se replicam e são transmitidos, destacando a importância do reconhecimento dessas alterações nos sorotipos virais em circulação (NATALI; BABRAK; MIHO, 2021).

1.12. Desenvolvimento da Bioinformática

A bioinformática teve seus primórdios na década de 1960, com Margaret Dayhoff desempenhando um papel crucial. Ela desenvolveu o pioneiro programa de bioinformática, o *software* COMPROTEIN, destinado a montar sequências de proteínas a partir de dados de peptídeos obtidos pelo método Edman. A ferramenta visava lidar com proteínas de maior porte, uma vez que o método de Edman apresentava limitações quanto ao número de aminoácidos sequenciados em uma única reação (50-60 aminoácidos) (GAUTHIER *et al*., 2019).

A contribuição pioneira da pesquisadora envolveu a introdução de uma notação de única letra para representar aminoácidos, promovendo uma simplificação essencial no processamento de dados. A análise destacou desafios conceituais e computacionais, enfatizando a avaliação de substituições em sequências de proteínas. Esse contexto culminou no desenvolvimento do primeiro modelo probabilístico de substituições de aminoácidos em 1978, enquanto outros avanços na biologia molecular solidificavam o ácido desoxirribonucleico (DNA) como a principal fonte de informação biológica (GAUTHIER *et al*., 2019).

Na década de 1990, o “Projeto Genoma Humano” impulsionou o campo da bioinformática, destacando a importância da computação na análise genômica. A Sociedade Alemã de Ciência da Computação formou um grupo de trabalho e organizou a primeira conferência nacional sobre bioinformática em 1993, que, posteriormente, tornou-se internacional, em 1996. Nesse período, a internet se popularizou, bancos de dados moleculares surgiram e métodos de integração de dados foram desenvolvidos (CHEN; HOFESTÄDT; TAUBERT, 2019).

Em 2004, a conferência *Integrative Bioinformatics* resultou na criação do periódico online *Journal of Integrative Bioinformatics* (JIB), publicado pela editora De Gruyter a partir de 2017, e na formação da Conferência Anual de Bioinformática Integrativa. Projetos de integração de dados do usuário foram iniciados, mas falhas levaram ao desenvolvimento de novos métodos de armazenamento, incluindo bancos de dados federados, *data warehouses* e mineração de texto (CHEN; HOFESTÄDT; TAUBERT, 2019).

Com grandes avanços nos últimos anos, a bioinformática estrutural de proteínas vem alcançando destaque notável ao combinar conhecimentos da química, física, biologia e ciência da computação para analisar e interpretar dados relacionados à estrutura tridimensional dessas macromoléculas, favorecendo a compreensão dos processos biológicos nos quais elas estão envolvidas e a identificação de sítios apropriados ao desenvolvimento de potenciais ligantes, dentre outras possibilidades (PAIVA *et al*., 2022).

Atualmente, as maiores tendências no uso da bioinformática são a utilização de *big data* clínico para análise de tendências genéticas, a aplicação da farmacogenômica nos cuidados clínicos de rotina e a exploração de abordagens ômicas para a descoberta e reaproveitamento de medicamentos (TENENBAUM, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

• Avaliar comparativamente as propriedades bioquímicas e imunológicas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

2.2. Específicos

• Reconhecer as principais substituições aminoacídicas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV;

• Determinar o peso molecular, a carga líquida, o ponto isoelétrico e as polaridades residuais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV;

• Verificar o conteúdo de estruturas secundárias e a sua localização na cadeia polipeptídica da proteína E dos quatro sorotipos do DENV;

• Identificar os potenciais sítios de modificações pós-traducionais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV;

• Analisar a antigenicidade com base na hidrofilicidade, acessibilidade e flexibilidade da proteína E dos quatro sorotipos do DENV;

• Predizer a afinidade de interação com alelos dos antígenos leucocitários humanos de classes I e II (HLAs-I/II) de peptídeos derivados da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de Estudo e Aspectos Éticos

Trata-se de um estudo descritivo *in silico* com abordagem quali-quantitativa, baseado em ferramentas de bioinformática de acesso aberto e previamente validadas. Por utilizar essencialmente bancos de dados de domínio público, cujas informações são agregadas, sem possibilidade de identificação individual, o protocolo proposto dispensa apreciação por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Entretanto, em atendimento ao previsto na Lei 13.123/2015 e seus regulamentos, esta pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AC4C6ED.

3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Como critérios de inclusão, foram consideradas as estruturas primárias da proteína E derivadas das sequências de referência (RefSeq) do genoma dos quatro sorotipos do DENV (DENV-1: NC_001477.1; DENV-2: NC_001474.2; DENV-3: NC_001475.2; DENV-4: NC_002640.1). Quanto aos critérios de exclusão, foram desconsideradas quaisquer sequências aminoacídicas incompletas e/ou contendo imprecisões na identidade de resíduos.

3.3. Coleta e Análise de Dados

3.3.1. Obtenção das Sequências Aminoacídicas da Proteína E do DENV

As sequências aminoacídicas da proteína E dos quatro sorotipos de DENV foram obtidas a partir dos respectivos segmentos nucleotídicos codificantes disponíveis no GenBank (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) por tradução conceitual com base no código genético degenerado universal e salvas no formato FASTA, utilizando a representação convencional de uma única letra para cada aminoácido.

3.3.2. Alinhamento das Sequências Aminoacídicas da Proteína E do DENV

Através da ferramenta Clustal Omega (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), foi realizado o alinhamento de sequências aminoacídicas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV de modo a identificar regiões conservadas e variáveis e estabelecer a matriz de identidade percentual (MADEIRA *et al*., 2024).

3.3.3. Determinação do Peso Molecular, Carga Líquida, Ponto Isoelétrico e Polaridades Residuais da Proteína E do DENV

As sequências aminoacídicas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV foram submetidas à análise no recurso PEPSTATS da plataforma EMBOSS (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/seqstats/emboss_pepstats/>) para determinação do seu

peso molecular, carga líquida, ponto isoelétrico e polaridades residuais. O peso molecular compreende a soma das massas atômicas na molécula; a carga líquida corresponde à carga elétrica resultante da substância, que pode ser positiva, negativa ou neutra; o ponto isoelétrico corresponde ao valor de potencial hidrogeniônico (pH) em que uma proteína apresenta carga líquida nula; já as polaridades residuais se referem ao momento dipolar resultante das cadeias laterais dos aminoácidos que compõem a proteína em questão. Os dados de peso molecular, carga líquida e ponto isoelétrico foram expressos em forma de tabelas, enquanto os dados de polaridades residuais foram apresentados como gráficos de setores, considerando as diferentes propriedades físico-químicas dos aminoácidos (apolar, polar neutro, polar ácido e polar básico) (MADEIRA *et al*., 2024).

3.3.4. Verificação das Estruturas Secundárias da Proteína E do DENV

O recurso PREDATOR da plataforma NPS@ (disponível em <https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_predator.html>) foi empregado para prever os diferentes tipos de estrutura secundária, incluindo alfas-hélices, folhas-beta e regiões intrinsecamente não estruturadas (bobinas aleatórias, do inglês *random coils*), e sua localização na cadeia polipeptídica da proteína E dos quatro sorotipos do DENV. Esta abordagem utiliza códigos de cores sobrepostos em estruturas primárias de proteínas para indicar a localização de tais estruturas secundárias e sua quantidade relativa nessas macromoléculas.

3.3.5. Identificação de Potenciais Sítios de Modificações Pós-Traducionais na Proteína E do DENV

Para a identificação de potenciais sítios de modificações pós-traducionais na proteína E dos quatro sorotipos do DENV, foi utilizado o recurso PROSCAN da plataforma NPS@ (disponível em <https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_proscan.html>). Esse algoritmo analisa a sequência aminoacídica e reconhece padrões de consenso para modificações pós-traducionais, bem como a sua classificação (glicosilações, miristoilações e fosforilações, dentre outras). Tais modificações são capazes de influenciar as propriedades de uma proteína recém-formada, podendo ser essenciais para sua função biológica. Esses dados foram exibidos na forma de gráficos de radar, mostrando os tipos e as quantidades de modificações pós-traducionais potencialmente presentes na proteína.

3.3.6. Análise da Antigenicidade por Hidrofilicidade, Acessibilidade e Flexibilidade da Proteína E do DENV

A antigenicidade da proteína E dos quatro sorotipos do DENV foi analisada através do recurso PCPROF da plataforma NPS@ (disponível em <http://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_pcprof.html>), que avalia a hidrofilicidade, acessibilidade e

flexibilidade de segmentos da cadeia polipeptídica para calcular a antigenicidade. A hidrofilicidade representa a capacidade de estruturas polares interagirem com uma solução aquosa, a acessibilidade consiste na capacidade de uma molécula estar acessível ao solvente para realizar interações químicas e a flexibilidade compreende a habilidade das moléculas de executar ajustes conformacionais no espaço. Os dados coletados foram representados sob a forma de gráficos de linhas, evidenciando valores individuais para cada agrupamento de aminoácidos da proteína.

3.3.7. Predição da Afinidade de Interação com Alelos dos HLAs-I/II de Peptídeos Derivados da Proteína E do DENV

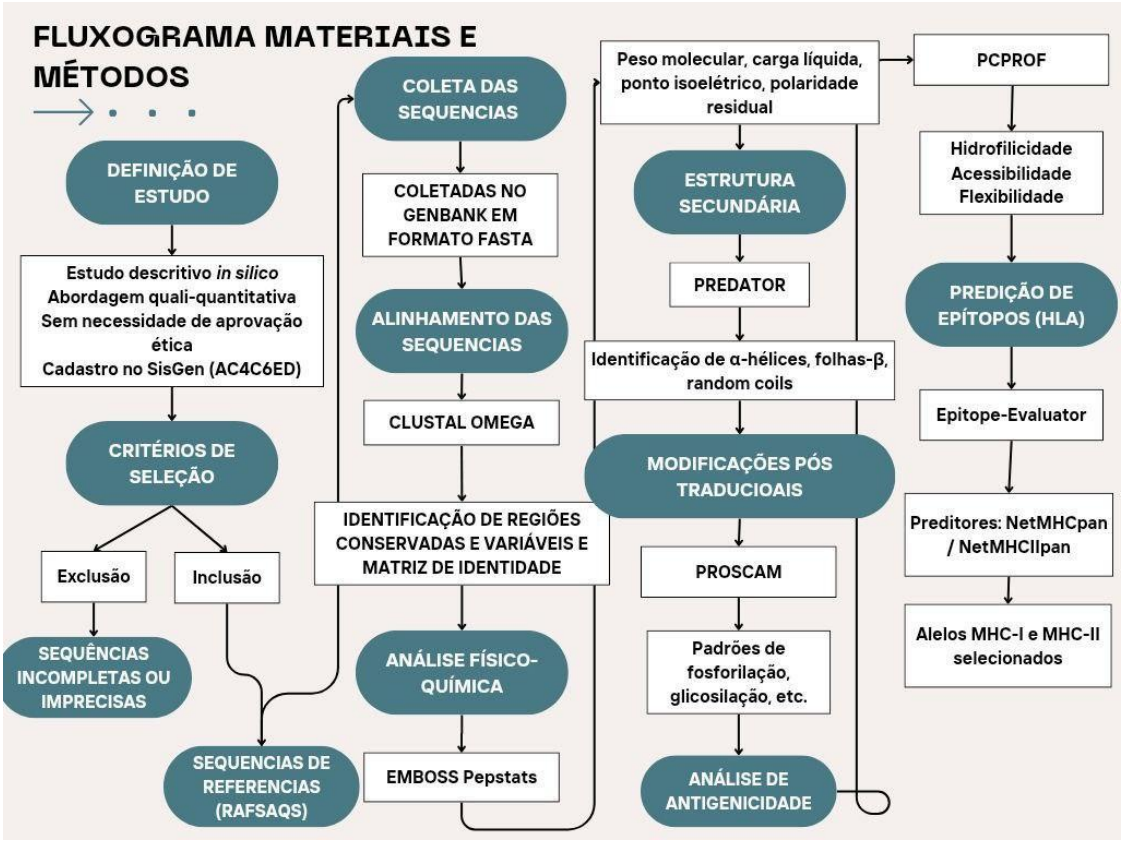
Para a análise dos epítopos de células T, utilizou-se o Epitope-Evaluator (disponível em: <https://fuxmanlab.shinyapps.io/Epitope-Evaluator/>), um *web server* interativo desenvolvido para avaliar epítopos preditos com base em modelos de ligação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (SOTO; REQUENA; BASS, 2022). A ferramenta permite analisar a afinidade de peptídeos para MHC de classe I e II, auxiliando na identificação de alvos imunogênicos. Foram empregados os preditores NetMHCpan para MHC-I e NetMHCIIpan para MHC-II, ranqueando os epítopos de acordo com a afinidade relativa ao MHC.

Para o MHC-I humano, foram utilizados os seguintes alelos representativos: HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*27:05, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01 e HLA-B*58:01. A análise da afinidade de interação foi conduzida para peptídeos de 9 aminoácidos, utilizando o percentil 2 como limiar de corte, de modo a garantir a escolha dos peptídeos com maior afinidade potencial de ligação aos alelos de HLA-I.

Quanto ao MHC-II humano, os seguintes alelos representativos foram selecionados: HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB4*01:01 e HLA-DRB5*01:01. A escolha desses alelos foi baseada em um estudo prévio que demonstrou que um conjunto de sete alelos DRB1 e DRB3/4/5 é suficiente para capturar aproximadamente 50% da resposta imune (PAUL *et al.,* 2015). A análise da afinidade de interação foi realizada considerando peptídeos de 15 aminoácidos, utilizando o percentil 5 como limiar de corte, garantindo a inclusão dos peptídeos com maior afinidade potencial de ligação aos alelos de HLA-II.

As etapas metodológicas estão descritas a seguir de forma detalhada, com base na ordem cronológica da análise *in silico* conduzida. Para facilitar a visualização do processo, apresenta-se um fluxograma esquemático das principais etapas deste estudo (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma representativo das etapas metodológicas do estudo.



Fonte: Própria autora.

4. RESULTADOS

4. 1 Alinhamento das Sequências Aminoacídicas da Proteína E do DENV

O alinhamento das sequências aminoacídicas dos quatro sorotipos do DENV evidenciou um percentual de identidade que variou de 63,08% (entre DENVs-3/4) a 77,69% (entre DENVs-1/3). A maior parte das 233 discordâncias aminoacídicas encontradas entre as cadeias polipeptídicas correspondeu a substituições com caráter conservativo quanto às propriedades residuais (45,49%); substituições semiconservativas e não conservativas representaram 15,02% e 38,63%, respectivamente, ao passo que inserções/deleções compuseram 0,86% de tais discordâncias (Figura 3).

Figura 6 – Matriz de identidade percentual e alinhamento múltiplo da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.



Legenda: Alinhamento das sequências, dentro do círculo vermelho estão as duas regiões de deleção, ambas encontradas no DENV-3. Fonte: Própria autora.

4.2 Determinação do Peso Molecular, Carga Líquida, Ponto Isoelétrico e Polaridades Residuais da Proteína E do DENV

Enquanto o peso molecular (53,68 kDa no DENV-3 a 54,44 kDa no DENV-2) e o ponto isoelétrico (7,01 no DENV-3 a 7,89 no DENV-1) da proteína E apresentaram pequenas variações entre os diferentes sorotipos de DENV, a carga líquida dessa macromolécula foi

notavelmente menor no DENV-3 (3,50) em relação aos demais sorotipos (8,00 nos DENVs-1/2 a 8,50 no DENV-4) (Tabela 1).

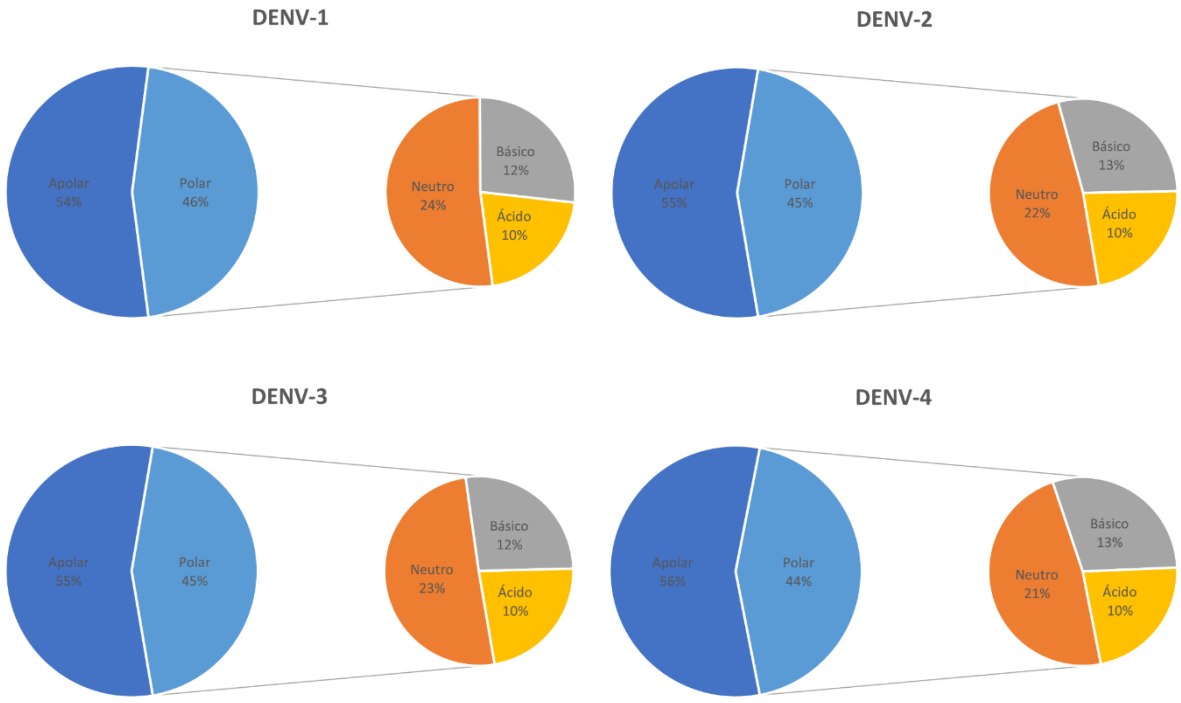
Tabela 1 – Peso molecular, carga líquida e ponto isoelétrico da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

	Peso Molecular (kDa)	Carga Líquida	Ponto Isoelétrico
DENV-1	53,85	8,00	7,89
DENV-2	54,44	8,00	7,77
DENV-3	53,68	3,50	7,01
DENV-4	53,99	8,50	7,75

Fonte: Própria autora.

Para todos os sorotipos do vírus, a proteína E apresentou maior quantidade de resíduos apolares (54-56%); dentre os resíduos polares (44-46%), observou-se uma ligeira predominância de neutros sobre carregados (básicos e ácidos) nos DENVs-1/3 (23-24% vs. 22%, respectivamente) e o inverso nos DENVs-2/4 (21-22% vs. 23%, respectivamente) (Figura 4).

Figura 4 – Polaridades residuais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

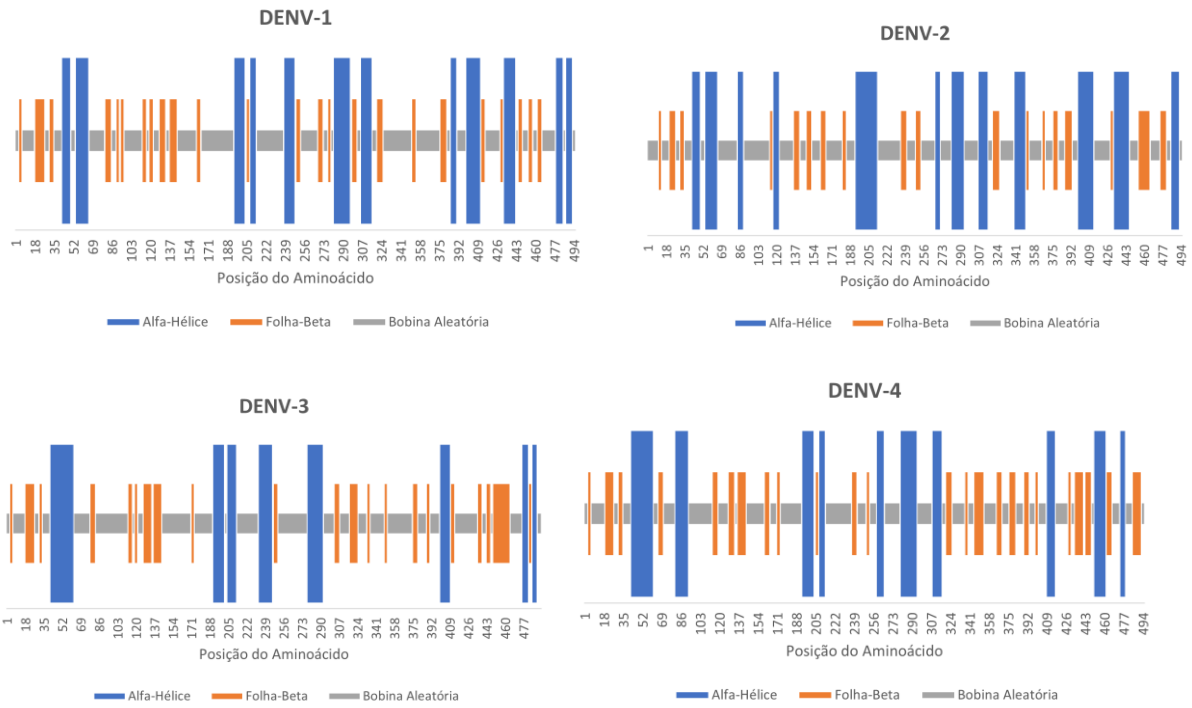


Fonte: Própria autora.

4.3 Verificação das Estruturas Secundárias da Proteína E do DENV

Apesar da ocorrência de enovelamento randômico ter sido predita em 53,74-59,63% da estrutura da proteína E para os quatro sorotipos do vírus, os DENVs-1/2 apresentaram maior teor predito de alfa-hélices do que de folhas-beta (23,03% vs. 21,82% e 25,86% vs. 18,59%, respectivamente), enquanto o contrário foi observado nos DENVs-3/4 (18,46% vs. 21,91% e 21,01% vs. 25,25%, respectivamente) (Figura 5).

Figura 8 – Estruturas secundárias preditas da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

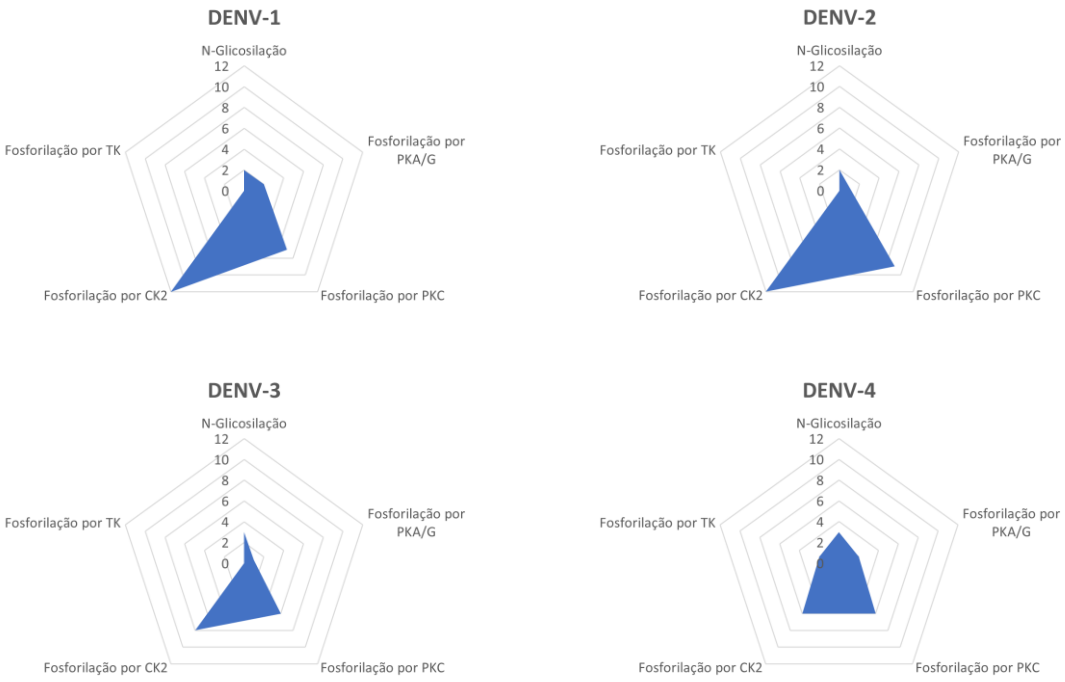


Fonte: Própria autora.

4.4 Identificação de Potenciais Sítios de Modificações Pós-Traducionais na Proteína E do DENV

Quanto ao potencial de modificações pós-traducionais, a maior parte dos padrões de consenso presentes na proteína E dos quatro sorotipos do vírus correspondeu a fosforilação por caseína-cinase II (CK2) (6-12 sítios); ainda que em pequena quantidade, apenas na proteína E do DENV-4 foram observados padrões de consenso para fosforilação por tirosina-cinase (TK) (2 sítios). Outras modificações pós-traducionais preditas incluíram N-glicosilação (2-3 sítios), fosforilação por proteína-cinase dependente de cAMP e cGMP (PKA/G, 1-2 sítios) e fosforilação por proteína-cinase C (PKC, 6-9 sítios) (Figura 6).

Figura 6 – Potenciais modificações pós-traducionais da proteína E dos quatro sorotipos do DENV.

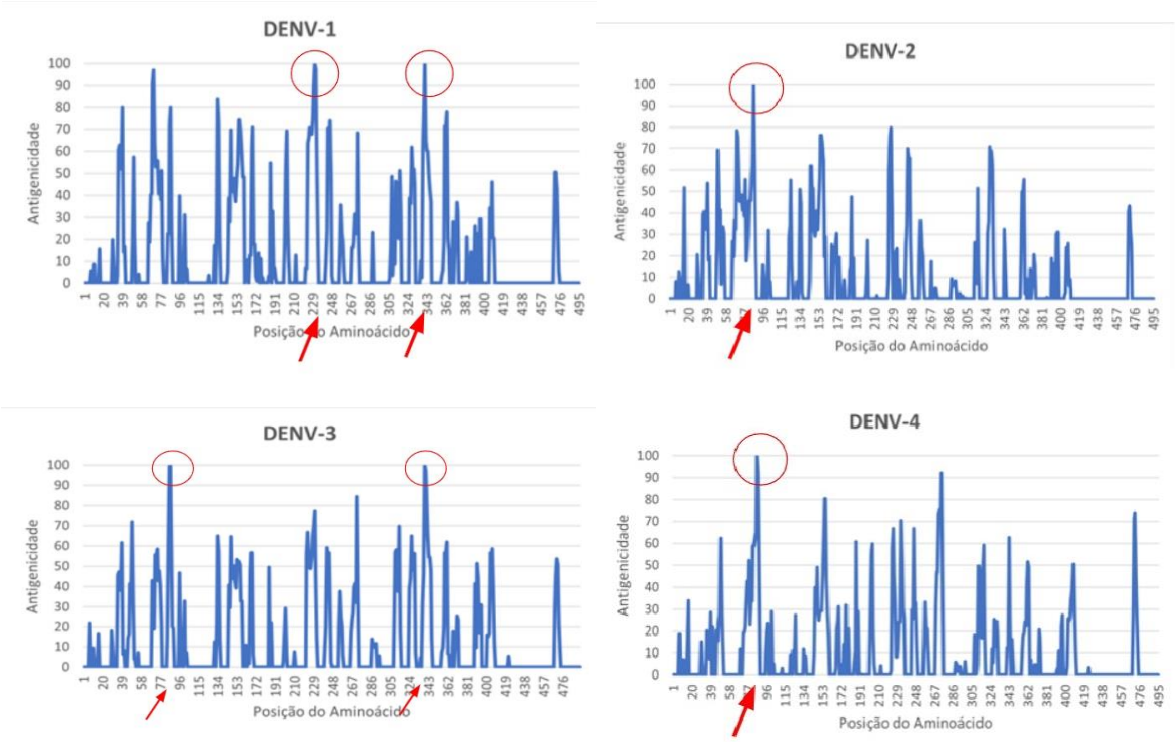


Fonte: Própria autora.

4.5 Análise da Antigenicidade por Hidrofilicidade, Acessibilidade e Flexibilidade da Proteína E do DENV

A convolução dos parâmetros de hidrofilicidade, acessibilidade e flexibilidade dos resíduos resultou em uma maior propensão antigênica na metade N-terminal da proteína E dos quatro sorotipos do vírus, ainda que um perfil característico tenha sido observado para os DENVs-1/3 e outro para os DENVs-2/4. Os aminoácidos W231/D341 no DENV-1, Q86 nos DENVs-2/4 e D87/D339 no DENV-3 apresentaram escores de antigenicidade máximos no reconhecimento por células B (Figura 7).

Figura 10 – Variações de antigenicidade ao longo da proteína E nos diferentes sorotipos.

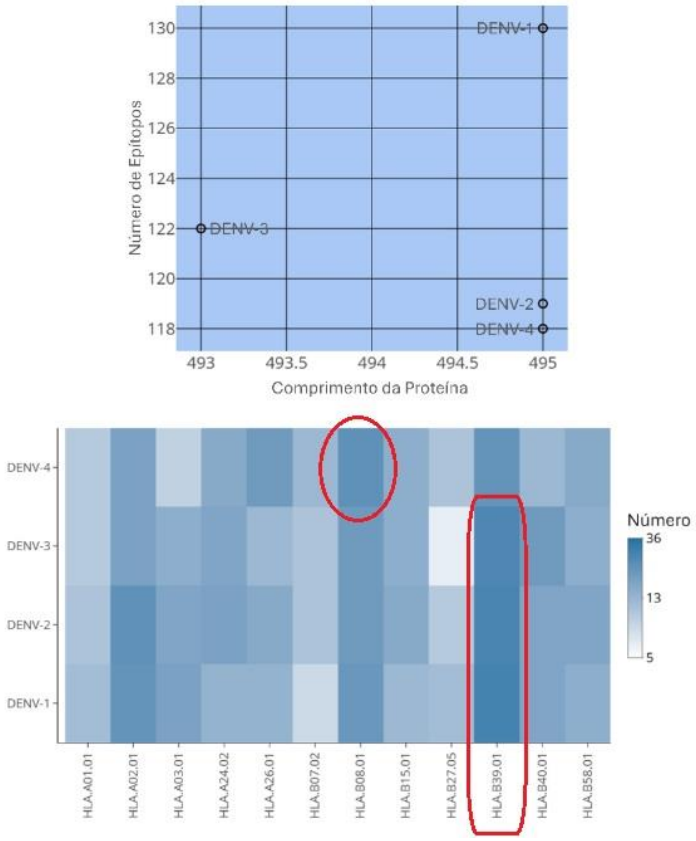


Fonte: Própria autora.

4.6 Predição da Afinidade de Interação de Peptídeos Derivados da Proteína E do DENV com Alelos de HLAs-I/II

No que diz respeito aos alelos de HLA-I, DENV-1 apresentou o maior número de epítopos (130), ao passo que DENV-4 o menor número (118), ficando DENV-2 e DENV-3 com números intermediários (119 e 122 epítopos, respectivamente). HLA-B*39:01 foi o alelo com o maior número de epítopos preditos para DENV-1 (29 epítopos), DENV-2 (28 epítopos) e DENV-3 (27 epítopos), sendo tal posto ocupado pelo alelo HLA-B*08:01 para DENV-4 (23 epítopos) (Figura 8).

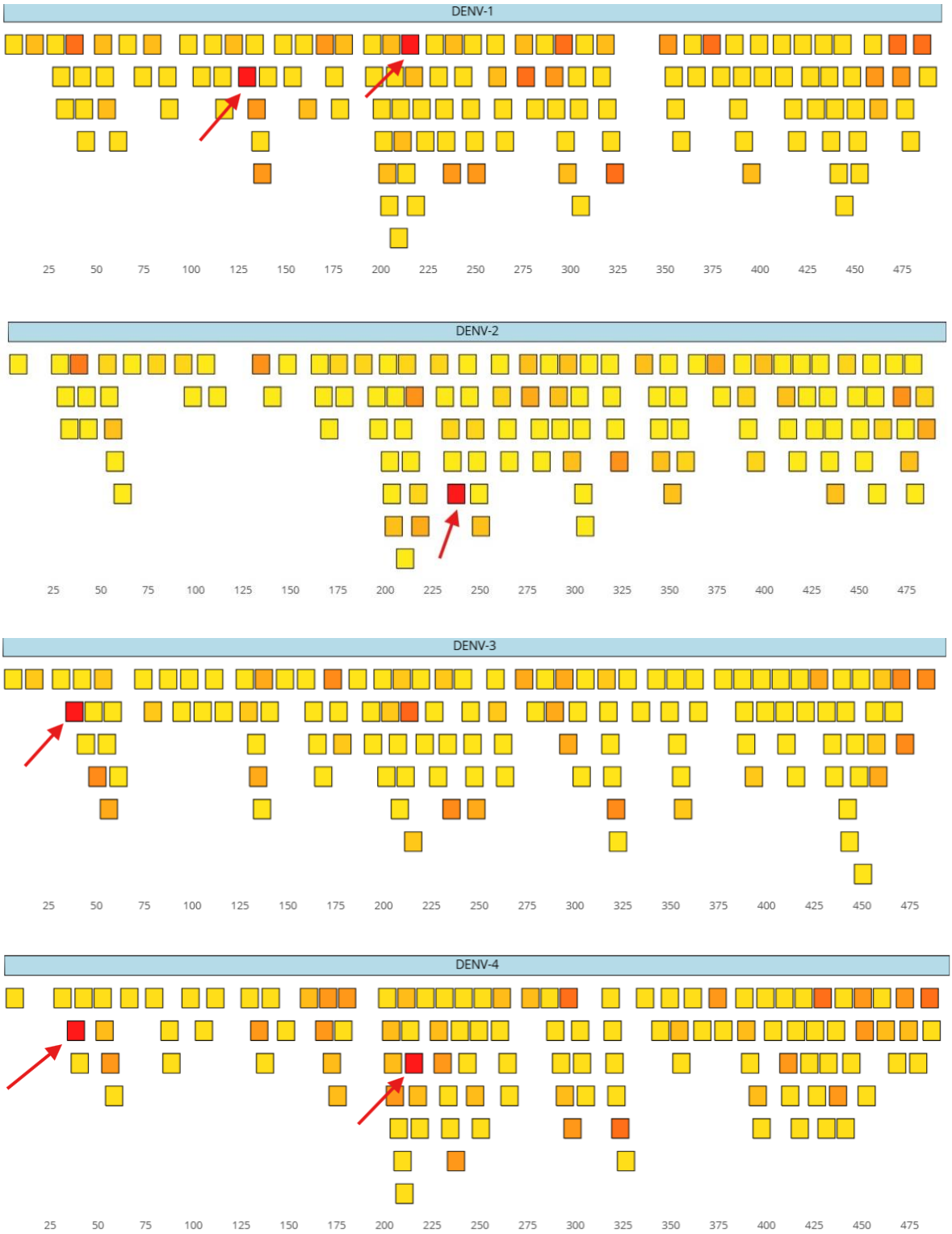
Figura 11 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I.



Legenda: À esquerda, correlação entre número de epítopos e comprimento da proteína E. À esquerda , correlação entre número de epítopos e alelo de HLA-I para cada sorotipo de DENV. Círculos em vermelho ressaltam os alelos mais promíscuos em cada sorotipo. Fonte: Própria autora.

Ainda com relação aos alelos de HLA-I, observou-se que os epítopos com elevada afinidade por múltiplos deles se localizaram, com frequência, em regiões divergentes da proteína E de cada sorotipo de DENV (Figura 9). Para o DENV-1, os epítopos KLEGKIVQY (125-134) e KQWFLDLPL (211-220) foram capazes de se ligar a 5 alelos (HLA-A*01:01/HLA-A*03:01/HLA-A*26:01/HLA-B*15:01/HLA-B*58:01 e HLA-A*02:01/HLA-B*15:01/HLA-B*27:05/HLA-B*39:01/HLA-B*40:01, respectivamente). Para o DENV-2, o epítopo IQKETLVTF (233-242) foi capaz de se ligar a 8 alelos (HLA-A*24:02/HLA-A*26:01/HLA-B*08:01/HLA-B*15:01/HLA-B*27:05/HLA-B*39:01/HLA-B*40:01/HLA-B*58:01). Para o DENV-3, o epítopo TMAKNKPTL (34-43) foi capaz de se ligar a 6 alelos (HLA-A*02:01/HLA-A*24:02/HLA-B*07:02/HLA-B*08:01/HLA-B*15:01/HLA-B*39:01). Para o DENV-4, os epítopos TMAQGKPTL (34-43) e KQWFLDLPL (211-220) foram capazes de se ligar a 5 alelos (HLA-A*02:01/HLA-B*07:02/HLA-B*08:01/HLA-B*15:01/HLA-B*39:01 e HLA-A*02:01/HLA-B*15:01/HLA-B*27:05/HLA-B*39:01/HLA-B*40:01, respectivamente).

Figura 12 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-I.

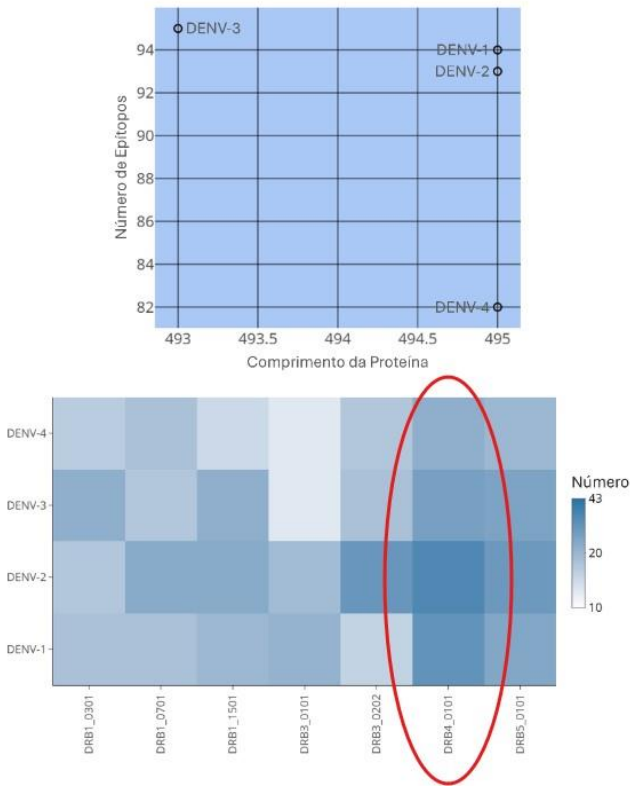


Legenda: A proteína E de cada sorotipo de DENV é exibida como uma barra azul clara, enquanto os epítopos são representados em um gradiente de cores de amarelo a vermelho, indicando o número de alelos de HLA-I aos quais cada epítopo pode se ligar. Regiões em vermelho, ressaltadas pelas setas vermelhas, indicam epítopos promíscuos, reconhecidos por um maior número de alelos. Abaixo de cada painel, a posição dos aminoácidos na cadeia polipeptídica é informada. Fonte: Própria autora.

No que diz respeito aos alelos de HLA-II, DENV-3 apresentou o maior número de epítopos (95), ao passo que DENV-4 o menor número (82), ficando DENV-1 e DENV-2 com

números intermediários (94 e 93 epítopos, respectivamente). HLA-DRB4*01:01 foi o alelo com o maior número de epítopos preditos para DENV-1 (30 epítopos), DENV-2 (34 epítopos), DENV-3 (26 epítopos) e DENV-4 (22 epítopos) (Figura 10).

Figura 13 – Número de Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II.

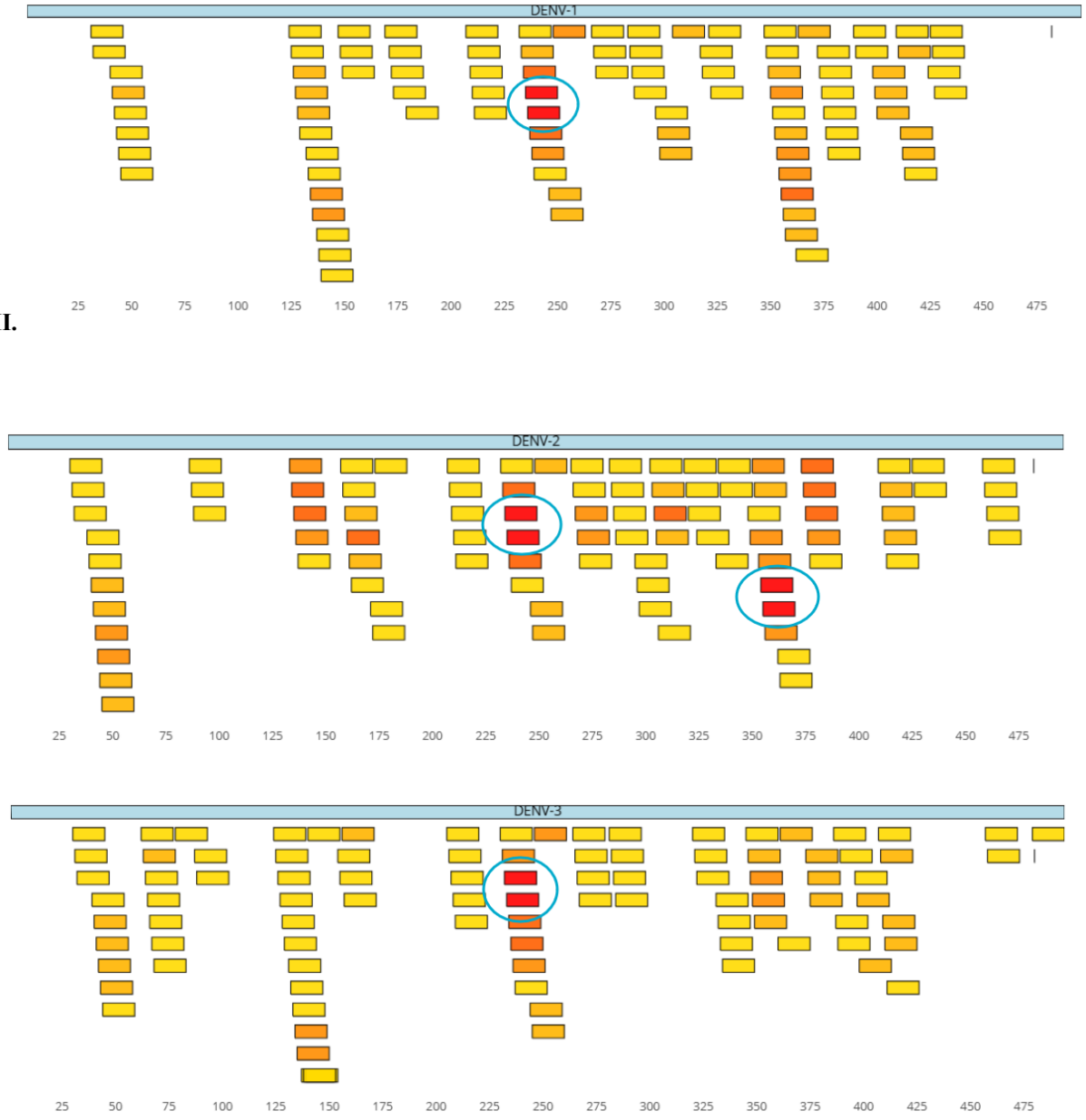


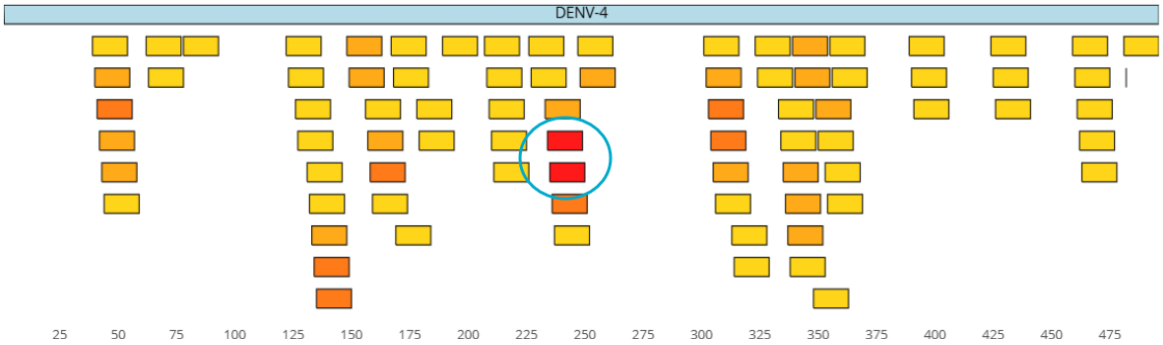
Legenda: À esquerda, correlação entre número de epítopos e comprimento da proteína E. esquerda, correlação entre número de epítopos e alelo de HLA-II para cada sorotipo de DENV, círculo vermelho apontando a região o alelo de maior promiscuidade entre os epitopos. Fonte: Própria autora.

Ainda com relação aos alelos de HLA-II, observou-se que os epítopos com elevada afinidade por múltiplos deles se localizaram, com frequência, em regiões equivalentes da proteína E de cada sorotipo de DENV (Figura 11). Para o DENV-1, os epítopos QDLLVTFKTAHAKKQ (235-250) e DLLVTFKTAHAKKQE (236-251) foram capazes de se ligar a 5 alelos (HLA-DRB1*07:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01/HLA-DRB5*01:01 para ambos). Para o DENV-2, os epítopos QKETLVTFKNPHAKK (234-249), KETLVTFKNPHAKKQ (235-250), TVNPIVTEKDSPVNI (354-369) e VNPIVTEKDSPVNIE (355-370) foram capazes de se ligar a 5 alelos (HLA-DRB1*07:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01/HLA-DRB5*01:01 para os dois primeiros e HLA-DRB1*03:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*01:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01 para os dois últimos). Para o DENV-3, os epítopos RKELLVTFKNAHAKK (232-247) e

KELLVTFKNAHAKKQ (233-248) foram capazes de se ligar a 5 alelos (HLA-DRB1*03:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01/HLA-DRB5*01:01 para o primeiro e HLA-DRB1*07:01/HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01/HLA-DRB5*01:01 para o último). Para o DENV-4, os epítopos YKERMVTFKVPHAKR (234-249) e KERMVTFKVPHAKRQ (235-250) foram capazes de se ligar a 4 alelos (HLA-DRB1*15:01/HLA-DRB3*02:02/HLA-DRB4*01:01/HLA-DRB5*01:01 para ambos).

Figura 14 – Localização dos Epítopos Preditos na Proteína E dos Quatro Sorotipos de DENV para HLA-II.





Legenda: A proteína E de cada sorotipo de DENV é exibida como uma barra azul clara, enquanto os epítopos são representados em um gradiente de cores de amarelo a vermelho, indicando o número de alelos de HLA-II aos quais cada epítopo pode se ligar. Regiões em vermelho, ressaltadas pelos círculos azuis, indicam epítopos promíscuos, reconhecidos por um maior número de alelos. Abaixo de cada painel, a posição dos aminoácidos na cadeia polipeptídica é informada. Fonte: Própria autora.

5. DISCUSSÃO

Dentre as proteínas estruturais do DENV, a proteína E é um dos principais alvos da resposta imune e desempenha um papel central na entrada viral, fusão de membranas e reconhecimento por anticorpos neutralizantes (FAHIMI *et al.,* 2018). Estudos indicam que a proteína E apresenta variações entre os sorotipos, o que pode impactar sua antigenicidade, imunogenicidade, estabilidade estrutural e nas suas interações com o sistema imune do hospedeiro (WATANABE *et al.,* 2019; YAP *et al.,* 2017).

Os percentuais de identidade das sequências aminoacídicas dos sorotipos do DENV variaram de 63,08% a 77,69%, com predominância de substituições conservativas (45,49%), seguidas de não conservativas (38,63%) e semiconservativas (15,02%). As substituições conservativas sugerem a manutenção de funções essenciais das proteínas, enquanto as não conservativas, embora em menor número, podem impactar a conformação proteica e a antigenicidade, influenciando as respostas imunológicas entre os sorotipos. Inserções e deleções foram raras (0,86%) e podem refletir eventos pontuais. Essas variações são particularmente relevantes, pois podem influenciar a resposta imunológica dos hospedeiros, contribuindo para diferenças na virulência e imunogenicidade dos sorotipos do DENV. Estudos também discutem a influência da variabilidade dos sorotipos na resposta imune, reforçando a importância dessas mudanças para o desenvolvimento de vacinas e terapias direcionadas (CASSETTI *et al.,* 2010; HALSTEAD, 2007).

A proteína E dos quatro sorotipos de DENV apresentou predominância de resíduos apolares (54-56%), com os resíduos polares representando 44-46%. Entre os resíduos polares, houve uma ligeira predominância de neutros sobre carregados nos sorotipos ímpares e o inverso nos sorotipos pares. Esses padrões refletem características estruturais que podem influenciar funções críticas, como a fusão de membranas, atribuída aos resíduos apolares, e possíveis variações na interação com o sistema imune devido às diferenças nos resíduos polares (ALI *et al*., 2017).

Quanto ao conteúdo de estruturas secundárias, os DENVs-1/2 apresentaram maior teor predito de alfa-hélices do que de folhas-beta. Esse padrão difere ligeiramente do que é comumente descrito na literatura, que indica que as proteínas da classe II geralmente têm uma maior proporção de folhas-beta em sua composição (KIELIAN, 2006). Em contraste, a maior quantidade de folhas-beta nos DENVs-3 e 4 pode indicar uma configuração estrutural que pode ser mais estável por conta das ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas que são encontradas em maior quantidade nessas estruturas secundárias (JACOBSEN *et al*., 2023).

A carga líquida de uma proteína, determinada pelo balanço entre resíduos positivos e negativos em certo pH, influencia diretamente sua interação eletrostática com a membrana celular, que é rica em lipídios aniónicos como a fosfatidilserina. Essas interações de longo alcance orientam e estabilizam proteínas na interface membranar e podem até induzir reorganização lateral de componentes da membrana. A eficiência dessa associação depende da magnitude e distribuição da carga, podendo superar barreiras energéticas como a dessolvatação (MULGREW-NESBITT *et al.*,2006)

A análise da carga líquida das proteínas E dos sorotipos do DENV revelou que, embora todas apresentem carga positiva em pH neutro, o DENV-3 possui uma carga significativamente menor (3,5) em comparação ao DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (entre 8,0 e 8,5). Segundo estudos estruturais de proteínas periféricas de membrana, cargas positivas mais elevadas favorecem a associação com superfícies de membranas aniónicas, como as celulares (ZHOU; PANG, 2018). Assim, a menor carga do DENV-3 pode resultar em uma interação menos eficiente ou menos persistente com a membrana, impactando a taxa de fusão viral ou o reconhecimento por receptores. Essa diferença pode estar relacionada a variações na infectividade, tropismo ou resposta imune entre os sorotipos.

A análise das modificações pós-traducionais da proteína E dos quatro sorotipos de DENV, revelou padrões distintos que refletem diferenças estruturais e funcionais entre os eles. A maior frequência de fosforilação por CK2 nos DENVs-1/2 em comparação com os DENVs-3/4 destaca o papel central dessa modificação na biologia viral. A CK2 é amplamente descrita como essencial para a maturação e estabilidade das partículas virais, bem como para a facilitação da interação com a maquinaria celular do hospedeiro (ANWAR *et al*., 2011). Essas diferenças entre os padrões de fosforilação podem sugerir comportamentos diferentes do ciclo viral, e modulação processos como replicação, montagem e infectividade, corroborando o papel das modificações pós-traducionais na adaptação do vírus.

A análise comparativa entre os sorotipos do DENV revela que todos apresentaram glicosilação em N67 e N153, porém DENV-3 e DENV-4 possuem sítios adicionais: N470 e N472, respectivamente. Essas variações podem influenciar a imunogenicidade e a capacidade de evasão do sistema imune, impactando a severidade da infecção. Outro aspecto relevante é a localização do sítio de glicosilação em N470, próximo ao segmento TM. Embora apresente similaridade com padrões de glicosilação conhecidos, sua posição pode restringir a acessibilidade e comprometer sua funcionalidade. Além disso, a ausência da glicosilação de N67 em outros flavivírus, como JEV, WNV, TBE e YFV, sugere que essas modificações

conferem ao DENV características exclusivas relacionadas à evasão imunológica e à patogenicidade (RUHUL AMIN *et al*., 2010).

A glicosilação da proteína E do DENV, especialmente nos sítios N67 e N153, desempenha um papel fundamental na adaptação viral a diferentes hospedeiros. Enquanto a glicosilação em N67 é essencial para a replicação eficiente do DENV-2 em células de mamíferos, facilitando a liberação de novas partículas virais pela via secretora, algumas linhagens desse sorotipo viral, como PUO-218 e NGC, contornam essa dependência por meio de mutações que mantêm resíduos hidrofóbicos. Já a glicosilação em N153, embora menos determinante, contribui para a replicação em células de mosquitos e auxilia o brotamento viral em células de mamíferos (YAP *et al.,* 2017). Além disso, sítios glicosilados desempenham um papel relevante na neutralização viral, pois anticorpos amplamente neutralizantes, como EDE1 e EDE2, reconhecem essas regiões, sendo que a ligação do EDE2 depende diretamente do glicano em N153. Esse achado reforça o potencial dessas estruturas como alvos estratégicos para antivirais e vacinas (WATANABE *et al.,* 2019).

A presença de padrões exclusivos de fosforilação por TK no DENV-4 sugere um mecanismo adaptativo específico desse sorotipo viral, possivelmente relacionado à modulação do ciclo de infecção e à evasão imunológica. Estudos apontam que a TK regula a montagem e replicação de partículas virais em outros flavivírus, como o vírus da hepatite C (HCV), onde desempenha um papel crucial no controle da estabilidade das partículas (YAMAUCHI *et al.,* 2015). Além disso, em patógenos como o vírus Ebola (EBOV) e o vírus Marburg (MARV), a ativação de TK do hospedeiro é essencial para a entrada viral e para a ativação de vias intracelulares necessárias à infecção, destacando o potencial dessa enzima como alvo terapêutico (STEWART *et al*., 2021).

A análise da antigenicidade das sequências proteicas dos quatro sorotipos de DENV revelou padrões distintos de propensão antigênica ao longo da proteína E, com regiões de alta antigenicidade distribuídas de forma não homogênea. Uma das regiões de maior antigenicidade observadas no estudo, situada em torno dos resíduos D341 no DENV-1 e D339 no DENV-3, é consistente com o conhecimento de que o EDIII (296-394), como um local exposto na superfície do vírion, é crucial para o reconhecimento de receptores celulares e a neutralização viral (FAHIMI *et al.,* 2018). Ademais, estudos sugerem que a seleção exclusiva de epítopos altamente neutralizantes, como aqueles localizados em EDIII, pode reduzir significativamente o risco de ADE. Isso ocorre porque anticorpos direcionados a essas regiões tendem a ser altamente específicos e bloqueiam eficazmente a entrada do vírus na célula hospedeira (MORGAN *et al.,* 2024).

Por outro lado, DENV-2 e DENV-4 apresentaram antigenicidade máxima em torno do resíduo Q86 da proteína E, situado no EDII (52-132/193-280). Sabe-se, no entanto, que anticorpos gerados contra epítopos presentes no EDII são amplamente reativos, mas possuem baixa capacidade de neutralização (SARKER; DHAMA; GUPTA, 2023). Desse modo, tais sorotipos de DENV poderiam escapar mais facilmente da resposta imune, tornando necessária a adoção de estratégias específicas para otimizar a imunogenicidade e a eficácia vacinal (AHMED; AKONDY, 2011).

A sobreposição entre epítopos promíscuos para HLA-II e regiões críticas para a neutralização de anticorpos sugere que as respostas imunes mediadas por células T $CD4^+$ e anticorpos neutralizantes podem estar interligadas. O presente estudo demonstrou que os epítopos promíscuos reconhecidos por alelos DRB analisados estão concentrados no EDII e no EDIII. Isso sugere que regiões estruturais desses domínios podem ser alvos ideais para estratégias de imunização, uma vez que ativam respostas T $CD4^+$ amplamente reativas e, possivelmente, favorecem a produção de anticorpos neutralizantes (SMITH; BUGADA; WEN, 2020).

No que diz respeito ao HLA-I, o alelo HLA-A*03:01 está potencialmente envolvido no reconhecimento de epítopos de todos os sorotipos do DENV. Embora haja poucas referências específicas na literatura sobre esse alelo em relação ao DENV, estudos prévios indicam que o HLA-A*03 pode desempenhar um papel protetor contra a dengue, estando associado a uma resposta imune mais eficaz e à eliminação viral. Evidências adicionais sugerem uma associação protetora desse alelo em pacientes com dengue hemorrágica na população malaia, o que reforça sua relevância na imunidade contra o vírus (CULSHAW, 2017; RATHAKRISHNAN *et a*l., 2014).

Além disso, o HLA-A*03 tem sido associado a uma menor gravidade da doença em determinados contextos populacionais. Em pacientes do grupo étnico malaio, por exemplo, sua presença foi correlacionada a um menor risco de formas graves da infecção por vírus dengue. Em outros estudos, esse alelo também demonstrou um efeito protetor contra vírus relacionados, como o vírus da hepatite B (HBV) e o HCV, especialmente em populações caucasianas e irlandesas. Esses achados sugerem que o HLA-A*03 desempenha um papel importante na modulação da resposta imune, cuja influência pode variar conforme o contexto genético e ambiental (APPANNA *et al.*, 2010).

O alelo HLA-A*24 também foi identificado como um dos principais alelos envolvidos no reconhecimento de epítopos do DENV. Diferentemente do HLA-A*03:01, amplamente associado a uma resposta imunológica eficaz, o HLA-A*24 está ligado a uma apresentação

deficiente de peptídeos, o que pode resultar em uma inflamação exacerbada. Essa resposta desregulada, característica de uma imunidade ineficiente, pode contribuir para o agravamento da doença, favorecendo o desenvolvimento de manifestações graves, como a febre hemorrágica da dengue (DHF) e a síndrome do choque da dengue (DSS) (CHEN; HOFESTÄDT; TAUBERT, 2019; COOK; THIBAUT; PETTERSEN, 2022; NGUYEN *et al*., 2008).

Segundo a literatura, o HLA-A*24 está fortemente associado a formas severas da dengue, especialmente em populações asiáticas, com destaque para os vietnamitas. Estudos indicam que esse alelo aumenta a suscetibilidade a DHF e que variantes específicas, como a presença de histidina na posição 70, estão associadas a uma maior afinidade por epítopos, influenciando diretamente a patogênese da doença. Além disso, o HLA-A*24 está relacionado à ativação de células T, promovendo maior produção de IFN-γ e aumento da expressão de CD69 em coculturas com células dendríticas infectadas (ALAGARASU *et al*., 2013; CHOTIYARNWONG *et al.,* 2007; COOK; THIBAUT; PETTERSEN, 2022; CULSHAW, 2017; DUAN *et al.,* 2015; MALININA; PATEL; BROWN, 2017; MANH *et al.,* 2018).

O HLA-A*26 é um alelo relevante ao reconhecimento de todos os sorotipos do DENV e tem sido investigado em estudos relacionados à doença, especialmente por meio de análises de ancoragem proteína-proteína. Essas investigações avaliaram sua capacidade de apresentar epítopos virais preditos, sugerindo que o HLA-A*26:01 possui alta afinidade para a ligação de epítopos, potencialmente estimulando uma resposta robusta de células T. Essa funcionalidade destaca seu papel como um mediador imunológico no reconhecimento de antígenos do DENV (GUPTA; KUMAR, 2022).

Entretanto, análises epidemiológicas indicam que esse alelo não atingiu significância estatística em relação à proteção contra formas graves da doença. O HLA-A*26 foi encontrado em baixa frequência entre pacientes com DSS, sugerindo uma possível associação com menor susceptibilidade à progressão da febre de dengue para formas severas. Essa tendência foi observada em populações do Sri Lanka, onde sua baixa prevalência pode refletir um efeito protetor. No entanto, essa hipótese ainda requer validação por meio de estudos adicionais, considerando limitações como o tamanho amostral reduzido e variações regionais nos perfis genéticos (STEPHENS *et al*., 2002).

Já o alelo HLA-A*01 tem sido consistentemente associado à progressão para formas graves da febre de dengue, como a DHF e a DSS. Em uma população brasileira, indivíduos portadores desse alelo apresentaram um risco três vezes maior de evolução para DHF, uma associação que também foi observada em crianças tailandesas e pacientes cubanos. Esses

achados sugerem um papel relevante do HLA-A*01 na modulação da susceptibilidade às formas graves em diferentes populações (MONTEIRO *et al.,* 2012; WEISKOPF *et al.,* 2016).

Do ponto de vista imunológico, o HLA-A*01:01, pertencente ao supertipo HLA-A*01, está envolvido na apresentação de peptídeos imunogênicos derivados do DENV e na ativação de células T $CD8^+$ específicas. Esse alelo desempenha um papel fundamental na imunidade adaptativa em infecções virais e tem sido investigado em contextos de vacinação, devido à sua capacidade de restringir epítopos imunogênicos (WEISKOPF *et al.,* 2016).

Outrossim, um estudo revelou que o alelo HLA-A*01:01 demonstrou restringir epítopos específicos do vírus Zika (ZIKV), mas não apresentou reatividade cruzada com o DENV-2, indicando que sua função imunológica pode variar conforme o tipo de infecção. Esse achado sugere que a apresentação de epítopos por esse alelo é específica para cada flavivírus, destacando a importância de investigar sua atuação em diferentes contextos virais, como ZIKV e DENV, para uma melhor compreensão da resposta imune contra essas infecções (WEN *et al.,* 2017).

Apesar do seu papel na apresentação de epítopos e ativação da resposta imunológica, a associação do HLA-A*01 com maior susceptibilidade à DHF em diversas populações destaca uma possível dualidade funcional. Esse comportamento pode ser influenciado por fatores genéticos, ambientais e pelo contexto da infecção, como a diferença entre infecções primárias e secundárias. Estudos futuros devem focar em elucidar os mecanismos determinantes dessa susceptibilidade e seu impacto na progressão da doença (MONTEIRO *et al.,* 2012; WEISKOPF *et al*., 2011).

Embora haja poucos registros na literatura, dados epidemiológicos apontam que o HLA-B*40 foi identificado com maior frequência em casos de DHF em comparação com a dengue clássica (DF). Esse achado sugere uma possível relação entre o HLA-B*40 e a gravidade da infecção pelo DENV, indicando que a resposta imune mediada por esse alelo pode estar associada a uma maior magnitude inflamatória, um fator característico das formas graves da doença (ALAGARASU *et al.,* 2013; BASHYAM; GREEN; ROTHMAN, 2006)

O HLA-B*58:01 tem sido associado a um possível papel protetor contra formas graves de dengue, como DHF e DSS, em populações filipinas. No entanto, essa associação perdeu significância estatística após a correção de Bonferroni, evidenciando a necessidade de mais estudos para validar sua relevância imunológica (MERCADO *et al.,* 2015). Funcionalmente, esse alelo foi utilizado em estudos de ancoragem proteína-proteína para avaliar a ligação de epítopos preditos, demonstrando potencial para apresentar peptídeos imunogênicos e induzir respostas de células T específicas (GUPTA; KUMAR, 2022).

A literatura sobre o HLA-B*58:01 ainda é limitada, especialmente no contexto de diferentes populações e sorotipos do DENV, ressaltando a necessidade de investigações adicionais para esclarecer seu impacto imunológico.

O alelo HLA-B*07 desempenha um papel significativo na resposta imune mediada por células T $CD8^+$ contra o DENV, com destaque para sua capacidade de apresentar epítopos virais altamente conservados entre os diferentes sorotipos. Estudos mostraram que os peptídeos restringidos por este alelo induzem respostas imunológicas mais robustas e consistentes, sugerindo uma contribuição efetiva para a proteção contra o DENV (REGUZOVA *et al*., 2021).

Além disso, o subtipo HLA-B*07:02 foi identificado como restritivo para múltiplos epítopos de células T $CD8^+$ em estudos que exploraram reatividade cruzada entre o DENV e o ZIKV. Esse subtipo demonstrou capacidade de induzir respostas imunológicas significativas, incluindo redução da carga viral em modelos de camundongos, indicando seu potencial protetor em infecções cruzadas. Apesar disso, a correlação entre a afinidade de ligação dos epítopos e sua imunogenicidade não foi evidente, sugerindo que fatores adicionais, como a composição do repertório de células T, influenciam a resposta imunológica (WEN *et al.,* 2017).

Epidemiologicamente, o HLA-B*07 foi associado a uma maior susceptibilidade à DHF em infecções secundárias, possivelmente devido à presença de alelos do mesmo supertipo, como o HLA-B*51, em algumas populações. No entanto, essas associações frequentemente não mantiveram significância estatística em análises ajustadas, destacando a complexidade de seu papel imunológico. Por outro lado, o alelo foi encontrado em baixa frequência em pacientes com DSS, sugerindo uma possível associação com menor susceptibilidade a formas graves da doença, especialmente em populações do Sri Lanka (MALAVIGE *et al.,* 2011; VEJBAESYA *et al.,* 2015).

Estudos também indicaram que o HLA-B*07 pode restringir epítopos específicos, como o NS3 221-232, com alta frequência de resposta em indivíduos infectados naturalmente. A magnitude dessa resposta foi maior em pacientes com DHF, o que pode refletir tanto sua contribuição protetora quanto seu papel na amplificação imunológica em casos de dengue grave (ZIVNA *et al*., 2002). Essas evidências sugerem que o HLA-B*07 desempenha um papel multifacetado na imunidade contra o DENV, influenciando tanto a proteção quanto a susceptibilidade em diferentes contextos populacionais e clínicos.

Quanto ao HLA-II, estudos anteriores indicam que o alelo HLA-DRB1*03:01 está negativamente associado às formas graves da doença, sendo considerado um fator protetor (CHEN; HOFESTÄDT; TAUBERT, 2019). Sua recorrência na ligação a epítopos de diferentes sorotipos do DENV sugere um possível papel na indução de uma resposta imune eficaz,

promovendo uma melhor ativação dos linfócitos T $CD4^+$ e, consequentemente, reduzindo o risco de complicações clínicas.

Por outro lado, o HLA-DRB1*07:01 apresenta um caráter ambíguo na literatura. Enquanto alguns estudos indicam uma associação com a DHF (ALAGARASU *et al*., 2013), outros sugerem um efeito protetor, especialmente em infecções secundárias por DENV-2 (MALAVIGE *et al.,* 2011). Essa discrepância pode ser atribuída a diferenças populacionais, variabilidade na resposta imunológica mediada por células T ou complexidade das interações entre os sorotipos do vírus e o sistema imunológico do hospedeiro. Ainda assim, sua presença consistente nos quatro sorotipos analisados reforça sua relevância na imunogenicidade do DENV, destacando a necessidade de investigações adicionais para esclarecer seu papel na progressão da doença.

Em contraste, o HLA-DRB1*15:01 surge como um fator de susceptibilidade à infecção pelo DENV. Estudos demonstram que esse alelo está associado a um maior risco de desenvolver formas graves da doença, incluindo a DHF (CARDOZO *et al.,* 2014; CHEN; HOFESTÄDT; TAUBERT, 2019).

Além desses, os *locis* DRB3, DRB4 e DRB5 também se mostraram altamente promíscuos nos quatro sorotipos de DENV, sugerindo um papel relevante na resposta imune ao vírus. Embora a literatura sugira que sua contribuição na restrição de epítopos seja menos expressiva em comparação ao DRB1 (GRIFONI *et al.,* 2019), sua presença consistente nos quatro sorotipos indica que esses *locis* desempenham uma função complementar na ampliação da imunogenicidade viral.

Considerando que a inclusão de DRB3, DRB4 e DRB5 nas análises de predição melhora a identificação de epítopos imunogênicos, sua interação entre os sorotipos de DENV merece ser explorada, principalmente por ser documentada em outros estudos com diferentes flavivírus (GRIFONI *et al*., 2019; PAUL *et al.,* 2015). Além disso, estudos indicam que os alelos DRB3*01:01 e DRB3*02:02 estão associados a epítopos da proteína E do ZIKV (EZZEMANI *et al.,* 2021). Como no presente estudo, eles apresentam um compartilhamento de epítopos considerável, sugerindo um mecanismo imunológico compartilhado entre flavivírus. Essa relação reforça a hipótese de que esses alelos possam também desempenhar um papel na resposta imune contra a proteína E do DENV.

6. CONCLUSÃO

A presente pesquisa reforça a relevância da variabilidade entre os sorotipos do DENV na resposta imunológica, destacando suas implicações para o desenvolvimento de vacinas, terapias e para a compreensão das interações imunológicas. As diferenças estruturais e

funcionais da proteína E, incluindo padrões de glicosilação e fosforilação, bem como a distribuição de epítopos reconhecidos por alelos de HLA, demonstram o impacto dessas variações na imunogenicidade e no potencial de escape imune. Ademais, a associação entre alelos HLA específicos e a severidade da infecção ressalta a importância dos fatores genéticos na suscetibilidade e na proteção contra o DENV, fornecendo subsídios valiosos para o aprimoramento de estratégias profiláticas e terapêuticas.

Embora o estudo tenha utilizado apenas sequências de referência dos sorotipos do DENV, foi possível observar importantes variações estruturais e diferenças significativas na interação com o sistema imune adaptativo. Estudos futuros devem explorar essas diferenças em maior profundidade, considerando a influência da diversidade genética viral sobre a imunogenicidade e a eficácia de estratégias imunoterapêuticas.

BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA DE NOTÍCIAS OFICIAL DO GOVERNO DO PARÁ. **Governo orienta sobre a prevenção de arboviroses no período chuvoso paraense – SESPA**. , 2022. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/governo-orienta-sobre-a-prevencao-de-arboviroses-no-periodo-chuvoso-paraense/>. Acesso em: 27 mar. 2025

AHMED, R.; AKONDY, R. S. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 3, p. 340–345, mar. 2011.

ALAGARASU, K. *et al*. Association of *HLA-DRB1* and *TNF* genotypes with dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v. 74, n. 5, p. 610–617, 1 maio 2013.

ALI, M. *et al.* Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9232, 23 ago. 2017.

ANGELIN, M. *et al*. Qdenga® - A promising dengue fever vaccine; can it be recommended to non-immune travelers? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 54, p. 102598, 1 jul. 2023.

ANWAR, A. *et al*. The kinase inhibitor SFV785 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23246, 2011.

APPANNA, R. *et al*. Susceptible and Protective HLA Class 1 Alleles against Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in a Malaysian Population. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e13029, 28 set. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe semanal nº 01: **Monitoramento dos casos de arboviroses – semanas epidemiológicas 01 a 04, 2025**. Brasília: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses/informe-semanal/2025/informe-semanal-no-01.pdf>.

BASHEER, A. *et al*. Development of a tetravalent subunit vaccine against dengue virus through a vaccinomics approach. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 17 nov. 2023.

BASHYAM, H. S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 176, n. 5, p. 2817–2824, 1 mar. 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância à Saúde e Ambiente. **Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024.** Boletim Epidemiológico, vol. 55, n. 11, 04 jul. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-11.pdf>

BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 263–281, 29 set. 2016.

CHAMBERS, Thomas J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, 44: 649–688, 1990.

CARDOZO, D. M. *et al*. Evidence of HLA-DQB1 Contribution to Susceptibility of Dengue Serotype 3 in Dengue Patients in Southern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, p. 968262, 2014.

CASSETTI, M. C. *et al*. Report of an NIAID workshop on dengue animal models. **Vaccine**, v. 28, n. 26, p. 4229–4234, 11 jun. 2010.

CHARETTE, M. *et al*. Dengue Incidence and Sociodemographic Conditions in Pucallpa, Peruvian Amazon: What Role for Modification of the Dengue-Temperature Relationship? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 180–190, jan. 2020.

CHEN, M.; HOFESTÄDT, R.; TAUBERT, J. Integrative Bioinformatics: History and Future. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 16, n. 3, p. 20192001, 13 set. 2019.

CHOO, S. Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 1, p. 11–23, 28 fev. 2007.

CHOTIYARNWONG, P. *et al*. Humidity control as a strategy for lattice optimization applied to crystals of HLA-A*1101 complexed with variant peptides from dengue virus. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. Pt 5, p. 386–392, 1 maio 2007.

COOK, A. C.; THIBAUT, D.; PETTERSEN, T. Major Histocompatibility Complex Class I and Dengue Hemorrhagic Fever: A Meta-Analysis of Human Leukocyte Antigens A*24 and B*44. **Cureus**, v. 14, n. 11, p. e31485, nov. 2022.

CULSHAW, A. **Germline bias dictates cross-serotype reactivity in a common dengue-virus-specific CD8 T cell response**.

Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 24 mar. 2025.

DUAN, Z.-L. *et al.* Identification of conserved and HLA-A*2402-restricted epitopes in Dengue virus serotype 2. **Virus Research**, v. 196, p. 5–12, 22 jan. 2015.

EZZEMANI, W. *et al.* Immuno-informatics-based Identification of Novel Potential B Cell and T Cell Epitopes to Fight Zika Virus Infections. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 21, n. 4, p. 572–581, 2021.

FAHIMI, H. *et al*. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2977–2996, abr. 2018.

FERNANDES, H. C. *et al.* VACINAS CONTRA DENGUE APROVADAS NO BRASIL: Revisão integrativa da literatura. **Congresso Internacional em Saúde**, n. 10, 14 jun. 2023.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fields virology**. [s.l: s.n.].

GAUTHIER, J. *et al.* A brief history of bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981–1996, 27 nov. 2019.

GRIFONI, A. *et al*. Characterization of Magnitude and Antigen Specificity of HLA-DP, DQ, and DRB3/4/5 Restricted DENV-Specific CD4+ T Cell Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1568, 2019.

GUPTA, S.; KUMAR, A. Design of an Epitope-Based Peptide Vaccine Against Dengue Virus Isolate from Eastern Uttar Pradesh, India. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 91, 2022.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet (London, England)**, v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 10 nov. 2007.

HARAPAN, H. *et al*. Dengue: A Minireview. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 829, 30 jul. 2020.

HERSHAN, Almonther Abdullah. Dengue virus: molecular biology and recent developments in control strategies, prevention, management, and therapeutics. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 107-124, 2023.

JACOBSEN, A. et al. **Introduction to Protein Structure**. arXiv, , 6 jul. 2023. Disponível em: <http://arxiv.org/abs/2307.02169>. Acesso em: 25 mar. 2025

KABIR, M. A. *et al.* Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. **Biosensors**, v. 11, n. 7, p. 206, 23 jun. 2021.

KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 38–47, 5 jan. 2006.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 8 mar. 2002.

LEAL, C. S.; CARVALHO, C. A. M. In Silico Physicochemical Characterization of Fusion Proteins from Emerging Amazonian Arboviruses. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 8, p. 1687, 4 ago. 2023.

LEE, S. A. *et al.* The impact of climate suitability, urbanisation, and connectivity on the expansion of dengue in 21st century Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009773, 9 dez. 2021.

LOZADA, C. *et al*. Identification and Characteristics of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 689006, 2021.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. **What is bioinformatics? An introduction and overview**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/2330725_What_is_bioinformatics_An_introduction_and_overview>. Acesso em: 27 mar. 2025.

MADEIRA, F. *et al*. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. **Nucleic acids research**, v. 52, n. W1, p. W521–W525, 1 jul. 2024.

MALAVIGE, G. N. *et al*. HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lankan population. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20581, 2011.

MALININA, L.; PATEL, D. J.; BROWN, R. E. How α-Helical Motifs Form Functionally Diverse Lipid-Binding Compartments. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 609–636, 20 jun. 2017.

MANH, D. H. et al. iPS cell serves as a source of dendritic cells for in vitro dengue virus infection model. **The Journal of General Virology**, v. 99, n. 9, p. 1239–1247, set. 2018.

MERCADO, E. S. *et al.* HLA-A*33:01 as Protective Allele for Severe Dengue in a Population of Filipino Children. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0115619, 6 fev. 2015.

MONTEIRO, S. P. *et al*. HLA-A*01 allele: a risk factor for dengue haemorrhagic fever in Brazil's population. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 224–230, mar. 2012.

MULGREW-NESBITT, Anna et al. The role of electrostatics in protein–membrane interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 8, p. 812-826, 2006.

MORGAN, R. N. *et al*. Multi-epitope peptide vaccines targeting dengue virus serotype 2 created via immunoinformatic analysis. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 17645, 31 jul. 2024.

MURPHY, D.; RECHE, P.; FLOWER, D. R. Selection-based design of in silico dengue epitope ensemble vaccines. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 1, p. 21–28, jan. 2019.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. Dengue Virus. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, p. 281, 20 set. 2019.

MAIA, Luis Janssen et al. Arbovirus surveillance in mosquitoes: Historical methods, emerging technologies, and challenges ahead. **Experimental Biology and Medicine**, v. 248, n. 22, p. 2072-2082, 2023.

NATALI, E. N.; BABRAK, L. M.; MIHO, E. Prospective Artificial Intelligence to Dissect the Dengue Immune Response and Discover Therapeutics. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 574411, 2021.

NAVECA, F. G. *et al*. Reemergence of Dengue Virus Serotype 3, Brazil, 2023. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 1482–1484, jul. 2023.

NGUYEN, T. P. L. *et al.* Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. e304, 1 out. 2008.

NORSHIDAH, H.; VIGNESH, R.; LAI, N. S. Updates on Dengue Vaccine and Antiviral: Where Are We Heading? **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 22, p. 6768, 9 nov. 2021.

NUNES, P. C. G. *et al*. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. **BMC Public Health**, v. 19, p. 329, 21 mar. 2019.

OMS, O. M. D. S. **Dengue guidelines, for diagnosis, treatment, prevention and control**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547871>. Acesso em: 28 mar. 2025.

OMS, O. M. D. S. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 28 mar. 2025.

PAIVA, V. DE A. *et al.* Protein structural bioinformatics: An overview. **Computers in Biology and Medicine**, v. 147, p. 105695, ago. 2022.

PAUL, S. et al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 28–34, jul. 2015.

RAAFAT, N.; BLACKSELL, S. D.; MAUDE, R. J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 653–660, 1 nov. 2019.

RATHAKRISHNAN, A. *et al.* Clinical and immunological markers of dengue progression in a study cohort from a hyperendemic area in Malaysia. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e92021, 2014.

REGUZOVA, A. *et al*. A Novel Orf Virus D1701-VrV-Based Dengue Virus (DENV) Vaccine Candidate Expressing HLA-Specific T Cell Epitopes: A Proof-of-Concept Study. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1862, 8 dez. 2021.

ROY, S. K.; BHATTACHARJEE, S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687–702, out. 2021.

RUHUL AMIN, M. *et al*. Prediction of the post-translational modification sites on dengue virus E protein and deciphering their role in pathogenesis. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, v. 6, n. 5, p. 508–521, 2010.

SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 264, 24 abr. 2018.

SARKER, A.; DHAMA, N.; GUPTA, R. D. Dengue virus neutralizing antibody: a review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1200195, 2023.

SILVA, N. M.; SANTOS, N. C.; MARTINS, I. C. Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 4, p. 150, 23 set. 2020.

SMITH, M. R.; BUGADA, L. F.; WEN, F. Rapid microsphere-assisted peptide screening (MAPS) of promiscuous MHCII-binding peptides in Zika virus envelope protein. **AIChE journal. American Institute of Chemical Engineers**, v. 66, n. 3, p. e16697, mar. 2020.

SOTO, L. F.; REQUENA, D.; BASS, J. I. F. Epitope-Evaluator: An interactive web application to study predicted T-cell epitopes. **PLOS ONE**, v. 17, n. 8, p. e0273577, 26 ago. 2022.

STEPHENS, H. A. F. *et al*. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 4, p. 309–318, out. 2002.

STEWART, C. M. *et al.* Ebola virus triggers receptor tyrosine kinase-dependent signaling to promote the delivery of viral particles to entry-conducive intracellular compartments. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009275, jan. 2021.

TENENBAUM, J. D. Translational Bioinformatics: Past, Present, and Future. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 31–41, 1 fev. 2016.

TEO, A. et al. Understanding antibody-dependent enhancement in dengue: Are afucosylated IgG1s a concern? **PLoS pathogens**, v. 19, n. 3, p. e1011223, mar. 2023.

THOMAS, A. *et al.* Dimerization of Dengue Virus E Subunits Impacts Antibody Function and Domain Focus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 18, p. e00745-20, 31 ago. 2020.

THOMAS, S. J.; YOON, I.-K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2295–2314, 2019.

TRIVEDI, S.; CHAKRAVARTY, A. Neurological Complications of Dengue Fever | Current Neurology and Neuroscience Reports. p. 515–529, 2022.

UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response - PubMed. 2018.

VEJBAESYA, S. *et al*. HLA Class I Supertype Associations With Clinical Outcome of Secondary Dengue Virus Infections in Ethnic Thais. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 6, p. 939–947, 15 set. 2015.

VILLALAÍN, J. Envelope E protein of dengue virus and phospholipid binding to the late endosomal membrane. **Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes**, v. 1864, n. 5, p. 183889, 1 maio 2022.

WATANABE, Y. *et al.* Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, v. 1863, n. 10, p. 1480–1497, out. 2019.

WEISKOPF, D. *et al.* Insights into HLA-Restricted T Cell Responses in a Novel Mouse Model of Dengue Virus Infection Point toward New Implications for Vaccine Design. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 4268–4279, 1 out. 2011.

WEISKOPF, D. *et al*. HLA-DRB1 Alleles Are Associated With Different Magnitudes of Dengue Virus-Specific CD4+ T-Cell Responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 7, p. 1117–1124, 1 out. 2016.

WEN, J. *et al*. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1–11, 13 mar. 2017.

WILKEN, L.; RIMMELZWAAN, G. F. Adaptive Immunity to Dengue Virus: Slippery Slope or Solid Ground for Rational Vaccine Design? **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 470, 15 jun. 2020.

YAMAUCHI, S. *et al.* Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 21857–21864, 4 set. 2015.

YAP, S. S. L. *et al*. Dengue Virus Glycosylation: What Do We Know? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1415, 25 jul. 2017.

ZEBA, A.; SEKAR, K.; GANJIWALE, A. M Protein from Dengue virus oligomerizes to pentameric channel protein: in silico analysis study. **Genomics & Informatics**, v. 21, n. 3, p. e41, set. 2023.

ZEIDLER, J. D. *et al.* Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 42, 13 mar. 2017.

ZIVNA, I. *et al.* T Cell Responses to an HLA-B*07-Restricted Epitope on the Dengue NS3 Protein Correlate with Disease Severity1. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5959–5965, 1 jun. 2002.

ZHOU, Huan-Xiang; PANG, Xiaodong. Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. **Chemical reviews**, v. 118, n. 4, p. 1691-1741, 2018.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Projeto de pesquisa financiado pela Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA), sob a forma de bolsa de estudos concedida à mestranda.