UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA NA AMAZÔNIA

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROPENSÃO ANTIGÊNICA DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS VÍRUS ILHÉUS E ROCIO

JOÃO VITOR DOS SANTOS BENJAMIN

BELÉM/PA
2026

JOÃO VITOR DOS SANTOS BENJAMIN

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROPENSÃO ANTIGÊNICA DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS VÍRUS ILHÉUS E ROCIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em parceria com o Instituto Evandro Chagas (IEC), como requisito necessário para a obtenção do grau de mestre.

Linha de pesquisa: Morfofisiologia e Genética dos Agentes Infecciosos, Parasitários e Vetores de Endemias na Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho.

BELÉM/PA
2026

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

Benjamin, João Vitor dos Santos

Análise in silico da propensão antigênica do ectodomínio da proteína de fusão do vírus ilhéus e rocio / João Vitor dos Santos Benjamin. – Belém: UEPA, 2026.

92f. : 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 na Amazônia, Belém, 2026.

1. Biologia Computacional. 2. Flavivirus. 3. Proteínas Virais - Fusão. I. Universidade do Estado do Pará. II. Título.

CDD 20.ed. 616.01

Elaborada por Josicléia Garcia Vieira - CRB-2 /562

JOÃO VITOR DOS SANTOS BENJAMIN

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROPENSÃO ANTIGÊNICA DO ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA DE FUSÃO DOS VÍRUS ILHÉUS E ROCIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em parceria com o Instituto Evandro Chagas (IEC), como requisito necessário para a obtenção do grau de mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho
Departamento de Patologia (DPAT)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Banca examinadora:

Prof. Dra. Tinara Leila de Souza Aarão
Faculdade de medicina (FAMED)
Universidade Federal do Pará (UFPA-Altamira)

Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves
Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Prof. Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcantara
Departamento de Patologia (DPAT)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Prof. Dr. Leonardo Quintão Siravenha
Departamento de Patologia (DPAT)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Universidade do Estado do Pará (UEPA)

BELÉM/PA
2026

EPÍGRAFE

“Confia ao Senhor as tuas obras, e os teus planos serão estabelecidos.”
(Provérbios 16:3)

DEDICATÓRIA

A Deus, à Nossa Senhora e aos meus pais Íris Santos e João Carlos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por me permitirem seguir firme, concedendo-me força, sabedoria e serenidade para enfrentar os desafios ao longo da minha vida. Pela proteção e pela fé que sustentaram minha caminhada, tornando possível perseverar diante das dificuldades e continuar avançando em busca dos meus objetivos pessoais e acadêmicos.

Aos meus pais, Íris do Socorro dos Santos e João Carlos Araújo Benjamin, por todo amor, dedicação e incentivo incondicional ao longo de minha trajetória. Pelo suporte constante, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em cada etapa da minha formação acadêmica.

Ao professor e orientador, Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho, pela disposição, paciência e generosidade em compartilhar conhecimento e experiência durante o desenvolvimento deste projeto. Sempre serei muito grato por todo o apoio.

Aos meus tios, Nazareno Benjamin e Ana Lúcia Benjamin, por todo o amparo, acolhimento e companheirismo durante minha formação acadêmica. Pela presença constante, pelo incentivo e por contribuírem para que eu pudesse seguir com tranquilidade e dedicação aos estudos.

À minha companheira, Fernanda Eduarda das Neves Martins, por todo amor, carinho, compreensão e dedicação em todos os segmentos da minha vida. Sua presença foi fundamental em cada conquista.

Aos amigos, em especial Mateus Almeida Castro, Eliane Leite da Trindade, Jonatan Carlos da Silva, Clarice Pinto, Cacilda Pinto e Victor Segtowick pela amizade, troca de conhecimentos e apoio nos momentos mais desafiadores.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia, pelo suporte na disponibilização de informações, bem como pela atenção e eficiência no atendimento das solicitações, contribuindo para o bom andamento das atividades acadêmicas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta trajetória e que representam luz em minha vida por estarem ao meu lado enfrentando desafios, e oferecendo apoio, incentivo e inspiração ao longo do caminho, deixo o meu sincero e profundo agradecimento.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS....9
LISTA DE FIGURAS....13
LISTA DE GRÁFICOS....14
RESUMO....15
ABSTRACT....16
1. INTRODUÇÃO....17
1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO ILHV E ROCV....17
1.2 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO DO ILHV E ROCV....21
1.3 CICLO BIOLÓGICO....22
1.4 MORFOLOGIA E GENOMA DA FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE*....26
1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DOS FLAVIVÍRUS ILHV E ROCV....29
1.5.1 Papel da Proteína E na Infecção do ILHV e ROCV....37
1.6 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR ILHV E ROCV....38
1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO ILHV E ROCV....40
1.8 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO DE CLASSE I E CLASSE II....41
1.9 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE PROTEÍNAS VIRAIS....46
2. OBJETIVOS....51
2.1 OBJETIVO GERAL....51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....51
3. MATERIAL E MÉTODOS....52
3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS....52
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO....52
3.3 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS....53
3.3.1 Obtenção das sequências aminoacídicas e definição do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV....53
3.3.2 Alinhamento das sequências aminoacídicas da proteína E do ILHV e ROCV..53

3.3.3 Determinação do peso molecular, da carga líquida, do ponto isoelétrico e das polaridades residuais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV 54

3.3.4 Predição de estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV 54

3.3.5 Identificação de potenciais sítios de modificações pós-traducionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV 54

3.3.6 Modelagem, refinamento e validação de estruturas tridimensionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV 55

3.3.7 Avaliação da antigenicidade do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV 55

3.3.8 Estimativa da afinidade de ligação de peptídeos derivados do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV aos HLAs-I/II 56

4. RESULTADOS 57

5. DISCUSSÃO 68

6. CONCLUSÃO 73

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

FONTES DE FINANCIAMENTO 91

ANEXO 1 92

ANEXO 2 93

ANEXO 3 94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3’SL – 3′ *stem–loop*

aa – Aminoácido

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAGV – Vírus Bagaza

BSQV – Vírus Bussuquara

C – Proteína do Capsídeo

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLIP – Class II-Associated Invariant Peptide

CPCV – Vírus Cacipacoré

CSE – Conserved Sequence Element

CxFV – Vírus Flavivírus Culex

CYC – Cyclization Sequence

DENV – Dengue Vírus

DI – Domínio I

DII – Domínio I

DIII - Domínio III

dsRNA – RNA fita dupla

E – Proteína do Envelope

ELISA-IgM – Ensaio Imunoenzimático de Captura de IgM

GL – Gotículas Lipídicas

GTase – Guanililtransferase

H1 – Hélice 1

H2 – Hélice 2

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – Human Leucocyte Antigen

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral

IGUV – Vírus Iguape

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IH – Teste de Inibição da Hemaglutinação

Ii – Cadeia Invariante

ILHV – Vírus Ilhéus

ISF – Insect-Specific Flavivirus

ITV – Vírus da Meningoencefalite Israelita e Turca

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

kDa – Quilodaltons

LCR – Líquido cefalorraquidiano

M – Proteína de Membrana

MC – Membranas Convolutas

MHC – Major Histocompatibility Complex

MTase – Metiltransferase

NJLV – Vírus Naranjal

NS – Proteína Não Estrutural

NTAV – Vírus Ntaya

nt – Nucleotídeo

ORF – Open Reading Frame

PII – Períodoo de Incubação Intrínseca

PIE – Período de Incubação Extrínseca

PNH – Primatas Não Humanos

prM - Proteína Pré-Membrana

PV – Pacotes de Vesículas

RCS2 – Repetições de CS2

RCS3 – Repetições de CS3

RdRp – RNA-polimerase dependente de RNA

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – Ácido Ribonucleico

rTG – Rede Trans-Golgi

RNP – Ribonucleoproteína

ROCV – Vírus Rocio

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

SLEV – Vírus Saint Louis

SNC – Sistema Nervoso Central

ssRNA+ – RNA fita simples com polaridade positiva

TAP – Adenosine Triphosphate-dependent Transporters Associated with Antigen Processing

TM1 – Segmento Transmembrana 1

TM2 – Segmento Transmembrana 2

TMUV – Vírus Tembusu

UTR – Untranslated Region

VIF – Vertebrate-Infecting Flavivirus

VM – Vesículas de Membrana

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da Febre Amarela

ZIKV – Vírus Zika

β2m – β2-microglobulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Linha temporal da detecção, circulação e vigilância do ILHV.....19

Figura 2- Distribuição geográfica do ROCV em diferentes regiões do Brasil.....20

Figura 3- Representação do ciclo de transmissão silvestre e urbano de ILHV e ROCV.....26

Figura 4 – Representação da estrutura da partícula viral madura e imatura de flavivírus 26

Figura 5 – Modelo de interação de RNA-RNA de iniciação de polimerase para síntese de RNA pela polimerase 28

Figura 6 – Esquema do processo de fusão dos dímeros da proteína E em pH baixo 30

Figura 7 - Estrutura intermediária responsável pela fusão de membrana alvo e viral 32

Figura 8 – Representação do processamento da poliproteínas de flavivírus 34

Figura 9 – Esquema de replicação e montagem da partícula viral 36

Figura 10 - Representação esquemática da sequência da proteína de E 37

Figura 11 – Representação do *locus* do HLA no cromossomo 6 42

Figura 12 – Representação das cadeias presentes nas estruturas das moléculas de HLA-I (à esquerda) e HLA-II (à direita) 44

Figura 13 – Esquema do trânsito, processamento e apresentação de antígenos por moléculas HLA-I 45

Figura 14 – Esquema do trânsito, processamento e apresentação de antígenos por moléculas HLA-II 46

Figura 15 - Fluxo metodológico para análise estrutural e predição de epítopos de HLA.....52

Figura 16 - Alinhamento duplo da RefSeq do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV..... 57

Figura 17 – Modelos tridimensionais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....60

Figura 18 – Correlação entre número de epítopos e comprimento de proteína do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV para HLA-I.....62

Figura 19 – Posição dos epítopos e promiscuidade alélica para HLA-I do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV..... 63

Figura 20 - Diagrama de Venn com epítopos para HLA-I conservados entre o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....64

Figura 21 - Correlação entre número de epítopos e comprimento de proteína do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV para HLA-II.....65

Figura 22 - Posição dos epítopos e promiscuidade alélica para HLA-II do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....66

Figura 23 - Diagrama de Venn com epítopos para HLA-II conservados entre o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV..... 67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Propriedades residuais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....58

Gráfico 2 - Estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....59

Gráfico 3 – Modificações pós-traducionais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV..60

Gráfico 4 – Antigenicidade do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV determinada a partir da convolução entre hidrofilicidade, flexibilidade e afinidade.....61

Gráfico 5 – Heatmap de distribuição do número de epítopos por alelo de HLA-I do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....62

Gráfico 6 - Afinidade de ligação de epítopos do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV a alelos de HLA-I. 64

Gráfico 7 – Heatmap de distribuição do número de epítopos por alelo de HLA-II do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.....65

Gráfico 8 - Afinidade de ligação de epítopos do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV a alelos de HLA-II.....67

RESUMO

Na Amazônia, a alta diversidade de arbovírus e vetores dificulta o controle epidemiológico, sendo o Brasil particularmente vulnerável, devido à sua diversidade entomológica e ambiental. Os vírus Ilhéus (ILHV) e Rocio (ROCV) pertencem à mesma espécie (*Orthoflavivirus ilheusense*), circulando em múltiplos hospedeiros e com evidências sorológicas em diversas regiões brasileiras, incluindo casos humanos graves recentes. A persistência e a expansão geográfica desses flavivírus reforçam a necessidade de vigilância contínua, diagnóstico aprimorado e compreensão da dinâmica de transmissão para prevenir novos surtos. Este estudo teve como objetivo analisar *in silico* a propensão antigênica do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV. Inicialmente, a região do ectodomínio da proteína E foi definida e sequências de referência (RefSeq) foram obtidas do banco de dados GenBank. Posteriormente, foram realizadas as seguintes etapas: alinhamento utilizando o servidor Needle; obtenção do peso molecular, carga líquida, ponto isoelétrico e polaridades residuais utilizando a ferramenta PEPSTATS; predição de estruturas secundárias utilizando a ferramenta PREDATOR; identificação dos sítios de modificação pós-traducional utilizando as ferramentas NetPhos 3.1 e NetNglyc; modelagem com o servidor PHYRE2.2; refinamento com o servidor MODREFINER; análise da qualidade das estruturas tridimensionais com o servidor PROCHECK; avaliação da antigenicidade com a ferramenta PCPROF; e estimativa da afinidade de ligação do peptídeo às moléculas de HLA-I/II com os servidores NetMHCpan-4.1, NetMHCIIpan-4.0 e Epitope-Evaluator. O alinhamento mostrou alta identidade e similaridade, mas com algumas diferenças específicas. As polaridades residuais mostraram predominância de perfil apolar em todas as sequências. Por outro lado, houve maior presença de folhas beta do que de hélices alfa nas cadeias polipeptídicas. Para as modificações pós-traducionais, observou-se um número maior de padrões de consenso para fosforilação de serina (S), treonina (T) e tirosina (Y) do que para glicosilação de asparagina (N). A modelagem das estruturas tridimensionais revelou distinções no domínio II da proteína E entre os vírus. A propensão antigênica apresentou distribuição tanto na região N-terminal quanto na C-terminal. Por fim, os alelos HLA-1 HLA.B39.01, HLA.B15.01, HLA.A01.01 e HLA.A26.01, e os alelos HLA-II DRB3.02.02, DRB4.01.01, DRB1.03.01 e DRB4.01.01 destacaram-se no reconhecimento de peptídeos do ectodomínio da proteína E. Portanto, foram observadas diferenças que podem influenciar a funcionalidade, a resposta imune e a progressão da doença, servindo como base para elucidar potenciais alvos terapêuticos e vacinais.

Palavras-chave: Biologia Computacional; Flavivirus; Proteínas Virais de Fusão.

ABSTRACT

In the Amazon, the high diversity of arboviruses and vectors makes epidemiological control difficult, with Brazil being particularly vulnerable due to its entomological and environmental diversity. Ilhéus (ILHV) and Rocio (ROCV) viruses belong to the same species (Orthoflavivirus ilheusense), circulating in multiple hosts and with serological evidence in several Brazilian regions, including recent severe human cases. The persistence and geographic expansion of these flaviviruses reinforce the need for continuous surveillance, improved diagnosis, and understanding of transmission dynamics to prevent new outbreaks. This study aimed to analyze in silico the antigenic propensity of the ectodomain of the E protein of ILHV and ROCV. Initially, the ectodomain region of the E protein was defined and reference sequences (RefSeq) were obtained from the GenBank database. Subsequently, the following steps were performed: alignment using the Needle server; obtaining molecular weight, net charge, isoelectric point, and residual polarities using the PEPSTATS tool; Prediction of secondary structures using the PREDATOR tool; identification of post-translational modification sites using the NetPhos 3.1 and NetNglyc tools; modeling with the PHYRE2.2 server; refinement with the MODREFINER server; analysis of the quality of three-dimensional structures with the PROCHECK server; evaluation of antigenicity with the PCPROF tool; and estimation of the peptide's binding affinity to HLA-I/II molecules with the NetMHCpan-4.1, NetMHCIIpan-4.0, and Epitope-Evaluator servers. The alignment showed high identity and similarity, but with some specific differences. Residual polarities showed a predominance of apolar profiles in all sequences. On the other hand, there was a greater presence of beta sheets than alpha helices in the polypeptide chains. For post-translational modifications, a greater number of consensus patterns were observed for serine (S), threonine (T), and tyrosine (Y) phosphorylation than for asparagine (N) glycosylation. Modeling of the three-dimensional structures revealed distinctions in domain II of the E protein among the viruses. Antigenic propensity showed a distribution in both the N-terminal and C-terminal regions. Finally, the HLA-1 alleles HLA.B39.01, HLA.B15.01, HLA.A01.01, and HLA.A26.01, and the HLA-II alleles DRB3.02.02, DRB4.01.01, DRB1.03.01, and DRB4.01.01 stood out in the recognition of ectodomain peptides of the E protein. Therefore, differences were observed that may influence functionality, immune response, and disease progression, serving as a basis for elucidating potential therapeutic and vaccine targets.

Keywords: Computational Biology; Flavivirus; Viral Fusion Proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO ILHV E ROCV

Nas regiões tropicais, especialmente na Floresta Amazônica, há uma grande diversidade de arbovírus de interesse para a saúde pública, dada sua capacidade de causar doenças em seres humanos. O Brasil, com extensa cobertura florestal na região amazônica, enfrenta desafios devido à propagação de insetos transmissores de arbovírus. Contendo a maior diversidade entomológica do mundo, com 400 e 500 mil espécies de insetos, o país lida com a complexidade de diferentes comportamentos e ecologias de vetores, dificultando a implementação de uma estratégia única de controle vetorial (Argondizzo; Silva; Missailidis, 2020; Almeida *et al.*, 2020).

Em 1944, no decorrer das investigações da febre amarela no Brasil, o Vírus Ilhéus (ILHV) foi isolado pela primeira vez no estado da Bahia, na cidade de Ilhéus, a partir de mosquitos capturados dos gêneros *Psorophora* e *Culex*. Posteriormente, no ano de 1959, o vírus foi isolado de humanos pela primeira vez no município brasileiro de Belém, capital do estado do Pará, sendo detectado, em seguida, em outros países da América Latina (Causey *et al.*, 1961). Em 2006, foram iniciados estudos de vigilância epidemiológica para investigação de casos de encefalite em uma região hiperendêmica no estado de São Paulo, onde foram constatados pacientes infectados pelo ILHV (Da Costa *et al.*, 2022; Milhim *et al.*, 2020).

O Vírus Rocio (ROCV), também transmitido por mosquitos dos gêneros *Culex* e *Psorophora*, foi isolado inicialmente um pouco mais tarde, em 1975, no cerebelo de um caso fatal que ocorreu durante um surto de encefalite que ocorreu no bairro do Rocio, Iguape, estado de São Paulo, Brasil, onde foram relatados mais de mil casos de encefalite, cuja taxa de mortalidade atingiu 13%, com o desenvolvimento de sequelas neurológicas em 20% dos afetados (Lopes *et al.*, 1978; Iversson, 1986).

A epidemia ocorreu entre os meses de março a junho do ano de 1975, com maior concentração de casos observada em homens adultos jovens, e a mortalidade foi consideravelmente menor quando houve assistência médica adequada (Lopes *et al.*, 1978). Entre os anos de 1975 e 1977, o ROCV ocasionou epidemias de encefalite que se estenderam ao Vale do Ribeira, área litorânea de São Paulo, Brasil (Tiriba, 1975).

É possível que o ROCV esteja presente em Iguape, São Paulo, Brasil, desde 1973, quando foram identificados sete casos em moradores locais, inicialmente relatados como doença meningocócica, mas com sequelas indicativas de encefalite. Como a doença não era

suspeitada na região antes de 1975 e devido à epidemia de meningite meningocócica no Brasil, é possível que os casos de encefalite tenham sido ignorados pela falta do diagnóstico preciso (Iverson, 1980).

Evidências sorológicas de anticorpos imunoglobulina G (IgG) e/ou imunoglobulina (IgM) contra ILHV já foram encontradas dispersos nas Américas do Sul e Central como em Trinidad e Tobago, Peru, Panamá, Colômbia, Guiana Francesa, Equador e Bolívia (Spence *et al.*,1962; Nassar *et al.*, 1997; Venegas *et al.*, 2012; Smith, 2016; Casseb *et al.*, 2014; Iversson *et al.*, 1993; Prías-Landínez, 1970; Buckley *et al.*, 1972. Romano-Lieber *et al.* 2000; Manock *et al.*, 2009). Na América do Norte, em Nova York, Estados Unidos da América, foram detectados anticorpos para ILHV em amostras de soro de pacientes internados, bem como o isolamento do vírus em amostras de sangue dos pacientes estudados (Southam *et al.*, 1954).

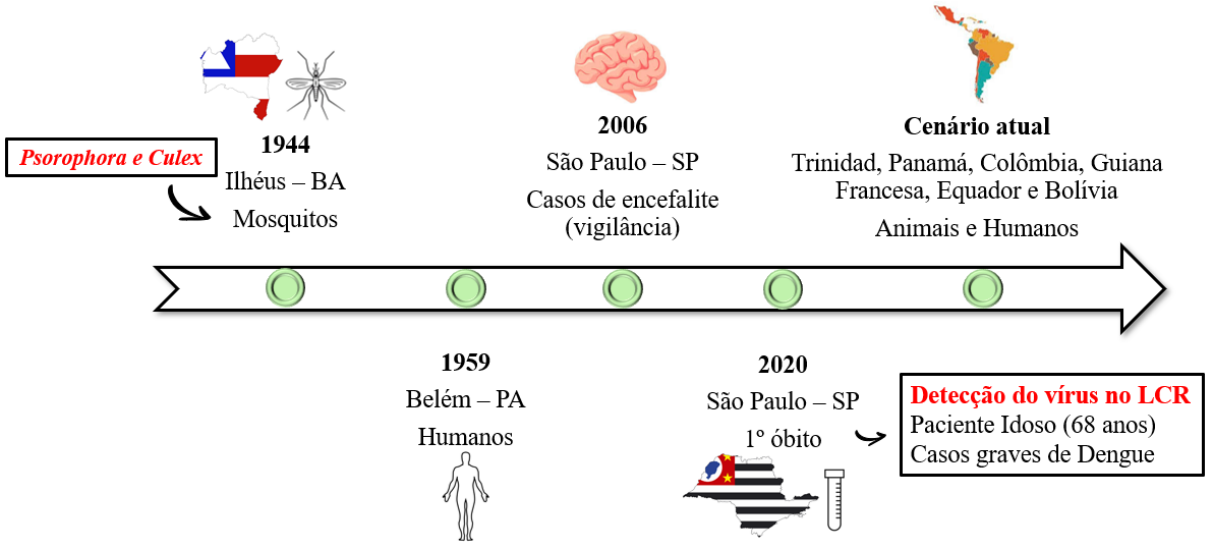
O ILHV é encontrado em mosquitos arbóreos, aves e seres humanos na América Central (Honduras, Guatemala e Panamá), no Caribe (Trinidad e Tobago) e na América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela), indicando uma ampla extensão geográfica de transmissão, sendo também detectado em roedores, equinos e primatas não humanos (Da Costa *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). As investigações afirmam a ocorrência de ciclos de transmissão do ILHV na região amazônica brasileira devido à alta prevalência de anticorpos IgM contra ILHV e a grande circulação de mosquitos vetores (Araújo *et al.*, 2019).

Após o primeiro isolamento do ILHV em mosquitos no Brasil, já foram encontradas evidências sorológicas do ILHV em amostras de soro de humanos nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Em Valença, Bahia, Brasil, foram detectados anticorpos para o ILHV em 2,7% da população de Corte de Pedra (Tavares-Neto *et al.*, 1986; 2004).

Outros locais da região Sudeste, como São Paulo, Osasco, Atibaia, Guarujá e na região Nordeste, em São Luís, já foram encontrados anticorpos para ILHV em hospedeiros vertebrados (Nassar *et al.*, 1997). Ainda na região Sudeste, no Vale do Ribeira, São Paulo, mesmo local onde ocorreu a epidemia de encefalite por ROCV, foram identificados uma prevalência de 12,6% de anticorpos para *Orthoflavivirus*, sendo que 2,2% correspondiam ao ILHV (Romano-Lieber *et al.*, 2000).

O primeiro óbito humano por ILHV ocorreu em 2020, em São Paulo, após a detecção do ILHV no líquido cefalorraquidiano (LCR) de um paciente de 68 anos diagnosticado com o vírus durante a investigação de casos graves de dengue. O paciente apresentou sintomas graves, como hemiplegia e edema cerebral, e faleceu 24 horas após a internação (Figura 1) (Milhim *et al.*, 2020).

Figura 1- Linha temporal da detecção, circulação e vigilância do ILHV



Fonte: Benjamin, 2026.

Outros estudos mostram a circulação ativa do ROCV na Amazônia brasileira, com focos de transmissão. Esse flavivírus é potencialmente emergente no Brasil e ainda pouco se sabe sobre a sua biologia estrutural. Atualmente, o vírus apresenta grandes chances de estar circulando entre diferentes regiões, o que torna necessário o aprimoramento de tecnologias de diagnóstico para flavivírus regionais juntamente com relatórios de vigilância (Casseb *et al.*, 2014; Saivish *et al.*, 2020).

A epidemiologia do ROCV no Brasil é marcada por surtos de encefalite ocorridos, principalmente no Vale do Ribeira, litoral de São Paulo. Casos esporádicos continuaram sendo registrados até 1989 na mesma região. O vírus foi isolado em amostras de tecidos humanos, de um camundongo sentinela e de aves silvestres, com suspeita de que as aves tenham um papel no ciclo de transmissão. O mosquito *Psorophora ferox* foi identificado como vetor principal e o *Aedes scapularis* foi relacionado à transmissão humana durante as epidemias (Tiriba, 1975; Lopes *et al.*, 1978; Iversson, 1986).

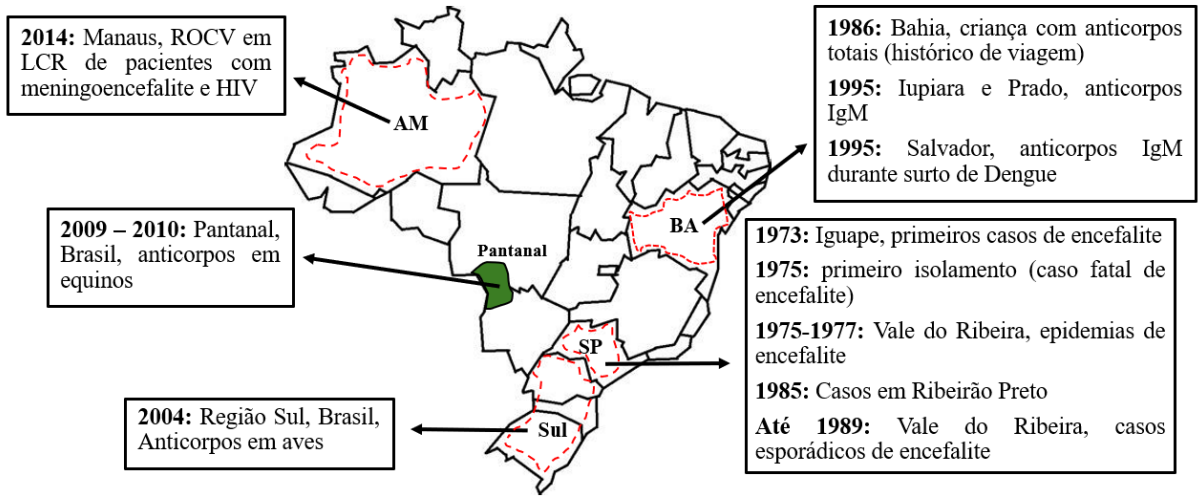
Além disso, houve relatos de circulação do vírus em outras regiões do Brasil. Em 1985, foi detectado um caso em Ribeirão Preto, São Paulo, e em 1986, uma criança na Bahia apresentou anticorpos contra o ROCV, embora sem histórico de viagem à região de São Paulo (Figueiredo, 1985). Em 1995, durante um surto de dengue em Salvador, foram encontrados anticorpos IgM para o ROCV em três pacientes, sugerindo que o vírus ainda circulava na cidade (Tavares-Neto *et al.*, 1996). Estudos sorológicos realizados em 1995 em duas cidades da Bahia, Ipupiara e Prado, detectaram anticorpos contra o vírus na população testada, sem histórico de viagens para áreas endêmicas (Straatmann *et al.*, 1997).

Em contraste com a região do Vale do Ribeira, as características climáticas e geográficas das cidades da Bahia, como o clima tropical úmido e a proximidade de áreas de mata nativa, são fatores que favorecem a circulação do ROCV. Esses achados sorológicos indicam que o ROCV pode estar circulando mais amplamente do que o inicialmente suposto, exigindo maior vigilância para possíveis surtos futuros (Straatmann *et al.*, 1997).

Na região Norte, mais especificamente no estado de Manaus, 34 anos após a epidemia inicial, o ROCV foi identificado em amostras de LCR de dois pacientes com meningoencefalite (casos não fatais), que também eram portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Figueiredo *et al.*, 2014). Além disso, em 2004, foi detectada a presença de anticorpos para ROCV em aves capturadas no Sul do Brasil, sugerindo a circulação do vírus em novas áreas, apesar da ausência de surtos em humanos. Ademais, cepas do vírus foram identificadas em camundongos sentinelas, pardais andinos, aves migratórias, cavalos, búfalos e seres humanos (Chávez *et al.*, 2013b).

Em 2009 e 2010, um estudo com equinos do Pantanal revelou uma alta prevalência de anticorpos para *Orthoflavivirus*, com detecção para ROCV. Esses resultados indicam uma possível introdução do vírus nessas regiões, que anteriormente não haviam apresentado evidências de sua circulação (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2014). Outro estudo com equinos, realizado por Silva e colaboradores (2014) detectou em 46 (6,1%) cavalos, anticorpos IgG para ROCV, sendo estes por reação monotítpica, no entanto, nenhum dos 415 cavalos estudados apresentaram comprometimento neurológico (Figura 2).

Figura 2- Distribuição geográfica do ROCV em diferentes regiões do Brasil.



Fonte: Benjamin, 2026.

Durante vários anos de vigilância epidemiológica, os estudos de Degallier *et al.* (1992) evidenciaram inúmeros hospedeiros silvestres do ROCV na Amazônia Brasileira, os quais

possuíam anticorpos contra esse patógeno (Lopes; Nozawa; Linhares, 2014; Degallier *et al.*, 1992). Embora não tenha sido confirmado um novo surto de encefalite em humanos fora das áreas de incidência histórica, a detecção do vírus em novas regiões e a possibilidade de reações cruzadas com outros *Orthoflavivirus* sugerem a necessidade de monitoramento contínuo e investigações adicionais para entender melhor a dinâmica de transmissão e os potenciais riscos à saúde pública (Straatmann *et al.*, 1997).

Considerando as pesquisas sorológicas realizadas em uma ampla gama de espécies hospedeiras e os relatos de infecções humanas relacionadas ao ILHV e ROCV, o contexto de crescente urbanização, empreendimentos agrícolas e mudanças climáticas sugere o aumento potencial de infecções causadas por estes vírus em populações humanas. Os modelos experimentais revelam que os vírus apresentam infecções produtivas de forma semelhante em linhagens de células de vertebrados e invertebrados, estando relacionados a outros flavivírus que causam doenças encefalíticas e a vetores comuns, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Diante disso, o aperfeiçoamento de conhecimentos e diagnóstico mais precisos sobre estas zoonoses de grande potencial de emergência permitirão que as medidas de saúde pública consigam responder de forma mais eficiente sobre os futuros surtos relacionados a estas doenças (Plante *et al.*, 2024; Saivish *et al.*, 2021; Gräf *et al.*, 2026).

1.2 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO DO ILHV E ROCV

O gênero *Orthoflavivirus*, família *Flaviviridae*, contém espécies virais transmitidas pela picada de mosquitos e carrapatos infectados. Esses vírus são responsáveis por diversos surtos de infecções por arbovírus no mundo, exigindo o desenvolvimento de estratégias para minimizar impactos de sua infecciosidade e transmissibilidade, além de demandarem a formulação de alternativas terapêuticas específicas para contornar os danos à saúde de indivíduos infectados. Alguns flavivírus representam sérias ameaças à saúde pública e estão amplamente distribuídos no Brasil, a exemplo do vírus Dengue (DENV) e do vírus Zika (ZIKV), enquanto outros são responsáveis por casos esporádicos de infecção em humanos com potencial de expansão, como o ROCV e o ILHV (Hoffmann *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

Na última atualização do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) realizado no mês de junho de 2024, consta que a família *Flaviviridae* abriga quatro gêneros virais, a saber *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Orthoflavivirus*, além de 53 espécies e 75 vírus (Simmonds, 2017; ICTV,2024). Dentro do gênero *Orthoflavivirus*, há 13 diferentes vírus de ocorrência no Brasil: vírus da Febre Amarela (YFV), vírus Bussuquara (BSQV), vírus Saint Louis (SLEV),

vírus Cacipacoré (CPCV), DENV e seus sorotipos 1, 2, 3 e 4, vírus Iguape (IGUv), vírus Naranjal (NJLV), vírus Flavivírus Culex (FCXV), ILHV e ROCV, entre outros (Leão, 2013).

O ILHV e ROCV são classificados como uma única espécie, *Orthoflavivirus ilheusense*, estando presentes no grupo antigênico do vírus Ntaya (VNAT), transmitido por mosquitos, que abrigam os vírus Bagaza (BAGV), vírus da Meningoencefalite Israelita e Turca (ITV), NATV, vírus Tembusu (TMUV) e ZIKV (Simmonds, 2017; ICTV, 2024). O ILHV e o ROCV são vírus do grupo sorológico B dos arbovírus, estando relacionados ao desenvolvimento de encefalites, doenças hemorrágicas e hepáticas que podem acometer vertebrados (Pauvolid-Corrêa *et al*, 2014).

É importante destacar que os vírus do gênero *Orthoflavivirus* são sorologicamente relacionados, o que significa que a reatividade cruzada entre eles é frequente. Essa característica pode ser observada em diversos testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático de captura de IgM (ELISA-IgM) e o teste de inibição da hemaglutinação (IH) (Simmonds, 2017; ICTV,2024).

Essa reatividade cruzada está associada à resposta imunológica direcionada aos epítopos antigênicos presentes na proteína de envelope (E), que são comuns a diferentes vírus do gênero *Orthoflavivirus*. Isso implica que, ao identificar anticorpos contra essa proteína, pode ser difícil distinguir entre os diferentes tipos de vírus, devido à similaridade estrutural e antigênica entre eles (BlitvichI *et al.*, 2015; Simmonds, 2017; ICTV,2024).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

Os flavivírus oferecem grande ameaça à saúde pública que infectam os seres humanos mediante artrópodes hematófagos que podem estabelecer surtos em uma determinada região. A grande amplitude de circulação dos vírus favorece a expansão das infecções em diferentes áreas com o potencial de ocorrência de surtos (Pielnaa *et al.*, 2020). O alcance das infecções virais é intensificado pelas mudanças climáticas e as migrações humanas, que contribuem para a proliferação e distribuição de espécies de vetores (Kraemer *et al.*, 2019).

Os artrópodes se infectam durante a realização do repasto com sangue infectado a partir de reservatórios animais e da circulação entre humanos e mosquitos. Os patógenos se alojam no intestino médio do inseto, onde se replicam no epitélio do órgão através das microvilosidades e se disseminam pela hemocele. A circulação da hemolinfa permite que o vírus atinja e realize a amplificação secundária para infecção eficiente de diversos tecidos e órgãos, como as glândulas salivares e tecidos do sistema reprodutor, permitindo a transmissão horizontal e

vertical, respectivamente (Romoser; Beaty; Marquardt, 1996; Girard; Klingler; Higgs, 2004; Franz *et al.*, 2015).

O período que envolve a ingestão de sangue infectado do hospedeiro pelo artrópode até o desenvolvimento da capacidade de estabelecer a infecção mediante o repasto é denominado de período de incubação extrínseca (PIE) e pode durar de 8 a 14 dias (OPAS, 2016). A partir da transmissão para um vertebrado, o tempo necessário entre o momento de infecção e a manifestação dos sintomas é classificado com período de incubação intrínseca (PII), podendo variar entre 4 e 10 dias. A estimativa dos períodos de incubação pode sofrer a influência de diversos fatores ambientais, pois temperaturas mais baixas podem comprometer a sobrevivência do vetor e impedindo que se torne competente para transmitir o vírus. O artrópode é capaz de infectar os seres humanos quanto possui capacidade infectante, mantendo-se assim pelo resto de sua vida (Chan; Johansson, 2012; Kramer, 2016; Brasil, 2017).

Os artrópodes infectados injetam vírions no hospedeiro pela saliva durante o repasto. A saliva contém proteínas, como lectina, apirase e D7, que apresentam propriedades antiangiogênica, imunomoduladora e anti-inflamatória (Sun *et al.*, 2020). Além disso, a transmissão pode ocorrer por via transovariana ou venérea, sendo esta primeira comumente associada à transmissão de flavivírus específicos de insetos (ISFs, do inglês *Insect-Specific Flaviviruses*) que limitam a infecção em artrópodes por flavivírus que infectam vertebrados (VIFs, do inglês *Vertebrate-Infecting Flaviviruses*), devido ao fenômeno denominado de exclusão de superinfecção (Peterson *et al.*, 2024).

O ciclo de transmissão depende de diversos fatores que transitam entre vetor, hospedeiro vertebrado e meio ambiente. A transmissibilidade vetorial é regulada por fatores extrínsecos, incluindo densidade e composição de populações de artrópodes e outras condições ambientais, que, a depender do grau de tolerância da espécie, podem impactar no contato entre o vetor e o hospedeiro vertebrado. Os insetos, por serem ectotérmicos, buscam microhabitats favoráveis para a sua sobrevivência, o que torna a temperatura um determinante fundamental na transmissão, especialmente no contexto de impactos ambientais. Diante desses efeitos, as temperaturas médias mais altas podem favorecer a transmissão viral, mas também comprometer o tempo de vida do vetor. Por outro lado, os fatores intrínsecos são, principalmente, características próprias dos hospedeiros invertebrados que estão intimamente relacionados à competência vetorial, reguladas pelo perfil genético e a capacidade do vetor para desenvolver infecção após o repasto sanguíneo, permitindo uma nova transmissão após apresentar carga viral suficiente (Hardy *et al.*, 1983; Gols *et al.*, 2021).

As Américas apresentam ampla disseminação de vetores responsáveis pela transmissão de arbovírus que circulam em ambientes silvestres, afetando acidentalmente os seres humanos com alta prevalência de anticorpos contra flavivírus. A degradação do ecossistema impulsiona a circulação de espécies de fêmeas de mosquitos do *gênero Aedes* e *Culex*. A evidência desses impactos está relacionada ao aumento de transmissão de doenças, muitas das quais apresentam sintomatologias inicialmente semelhantes. O destaque às infecções por ZIKV ocorreu devido aos casos de alterações no sistema nervoso central (SNC) e anomalias congênitas, assim como, mais recentemente, a doença febril aguda provocada pelo vírus Oropouche, pertencente à família *Peribunyaviridae* (Araújo *et al.*, 2019; Couto-Lima *et al.*, 2017; Lowe *et al.*, 2018; Das Neves Martins *et al.*, 2025).

A propagação das infecções causadas pelos flavivírus ILHV e ROCV é sustentada por ciclos de transmissão envolvendo principalmente aves silvestres, que acidentalmente afetam seres humanos. No caso do ILHV, os vetores identificados incluem *Culex coronator*, *Haemagogus spegazzinii*, *Sabethes chloropterus* e *Psorophora ferox*. Quanto ao ROCV, destacam-se os mosquitos *Psorophora ferox*, que vivem próximos a comunidades ribeirinhas, e outros insetos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, os quais estão presentes em diversos ecossistemas, sendo o *Aedes scapularis* considerado um possível vetor ponte entre os ambientes silvestres e peridomiciliares (Moura Reis; Nunes Neto, 2021; Saivish *et al.*, 2021).

A identificação de resultados sorológicos positivos em aves para o ILHV ocorreu principalmente em áreas não florestadas e envolveu espécies migratórias, residentes-migratórias e residentes. A espécie identificada como migratória foi *Amazilia versicolor* e as espécies residente-migratórias foram *Columbina talpacoti*, *Crotophaga ani*, *Myiophobus fasciatus*, *Elaenia chiriquensis*, *Thryothorus longirostris*, *Turdus rufiveniris* e *Sporophila caerulescens*. Além disso, as espécies residentes envolvem *Dysithamnus mentalis*, *Troglodytes aedon*, *Turdus albicollis*, *Passer domesticus*, *Geothlypis aequinoctialis*, *Thraupis sayaca*, *Ramphocelus bresilius*, *Tachyphonus coronatus* e *Zonotrichia capensis* (Ferreira *et al.*, 1994).

O vírus também foi identificado em primatas, os quais apresentaram anticorpos específicos para o ILHV em amostras de soro de *Alouatta caraya*. Apesar da grande diversidade de hospedeiros infectados, os mosquitos são as principais populações nas quais o vírus foi identificado em isolados, sendo os gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Psophora* e *Sabethes* reconhecidos pela transmissão de diversos arbovírus (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2017; Wanzeller *et al.*, 2023).

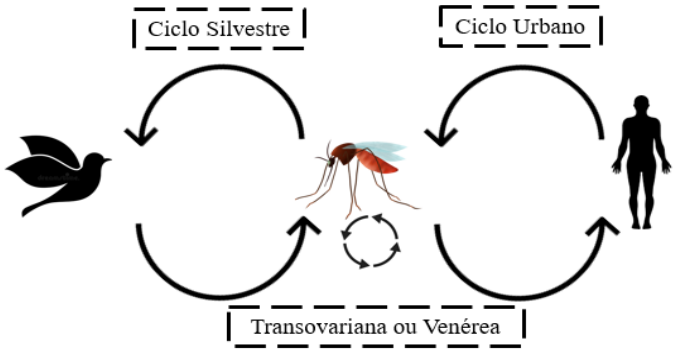
Os mosquitos apresentam uma grande diversidade de habitats e um variado comportamento alimentar, permitindo a existência de múltiplos ciclos de transmissão. O ILHV apresenta um grande potencial de alcance de espécies hospedeiras, as quais apresentam linhagens celulares com títulos de pico para o vírus. Esse contexto sugere que o potencial de propagação associado às infecções produtivas pode favorecer a emergência e provocar epidemias, especialmente em áreas de expansão de intervenção antrópica, aumentando o risco de transbordamento do vírus para populações humanas. Atualmente, infecções humanas são relatadas diante da apresentação de comprometimento do sistema nervoso com quadros de encefalite que sugere maior ampliação de medidas de vigilância (Plante *et al.*, 2024; Milhim *et al.*, 2020).

O ILHV circula em um ciclo de transmissão entre aves (residentes e migratórias) e mosquitos, além de já ter sido identificado, equinos, primatas não humanos (PNHs), preguiças, búfalos e humanos, com evidências em várias regiões da América Central e do Sul (Spence *et al.*, 1962; Iversson *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2001; Medlin *et al.*, 2016; Causey *et al.*, 1961).

Os casos de encefalite provocados pelo ROCV destacam a grande circulação do vírus em populações humanas em locais onde houve a captura de aves que apresentaram anticorpos contra o vírus. As aves migratórias (*Sporophila caerulescens* e *Turdus amaurochalinus*) favoreceram a dispersão viral entre os estados brasileiros e contribuíram com a hipótese de outros casos de circulação do ROCV em regiões amazônicas (Ferreira *et al.*, 1994). O vetor *Psorophora ferox* possui atração por seres humanos e pássaros selvagens, ampla distribuição geográfica e hábitos diurnos, revelando grande potencial de dispersão de infecção, responsável pelo surgimento de surtos em áreas com casos da doença (De Souza Lopes *et al.*, 1981).

A picada dos mosquitos pode afetar outros hospedeiros vertebrados, como cavalos e búfalos (*Bubalus bubalis*), importantes na manutenção do vírus. As espécies de animais presentes na Amazônia brasileira podem desenvolver infecção, o que indica um grande risco para populações humanas próximas à manutenção destes animais (Silva *et al.*, 2014; Casseb *et al.*, 2014). A grande probabilidade de circulação em várias áreas no Brasil destaca a importância de implementar métodos de diagnóstico eficazes para o rastreamento específico da doença, que pode ser responsável por graves complicações em pacientes infectados (Saivish *et al.*, 2020).

Figura 3- Representação do ciclo de transmissão silvestre e urbano de ILHV e ROCV

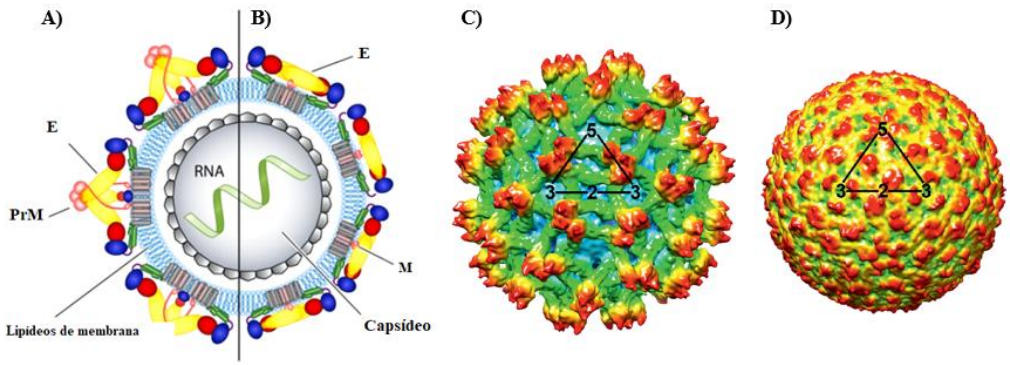


Fonte: Benjamin, 2026.

1.4 MORFOLOGIA E GENOMA DA FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE*

Assim como outros *Orthoflavivirus*, o ILHV e o ROCV se apresentam como partículas virais esféricas com cerca de 50 nm de diâmetro, contendo um genoma de RNA fita simples com polaridade positiva (ssRNA+) de 9,2–11,0 kb, o qual é responsável por codificar três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C, 11 kDa), a proteína do envelope (E, 50 kDa) e a proteína pré-membrana (prM, 26 kDa), em partículas de vírus imaturos, ou a proteína de membrana (M, 8 kDa), em vírus maduros (Figura 4). Ainda, são sintetizadas sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Simmonds, 2017; ICTV, 2024).

Figura 4 – Representação da estrutura da partícula viral imatura e madura de flavivírus.



Fonte: Adaptado de Kumar, 2019; ICTV, 2024; Simmonds, 2017.

Legenda: A) Representação esquemática da partícula dos vírus da família *Flaviviridae,* fase imatura. B) Representação esquemática da partícula dos vírus da família *Flaviviridae,* fase madura. C) Reconstrução crioeletrônica tridimensional de partícula imatura dos vírus da família *Flaviviridae*. D) Reconstrução crioeletrônica tridimensional de partícula madura dos vírus da família *Flaviviridae*.

O genoma viral apresenta apenas um único quadro de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*), flanqueado por duas regiões não traduzidas (UTRs, do inglês *untranslated*

regions) 5’ e 3’, sendo que a região 5’UTR com cerca de 100 nucleotídeos (nt) de comprimento e, a 3’UTR, 350 a 700 nt. Com a internalização viral, o RNA de sentido positivo é utilizado como mRNA para a tradução de poliproteínas que darão origem a proteínas maduras após a clivagem pós-traducional (Rice *et al.*, 1985).

O processo de replicação envolve sequências complementares 5’ e 3’ localizadas, respectivamente, na região 5´UTR com loops de haste 5´ A (5´SLA) e B (5´SLB) e na região 3'UTR, próxima à estrutura haste-alça altamente conservada (3’SL, do inglês 3′ *stem–loop*). Essas regiões são importantes para o reconhecimento da replicase, possibilitando a síntese de moléculas de RNA em comprimento total (Lodeiro; Filomatori; Gamarnik, 2009; Hahn *et al.*, 1987; Comolli, 2002; Shi *et al.*, 1996). A ciclização do RNA após a formação do complexo de replicação permite que os ribossomos passem pela totalidade do genoma para a produção de fita negativa e sejam liberados sem conseguir se religarem no terminal 5’ para iniciar um novo ciclo. Contudo, o molde de RNA fita positiva é produzido com maior frequência no processo de infecção, sendo transportado para o local de replicação de membrana devido às características hidrofóbicas (Proutski, 1997; Chu; Westaway, 1987; Chu; Westaway, 1992).

A região 5’UTR apresenta extremidades menores responsáveis pela modulação da iniciação da síntese tanto de fita positiva quanto de fita negativa. Além disso, o 3’UTR é responsável pela mobilização da maquinaria de replicação para a síntese de fita negativa, que precisa estar associada a um elemento de sequência conservada (CSE, do inglês *conserved sequence element*) que compõe uma região promotora para posteriormente haver a transcrição do mRNA. O mesmo CSE está também presente na extremidade 5’, destacando um papel fundamental na síntese de RNA fita negativa (Frolov; Hardy; Rice, 2001; Levis; Schlesinger; Huang, 1990).

As sequências 5’UTR formam estruturas secundárias que apresentam uma haste com uma pequena alça superior e uma alça lateral maior. A estrutura adicional de haste e laço forma a região de códon de iniciação de tradução, sendo que a trilha oligo (U) atua na modulação da síntese de RNA, pois o RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, do inglês RNA-dependent RNA polymerase) necessita de uma sequência de nucleotídeos para a interação com o elemento promotor. A alça lateral é constituída por 3'-terminais do NCR 5’ que inclui também o códon de iniciação da ORF (Brinton; Dispoto, 1988; Filomatori *et al.*, 2011; Villordo; Gamarnik, 2009).

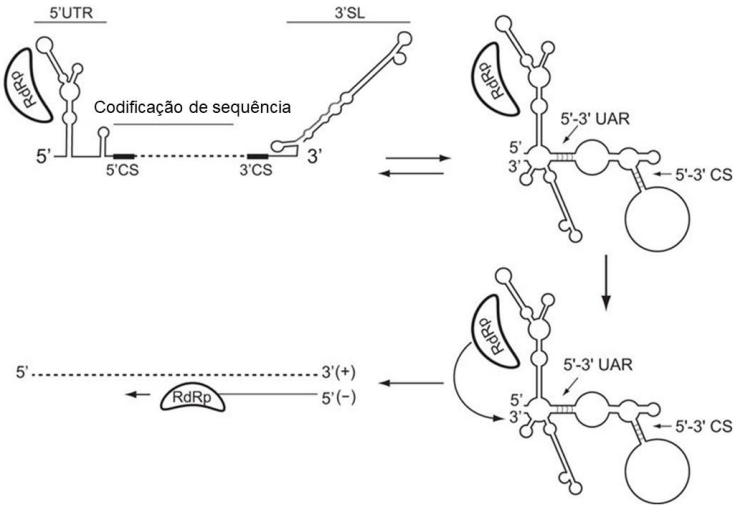
A estrutura secundária do UTR 3’ apresenta uma haste-alça menor e uma haste-alça longa denominada 3’ haste-alça (3’SL, do inglês *stem-loop*). Os 3’SL são regiões conservadas essenciais para a liberação de sinais de reconhecimento e ligação da polimerase viral, além de

sequências de ciclização (Brinton; Fernandez; Dispoto, 1986; Zeng; Falgout; Markoff, 1998). O SL 3’ apresenta elementos promotores de RdRP empregam um molde de fita dupla para iniciar a fita positiva assimétrica semiconservativa (Khromykh *et al.*, 2003). O início da síntese negativa requer a cauda poli (A) 3’, onde um complexo de ribonucleoproteína (RNP) interage com a proteína de ligação poli (A) na extremidade do RNA viral, permitindo a circularização e dando início à síntese da fita negativa (Figura 2) (Herold; Andino, 2001).

O pentanucleotídeo 5'-CACAG presente no 3’-terminal apresenta grande relevância na ligação de proteínas celulares ou virais nas estruturas de haste e alça 3’ conservada na replicação nas estruturas de haste e alça 3’ conservada (Khromykh *et al.*, 2001). As regiões conservadas são essenciais para a liberação de sinais de reconhecimento e ligação da polimerase viral, além de sequências de ciclização (Brinton; Fernandez; Dispoto, 1986; Zeng; Falgout; Markoff, 1998).

A sequência de ciclização (CYC, do inglês *cyclization sequence*) está incluída na região da sequência conservada CS1 para permitir ciclização e replicação, sendo importante na modulação das atividades da RdRp, mas não regula a tradução viral (You; Padmanabhan, 1999). Além disso, cópias da segunda sequência conservada CS2 e repetições de CS2 (RCS2) são encontradas em alguns flavivírus, assim como de CS3 e repetições de CS3 (RCS3), facilitando a replicação (Lo *et al.*, 2003). A ciclização promove a aproximação do complexo polimerase-promotor para o local de início 3’ e favorece a conformação adequada da extremidade durante este processo para a síntese de RNA (Figura 5) (Chen; Patton, 1998; Zhang; Zhang; Simon, 2004).

Figura 5– Modelo de interação RNA-RNA para iniciação da síntese de RNA pela polimerase.



Fonte: Villordo; Gamarnik, 2009.

Legenda: A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral se liga ao promotor 5’ do genoma. A ciclização do genoma ocorre por meio de interações RNA-RNA, que aproxima a extremidade 3’ ao complexo da polimerase por meio do elemento 3’SL, utilizando como molde para a síntese da fita negativa de RNA.

1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DOS FLAVIVÍRUS ILHV E ROCV

As infecções por flavivírus são uma grande preocupação no mundo todo, sendo de grande importância a compreensão de sua biologia. As interações moleculares que permitem a invasão do vírus na célula revelam a interação de receptores celulares na internalização dos vírus. Mediante a interação dos receptores, destaca-se a atividade da glicoproteína E, a qual permite o reconhecimento e fixação na superfície celular, importante facilitadora na interação posterior com receptores endocíticos (Perera-Lecoin *et al.*, 2013).

O início da infecção viral é mediado pela interação entre o vírus e a célula, realizado por meio do contato de glicoproteínas que promovem a concentração do vírus na superfície da célula e a interação da proteína E juntamente com os fatores de entrada. O processo de invasão ocorre por adesão mediada por moléculas celulares específicas, como os glicosaminoglicano, receptores não integrina específica para células dendrítica e outras glicoproteínas, as quais interagem com locais de glicosilação presentes na proteína E, desencadeando a transdução de sinal e a regulação dos linfócitos ao permitir o escape do sistema imunológico, determinantes para a replicação do vírus (Hu *et al.*, 2021a; Ishida *et al.*, 2023; Quong; Romanow; Murre, 2002).

A proteína prM também faz parte da composição estrutural da partícula viral imatura, estando ligada à proteína E. O dobramento adequado da proteína E é essencial para a formação do complexo prM-E, mas algumas substituições aminoacídicas em especial podem interferir na conformação da proteína de envelope, afetando o processo de replicação viral. Durante a maturação da partícula, a proteína prM é clivada pela furina, o que libera uma porção M na região C-terminal e a porção pr na região N-terminal, esta última se dissociando do vírus após a exocitose. A proteína E é dobrada em uma estrutura barril β central, uma região alongada altamente conservada com domínio de fusão hidrofóbico e um barril β semelhante à imunoglobulina com receptores de ligação celular presentes. Essas estruturas são categorizadas em domínio I (DI), domínio I (DII) e domínio III (DIII), respectivamente. Os três domínios adotam uma organização estrutural em formato de espinha de peixe que se alinha ao padrão icosaédrico, apresentando duas dobras estruturais (Dejnirattisai *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2004).

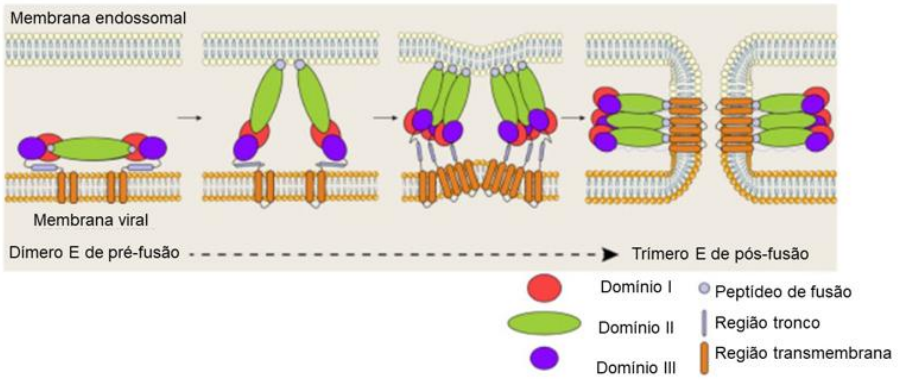
A ligação da proteína E aos receptores presentes na membrana plasmática da célula hospedeira desencadeia o processo de endocitose mediada por clatrina seguido pela reação de

fusão do envelope viral com a membrana endossomal. O RNA viral é então liberado no citoplasma, iniciando a transcrição e, posteriormente, a tradução de uma poliproteína nos ribossomos. Essa poliproteína é responsável pela formação de todas as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Complexos de replicação são formados no retículo endoplasmático, onde o genoma viral é replicado e as proteínas virais são sintetizadas para a montagem da progênie, permitindo a disseminação e replicação desses flavivírus em novas células hospedeiras (Morita; Suzuki, 2021).

O peptídeo de fusão presente em DII é exposto pela separação do dímero E, devido ao baixo pH endossomal, inserindo-se na membrana alvo. Enquanto isso, o DIII sofre variações e gira em contato trimérico, proporcionando a dobra em direção ao peptídeo de fusão localizado na porção C-terminal que forma o poro de fusão para, posteriormente, liberar o genoma viral no citosol. A histidina conservada, localizada entre DI e DIII, atua como um sensor de baixo pH que promove mudanças de interações dos domínios para a projeção externa do peptídeo de fusão, enquanto também estabiliza o trímero formado (Figura 6) (Fritz; Stiasny; Heinz, 2008; Villalaín, 2023).

Os vírions realizam uma rotação dos monômeros E na região de dobradiças, que são delimitadas por DI e DII, necessárias para mobilizar o peptídeo de fusão em direção à membrana celular do hospedeiro (Figura 6). O movimento é auxiliado pela presença de glicinas entre estes dois domínios, o que favorece a transição conformacional da proteína de um dímero para um trímero. A região possui resíduos conservados para a manutenção da estrutura e função da proteína E, no entanto mutações nesses resíduos podem afetar a reatividade dos anticorpos neutralizantes, assim como em outros epítopos alvos da proteína E (Haslwanter *et al.*, 2022; Maloney *et al.*, 2023).

Figura 6 – Esquema do processo de fusão dos dímeros da proteína E em pH baixo.



Fonte: Hu *et al.*, 2021a.

Os vírions imaturos apresentam morfologia pontiaguda, enquanto as partículas maduras possuem conformação mais esférica (Anastasina *et al.*, 2024). A transição conformacional é realizada pela clivagem da proteína prM, a qual envolve o peptídeo de fusão em DII, protegendo-o do meio ácido proporcionado pelo RTG durante a realização da exocitose da partícula, protegendo-o da mudança conformacional permanente. A dissociação em pr e M, mediada pela furina, promove o movimento do dímero, incluindo o peptídeo de fusão, mais externamente (Stadler *et al.*, 1997). O pH baixo realiza a protonação das histidinas localizadas nas proteínas prM e E, o que gera repulsão entre M e E, enquanto ocorre atração entre peptídeo pr e E para expor o local de clivagem da furina (Zheng *et al.*, 2014).

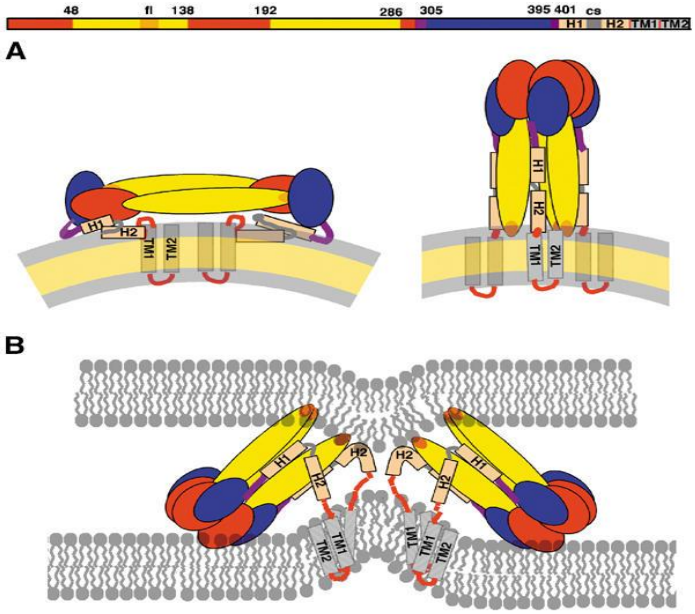
O peptídeo de fusão fica acessível em DII, devido à liberação de pr em pH neutro, anteriormente ligado na extremidade de DII para proteger da reação ao pH baixo do rTG (Zheng; Umashankar; Kielian, 2010). A suscetibilidade à clivagem de prM na partícula imatura está associada à mudança conformacional da proteína, em pH neutro e abaixo, pelos resíduos de histidina protonados, favorecendo a realização da proteólise (Anastasina *et al.*, 2024).

A região do tronco apresenta hélices 1 e 2 (H1 e H2), de natureza anfipática, que ficam planas sobre a membrana e são levemente carregadas positivamente, conectadas por uma sequência conservada, podendo conferir estabilidade ao ectodomínio de E (Allison *et al.*, 1999). A polaridade dessas moléculas permite que, em um ambiente de pH mais baixo, ocorra a elevação do rearranjo das hélices. A conformação de H1 permite a estabilidade do trímero em DII, onde a H1 se encaixa dando aparência de "tripé" em uma conformação aberta e uma interação lateral entre trímero por meio de interações de peptídeos de fusão, levando à formação de um anel de cinco trímeros associados que desestabiliza a membrana alvo. A estrutura H2 sofre variação de orientação, permitindo a aproximação dos peptídeos de fusão e dos segmentos TM para forçar a abertura do poro de fusão (Figura 7). No processo de interação com a membrana alvo, a H2 acomoda a mudança de simetria intermediária e o posterior fechamento desta hélice forçará a abertura do poro de fusão (Bressanelli *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2004).

A região de âncora transmembrana está associada a um par de hélices em espiral antiparalela, que se ancoram em E e em M, além de esta última apresentar uma hélice α, que não penetra o nucleocapsídeo. A região transmembrana possui uma grande quantidade de resíduos polares, estando inseridas na porção polar dos fosfolipídios da membrana (Zhang *et al.*, 2003). A interação entre H2 e a porção TM1 da proteína E apresenta continuidade de hélice α até a extensão C-terminal, permitindo uma atividade fundamental na estabilização do hemodímero prM-E que confere suporte estrutural para a funcionalidade do complexo proteico

(Allison *et al.*, 1999). Além disso a TM2, apresenta atividade de sequência de sinal para a proteína não estrutural NS1 (Rice *et al.*, 1996).

Figura 7 - Estrutura intermediária responsável pela fusão de membrana alvo e viral.



Fonte: Bressanelli *et al.*, 2004.

Legenda: (A) Representação da estrutura da proteína E em pH neutro (à esquerda) e a mudança conformacional após a fusão (à direita). (B) A H1 estabiliza DII em uma conformação aberta, permitindo a formação de trímero pelos laços de peptídeo de fusão. A estrutura H2 acomoda a mudança de simetria que atua como amarra às regiões TM e, ao se fechar, esta hélice força a abertura do poro de fusão.

A proteína NS1 intensifica a clivagem de C4 em C4b que permite a redução de resposta dessas vias com implicações funcionais da via clássica e lectina. Além disso, a interação da proteína com C1 e C4 contribuem na redução da deposição de C3b e C4b nas partículas, e consequentemente a redução da neutralização mediada por complemento (Avirutnan *et al.*, 2010). A expressão de NS1 no retículo endoplasmático (RE), a qual se insere na membrana, permite a agregação perinuclear, resultando em estruturas semelhantes ao compartimento de replicação. Ao se ligar ao folheto interno da membrana, a proteína NS1 permite a alteração da curvatura da membrana por meio de *loops* flexíveis que induzem a invaginação do retículo para a realização da formação do complexo de replicação e síntese do RNA (Ci *et al.*, 2020).

A protease NS2B/NS3 é uma serina semelhante a tripsina. A proteína NS3 possui um domínio de protease ativo para a clivagem de locais não estruturais da poliproteína. De forma complementar, NS2B atua de forma concomitante para esta clivagem em regiões representadas entre NS2A/NS2B, NS3/NS4A e NS4B/NS5. Esse mecanismo de clivagem requer a associação combinada da atividade de protease de NS2B e NS3 (Figura 8) (Falgout *et al.*, 1991; Chambers; Grak Oui; Rice, 1991; Lin *et al.*, 1993). A proteína NS2B apresenta três domínios hidrofóbicos

e um domínio hidrofílico responsáveis por induzir mudança conformacional de NS3 para a sua ativação sem comprometer a estabilidade da desta proteína (Benzaghou *et al.*, 2006 Erbel *et al.*, 2006).

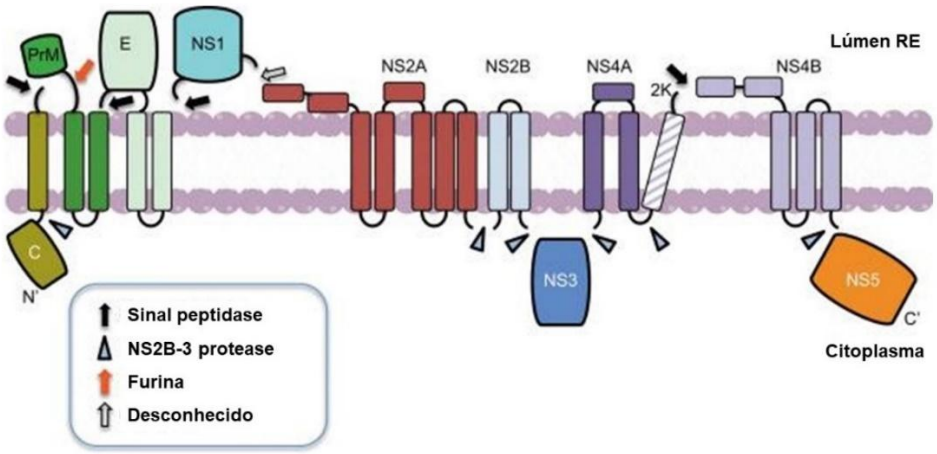
A estabilidade das moléculas de mRNA é crucial para a tradução por meio da estrutura *cap* presente no ácido nucleico (Shuman, 2000). Para isso, a proteína NS5 possui o papel de RNA guanililtransferase (GTase), onde o guanosina trifosfato é utilizado como substrato que gera um intermediário GMP-enzima, estimulada a formação pela atividade da proteína NS3. O domínio metiltransferase (MTase) de NS5 permite a atividade de reação da GTase. A enzima é responsável por sintetizar o componente *cap* metilada na presença de NS3. A fita de RNA positiva reage com a RNA trifosfatase (RTase) de NS3 e remove o gama-fosfato do RNA que interage com o domínio MTase-GTase de NS5. Essa associação intensifica a atividade de GTase que gera a oferta de guanosina monofosfato ao RNA e a produção do transcrito com *cap* (Issur *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que a montagem da partícula viral é realizada pela proteína NS2A, que induz a formação de membranas específicas do vírus, de forma complementar à NS4A e recruta C-prM-E, NS2B/NS3 e RNA viral para o local de montagem. As moléculas podem ser recrutadas e montadas por oligomerização da proteína NS2A, onde NS2B/NS3 realiza a clivagem de C-prM-E para a produção de proteínas estruturais (Lobigs; Lee, 2004; Amberg; Rice, 1999; Zhang *et al.*, 2016). Posteriormente, o nucleocapsídeo é formado pela associação de proteínas C presentes em gotículas lipídicas ao redor, as quais podem controlar a disponibilidade dessas proteínas para a montagem da partícula. As propriedades básicas da proteína permitem que elas sejam armazenadas nessas gotículas, sendo esta característica também presente em mosquitos, o que se pode descrever como uma manutenção evolutiva de organelas de replicação viral. Diante disso, o RNA viral pode interagir com a superfície das gotículas onde estão presentes as proteínas C para a formação do nucleocapsídeo que posteriormente será envolvido pelas proteínas prM e E, brotando do RE (Samsa *et al.*, 2009).

A infecção por flavivírus induz a formação de dobramentos de membranas típicos, sendo realizado pela proteína NS4A a partir da clivagem pela protease NS2B-3 no sítio 4A-2K. Esse mecanismo permite a liberação de NS4A, que resulta em modificações de membrana para a constituição reticular de vesículas e o direcionamento desta proteína para o local de replicação permite visualizar a presença de membranas e proteínas do trans-Golgi que são cruciais durante a infecção. A proteína não estrutural NS4A, portanto, induz grandes extensões de modificações de membranas citoplasmáticas na presença do domínio C-terminal 2K, além de permitir a migração de proteínas NS4B para o núcleo (Roosendaal *et al.*, 2006).

A proteína NS4B apresenta grandes associações com proteínas de replicase viral e do hospedeiro que participam do processo de replicação do vírus. A glicosilação N-terminal é determinante para promover a atividade biológica desta proteína e a interação com outras envolvidas na replicação do vírus, como NS1 no vírus Nilo Ocidental (WNV) e interação com NS4A do vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (Naik; Wu, 2015; Youn *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). A sua distribuição no RE permite a reorganização da organela, promove a mudança de conformação da curvatura, proliferação de fábricas de replicação e escape da resposta imune, como a alteração da mudança conformacional de mitocôndrias e sinalização por meio de IFN-1, grânulos de estresse, interferência de RNA e resposta às proteínas dobradas (Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Zmurko; Neyts; Dallmeier, 2015).

Figura 8 – Representação do processamento da poliproteína de flavivírus.



Fonte: Apte-Sengupta; Sirohi; Kuhn, 2014.

Legenda: A poliproteína é clivada por proteases celulares e virais. Os domínios transmembranas são indicados por cilindros e laços de conexão representados por linhas. Setas pretas, azuis e vermelhas indicam pontos de clivagem.

A replicação dos flavivírus envolve uma rede estendida de membranas modificadas do RE. O processo envolve cerca de três estruturas membranosas distintas nas células hospedeiras: pacotes de vesículas (PVs), vesículas de membrana (VMs) e membranas convolutas (MCs). Os PVs envolvem pequenos aglomerados de VMs derivados a partir da modificação de membrana do RE e utilizados como locais de replicações dos vírus. As VMs consistem em estruturas conectadas ao citoplasma das células, onde possibilita a troca de moléculas com o ambiente celular. As MCs são possíveis locais de replicação, tradução e processamento de poliproteínas

virais, além de serem importantes para o armazenamento de proteínas dos vírus (Bienz *et al.*, 1992; Mackenzie; Jones; Young, 1996; Grief *et al.*, 1997).

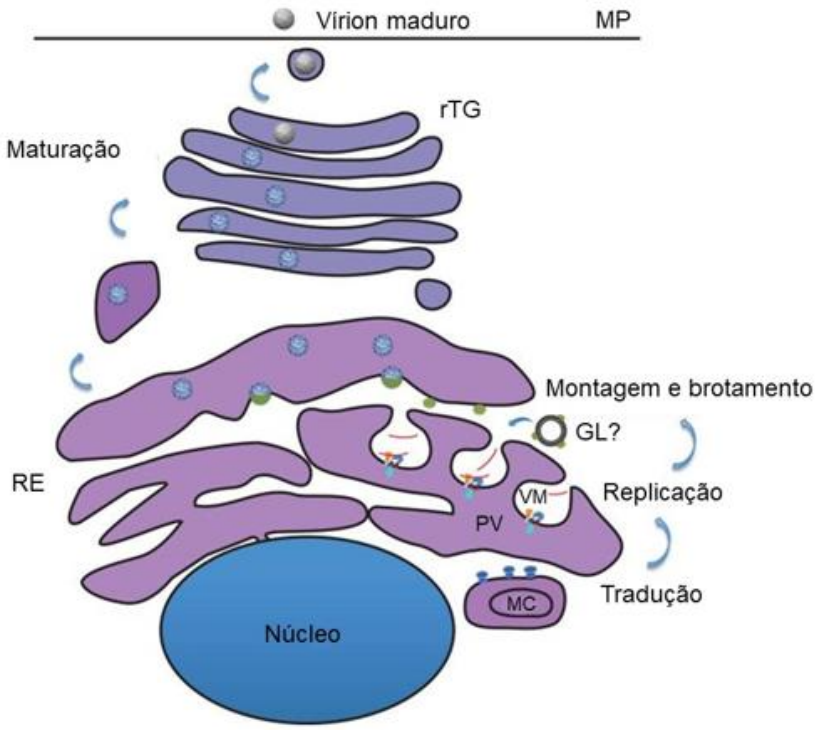
As MCs apresentam a localização no complexo de protease NS2B-NS3 juntamente com NS4A. Essas estruturas membranosas se originam no compartimento intermediário e no RE rugoso. Por outro lado, o PV deriva de membranas da rTG e nele foram identificadas as proteínas NS1, NS3, NS2A e NS4A (Mackenzie *et al.*, 1998). A clivagem da peptidase de sinal ocorre no lúmen do RE, enquanto as realizadas pela protease viral ocorrem em MCs, onde a proteínas de forma individual permanecem dentro destas vesículas e outras migram para o núcleo e são transportadas por PVs para a replicação do genoma (Chambers; Grakoui; Rice, 1991; Westaway *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1998).

A modificação de membrana para a formação de estruturas importantes para a replicação viral pode ser influenciada por diversos fatores. Entre eles, destacam-se mudanças na composição lipídica proporcionadas pela curvatura da membrana, perfil de proteínas presentes na membrana, a ação de proteínas do citoesqueleto e motores de microtúbulos. A organização funcional da membrana ocorre por meio de hélices anfipáticas e superfícies côncavas de proteínas que apresentam hélices anfipáticas, que possuem regiões a-helicoidais com uma face polar carregado e outra hidrofóbica, permitindo a associação com os dois folhetos de membrana (Antonny, 2006; Mcmahon; Gallop, 2005). Alguns lipídios, como ácido lisofosfatídico e o ácido fosfático, proporcionam uma curvatura negativa espontânea da monocamada, enquanto enzimas flipase podem realizar a estruturação assimétrica, as quais geram a reorganização de membrana durante a infecção ao permitir a translocação de fosfolipídeos ao longo da membrana e estimular um sinal específico por *flip-flop* rápido (Kooijman *et al.*, 2003; Devaux *et al.*, 2008)

As VMs ou esférulas são características comuns a diversas famílias virais, mas as origens podem derivar do RE, das mitocôndrias, peroxissomos ou membranas do trans-Golgi a depender do sistema que está associado ao processo de replicação (Spuul *et al.*, 2010; Miller; Krijnse-Locker, 2008; Offerdahl *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2008). A importação do material necessário ocorre por meio de poros conectados ao citosol para a replicação e a mobilização dos componentes necessários que são regulados por meio das vesículas de membrana ao permitir a transição do genoma recém-sintetizado para a realização da tradução das proteínas utilizadas na montagem do vírus. Ao ser enviado para a região de tradução, o material genético permite a formação do nucleocapsídeo, que ocorre próxima às áreas de brotamento viral (Figura 9). A destinação para o ambiente extracelular é realizada pela via secretora por translocação co-traducional do RE, posteriormente por intermediários vesiculares do RE em direção ao complexo de Golgi e finalizando no meio extracelular (Miller; Krijnse-Locker, 2008). As

partículas maduras são encaminhadas para o complexo de Golgi, onde a proteína prM presente é clivada pela furina, permitindo a maturação do vírus (Welsch *et al.*, 2009; Shapiro *et al.*, 1997).

Figura 9 – Esquema de replicação e montagem da partícula viral.



Fonte: Apte-Sengupta; Sirohi; Kuhn, 2014.

Legenda: MC: Membranas Convolutas, GL: Gotículas Lipídicas, RE: Retículo Endoplasmático, MP: Membrana Plasmática, rTG: Rede Trans-Golgi, PV: Pacotes de Vesículas, VM: Vesículas de Membrana.

O material genético dos flavivírus é formado por RNA de fita positiva, polaridade semelhante ao mRNA. Este perfil permite que o material genético seja traduzido pela célula hospedeira para a formação de uma poliproteína que será clivada em múltiplas proteínas estruturais e não estruturais por proteases virais. Após a síntese dessas proteínas, o RNA fita simples é convertido em fita dupla (dsRNA) para atuar como molde transcricional da replicação do vírus próximo ao núcleo. O poro de VM funciona para secretar o RNA recém-sintetizado para o encontro das proteínas C, E e prM, sendo envolvidos pela membrana RE (Junjhon *et al.*, 2014). A formação das estruturas que envolvem a replicação viral depende da interação entre NS1 com NS4A-2K-4B para a compacidade de flexão de membrana, sendo que a proteína NS1 apresenta grande afinidade por lipídeos, os quais são recrutados para o local de replicação (Płaszczyca *et al.*, 2019).

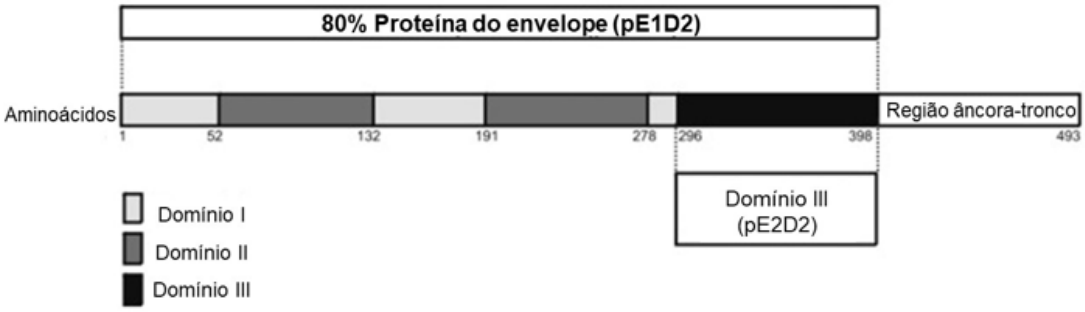
1.5.1 Papel da Proteína E na Infecção do ILHV e ROCV

A proteína E desempenha um papel crucial como o principal alvo para os anticorpos neutralizantes, sendo fundamental na indução de uma resposta imunológica protetora contra os vírus do gênero *Orthoflavivirus*. Ela é capaz de gerar não apenas anticorpos neutralizantes, que bloqueiam a capacidade do vírus de infectar células, mas também anticorpos não neutralizantes, que, embora não possam impedir a infecção, interagem com outros vírus do mesmo gênero. Esse fenômeno está relacionado à presença de sítios antigênicos específicos na proteína E, que são comuns entre os diferentes *Orthoflavivirus*. Esses sítios antigênicos, localizados nos três domínios estruturais da proteína E, são essenciais para a neutralização do vírus (ICTV, 2024).

A proteína E é a principal proteína presente na superfície do vírion responsável pela interação com receptores e fusão de membrana. Essa proteína de fusão pertence à classe II e atua em ssociação com a proteína prM (Russell; Dalrymple; Johnston, 1989). O amadurecimento proteico ocorre mediante o Golgi e rTG, em baixo pH, permitindo a mudança conformacional da proteína de fusão e a exposição da região sensível a furina em prM. A porção pr é clivada de M ao ocorrer o retorno do pH neutro quando a partícula emerge para posteriormente invadir uma nova célula com o retorno à diminuição do pH, a qual irá mediar a liberação do genoma viral (Harrison, 2015).

A estrutura da proteína E é rica em folhas-β, que permitem a formação de homodímeros formados por monômeros DI, DII e DIII do ectodomínio (Figura 10). O domínio I é crucial para as mudanças conformacionais da cadeia polipeptídica; o domínio II apresenta, em sua extremidade, o peptídeo de fusão; e o domínio III contribui para a estabilidade da proteína. Um bolso hidrofóbico formado por DI e DIII permite a ligação da porção pr. As regiões de haste e transmembrana C-terminal participam na montagem do vírion e interação com a proteína prM. Em disposição paralela ao plano da membrana, encontram-se α-hélices anfipáticas importantes na estabilização de partículas virais. Dentre as suas funções, a proteína E influencia a virulência, morfogênese e neuroinvasão (Hu *et al.*, 2021a).

Figura 10 – Representação esquemática da estrutura primária da proteína de E.



Fonte: Azevedo *et al.*, 2011

Os três domínios supracitados constituem o ectodomínio da proteína E e são reconhecidos por anticorpos neutralizantes, que inibem a entrada viral. Estudos evidenciam o efeito protetor de linfócitos T, sendo que as células T $CD8^+$ estão muito presentes em infecções persistentes no SNC e as células T $CD4^+$ auxiliam no controle da infecção, estimulando as respostas das células B. Estas últimas, por sua vez, possuem grande relevância no reconhecimento diferencial de flavivírus, com grande impacto em estudos de soroprevalência e medidas de vacinação (De Filette *et al.*, 2014; Amrun *et al.*, 2019).

Os domínios I, II e III apresentam grandes induções de resposta imune do hospedeiro. A região do ectodomínio se mostra mais vantajosa na produção vacinal, uma vez que a extremidade C-terminal possui característica mais hidrofóbica, interferindo na secreção da proteína (Henchal *et al.*, 1985; Shin *et al.*, 2022).

1.6 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR ILHV E ROCV

Os flavivírus compartilham manifestações clínicas semelhantes entre si e com outros arbovírus. No caso do ILHV, essas manifestações incluem casos subclínicos, doença febril grave e encefalite, resultando em comprometimento do SNC. Os sintomas abrangem fadiga, prostração, pirexia, calafrios, cefaleia, fotofobia, diplopia, dor retrocular, vertigem, edema facial, erupções cutâneas e edema de gânglios axilares, cervicais e inguinais, além de náuseas, vômitos, diarreia e sintomas respiratórios (Moura Reis; Nunes Neto, 2021). Similarmente, o ROCV também está associado a distúrbios neurológicos, seguido por manifestações clínicas como febre, vômito, letargia, dor de cabeça intensa, tontura, fotofobia e fraqueza nos membros inferiores (Amarilla *et al.*, 2017).

A infecção por ILHV e ROCV apresenta uma série de sintomas comuns, onde ambas as infecções podem levar ao comprometimento do SNC e apresentar manifestações clínicas como febre alta, dor de cabeça intensa, cansaço extremo, fraqueza nas extremidades, fotofobia, dor retroocular, vertigem, edema facial, erupções cutâneas e linfadenopatia (Nassar *et al.*, 1997; Venegas *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2019; Spence *et al.*, 1962).

Nos casos mais graves, tanto no ILHV quanto no ROCV, o comprometimento do SNC pode resultar em falta de resposta excessivamente profunda, coma, convulsões e complicações respiratórias (Lopes *et al.*, 1978; Iversson, 1980, Saivish *et al.*, 2020; Iversson *et al.*, 1989; Rosemberg, 1980). No ILHV, pode ainda haver o comprometimento cardíaco (Nassar *et al.*, 1997).

O período de incubação do ILHV é curto (Pinheiro *et al.*, 1986), enquanto o ROCV apresenta período de incubação mais longo, que varia de 7 a 14 dias, e a doença pode levar a

sequelas neurológicas e neuropsiquiátricas em 20% dos pacientes, com dificuldades de coordenação motora, distúrbios sensoriais na visão, audição e olfato, além de desequilíbrio, dificuldades para engolir, incontinência urinária e falhas de memória (Lopes *et al.*, 1978). Em ambos os casos, a taxa de letalidade pode ser significativa, sendo que, no ROCV, a mortalidade atinge 13% dos indivíduos cometidos (Rosemberg, 1980).

Os estudos histopatológicos para o ILHV revelaram presença de leptomeningite, edema leve e congestão, seguida de reação inflamatória no cérebro de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*). Diante dessas alterações, foram evidenciadas o aumento da área de neurônios acidófilos ou necrose celular. Outros órgãos foram afetados, como o fígado, onde houve intensa tumefação celular em zonas médio-zonais e região periportal; o baço apresentou hiperplasia folicular na polpa branca, enquanto a polpa vermelha apresentou congestão seguida de aparecimento de macrófagos e, nos rins, foi identificada congestão focal intertubular, o que evidencia progressão da lesão diante do tropismo por diferentes órgãos (Azevedo *et al.*, 2010).

Nas infecções causadas por ROCV, os vírions são encontrados no lúmen de organelas citoplasmáticas membranosas, como o complexo de Golgi e o RE, além de em vesículas intracitoplasmáticas e no envelope nuclear de forma dispersa, proporcionando hipertrofia das organelas citadas. A presença do vírus no SNC, após cruzar a barreira hematoencefálica está associada a quantidades significativas de infiltrados inflamatórios, incluindo linfócitos, células assassinas naturais (NK; do inglês, *natural killers*), neutrófilos, monócitos e macrófagos, particularmente na medula espinhal e no cérebro. Essa infiltração está associada ao desenvolvimento de paralisia aguda dos membros flácidos e, em casos mais graves, resulta em morte do hospedeiro (De Barros *et al.*, 2011).

As citocinas do tipo Th1 IFN-γ e IL-1β foram detectadas, sendo responsáveis pela produção de óxido nítrico e peróxido com maiores chances de perda neuronal (Ghoshal *et al.*, 2007). A produção de IFN-γ esteve associada, em estudos com modelo animais para WNV, a maiores viremias em tecidos linfoides e disseminação mais rápida para o cérebro e medula, gerando maior mortalidade (Shrestha *et al.*, 2006). Além disso, as citocinas do tipo Th2 IL-4, IL-10 e TGF-β são correlacionadas ao início de meningoencefalomielite, por agir com um mecanismo de *feedback* negativo para citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e TNF-α. Diante disso, a reação inflamatória no SNC promove o aparecimento de lesões tissulares com morte celular proporcionada pela indução de produção de citocinas a partir de células gliais e macrófagos, além do aumento de células produtoras de caspase 3, como neurônios e células linfomononucleares e endoteliais em diferentes áreas do SNC (Abbas; Lichtman, 2005; De Barros *et al.*, 2011).

As células gliais e macrófagos ativados induzem a apoptose por meio da sinalização de citocinas que, posteriormente, pode levar à necrose, sugerindo um papel fundamental das respostas dos macrófagos na patogênese da infecção. A proteína inflamatória de macrófagos 1α (MIP-1α) interage com o receptor de quimiocina CCL5 (CCR5), desempenhando atividade significativa no recrutamento de células inflamatórias para o cérebro que podem estar infectadas, determinando a gravidade da doença (Chávez *et al.*, 2013a). Por outro lado, os monócitos migram para o SNC por meio da interação entre o CCL2 e CCR2. Estudos destacam que o CCL2 no sangue e no cérebro em infecções por ROCV resulta no aumento da infiltração de macrófagos e linfócitos T $CD8^+$ no tecido cerebral (Amarilla *et al.*, 2019).

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO ILHV E ROCV

O diagnóstico laboratorial do ILHV e ROCV pode ser realizado por técnicas sorológicas, virológicas e moleculares (Clarke *et al.*, 1958; Pinheiro, 1983). É importante ressaltar que o tempo de doença é um fator crucial na detecção viral e/ou anticorpos contra o vírus. Para tanto, para ensaios sorológicos, preconiza-se o tempo de doença em fase aguda e convalescente e, em ensaios virológicos e moleculares, o tempo de doença em fase aguda. Cada tempo de doença será, então, estimado de acordo com o espécime a ser utilizado em cada metodologia, como análises em amostras de soro, LCR, tecidos, sangue e, em alguns casos, plasma (Karabatsos, 1985; BRASIL, 2024).

As investigações precisas de arbovírus em áreas endêmicas são fundamentais para fortalecer a vigilância e combater os efeitos debilitantes da doença. O diagnóstico para arbovírus é um grande desafio, devido à complexidade na execução dos exames laboratoriais, semelhanças na sintomatologia e possibilidade de reações cruzadas em testes sorológicos. Para uma detecção viral mais específica e diferenciação dos tipos virais, os testes demandam uma combinação de métodos tradicionais baseados em técnicas sorológicas, juntamente com análise molecular, como transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), *nested* RT-PCR, RT-PCR em tempo real e novos biossensores, mas nem sempre esses métodos estão disponíveis em centros médicos e laboratórios especializados (Mizuta *et al.*, 2019; Argondizzo; Silva; Missailidis, 2020).

A aplicação de métodos sorológicos para arbovírus pode ser desafiador, devido às relações sorológicas que favorecem reatividade cruzada, as quais podem ser verificadas por testes sorológicos como ELISA-IgM, ELISA-IgG e teste de IH, que utilizam anticorpos monoclonais e policlonais. O teste de neutralização por redução em placa (PRNT) pode ser utilizado como teste confirmatório para resultados de IH. O teste de neutralização e o teste de

fixação do complemento podem ser empregados para identificar vírus do gênero *Orthoflavivirus* antigenicamente mais próximos, embora não cheguem a distinguir as espécies (BRASIL, 2024; Casseb *et al.*, 2014; ICTV, 2024).

A técnica de isolamento viral pode ser realizada mediante cultura de células de mosquitos *Aedes albopictus* (C6/36), de células epiteliais de rim de macaco verde africano (Vero) e/ou em camundongos *Swiss* albinos recém-nascidos, para detecção de ILHV e ROCV (BRASIL, 2024). Já por teste de imuno-histoquímica, pode ser feita a detecção de antígenos de ambos os vírus, mediante análise de vísceras de humanos e animais vertebrados (BRASIL, 2024).

1.8 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO DE CLASSE I E CLASSE II

O sistema imunológico de vertebrados apresenta mecanismos adaptativos que regulam respostas celulares e hormonais essenciais para combater doenças infecciosas. Esse mecanismo ocorre por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), sendo conceituado em humanos como antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leucocyte antigen*). O MHC apresenta uma característica multigênica fundamental na modulação imunológica para o reconhecimento de patógenos pelas células T a partir da coesão entre HLA, peptídeo e receptor de linfócito T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) (Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013; Medhasi; Chantratita, 2022).

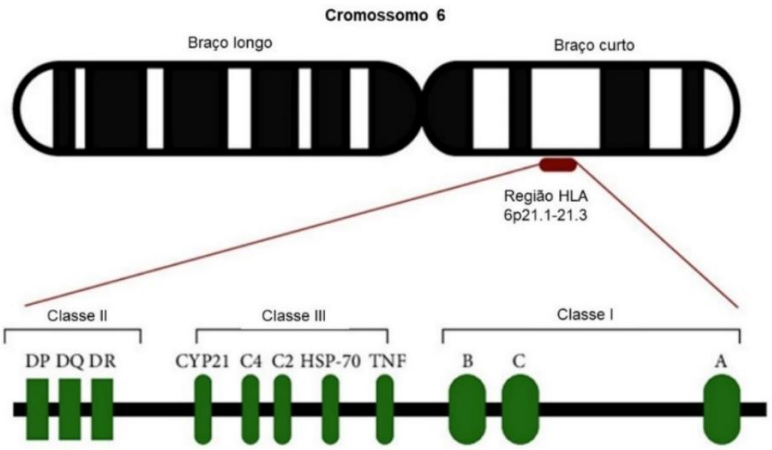
O HLA é uma glicoproteína presente na superfície celular que permite o reconhecimento de diversos peptídeos, devido ao seu caráter poligênico e polimórfico. Além disso, são categorizadas duas classes de HLA representadas por moléculas de HLA de classe I, encontradas na superfície de todas as células nucleadas, apresentando peptídeos às células T $CD8^+$, e moléculas de HLA de classe II, geralmente presentes em células apresentadoras de antígenos profissionais (células dendríticas, fagócitos mononucleares e células B) e essenciais para a regulação de células T $CD4^+$. A ocorrência de certas mudanças aminoacídicas influencia no perfil de resistência de patógenos e apresenta uma influência genética, podendo ser por mutações, recombinações ou migrações de populações que garante o polimorfismo nas populações responsável por maior resistência contra patógenos (Robson *et al.*, 2018; Ryan; Cobb, 2012; Sommer, 2005).

A molécula de MHC apresenta uma região de ancoragem sobre a superfície celular e uma região de ligação de peptídeos ou sulco de ligação de peptídeos responsável pelo

reconhecimento de antígenos que mediará a cascata de resposta imune após a correspondência entre a molécula de MHC, antígeno e TCR. O TCR apresenta cadeias αβ ligadas por dissulfeto envolvido no processo de reconhecimento do peptídeo apresentado pela molécula MHC não covalentemente ligados à proteína CD3, correceptor CD4 ou CD8, além de moléculas coestimuladoras e acessórias (Altuvia; Margalit, 2004; Van Der Merwe; Davis, 2003; Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013).

Os genes do HLA estão presentes no braço curto do cromossomo 6 com aproximadamente 3600 kb de DNA, sendo dividido em 3 regiões. A região relativa à classe I envolve três *loci* clássicos HLA-A, HLA-B e HLA-C responsáveis pela codificação de cadeias pesadas, três *loci* HLA-E, HLA-F e HLA-G não clássicos com polimorfismo limitado se comparado aos clássicos e demais genes e pseudogenes não codificantes. A região representada pela classe II inclui genes clássicos HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR e não clássicos HLA-DO e HLA-DM. As moléculas não clássicas estão nas membranas internas dos lisossomos, onde ajudam a carregar antígenos das moléculas clássicas do MHC de classe II (Figura 11) (Trägärdh *et al.*, 1980; Parham *et al.*, 1988; Matzaraki *et al.*, 2017).

Figura 11 – Representação dos *loci* do HLA no cromossomo 6.



Fonte: Medhasi; Chantratita, 2022.

As respostas imunes inatas possuem como elementos desencadeantes os padrões moleculares associados a patógenos, que são estruturas conservadas vinculadas ao perfil de virulência e sobrevivência, sendo facilmente reconhecidos pelos receptores Toll-like (TLRs) que são receptores de reconhecimento de padrão (PRR) para diferentes vias de sinalização celular (Qian; Cao, 2013). Para a detecção de variações antigênicas, há a ativação do sistema imune adaptativo envolvendo atividade Th1/Th2 e resposta humoral com produção de

anticorpos, principalmente no perfil Th2, mediada pela ação eficiente de células apresentadores de antígenos (APC) para a sinalização tanto do ambiente extra quanto intracelular. Por outro lado, o aumento das respostas Th1 podem estar relacionadas a danos teciduais pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que a atividade por Th2 pode favorecer a persistência viral pela redução da resposta inflamatória (Knight; Macatonia; Patterson, 1993; Dabbagh *et al.*, 2002; Decker *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2025).

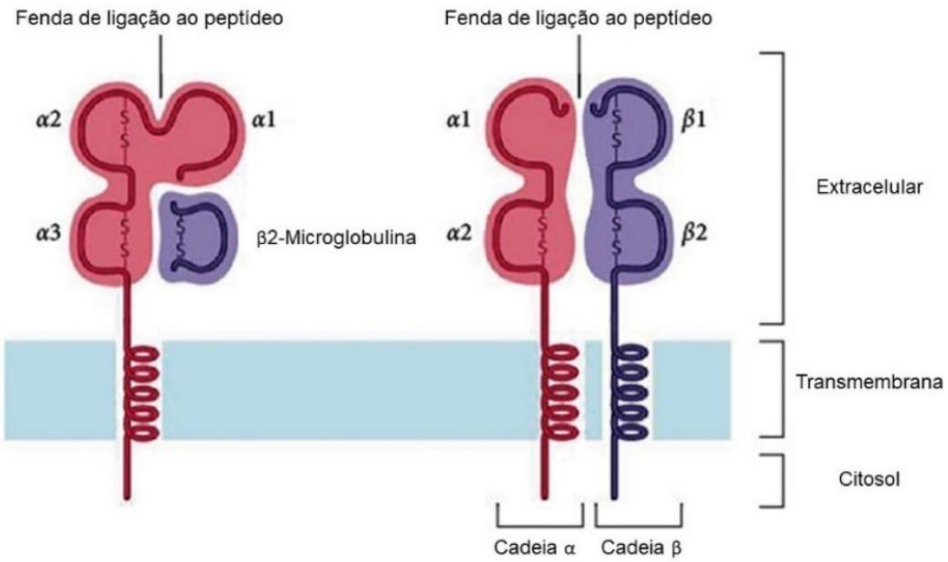
As moléculas de MHC presente em APCs possuem influência relevante na ligação de peptídeos nestes dois ambientes, que são apresentados e reconhecidos pelos receptores de células T (TCR), formando o completo TCR-peptídeo-MHC (Decker *et al.*, 2006; Blum; Wearsch; Cresswell, 2013; Mariuzza; Agnihotri; Orban, 2020). A maioria das células T reconhece peptídeos curtos se comparados às células B, que podem reconhecer peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e outras moléculas químicas pequenas; enquanto as moléculas de classe I possuem tamanho para a ligação de peptídeos de 8-11 resíduos, as de classe II, por apresentarem uma fenda maior, permitem a ligação de peptídeos de até 30 resíduos ou mais (Abbas; Lichtman; Pillai, 2018).

As moléculas de classe I são heterodímeros de ligação não covalente, as quais possuem uma cadeia polipeptídica pesada com peso molecular de 44 quilodaltons (kDa) glicosiladas com orientação de sua porção principal N-terminal na região extracelular apresentando três domínios extracelulares α1 (90 aa), α2 (92 aa) e α3 (92 aa) ligadas a uma região transmembrana (25 aa) e a uma cauda citoplasmática (30 aa) que se ancora à membrana plasmática. Além disso, a molécula também apresenta uma cadeia leve não covalentemente ligada denominada de β2-microglobulina (β_2m) de 12 kDa que está associada a um domínio α3. A grande parte das substituições aminoacídicas ocorre nos alelos responsáveis pela codificação da molécula de classe I nos domínios α1 e α2 que formam o sulco de ligação por meio de ligação de hidrogênio, sendo o domínio α3 mais conservado e, β_2m, invariante (Figura 9) (Bjorkman *et al.*, 1987; Bjorkman; Parham, 1990; Uehara *et al.*, 1980; Grey *et al.*, 1973; Trägärdh *et al.*, 1980; Parham *et al.*, 1988).

A molécula de classe II se encontra na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células B e células dendríticas. A estrutura da molécula apresenta uma cadeia α (32 a 34 kDa) e uma cadeia β (29 a 32 kDa) dobradas em dois domínios separados. As cadeias são divididas em regiões citoplasmáticas α1 e β1, que possuem um sulco de coesão de peptídeos, e o domínio α2 e β2, de natureza mais conservada para a ligação ao receptor TCR.

Os peptídeos ligados à fenda da molécula HLA de classe I geralmente são mais curtos que os de classe II, devido à conformação em fenda destas moléculas, que permite um envolvimento estendido da superfície do peptídeo que se projeta em ambas as extremidades para uma ligação aberta onde não apresenta o mesmo padrão de interação de ligação de hidrogênio visto no HLA de classe I, permitindo a acomodação do antígeno na superfície da molécula (Figura 12) (Brown *et al.*, 1993; Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013).

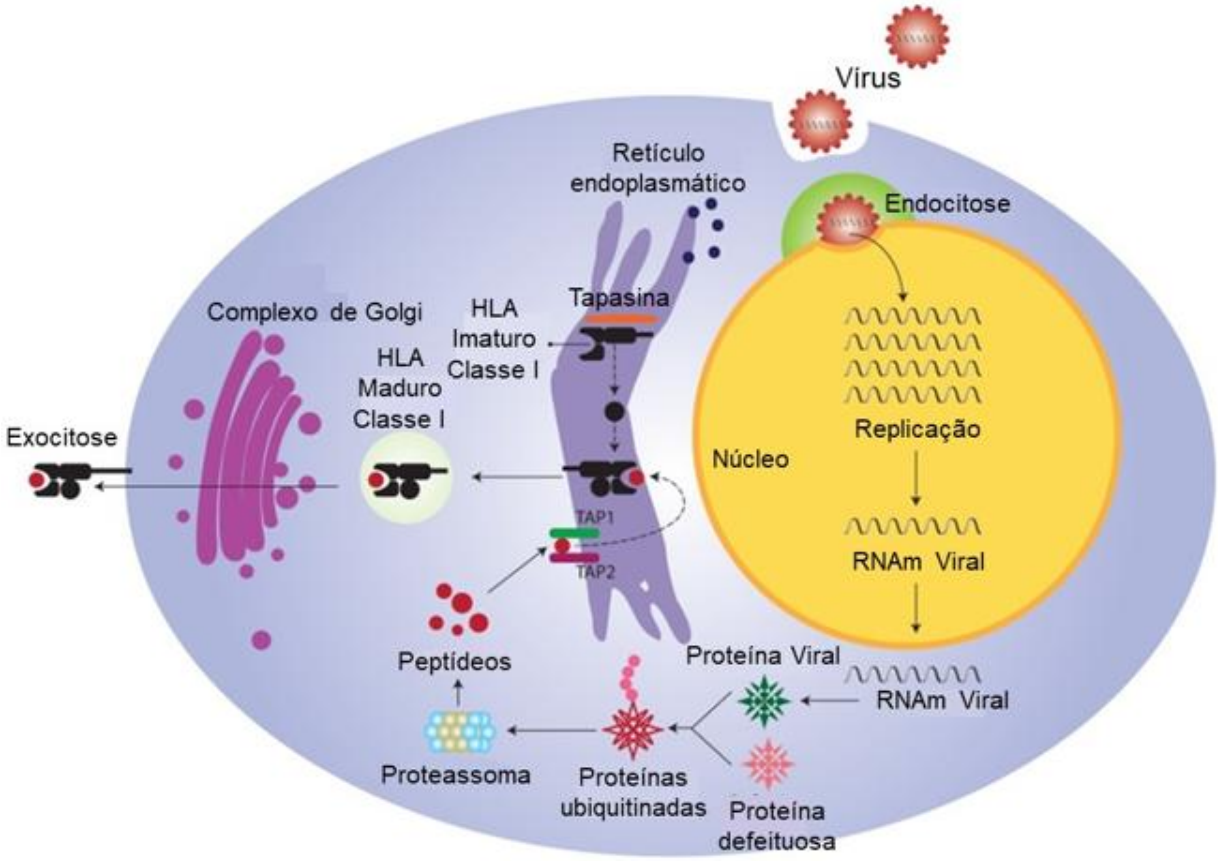
Figura 12 – Representação das cadeias presentes nas estruturas das moléculas de HLA-I (à esquerda) e HLA-II (à direita).



Fonte: Medhasi; Chantratita, 2022.

As moléculas de HLA de classe I promovem apresentação de antígenos originados de infecções intracelulares, como aquelas relacionadas aos vírus. Os peptídeos são ubiquitinados e submetidos à proteólise, sendo, posteriormente, encaminhados para o retículo endoplasmático pelos transportadores dependentes de trifosfato de adenosina associados à apresentação de antígenos (TAP, do inglês *adenosine triphosphate-dependent transporters associated with antigen processing*), onde irão se ligar à cadeia pesada e à β_2m pela ponte formada entre estas moléculas pelo conjunto das chaperonas tapasina, calnexina, calreticulina e a tioloxidorredutase ERp57. Além disso, a tapasina atua na estabilização da molécula de classe I até a montagem estável com o peptídeo e o conjunto peptídeo-MHC é destinado para a superfície da membrana celular e reconhecido pelo TCR do T $CD8^+$ e células NK (Figura 13) (Heemels; Ploegh, 1995; Williams; Peh; Elliott, 2002; Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013).

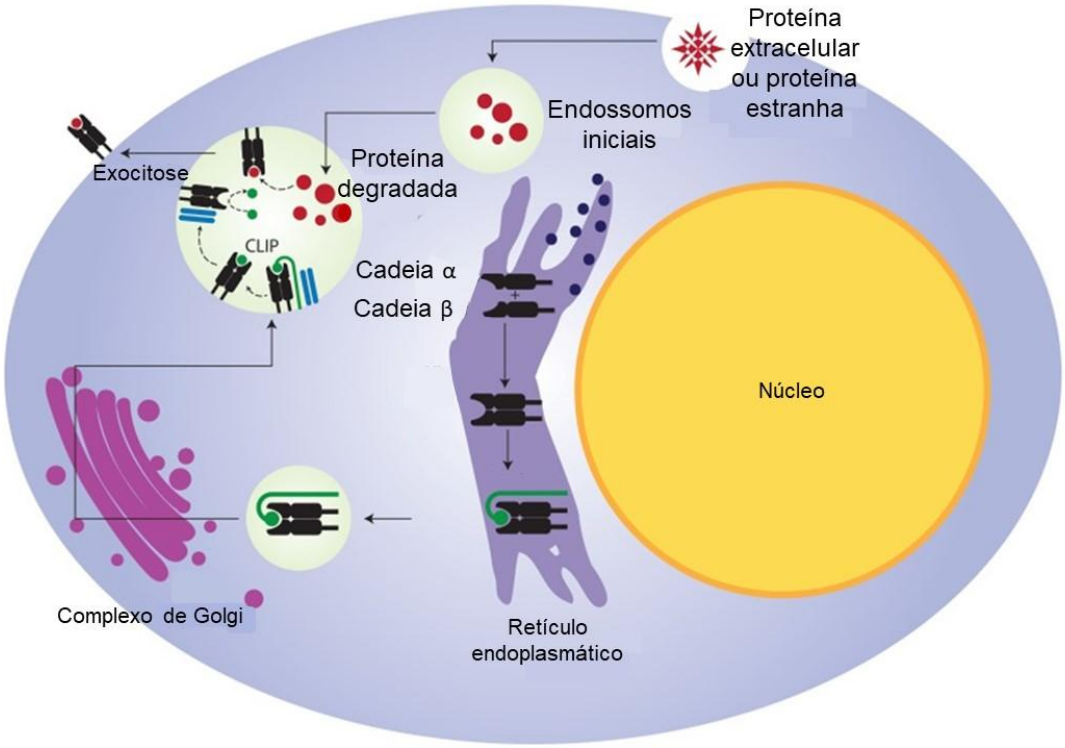
Figura 13 – Esquema do trânsito, processamento e apresentação de antígenos por moléculas de HLA-I.



Fonte: Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013.

Os patógenos extracelulares são apresentados pelas moléculas de classe II. O agente infeccioso é internalizado na célula por meio de fagossomos que se fundem aos lissosomos, formando o fagolissomo ou lisossomo secundário. As cadeias da molécula de classe II ligam-se a uma cadeia invariante (Ii) para estabilizar a estrutura e evitar a ligação de peptídeos dentro do RE. A Ii é direcionada para o compartimento do HLA de classe II, onde será degradada pela catepsina, gerando um peptídeo invariante associado à classe II (CLIP, do inglês *class II-associated invariant peptide*), que permanece no sulco de ligação da molécula de MHC II. A remoção do CLIP, substituído pelo peptídeo derivado do patógeno, é fundamental para a apresentação antigênica às células T $CD4^+$ (Figura 14) (Ghosh *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1994; ; Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013).

Figura 14 – Esquema do trânsito, processamento e apresentação de antígenos por moléculas de HLA-II.



Fonte: Cruz-Tapias; Castiblanco; Anaya, 2013.

As infecções causadas por arbovírus podem estar associadas a complicações, como hemorragia, choque, falência de órgãos e óbito. Diante disso, para a devida resposta imune, é necessário o envolvimento coordenado de diversos processos de fragmentação e exibição peptídica pelas moléculas de HLA aos TCRs de linfócitos (Raghavan *et al.*, 2019). Os flavivírus regulam positivamente as moléculas clássicas HLA-A, -B e -C. O aumento da atividade de HLA-E também está presente em resposta ao estímulo de citocinas e atividade do sistema imune inato, como monócitos, e podem proporcionar a inibição de células NK pelo reconhecimento do heterodímero inibitório CD94/NKG2A (Mckechnie *et al.*, 2019).

1.9 IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE COMPUTACIONAL DE PROTEÍNAS VIRAIS

As arboviroses representam grandes impactos para a saúde pública, principalmente por envolverem uma vasta diversidade de espécies responsáveis por causar doenças em humanos. Os fatores ambientais, como a vegetação, a temperatura e a precipitação influenciam diretamente na manutenção viral, além de estarem atrelados às mudanças climáticas proporcionadas pelo desmatamento, migrações e urbanização. Diante disso, o desenvolvimento de vacinas e terapias possui grande relevância no contexto de emergência e reemergeência de doenças na Amazônia, a partir das análises epidemiológicas para a implementação de

estratégias de vacinação que possam atender aos contextos de infraestrutura de distribuição e políticas orçamentárias (Ryan *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2024; Ribeiro Dos Santos *et al.*, 2025).

O desenvolvimento de vacinas ainda permanece um grande desafio no que consiste ao risco de formação de imunidade incompleta. Contudo, recentemente, a vacina Dengvaxia® (CYD-TDV), baseada em quimeras de genes de prM, proteína E dos quatro sorotipos de DENV e genes da cepa 17D do YFV, foi licenciada no Brasil, mostrando a capacidade de induzir resposta significativa a partir de material recombinante tetravalente atenuado, sendo estipulado pelo Comitê Consultivo sobre Práticas de Imunização (ACIP) o uso em crianças de 9 a 16 anos em áreas endêmicas. Além disso, também foi autorizada a vacina QDENGA® (TAK-003) a paritr do sorotipo DENV-2 (DEN2-PDK-53) vivo atenuado e quimeras DENV-1, DENV-3 e DENV-4 em sua composição com maiores respostas de anticorpos neutralizantes para o sorotipo 2 que se ligam em regiões conservadas entre os sorotipos, sendo que se mostra eficaz contra a dengue por 3 anos, com respostas significativas em pacientes hospitalizados, sendo necessária a avaliação da dose de reforço (Sabin; Schlesinger, 1945; Villar *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2022; Sáez-Llorens *et al.*, 2017; White *et al.*, 2021; Rivera *et al.*, 2022).

Por outro lado, ainda não estão disponíveis vacinas contra ZIKV e CHIKV, mas existem diversas propostas em fases de avaliação que são candidatas relevantes. Apesar de ZIKV e DENV serem representantes da mesma família viral, as respostas referentes à neutralização de anticorpos demonstraram que a reação para o ZIKV diverge quanto ao sorocomplexo do DENV visualizada por mapas antigênicos, onde percebe-se maior agrupamento DENV-1–4 e ZIKV na fase aguda, mas diferenças significativas estão presentes na fase de convalescença que se mantem por até 6 meses (Montoya *et al.*, 2018). A formulação de métodos imunes permanece um grande desafio, mas as vacinas já desenvolvidas contra flavivírus podem ser utilizadas como estratégias para a elaboração de vacinas contra o ZIKV, incluindo métodos de RNA, DNA, subunidades proteicas, recombinantes baseadas em vetores e partículas inativadas purificadas (Ishikawa; Yamanaka; Konishi, 2014; Barouch; Thomas; Michael, 2017).

Assim como percebem-se avanços importantes de estratégias de imunização de flavivírus, os alfavírus também correspondem a alvos de pesquisas vacinal com a demostranção de atividade de células B contra CHIKV e outros alfavírus artritogênicos, como os vírus Mayaro (MAYV), Ross River (RRV) e O'nyong'nyong (ONNV), a partir de resíduos de proteínas E1 e domínios A e B da proteína E2, sendo importante considerar que o perfil da resposta vacinal pode apresentar neutralização cruzada entre diferentes alfavírus (Raju *et al.*, 2023; Nguyen *et*

al., 2020; Kosulin *et al.*, 2025). As análises da atividade de neutralização evidenciam alvos antigênicos importantes localizados em resíduos do peptídeo de fusão, o qual demostras perfil de conservação significativo, sendo que estruturas variáveis podem apresentar alvos localizados na cadeia princial, onde há alta dependência de interações virais, o que dificulta a seleção de mutações (Sutton *et al.*, 2023).

Os medicamentos utilizados no contexto de infecções contra arbovírus ainda não são específicos para o tratamento, sendo geralmente empregados para o controle de sintomas associados às doenças. Essas limitações alertam para testes em modelos experimentais de fármacos antivirais, como sofosbuvir, azitromicina, ribavirina, cloroquina (em estágios iniciais), niclosamida, espiropirazolopiridona, 1-[(2-metilbenzimidazol-1-il)metil]-2-oxo-indolin-3-ilideno]-amino] tioureia (MBZM-N-IBT), delfinidina e galato de epigalocatequina, os quais podem apresentar respostas importantes que incluem inibir replicação viral, incluindo efeitos sobre a proliferação em células gliais, inibição da infecção por meio da acidificação endossomal e inibição dos mecanismos de fusão de membrana e inibição da nsP2, além de alguns destes fármacos atuarem na diminuição da resposta inflamatória, levando à reducação de complicações clínicas (Bullard-Feibelman *et al.*, 2017; Retallack *et al.*, 2016; Smee *et al.*, 1988; Khan *et al.*, 2010; Vázquez-Calvo *et al.*, 2017; Kao *et al.*, 2018; De *et al.*, 2022).

Técnicas computacionais de alto desempenho são cruciais para prever estruturas e funções de moléculas virais, proporcionando benefícios significativos na predição de antígenos. A aplicação de bancos de dados na investigação molecular utiliza estratégias como dinâmica molecular, ancoragem molecular e inteligência artificial para analisar produtos. Essas ferramentas facilitam a identificação de moléculas capazes de se ligar a regiões funcionais dos antígenos virais, informando o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no controle e tratamento de infecções virais (Mani *et al.*, 2023). A análise computacional utiliza servidores virtuais e algoritmos especializados para identificar alvos virais de forma eficiente, permitindo a obtenção de dados moleculares e estruturais de moléculas-alvo relevantes mediante o uso coordenado de algoritmos (Hu *et al.*, 2021b).

Os dados obtidos a partir de análises das sequências aminoacídicas da proteína E dos flavivírus podem auxiliar na compreensão da estrutura e da função dessa macromolécula, os quais influenciam na sua antigenicidade. Nesse sentido, arbovírus emergentes, como o ILHV e ROCV, se fazem relevantes alvos para estudos moleculares de tal proteína, abrindo caminho para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle antes de uma disseminação com maior impacto sobre a saúde pública (Fontes-Garfias *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017).

As ferramentas de bioinformática auxiliam na análise de dados massivos do proteoma de agentes infecciosos, permitindo a elucidação de propriedades antigênicas (Lim; Choi; Kim, 2023). Os novos métodos de análise computacional geram avanços nos estudos associados ao desenvolvimento bem-sucedido de vacinas, incluindo pesquisas sobre a resposta humoral e celular de infecções virais a partir de análises de regiões específicas de suas distintas proteínas (Sharma *et al.*, 2021). Assim, o método de análise *in silico* fornece informações sobre a estrutura e função de alvos proteicos para concepção de drogas e vacinas (Srivastava *et al.*, 2021).

Os métodos de bioinformática têm se mostrado ferramentas importantes no desenvolvimento de vacinas, incluindo modelos de análises para a avaliação de genes que podem apresentar alvos vacinais e as interações com MHC para avaliação da aplicabilidade de populações humanas. O avanço dos impactos ambientais pode acelarar mecanismos adaptativos e a disseminação de agentes infecciosos, o que demanda maior celeridade na elaboração de vacinas e fármacos para atuar no controle e tratamento de doenças. A imunoinformatica, neste cenário, poderá contribuir com uma abordagem de construção vacinal multiepítopo de forma mais eficiente por meio da predição de propriedades físico-quimícas, alergênicas e antigênicas com categorização da ligação de peptídeos com moléculas de HLA (Lamiable *et al.*, 2016; Gfeller; Bassani-Sternberg, 2018; Chauhan *et al.*, 2019).

As vacinas contra flavivírus representam uma importante ferramenta no controle de doenças no mundo. O futuro das pesquisas envolvendo as estratégias de vacinação será guiado por métodos de precisão envolvendo antígenos responsáveis por desencadear imunidade celular, como anticorpos neutralizantes e respostas T $CD4^+$ e $TCD8^+$, contribuindo para a determinação de candidatos vacinais e adjuvantes para o estímulo de diferentes vias de atividade imunológica. A ligação de epítopos a alelos de HLA pode ser predita a partir de algoritmos computacionais, contudo, mesmo de diante de grandes modelos para definição de efeitos protetores, ainda existe a necessidade do desenvolvimento de modelos *in vitro* e *in vivo* apropriados para a confirmação das respostas imunológicas (Bonam; Saksena; Reche, 2025; Grifoni *et al.*, 2020; Vaughan *et al.*, 2010).

As sequências de aminoácidos da proteína E de isolados de flavivírus oriundos da Amazônia brasileira são muito similares, mas as pequenas variações nessas sequências podem resultar em importantes diferenças nas suas propriedades bioquímicas e imunológicas, influenciando, portanto, a patogenicidade das infecções. As ferramentas computacionais podem ser utilizadas para estimar epítopos potenciais de células B e T, sendo este último sob influência dos MHCs de classe I e II. As análises permitem avaliar a dinâmica molecular e o perfil genético de regiões imunorreativas para a seleção de epítopos potenciais, contribuindo

para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas (Palanisamy; Lennerstrand, 2017; Bergamaschi *et al.*, 2019). O uso de bibliotecas de peptídeos combinatórios para caracterizar as moléculas de HLA permite a avaliação imparcial e abrangente da especificidade de ligação. A precisão das análises preditivas é baseada em medidas de afinidade, onde uma afinidade prevista mais forte apresenta maiores chances de corresponder a uma afinidade real mais elevada (Wang *et al.*, 2010; Lundegaard *et al.*, 2008; Lundegaard; Nielsen; Lund, 2006; Wang *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a propensão antigênica do ectodomínio da proteína E dos flavivírus ILHV e ROCV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

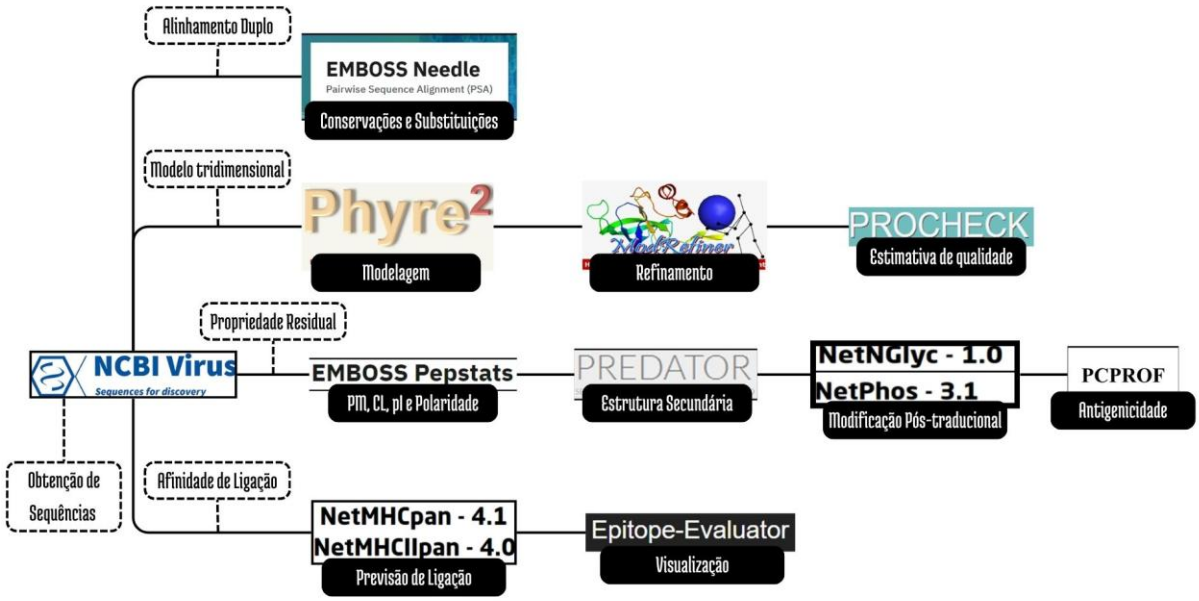
- Determinar as polaridades residuais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV.
- Predizer as estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV.
- Reconhecer os potenciais sítios de modificações pós-traducionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV.
- Realizar a modelagem, o refinamento e a validação da estrutura tridimensional do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV.
- Avaliar parâmetros como hidrofilicidade, flexibilidade e acessibilidade do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV para prever sua antigenicidade.
- Estimar a afinidade de ligação de peptídeos derivados do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV às duas classes de antígenos leucocitários humanos (HLAs-I/II).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O estudo em questão trata-se de uma análise *in silico*, com caráter transversal e descritivo, adotando uma abordagem quali-quantitativa. Para alcançar os resultados, foram empregadas ferramentas de bioinformática de acesso aberto e previamente validadas pela comunidade científica (Figura 15).

Figura 15 – Fluxo metodológico para análise estrutural e predição de epítopos de HLA.



Fonte: Próprio autor.

Por utilizar sequências aminoacídicas derivadas por tradução conceitual de genomas virais previamente divulgados, esta pesquisa não requer apreciação por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) ou Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). No entanto, antes da divulgação dos resultados, foi realizado o cadastro desta pesquisa no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A577EAD (ANEXO 1), em atendimento ao previsto na Lei 13.123/2015 e seus regulamentos.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas nas análises as sequências aminoacídicas do ectodomínio da proteína E derivadas dos genomas de referência do ILHV e ROCV, sendo excluídas das análises qualquer sequência que, eventualmente, estivessa incompleta ou contivesse imprecisões aminoacídicas –

isto é, cujos resíduos sejam representados pelos códigos Asx/B (ácido aspártico ou asparagina), Glx/Z (ácido glutâmico ou glutamina), Xle/J (leucina ou isoleucina) ou Xaa/X (qualquer aminoácido).

3.3 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

3.3.1 Obtenção das sequências aminoacídicas e definição do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

Os genomas de referência (RefSeq) do ILHV e ROCV foram recuperados do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e, após a identificação da região codificante da proteína E, a sequência aminoacídica do ectodomínio foi obtida em formato FASTA por tradução conceitual com base no código genético degenerado universal.

Conforme definido em estudos prévios com sequências de vírus prototípicos da família *Flaviviridade*, como YFV e DENV, o ectodomínio da proteína E consiste na estrutura terminal localizada antes do início da região stem, sendo caracterizada como a porção solúvel, globular e funcional identificada pelo aspecto funcional de ligação ao receptor fusão de membranas. A estrutura é notada pelos domínios extracelulares, envolvendo domínios I e II entre os resíduos 3-299 para ILHV e ROCV até o final do Domínio III entre os resíduos 308-399 para ILHV e 308-404 para ROCV, onde foram excluídas regiões stem e transmembrana (TM) localizadas entre os resíduos 405-501 para ILHV e ROCV, por estarem próximas à membrana e não participarem de interações externas. Para isso, foram considerados resíduos 1-404 por apresentarem segmentos expostos a unidade estrutural do ectodomínio da proteína E (Rice *et al.*, 1985; Azevedo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

3.3.2 Alinhamento das sequências aminoacídicas da proteína E do ILHV e ROCV

A utilização do servidor Needle (disponível no site <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle>) possibilitou o alinhamento de duas sequências correspondentes às cadeias aminoacídicas da proteína E do vírus ILHV e ROCV, aplicando-se o algoritmo *Needleman-Wunsch* para o alinhamento global. Esse tipo de alinhamento permite a identificação de regiões conservadas e de substituições aminoacídicas, classificadas como conservativas ou não conservativas, para a análise percentual de identidade. Na substituição conservativa, apesar da troca do resíduo, é possível manter as propriedades funcionais da respectiva região, mas, na substituição não conservativa, há mudanças substanciais de propriedades funcionais (Madeira *et al.*, 2024).

3.3.3 Determinação do peso molecular, da carga líquida, do ponto isoelétrico e das polaridades residuais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

As sequências aminoacídicas obtidas foram submetidas à ferramenta PEPSTATS (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/seqstats/emboss_pepstats>), que pertence à plataforma *European Molecular Biology Open Software Suite* (EMBOSS), para que fosse possível determinar o peso molecular, carga líquida, ponto isoelétrico (pI) e polaridades residuais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV (Madeira *et al.*, 2024).

O peso molecular da proteína é expresso em quilodaltons (kDa) e refere-se à massa das proteínas. A carga líquida resulta da soma das cargas dos aminoácidos que compõem a proteína que pode resultar em um produto positivo ou negativo. O pI corresponde ao pH no qual a proteína apresenta carga líquida nula. A ferramenta utilizada para a análise permite a obtenção de dados sobre a polaridade residual da cadeia polipeptídica, classificando os aminoácidos conforme suas cadeias laterais em apolares e polares (neutras, ácidas ou básicas). Para esta análise, foram incluídas as cargas N-terminais e C-terminais dos aminoácidos, sem levar em consideração pesos monoisotópicos dos aminoácidos. Os dados obtidos foram representados sob a forma de gráficos de setores.

3.3.4 Predição de estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

Foi utilizada a ferramenta PREDATOR (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_predator.html>), que pertence à plataforma *Network Protein Sequence @nalysis* (NPS@), para a predição de estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV, como α-hélices, folhas-β pregueadas e regiões intrinsecamente desestruturadas. Esse recurso foi configurado para largura de saída em 70 aminoácidos e assinalamento de estruturas secundárias no padrão DSSP, indicando a posição dessas estruturas e a sua abundância relativa na macromolécula de interesse sob a forma de gráficos de colunas (Combet *et al.*, 2000).

3.3.5 Identificação de potenciais sítios de modificações pós-traducionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

Modificações pós-traducionais no ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV foram preditas pela ferramenta NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>), que permite identificar potenciais sítios de fosoforilação de resíduos de serina, treonina ou tirosina para as seguintes 17 cinases: ATM, CKI, CKII, CaM-II, DNAPK, EGFR, GSK3, INSR, PKA, PKB, PKC, PKG, RSK, SRC, cdc2, cdk5 e p38MAPK (Blom; Gammeltoft; Brunak, 1999; Blom *et al.*, 2004).

For glycosylation site analysis, the sequences were submitted to the NetNglyc tool (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>), through the evaluation of the Asn-Xaa-Ser/Thr sequence contexto (Gupta; Brunak, 2002). Os dados emitidos pelo algoritmo computacional foram expressos em tabelas e gráficos stem plot, evidenciando a quantidade e o tipo de modificações pós-traducionais localizadas.

3.3.6 Modelagem, refinamento e validação de estruturas tridimensionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

As estruturas tridimensionais do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV foram modeladas em sua integralidade no modo intensivo do servidor PHYRE2.2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>), partindo modelagem baseada por homologia e empregando recursos *ab initio* (Powell *et al.*, 2025). Para o refinamento dos modelos de saída, disponibilizados no formato PDB, foi utilizado o servidor MODREFINER (<https://zhanggroup.org/ModRefiner/>) e, para assegurar a qualidade e a confiabilidade da estrutura tridimensional modelada e refinada, o modelo final foi submetido ao servidor PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) para validação através de gráficos de Ramachandran (Xu; Zhang, 2011; Laskowski *et al.*, 1993).

3.3.7 Avaliação da antigenicidade do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV

Para avaliação da antigenicidade do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV, propriedades como hidrofilicidade, flexibilidade, acessibilidade e antigenicidade de Parker foram extraídas com a ferramenta PCPROF (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_pcprof.html>), integrante da plataforma NPS@, considerando um ajuste do tamanho de janela de análise para 7 aminoácidos. Os dados gerados por esse recurso foram expressos como gráficos de linhas (Parker; Guo; Hodges, 1986; Combet *et al.*, 2000).

A hidrofilicidade consiste na atividade funcional das estruturas polares interagindo com o meio aquoso, a acessibilidade representa a disponibilidade da molécula em estar viável para interações, a flexibilidade representa a possibilidade de mudanças conformacionais da estrutura para viabilizar interações bioquímicas e, por fim, a antigenicidade de Parker representa a convergência das propriedades anteriormente descritas.

3.3.8 Estimativa da afinidade de ligação de peptídeos derivados do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV aos HLAs-I/II

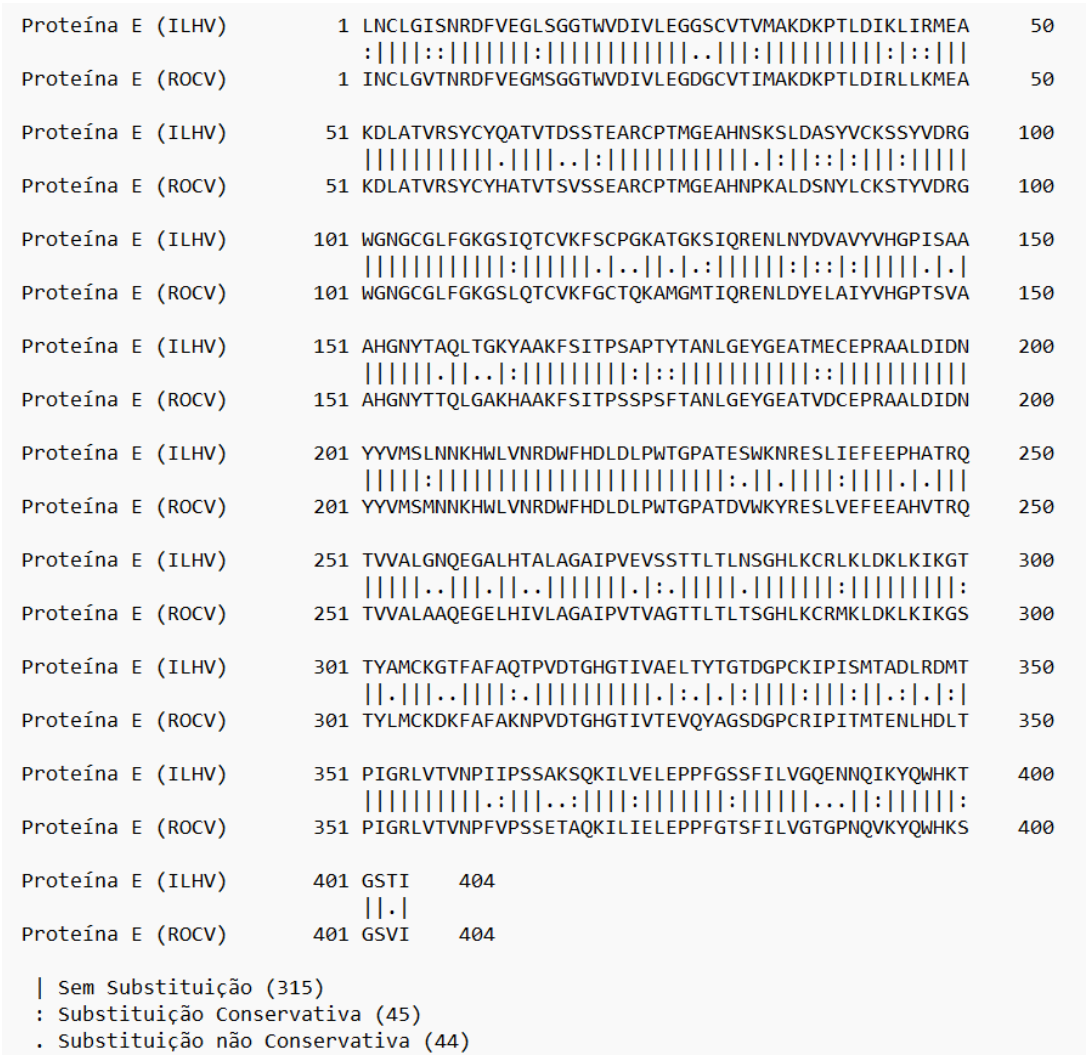
NetMHCpan-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>) e NetMHCIIpan-4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.0/>) foram os servidores utilizados para prever a ligação entre peptídeos e moléculas de MHC-I e MHC-II, respectivamente, explorando tecnologias de aprendizagem de máquina (Reynisson *et al.*, 2020). Nessa abordagem, peptídeos derivados do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV foram avaliados quanto à afinidade de ligação aos alelos representativos de diferentes supertipos mais comuns de HLA-I A/B (A*01:01, A*02:01, A*03:01, A*24:02, A*26:01, B*07:02, B*08:01, B*15:01, B*27:05, B*39:01, B*40:01 e B*58:01) e HLA-II DRB (DRB1*03:01, DRB1*07:01, DRB1*15:01, DRB3*01:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01 e DRB5*01:01).

Para a visualização dos dados, que envolvem número, densidade, distribuição por alelo de MHC, posição aminoacídicas, promiscuidade e conservação de epítopos, foi utilizada a ferramenta Epitope-Evaluator (<https://fuxmanlab.shinyapps.io/Epitope-Evaluator/>). A ferramenta apresenta métodos de verificação de dispersão de epítopos para a identificação de proteínas altamente imunogênicas, com dados representados por meio de mapas de calor e diagramas de Venn (Soto; Requena; Fuxman Bass, 2022).

4. RESULTADOS

As análises realizadas envolveram as RefSeqs da proteína E do ILHV e ROCV (ambas com 404 resíduos), com código de acesso YP_001040006 e YP_009553341, respectivamente. O alinhamento realizado entre as sequências aminoacídicas do ectodomínio da proteína E dos vírus evidenciou percentual de identidade de 78% e percentual de similaridade de 89,1%. Diante disso, foi possível detectar que 89 resíduos apresentaram substituição, sendo 45 conservativas e 44 não conservativas (Figura 16).

Figura 16 – Alinhamento das RefSeqs do ectodomínio da proteína E do ILHV e ROCV.

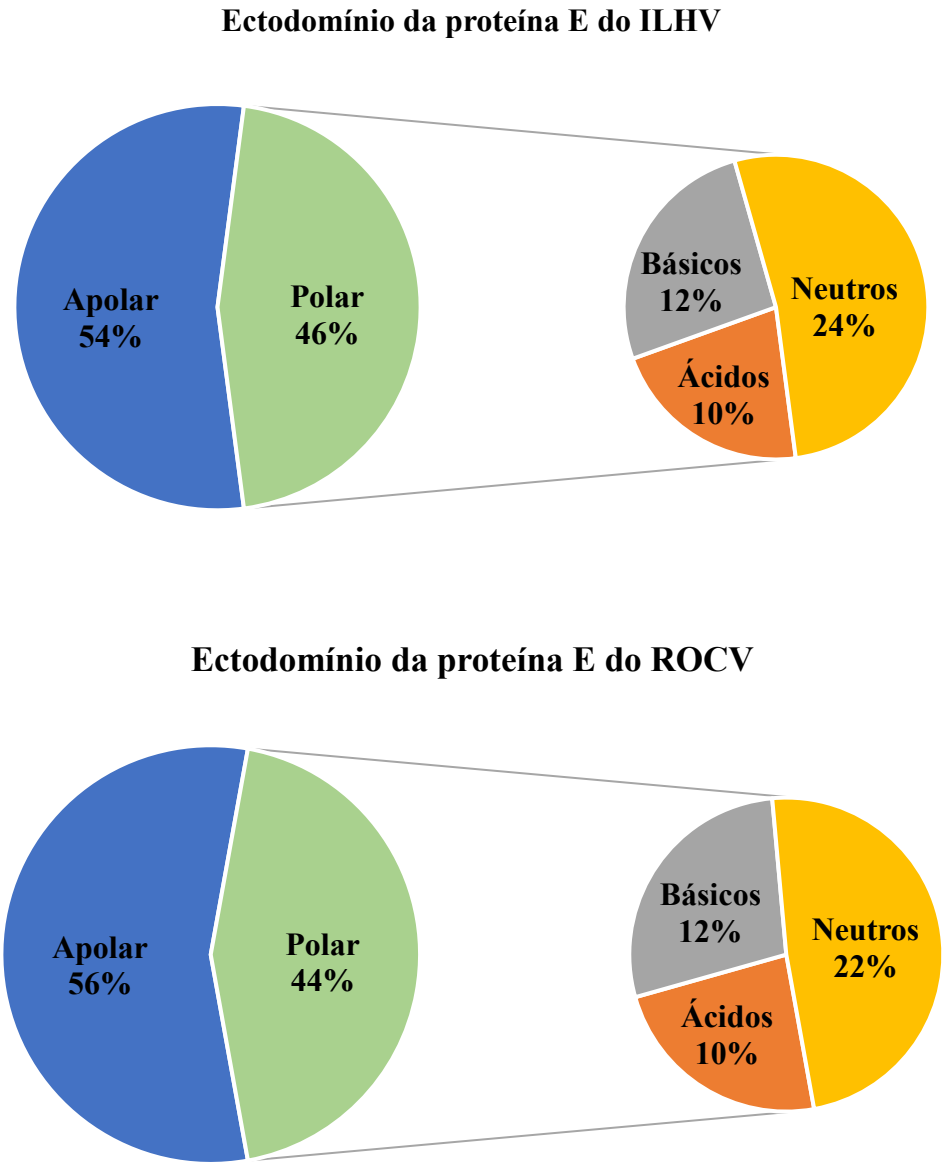


Fonte: Próprio autor.

Os pesos moleculares do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV foram de 43,83 kDa e 44,16 kDa, respectivamente. Os valores de suas cargas líquidas foram 3 para o ILHV e 1,5 para o ROCV, enquanto os valores aproximados de seus pontos isoelétricos foram 6,96 e

6,67, respectivamente. Em relação às polaridades residuais, o ectodomínio da proteína E exibiu predomínio do perfil apolar em ambos os casos, representando 54,21% para ILHV e 55,69% para ROCV. Dentre os aminoácidos polares de ILHV (45,79%), observou-se predominância de resíduos neutros (24,01%) e menor presença de resíduos básicos (11,88%) e ácidos (9,90%); em relação aos aminoácidos polares do ROCV (44,31%), houve também maior teor de resíduos neutros (21,53%) e menor proporção de resíduos básicos (12,38%) e ácidos (10,40%) (Gráfico 1).

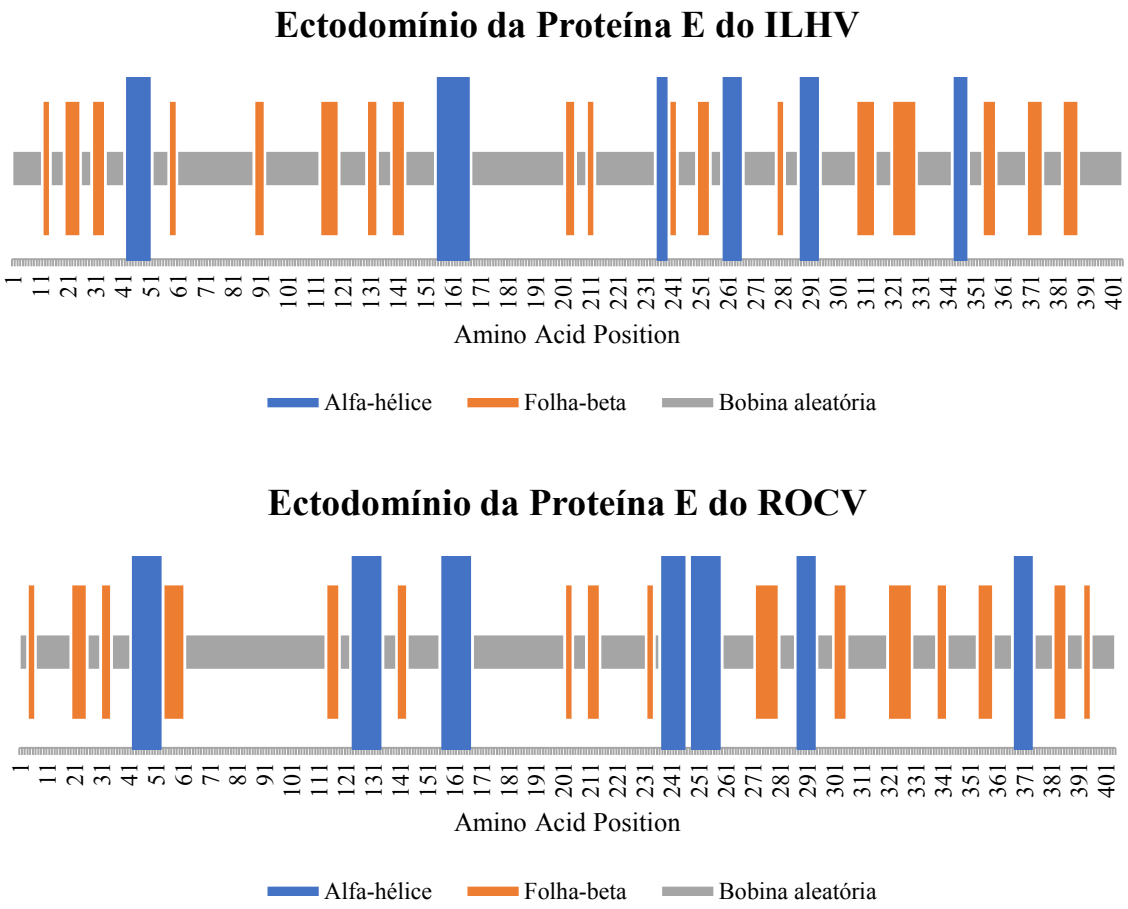
Gráfico 1 – Propriedades residuais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

A análise preditiva das estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV indicou maior proporção de bobinas aleatórias, correspondendo a 65,84% e 61,14%, respectivamente, em comparação a alfa-hélices (12,38% e 17,33%, respectivamente) e folhas-beta (21,78% e 21,53%, respectivamente). Tais estruturas secundárias se distribuíram intercaladamente ao longo da cadeia polipeptídica (Gráfico 2).

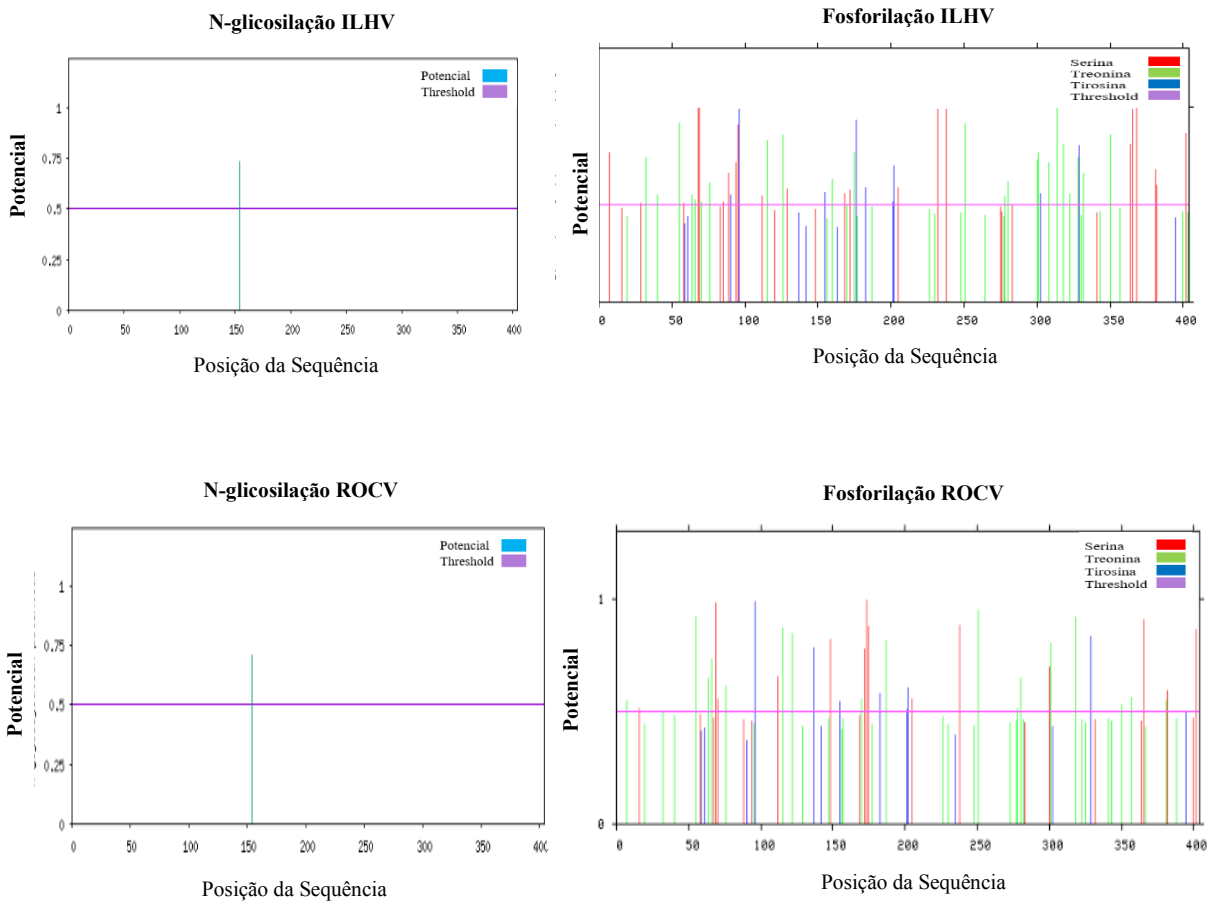
Gráfico 2 – Estruturas secundárias do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

A análise de modificações pós-traducionais indicou que o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou menor tendência a N-glicosilação, com a presença de um único padrão-consenso no resíduo 154 em ambos os vírus, do que a S- fosforilações (31 e 18 padrões-consenso, respectivamente), T- fosforilações (32 e 23 padrões-consenso, respectivamente) ou Y-fosforilações (12 e 11 padrões-consenso, respectivamente) (Gráfico 3).

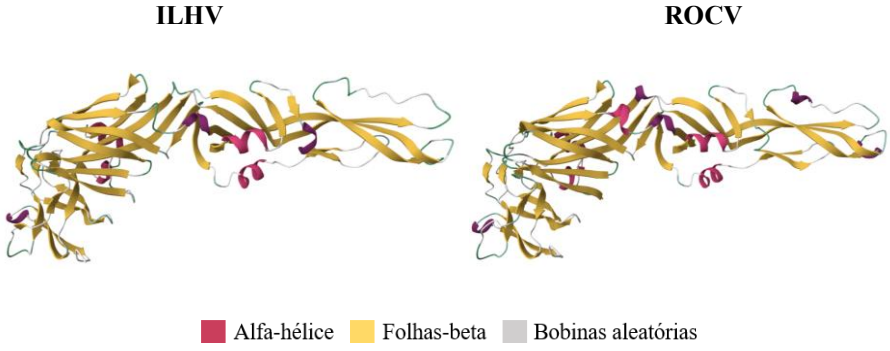
Gráfico 3 – Modificações pós-traducionais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

O ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou variabilidade na conformação em DII, incluindo a disposição de alfa-hélices, folhas-beta e bobinas aleatórias (Figura 17). Com relação às propriedades termodinâmicas, regiões favoráveis contiveram 317 e 325 resíduos para ILHV e ROCV, respectivamente (Anexo 2).

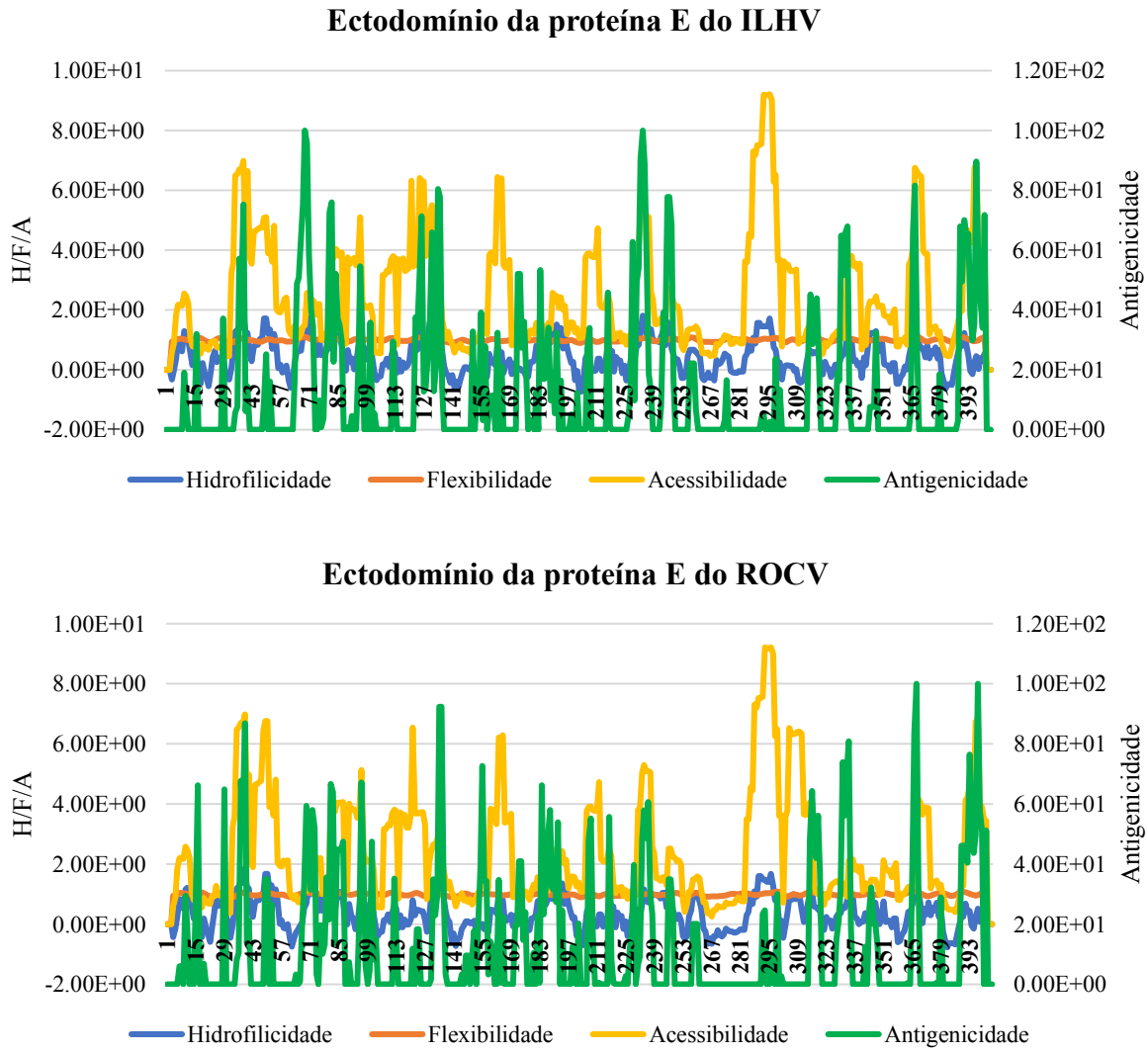
Figura 17 – Modelos tridimensionais do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

O ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou diferentes padrões de convergência para os parâmetros de hidrofilicidade, flexibilidade e acessibilidade, resultando em maiores propensões antigênicas no terço inicial e central para ILHV e no terço final para ROCV. Diante disso, o ectodomínio da proteína E do ILHV apresentou maiores picos de antigenicidade em torno dos aminoácidos Ser69 e Lys234. Por outro lado, para a mesma proteína, o ROCV apresentou maiores picos de antigenicidade em torno dos aminoácidos Thr367 e Trp397 (Gráfico 4).

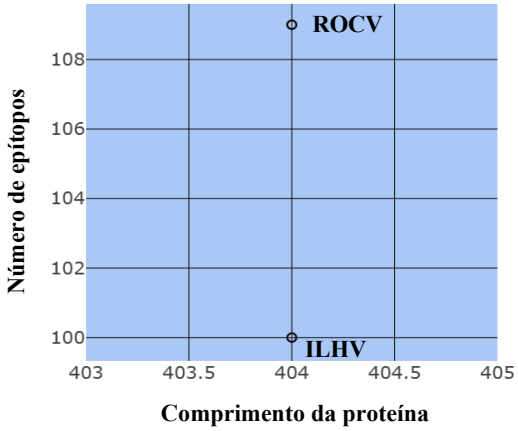
Gráfico 4 – Antigenicidade do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV determinada a partir da convolução entre hidrofilicidade, flexibilidade e afinidade.



Fonte: Próprio autor.

O ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV demonstrou diferença no número de epítopos para HLA-I, sendo identificados 100 epítopos (densidade de 0,25) para ILHV e 109 epítopos (densidade de 0,27) para ROCV (Figura 18).

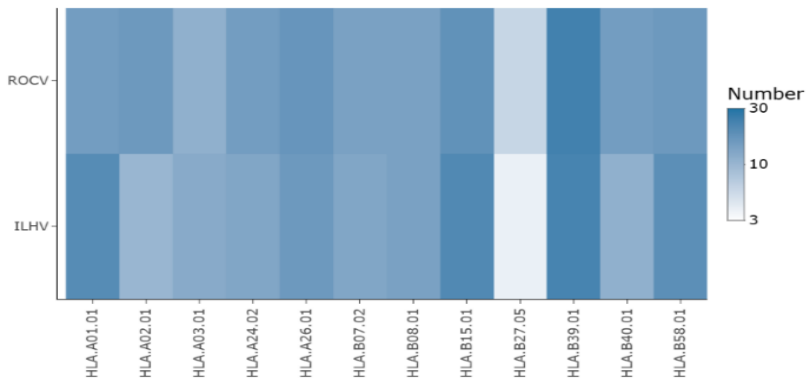
Figura 18 – Correlação entre número de epítopos e comprimento de proteína do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV para HLA-I.



Fonte: Próprio autor.

A distribuição do número de epítopos por afinidade aos alelos de HLA-I demonstrou, para ILHV, maior tendência para HLA.B39.01 (23 epítopos, com densidade de 0,06), HLA.B15.01 (21 epítopos, com densidade de 0,05) e HLA.A01.01 (20 epítopos, com densidade de 0,05) e, para ROCV, maior tendência para HLA.B39.01 (24 epítopos, com densidade de 0,06), HLA.B15.01 (18 epítopos, com densidade de 0,04) e HLA.A26.01 (17 epítopos, com densidade de 0,04) (Gráfico 5).

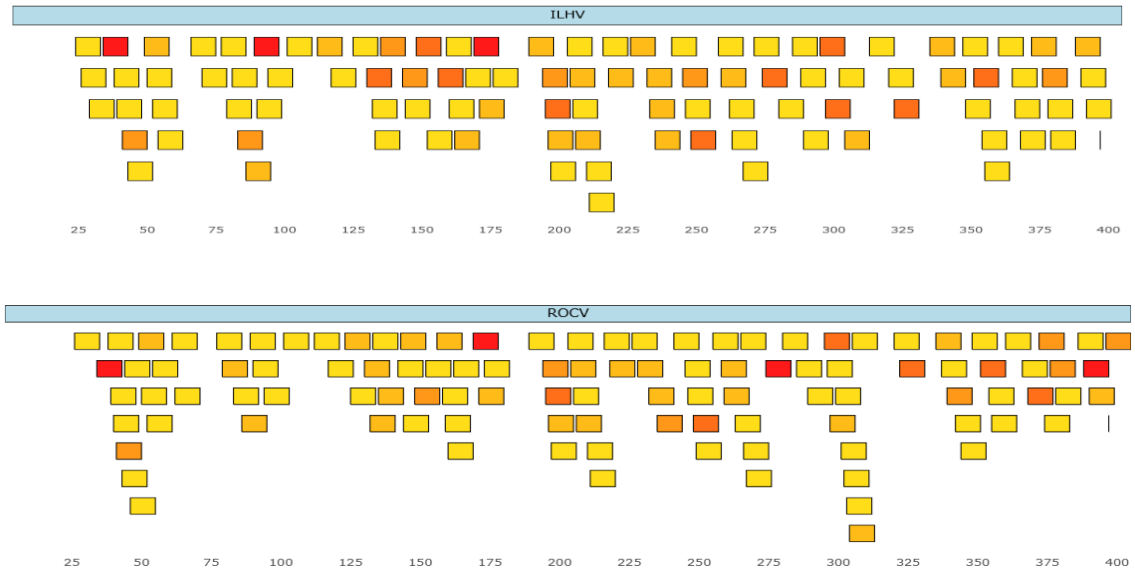
Gráfico 5 – *Heatmap* de distribuição do número de epítopos por alelo de HLA-I do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

Os epítopos para HLA-I contidos no ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentaram diferentes localizações e padrões de promiscuidade, isto é, a afinidade de um mesmo epítopo por diferentes alelos. O ILHV apresentou promiscuidade com 5 alelos para os epítopos representados pelas sequências VMAKDKPTL (34-42; HLA.A02.01, HLA.A24.02, HLA.B08.01, HLA.B15.01 e HLA.B39.01), ASYVCKSSY (89-97) e SITPSAPTY (169-177), sendo estes dois últimos associados aos mesmos alelos (HLA.A01.01, HLA.A03.01, HLA.A26.01, HLA.B15.01 e HLA.B58.01). Por outro lado, o ROCV apresentou promiscuidade com 5 alelos para os epítopos representados pelas sequências IMAKDKPTL (34-42; HLA.A02.01, HLA.A24.02, HLA.B08.01, HLA.B15.01 e HLA.B39.01), SITPSSPSF (169-177; HLA.A24.02, HLA.A26.01, HLA.B07.02, HLA.B15.01 e HLA.B58.01), TVAGTTLTL (274-282; HLA.A02.01, HLA.A26.01, HLA.B07.02, HLA.B15.01 e HLA.B39.01) e GTGPNQVKY (388-396; HLA.A01.01, HLA.A03.01, HLA.A26.01, HLA.B15.01 e HLA.B58.01) (Figura 19).

Figura 19 – Posição dos epítopos e promiscuidade alélica para HLA-I do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.

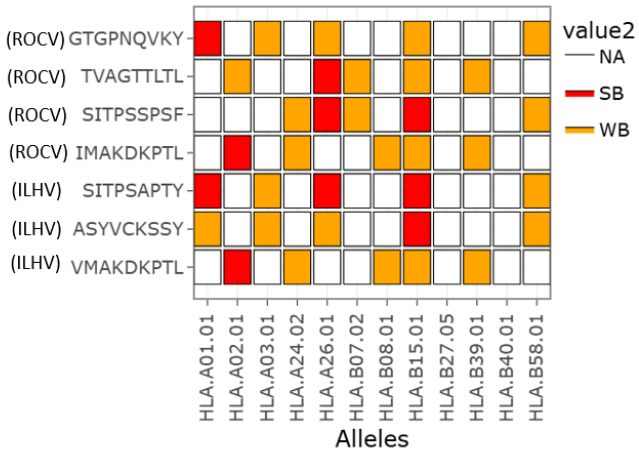


Fonte: Próprio autor.

Para o ectodomínio da proteína E do ILHV, a maior afinidade de ligação a alelos de HLA-I residiu nos epítopos VMAKDKPTL (posição 33; HLA.A02.01); ASYVCKSSY (posição 88; HLA.B15.01) e SITPSAPTY (posição 168; HLA.A01.01, HLA.A26.01 e HLA.B15.01); já para o ectodomínio da proteína E do ROCV, a maior afinidade de ligação a alelos de HLA-I foi observada nos epítopos IMAKDKPTL (posição 33; HLA.A02.01),

SITPSSPSF (posição 168; HLA.A26.01 e HLA.B15.01), TVAGTTLTL (posição 273; HLA.A26.01) e GTGPNQVKY (posição 387; HLA.A01.01) (Gráfico 6).

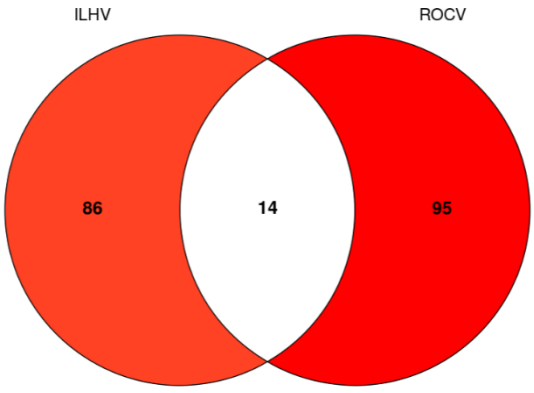
Gráfico 6 – Afinidade de ligação de epítopos do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV a alelos de HLA-I.



Fonte: Próprio autor.

O ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou 14 epítopos para HLA-I conservados entre si: AALDIDNYY, ALDIDNYYV, EAKDLATVR, GWGNGCGLF, HWLVNRDWF, KDLATVRSY, KHWLVNRDW, LATVRSYCY, LDIDNYYVM, MEAKDLATV, RAALDIDNY, RDWFHDLDL, TPIGRLVTV e WFHDLDLPW (Figura 20).

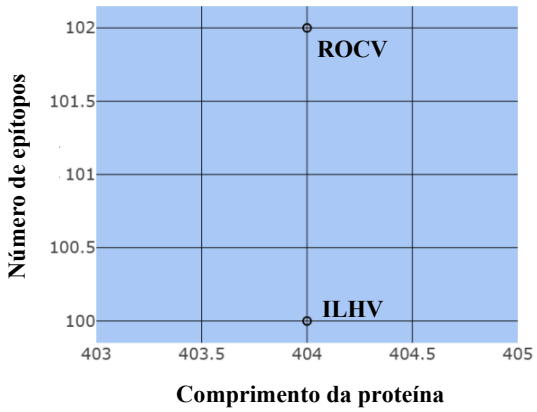
Figura 20 – Diagrama de Venn com epítopos para HLA-I conservados entre o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

Para HLA-II, o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou diferença mais discreta no número de epítopos, sendo identificados 100 epítopos (densidade de 0,25) para ILHV e 102 epítopos (densidade de 0,25) para ROCV (Figura 21).

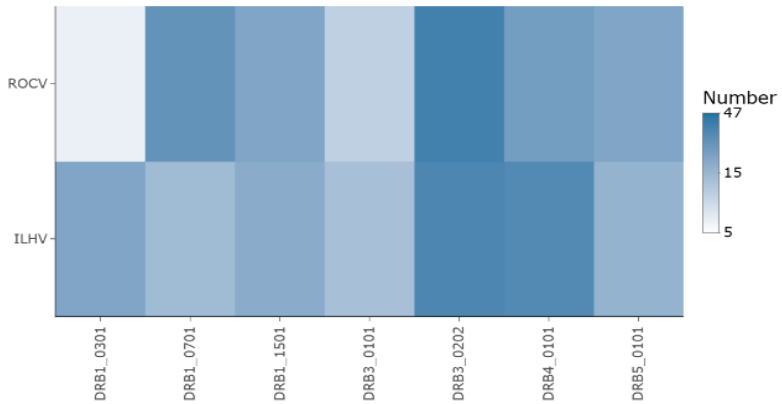
Figura 21 – Correlação entre número de epítopos e comprimento de proteína do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV para HLA-II.



Fonte: Próprio autor.

A distribuição do número de epítopos por afinidade aos alelos de HLA-II demonstrou, para ILHV, maior tendência para DRB3.02.02 (34 epítopos, com densidade de 0,08), DRB4.01.01 (32 epítopos, com densidade de 0,08) e DRB1.03.01 (20 epítopos, com densidade de 0,05) e, para ROCV, maior tendência para DRB3.02.02 (37 epítopos, com densidade de 0,09), DRB1.07.01 (27 epítopos, com densidade de 0,07) e DRB4.01.01 (23 epítopos, com densidade de 0,06) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – *Heatmap* de distribuição do número de epítopos por alelo de HLA-II do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.

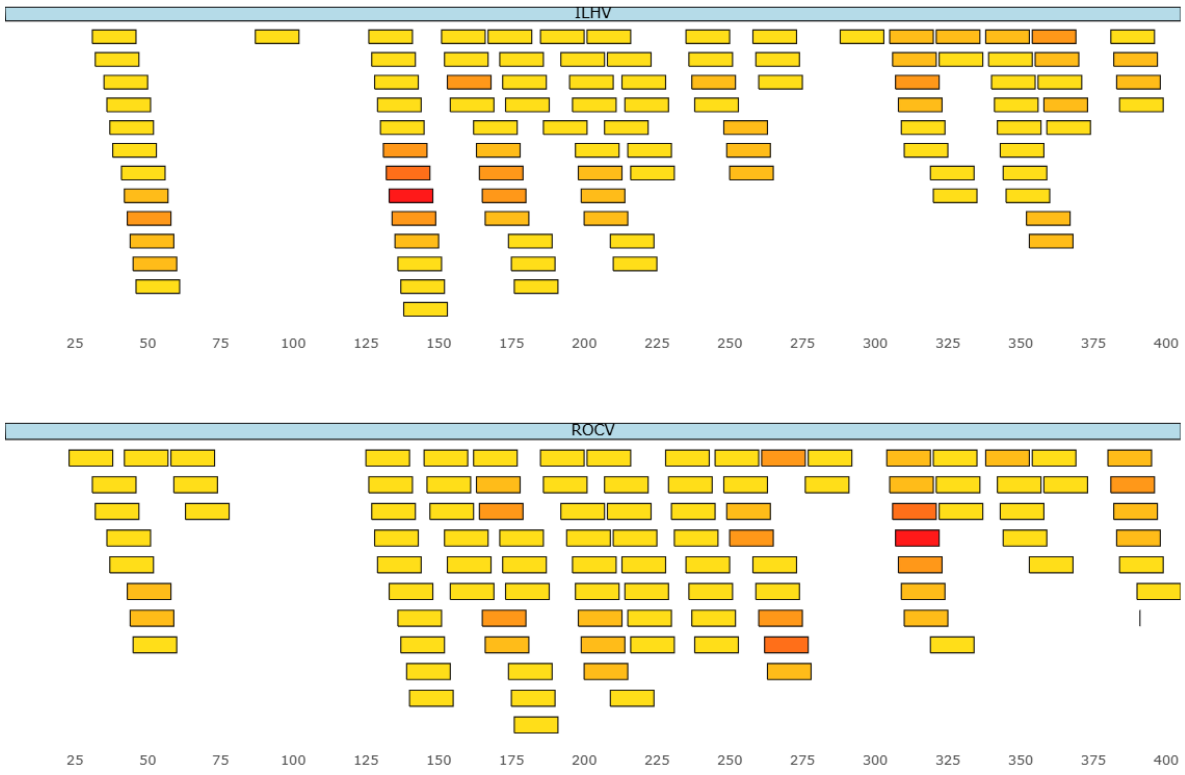


Fonte: Próprio autor.

Os epítopos para HLA-II contidos no ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV também apresentaram diferentes localizações e padrões de promiscuidade. O ILHV apresentou

promiscuidade com 5 alelos para o epítopo representado pela sequência RENLNYDVAVYVHGP (133-147; DRB1_0301, DRB1_0701, DRB1_1501, DRB3_0101 e DRB3_0202) e com 4 alelos para o epítopo representado pela sequência QRENLNYDVAVYVHG (132-146; DRB1_0301, DRB1_0701, DRB3_0101 e DRB3_0202). Por outro lado, o ROCV apresentou promiscuidade com 5 alelos para o epítopo representado pela sequência KDKFAFAKNPVDTGH (306-320; DRB1_0701, DRB3_0101, DRB3_0202, DRB4_0101 e DRB5_0101) e com 4 alelos para os epítopos representados pelas sequências CKDKFAFAKNPVDTG (306-320; DRB1_0701, DRB3_0202, DRB4_0101 e DRB5_0101) e ELHIVLAGAIPVTVA (262-276; DRB1_0701, DRB1_1501, DRB3_0202 e DRB5_0101) (Figura 22).

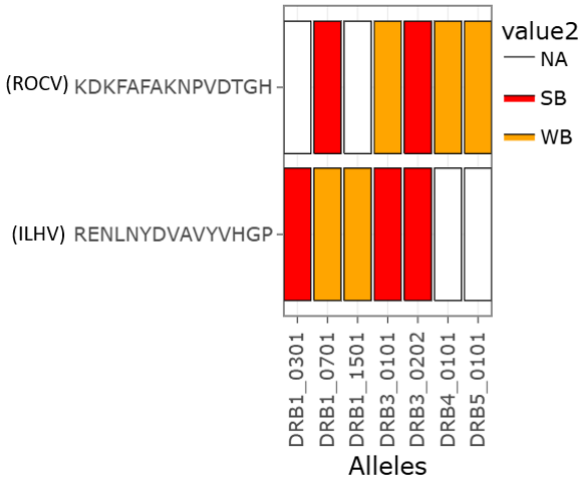
Figura 22 – Posição dos epítopos e promiscuidade alélica para HLA-II do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

Para o ectodomínio da proteína E do ILHV, a maior afinidade de ligação a alelos de HLA-II residiu no epítopo RENLNYDVAVYVHGP (posição 132; DRB1_0301, DRB3_0101 e DRB3_0202); já para o ectodomínio da proteína E do ROCV, a maior afinidade de ligação a alelos de HLA-II foi observada no epítopo KDKFAFAKNPVDTGH (posição 306; DRB3_0701 e DRB3_0202).

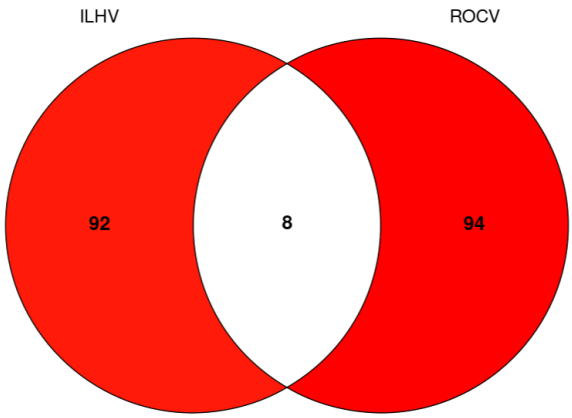
Gráfico 8 – Afinidade de ligação de epítopos do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV a alelos de HLA-II.



Fonte: Próprio autor.

O ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentou 8 epítopos para HLA-II conservados entre si: EPRAALDIDNYYVMS, KHWLVNRDWFHDLDL, LVNRDWFHDLDLPWT, NKHWLVNRDWFHDLD, NNKHWLVNRDWFHDL, NRDWFHDLDLPWTGP, RDWFHDLDLPWTGPA e VNRDWFHDLDLPWTG (Figura 23).

Figura 23 – Diagrama de Venn com epítopos para HLA-II conservados entre o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.



Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÃO

A floresta amazônica brasileira apresenta grande diversidade de arbovírus de interesse para a saúde pública, devido à capacidade de causar doenças em seres humanos. Dentre essas espécies, estão os representantes ILHV e ROCV, os quais são associados a manifestação de casos de encefalite com o desenvolvimento de sequelas significativas no SNC. O ILHV apresenta ampla dispersão, sendo identificado em mosquitos arbóreos, aves e seres humanos na América Central, no Caribe e na América do Sul, e o ROCV demonstra circulação ativa no território brasileiro, sendo necessário o aprimoramento de tecnologias de diagnóstico e controle desses vírus (Argondizzo; Silva; Missailidis, 2020; Milhim *et al.*, 2020; Iversson, 1986; Da Costa *et al.*, 2022; Casseb *et al.*, 2014).

As infecções por flavivírus estão associadas a diversos efeitos sobre o SNC, decorrentes de diferentes perfis fisiopatológicos de relevância para a saúde pública, o que demanda o desenvolvimento e a implementação de estratégias eficazes de prevenção e controle. Diante das estratégias de prevenção, as interações entre os peptídeos e alelos de HLA podem revelar alvos para a ligação comum às moléculas de classe I e II com predominância de supertipos específicos e variações de epítopos que divergem entre espécies de flavivírus, como ZIKV e DENV. As estratégias que envolvem a predição de alvos antigênicos são úteis para a identificação de regiões relevantes, permitindo a identificação de epítopos que compartilham os mesmos supertipos. Neste sentido, as regiões que apresentam maior diversidade de moléculas de HLA podem favorecer a formulação de vacinas protetoras, mas estudos futuros ainda devem ser realizados para investigação de técnicas multiepítopos para as regiões conservadas (Eickhoff *et al.*, 2023).

As sequências aminoacídicas da proteína E dos flavivírus podem proporcionar diversas informações sobre a sua antigenicidade. Nesse sentido, as ferramentas de bioinformática favorecem grandes avanços nos estudos envolvendo o desenvolvimento de fármacos e vacinas a partir da compreensão das respostas imunológicas contra alvos virais. Conforme demonstrado neste estudo, o ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresenta alvos relevantes para o desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas, com respostas imunes adaptativas humoral e celular contra tal proteína já reportadas na literatura científica (Fontes-Garfias *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2018; McAuley *et al.*, 2016; Amaral *et al.*, 2021).

Neste estudo, foi possível perceber que os ectodomínios da proteína E de ILHV e ROCV apresentaram elevada identidade e similaridade, com significativa conservação do conteúdo de

resíduos dessa macromolécula em ambos. Sabe-se que domínios estruturalmente conservados entre glicoproteínas de fusão dos flavivírus apresentam importante papel na replicação e montagem de novos vírions, pois contribuem criticamente para a invasão da célula hospedeira (Rangel *et al.*, 2022). Segundo Barba-Spaeth e colaboradores (2016), a conservação de resíduos da proteína E permite a produção e anticorpos de forma cruzada, especialmente importante ao considerar a seleção de alvos para o desenvolvimento de vacinas polivalentes de forma racional. Além disso, os domínios DI e DII, especialmente o laço de fusão, mostram-se mais conservados que o domínio DIII entre os flavivírus, indicando maiores chances de respostas com ampla neutralização cruzada para DI e DII, apesar de DIII possuir melhor desempenho antigênico para a produção de vacinas (Priyamvada *et al.*, 2016; Lunardelli *et al.*, 2023).

Porém, neste estudo, constatou-se também a presença de substituições não conservativas, que podem afetar de modo significativo as propriedades estruturais (83-85) e imunológicas (386-390), bem como, consequentemente, a funcionalidade dessa proteína. A presença de substituições aminoacídicas no ectodomínio da proteína E pode sinalizar modificações na conformação de flavivírus em diversos estágios do seu ciclo replicativo, resultando em impedimentos ou facilitações no processo de fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, impactando na infecciosidade desses vírus (Wu *et al.*, 2003; Roehrig *et al.*, 2013).

Observou-se pouca distinção de peso molecular entre os ectodomínios da proteína E de ILHV e ROCV, o que está em consonância com a equivalente extensão das suas cadeias polipeptídicas. Ademais, as cargas líquidas de ambos os ectodomínios apresentaram valores positivos, haja vista que o quantitativo de aminoácidos polares básicos (cargas positivas) foi superior ao quantitativo de aminoácidos polares ácidos (cargas negativas). Quanto aos valores de pI, verificou-se valores inferiores 7 para ambos os vírus, sinalizando que a ativação dessa proteína ocorre em pH baixo para direcionar a fusão com a membrana endossomal (White *et al.*, 2023). Nesse ambiente ácido, os homodímeros da proteína são dissociados em monômeros, com a alça de fusão – inicialmente oculta – sendo exposta, permitindo a fusão entre membranas (Huang *et al.*, 2024; Kielian, 2006).

Constatou-se um predomínio do perfil apolar no ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV, o que se esperava para uma proteína de fusão que precisa estar inserida no envelope viral e interagir com a bicamada lipídica da membrana endossomal (Vaney; Rey, 2011). Por outro lado, a composição de resíduos polares evidenciou a natureza anfipática dessa

macromolécula, dado que também necessita interagir com componentes carregados (Mangala Prasad *et al.*, 2022).

Verificou-se um predomínio de folhas-beta sobre alfa-hélices no ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV, uma característica esperada para uma proteína de fusão viral de classe II, que tipicamente apresenta conteúdo marcante de estruturas secundárias classificadas como folhas-beta (Kielian, 2006), as quais compõem os três domínios globulares desta macromolécula, permitindo a formação de fitas e alças que conferem estabilidade, modificações conformacionais e mobilidade molecular (Barrett; Dutch, 2020).

Apesar do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV apresentarem baixa tendência a N-glicosilação, a presença dessa modificação pós-traducional na proteína E dos flavivírus é fundamental para o tropismo, a infecciosidade, a formação e a liberação de partículas virais, sendo que mutações nesse padrão-consenso podem modificar o sucesso da fusão entre membranas (Mondotte *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2023), além de ser determinante no ciclo de transmissão dos flavivírus, permitindo a evasão ao sistema imunológico do inseto vetor e tornando, portanto, eficientes as interações vírus-vetor (Dan *et al.*, 2018). A alta tendência a fosforilação (especialmente T e S) revela que o ectodomínio da proteína E pode estar envolvido, de modo importante, na transdução de sinais em células hospedeiras e na conservação dos resíduos (Keck *et al.*, 2015; Chen; Chen; Li, 2010).

A presença de regiões com elevada propensão antigênica no ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV evidencia o potencial imunogênico dessa macromolécula, com capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes (nAbs) (Gallichotte *et al.*, 2019). Ao se ligarem nesses alvos, os anticorpos podem conferir proteção a longo prazo contra a infecção viral, inibindo a interação vírus-célula (Heinz, Stiasny, 2012).

Quanto às estruturas tridimensionais do ectodomínio da proteína E, a região DII foi a que mais demonstrou diferenças entre ILHV e ROCV, principalmente na disposição em sequência de estruturas secundárias. Como já exposto, DI e DII são fracamente capazes de induzir anticorpos neutralizantes, visto que tal atividade se concentra significativamente em DIII (Stettler *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2020; Lunardelli *et al.*, 2023), que se apresentou conformacionalmente conservado entre os vírus neste estudo.

O DIII apresenta atividade fundamental no reconhecimento e interação com receptores celulares de hospedeiros vertebrados e invertebrados, de modo que mutações (por exemplo, M304, C305, T332 e S365) resultam em alterações conformacionais que podem comprometer a entrada viral, (Jaimipuk *et al.*, 2022). Contudo, a região de dobradiça EDI-EDII constitui um

alvo hidrofóbico conservado para a formulação de vacinas baseadas em mutações atenuantes na região, incluindo os resíduos A54, I130, Y201, A269 e L281 em regiões entremeadas por folhas β que giram em seu eixo para mobilizar o peptídeo de fusão (Maloney *et al.*, 2023). Por outro lado, resíduos de His244 podem se apresentar como um sensor de pH próximo à região, permitindo a ligação por fosfolipídeos negativos (Seligman, 2008; Villalaín, 2023).

Os ectodomínios das proteínas E de ILHV e ROCV apresentaram numerosos epítopos com afinidade de ligação para moléculas de HLA-I e HLA-II, com pequenas diferenças que podem resultar de distintos processos de apresentação e interação com a membrana do RE no transporte convencional de peptídeos (Kaabinejadian *et al.*, 2016). A presença de alvos virais distribuídos no peptidoma de ambas as moléculas de HLA sugere uma formulação vacinal com diversos peptídeos de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ para potencializar a eficácia da imunização (Weingarten-Gabbay *et al.*, 2024).

Considerando ambos os vírus simultaneamente, o ectodomínio da proteína E apresentou mais epítopos para os alelos HLA.B39.01 e HLA.B15.01 de HLA-I. As pequenas variações genéticas entre os vírus podem representar distinções quanto aos padrões de resposta, tendo os alelos B*39:01 efeito protetor para algumas infecções, ainda que a sua distribuição em populações ameríndias esteja associada a formas clínicas mais graves (Pérez-Rubio *et al.*, 2021; Xiong *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2012; Neumann-Haefelin *et al.*, 2007; Olafsdottir *et al.*, 2022). Quanto a HLA-II, o ectodomínio da proteína E de ambos os vírus apresentou mais epítopos para os alelos DRB3.02.02 e DRB4.01.01. Tais alelos podem representar diferentes padrões imunológicos que incluem favorecimento da eliminação viral e associação com formas clínicas mais graves, respectivamente (Harris *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2018; Lacher *et al.*, 2018; Mocci *et al.*, 2023; Drosu *et al.*, 2024; Vishnubhotla *et al.*, 2021).

A partir das nossas predições com ILHV e HLA-I, identificamos os epítopos VMAKDKPTL (34-42), ASYVCKSSY (89-97) e SITPSAPTY (169-177) com maior promiscuidade e afinidade alélicas, representando regiões distribuídas entre os domínios DI e DII ou próximas ao peptídeo de fusão. Quanto às análises com ROCV e HLA-I, foi identificada maior promiscuidade e afinidade alélicas nos epítopos IMAKDKPTL (34-42), SITPSSPSF (169-177), TVAGTTLTL (274-282) e GTGPNQVKY (388-396), sendo os três primeiros presentes entre DI e DII e, o último, em DIII. Mutações nesses epítopos podem vir a influenciar nos mecanismos de patogênese e resistência viral, tornando-os alvos de interesse na formulação de vacinas (Mushtaq *et al.*, 2023).

No que diz respeito às predições com HLA-II, os epítopos de maior promiscuidade e afinidade alélicas foram RENLNYDVAVYVHGP (133-147) para ILHV e KDKFAFAKNPVDTGH (307-322) para ROCV, os quais estão distribuídos em diferentes domínios da proteína E, podendo contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento vacinal, especialmente naquelas estratégias baseadas em DIII, tido como o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Zhang *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÃO

Esta pesquisa evidenciou que ILHV e ROCV apresentam variações nas propriedades físico-químicas, conformacionais e imunológicas do ectodomínio da proteína E, ainda que sejam membros do mesmo gênero viral, as quais podem influenciar em diversos estágios do seu ciclo replicativos. Tais diferenças, correlacionadas às mutações presentes entre os diferentes domínios da proteína, podem identificar regiões de maior propensão antigênica e reconhecimento da atividade imunológica que podem interferir no reconhecimento celular e na progressão da doença ocasionada pelos vírus. Por fim, ainda se tornam necessários estudos experimentais que possem aprimorar as investigações estabelecidas neste estudo, confirmando as propriedades investigadas de forma comparativa entre os tipos virais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. In: Imunologia Celular e Molecular 5° Edição. **Imunologia Celular e Molecular 5° Edição. Abbas AK**, 2005.

ALLISON, S. L. *et al.* Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus Envelope protein E. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5605–5612, 1999.

ALMEIDA, J. F. *et al.* Diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in different types of larvitraps in an Amazon rural settlement. **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0235726, 2020.

ALTUVIA, Y.; MARGALIT, H. A structure-based approach for prediction of MHC-binding peptides. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 34, n. 4, p. 454–459, 2004.

AMARAL, Marcelo Pires *et al.* Prime-boost with Chikungunya virus E2 envelope protein combined with Poly (I:C) induces specific humoral and cellular immune responses. **Current research in immunology**, v. 2, p. 23–31, 2021.

AMARILLA, A. A. *et al.* Chimeric viruses between Rocio and West Nile: the role for Rocio prM-E proteins in virulence and inhibition of interferon-α/β signaling. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

AMARILLA, A. A. *et al.* CCR2 plays a protective role in Rocio virus–induced encephalitis by promoting macrophage infiltration into the brain. **The journal of infectious diseases**, v. 219, n. 12, p. 2015–2025, 2019.

AMBERG, S. M.; RICE, C. M. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the Flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. **Journal of virology**, v. 73, n. 10, p. 8083–8094, 1999.

AMRUN, S. N. *et al.* Novel differential linear B-cell epitopes to identify Zika and dengue virus infections in patients. **Clinical & translational immunology**, v. 8, n. 7, 2019.

ANASTASINA, M. *et al.* The structure of immature tick-borne encephalitis virus supports the collapse model of flavivirus maturation. **Science advances**, v. 10, n. 27, p. eadl1888, 2024.

ANTONNY, B. Membrane deformation by protein coats. **Current opinion in cell biology**, v. 18, n. 4, p. 386–394, 2006.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Current opinion in virology**, v. 9, p. 134–142, 2014.

ARAÚJO, P. A. *et al.* Investigation about the occurrence of transmission cycles of arbovirus in the tropical forest, Amazon region. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 774, 2019.

ARGONDIZZO, A. P. C.; SILVA, D.; MISSAILIDIS, S. Application of aptamer-based assays to the diagnosis of arboviruses important for public health in Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 1, p. 159, 2020.

AVIRUTNAN, P. *et al.* Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The journal of experimental medicine**, v. 207, n. 4, p. 793–806, 2010.

AZEVEDO, A. S. *et al.* DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e20528, 2011.

AZEVEDO, R. DO S. DA S. *et al.* Estudo experimental sobre a patogenicidade do Vírus Ilhéus em hamsters dourados (Mesocricetus auratus). **Revista pan-amazonica de saude**, v. 1, n. 1, 2010.

BARRETT, Chelsea T.; DUTCH, Rebecca Ellis. Viral membrane fusion and the transmembrane domain. **Viruses**, v. 12, n. 7, p. 693, 2020.

BENZAGHOU, I. *et al.* Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase. **FEBS letters**, v. 580, n. 3, p. 867–877, 2006.

BERGAMASCHI, G. *et al.* Computational analysis of Dengue virus envelope protein (E) reveals an Epitope with Flavivirus immunodiagnostic potential in peptide microarrays. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1921, 2019.

BIENZ, K. *et al.* Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. **Journal of virology**, v. 66, n. 5, p. 2740–2747, 1992.

BJORKMAN, P. J. *et al.* Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 506–512, 1987.

BJORKMAN, P. J.; PARHAM, P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. **Annual review of biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 253–288, 1990.

BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927–1959, 2015.

BONAM, Srinivasa Reddy; SAKSENA, Nitin K.; RECHE, Pedro A. Editorial: Innovative vaccine strategies for enhanced flavivirus immunization. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, n. 1729523, p. 1729523, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. 2** ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. Guia de vigilância em saúde: volume 2. **Ministério da Saúde, Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente**. – 6. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2024.

BRESSANELLI, S. *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **The EMBO journal**, v. 23, n. 4, p. 728–738, 2004.

BRINTON, M. A.; DISPOTO, J. H. Sequence and secondary structure analysis of the 5′-terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology**, v. 162, n. 2, p. 290–299, 1988.

BRINTON, M. A.; FERNANDEZ, A. V.; DISPOTO, J. H. The 3′-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. **Virology**, v. 153, n. 1, p. 113–121, 1986.

BROWN, J. H. *et al.* Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, v. 364, n. 6432, p. 33–39, 1993.

BUCKLEY, S. M. *et al.* Arbovirus neutralization tests with Peruvian sera in Vero Cell cultures. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 4, p. 451-455, 1972.

CASSEB, A. R. *et al.* Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (Bubalus bubalis) in Brazilian Amazon. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, n. 1, p. 9, 2014.

CAUSEY, O. R. *et al.* The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 227-249, 1961.

CHAMBERS, T. J.; GRAKOUI, A.; RICE, C. M. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. **Journal of virology**, v. 65, n. 11, p. 6042–6050, 1991.

CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The incubation periods of Dengue viruses. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50972, 2012.

CHATEL-CHAIX, L. *et al.* Dengue virus perturbs mitochondrial morphodynamics to dampen innate immune responses. **Cell host & microbe**, v. 20, n. 3, p. 342–356, 2016.

CHÁVEZ, J. H. *et al.* Influence of the CCR-5/MIP-1 α axis in the pathogenesis of Rocio virus encephalitis in a mouse model. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 5, p. 1013–1018, 2013a.

CHÁVEZ, J. H. *et al.* Production and diagnostic application of recombinant domain III of West Nile envelope protein in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 97-99, 2013b.

CHEN, D.; PATTON, J. T. Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3′ end for efficient minus-strand synthesis. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7387–7396, 1998.

CHEN, Sean Chun-Chang; CHEN, Feng-Chi; LI, Wen-Hsiung. Resíduos de serina e treonina fosforilados e não fosforilados evoluem a taxas diferentes em mamíferos. **Biologia Molecular e Evolução** , v. 27, n. 11, p. 2548–2554, 2010.

CHU, P. W. G.; WESTAWAY, E. G. Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: Reinitiation of synthesis in Vitro. **Virology**, v. 157, n. 2, p. 330–337, 1987.

CHU, P. W. G.; WESTAWAY, E. G. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. **Archives of virology**, v. 125, n. 1–4, p. 177–191, 1992.

CI, Y. *et al.* Zika NS1–induced ER remodeling is essential for viral replication. **The journal of cell biology**, v. 219, n. 2, 2020.

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, p. 561-573, 1958.

COMOLLI, L. R. NMR structure of the 3’ stem-loop from human U4 snRNA. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 20, p. 4371–4379, 2002.

COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 4848, 2017.

CRUZ-TAPIAS, P.; CASTIBLANCO, J.; ANAYA, J.-M. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. **El Rosario University Press**, 2013.

DA COSTA, V. G. *et al.* Clinical landscape and rate of exposure to Ilheus virus: Insights from systematic review and meta-analysis. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 92, 2022.

DAS NEVES MARTINS, F. E. *et al.* Newborns with microcephaly in Brazil and potential vertical transmission of Oropouche virus: a case series. **The Lancet infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 155–165, 2025.

DE BARROS, V. E. D. *et al.* An Experimental Model of Meningoencephalomyelitis by Rocio Flavivirus in Balb/C Mice: Inflammatory Response, Cytokine Production, and Histopathology. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 2, p. 363–373, 2011.

DE FILETTE, M. *et al.* T cell Epitope mapping of the E-protein of west Nile virus in BALB/c mice. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115343, 2014.

DEGALLIER, N. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**, n. 1, p. 69–111, 1992.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 745–748, 2010.

DE SOUZA LOPES, O. *et al.* Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from Psorophora Ferox (Humboldt, 1819). **American journal of epidemiology**, v. 113, n. 2, p. 122–125, 1981.

DEVAUX, P. F. *et al.* How lipid flippases can modulate membrane structure. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1778, n. 7–8, p. 1591–1600, 2008.

DIAS, R. S. *et al.* DENV-3 precursor membrane (prM) glycoprotein enhances E protein immunogenicity and confers protection against DENV-2 infections in a murine model. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 17, n. 5, p. 1271–1277, 2021.

DROSU, Natalia *et al.* CD4 T cells restricted to DRB1*15:01 recognize two Epstein-Barr virus glycoproteins capable of intracellular antigen presentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 121, n. 44, p. e2416097121, 2024.

EICKHOFF, Christopher S. *et al.* Identification of immunodominant T cell epitopes induced by natural Zika virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1247876, 2023.

ERBEL, P. *et al.* Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 4, p. 372–373, 2006.

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

FERREIRA, I. B. *et al.* Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, State of São Paulo, Brazil: I. Detection of hemagglutination-inhibition antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 265-274, 1994.

FIGUEIREDO, L. T. M. Estudo sobre infecções por arbovírus na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. 1985. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1985.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on infections of the central nervous system by St. Louis encephalitis, Rocio and West Nile flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, p. 955-968, 2014.

FILOMATORI, C. V. *et al.* RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. **The journal of biological chemistry**, v. 286, n. 9, p. 6929–6939, 2011.

FONTES-GARFIAS, C. R. *et al.* Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. **Cell reports**, v. 21, n. 5, p. 1180–1190, 2017.

FRANZ, A. W. E. *et al.* Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 2015.

FRITZ, R.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. **The journal of cell biology**, v. 183, n. 2, p. 353–361, 2008.

FROLOV, I.; HARDY, R.; RICE, C. M. Cis-acting RNA elements at the 5′ end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 7, n. 11, p. 1638–1651, 2001.

GALLICHOTTE, Emily N. *et al.* Role of Zika virus envelope protein domain III as a target of human neutralizing antibodies. **MBio**, v. 10, n. 5, p. 10.1128/mbio. 01485-19, 2019.

GHOSH, P. *et al.* The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. **Nature**, v. 378, n. 6556, p. 457–462, 1995.

GHOSHAL, A. *et al.* Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 483–496, 2007.

GIBBONS, D. L. *et al.* Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 320–325, 2004.

GIRARD, Y. A.; KLINGLER, K. A.; HIGGS, S. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected Culex pipiens quinquefasciatus. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 4, n. 2, p. 109–122, Verão 2004.

GOLS, R. *et al.* Within-patch and edge microclimates vary over a growing season and are amplified during a heatwave: Consequences for ectothermic insects. **Journal of thermal biology**, v. 99, n. 103006, p. 103006, 2021.

GOTO, Yoshihiko *et al.* Molecular basis of potent antiviral HLA-C-restricted CD8+ T cell response to an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 8062, 2025.

GRÄF, Tiago *et al.* Rocio virus sustained circulation in Brazil: first infection case in a horse highlights the need for enhanced arbovirus surveillance. **Archives of Virology**, v. 171, n. 4, 2026.

GREY, H. M. *et al.* The small subunit of hl-a antigens is ß2-microglobulin. **The journal of experimental medicine**, v. 138, n. 6, p. 1608–1612, 1973.

GRIEF, C. *et al.* Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. **Archives of virology**, v. 142, n. 12, p. 2347–2357, 1997.

GRIFONI, Alba *et al.* A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 4, p. 671-680.e2, 2020.

HAHN, C. S. *et al.* Conserved elements in the 3′ untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **Journal of molecular biology**, v. 198, n. 1, p. 33–41, 1987.

HAN, J.-F. *et al.* Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10047, 2017.

HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual review of entomology**, v. 28, n. 1, p. 229–262, 1983.

HARRIS, Rebecca A. *et al.* Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and African Americans. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 1, p. 70–79, 2008.

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Virology**, v. 479–480, p. 498–507, 2015.

HASLWANTER, D. *et al.* Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies. **Cell host & microbe**, v. 30, n. 2, p. 248- 259.e6, 2022.

HEEMELS, M.-T.; PLOEGH, H. Generation, translocation, and presentation of mhc class i-restricted peptides. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 463–491, 1995.

HEINZ, Franz X.; STIASNY, Karin. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, 2012.

HENCHAL, E. A. *et al.* Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 1, p. 162–169, 1985.

HEROLD, J.; ANDINO, R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein–protein bridge. **Molecular cell**, v. 7, n. 3, p. 581–591, 2001.

HOFFMANN, H.-H. *et al.* TMEM41B is a pan-flavivirus host factor. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 133-148.e20, 2021.

HU, T. *et al.* The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: viral entry. **Virology journal**, v. 18, n. 1, 2021a.

HU, T. *et al.* Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. **Briefings in bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 631–641, 2021b.

HU, Tao *et al.* Substitutions at loop regions of TMUV E protein domain III differentially impair viral entry and assembly. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 688172, 2021c.

HU, Jian Ming *et al.* HLA-DQB1*03 and DRB1*07 alleles increase the risk of cervical cancer among Uighur and Han women in Xinjiang, China. **Future Oncology (London, England)**, v. 14, n. 20, p. 2005–2011, 2018.

HUANG, Rong *et al.* A mutação do resíduo 389 da proteína do envelope do vírus da encefalite japonesa atenua a neuroinvasividade viral. **Virology Journal** , v. 21, n. 1, p. 128, 2024.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). The Master Species List: A Spreadsheet of Current Taxonomy. ICTV_Master_Species_List_2023_MSL39.v3.xlsx. Versão 4. 2024.

ISHIDA, K. *et al.* N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 19, n. 10, p. e1011681, 2023.

ISSUR, M. *et al.* The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 12, p. 2340–2350, 2009.

IVERSSON, L. B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovirus na Região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública** (São Paulo), v. 14, p. 9-35, 1980.

IVERSSON, L. B. *et al.* Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 4, p. 355-359, 1993.

IVERSSON, L. B. Rocio encephalitis. In: MONATH, T. P. (Ed.). The arboviruses: Epidemiology and ecology. **Boca Raton**, FL: CRC Press, p. 77-92, 1986.

JAIMIPUK, Thitigun *et al.* A small-plaque isolate of the Zika virus with envelope domain III mutations affect viral entry and replication in mammalian but not mosquito cells. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 480, 2022.

JOHNSON, B. W. *et al.* Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. **Journal of Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 956-958, 2007.

JUNJHON, J. *et al.* Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. **Journal of virology**, v. 88, n. 9, p. 4687–4697, 2014.

KAABINEJADIAN, Saghar *et al.* Immunodominant West Nile virus T cell epitopes are fewer in number and fashionably late. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 196, n. 10, p. 4263–4273, 2016.

KECK, Forrest *et al.* Phosphorylation of single stranded RNA virus proteins and potential for novel therapeutic strategies. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5257-5273, 2015.

KIELIAN, Margaret. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 38-47, 2006.

KHROMYKH, A. A. *et al.* Essential role of cyclization sequences in Flavivirus RNA replication. **Journal of virology**, v. 75, n. 14, p. 6719–6728, 2001.

KHROMYKH, A. A. *et al.* Significance in replication of the terminal nucleotides of the *Flavivirus* genome. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10623–10629, 2003.

KIM, Young Chan *et al.* Optimization of Zika virus envelope protein production for ELISA and correlation of antibody titers with virus neutralization in Mexican patients from an arbovirus endemic region. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 193, 2018.

KOOIJMAN, E. E. *et al.* Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 4, n. 3, p. 162–174, 2003.

KUMAR, K. *et al.* The distribution of important sero-complexes of flaviviruses in Malaysia. **Tropical animal health and production**, v. 51, n. 3, p. 495–506, 2019.

KRAMER, L. D. Complexity of virus–vector interactions. **Current opinion in virology**, v. 21, p. 81–86, 2016.

KRAEMER, M. U. G. *et al.* Publisher Correction: Past and future spread of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Aedes albopictus. **Nature microbiology**, v. 4, n. 5, p. 901, 2019.

LACHER, Markus D. *et al.* SV-BR-1-GM, a clinically effective GM-CSF-secreting breast cancer cell line, expresses an immune signature and directly activates CD4+ T lymphocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 776, 2018.

LEÃO, R. Medicina tropical e infectologia na Amazônia. **Belém: Samauma Editorial**. v. 23, p. 481–503, 2013.

LEE, Eva; LOBIGS, Mario. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. **Journal of Virology**, v. 82, n. 12, p. 6024–6033, 2008.

LEVIS, R.; SCHLESINGER, S.; HUANG, H. V. Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. **Journal of virology**, v. 64, n. 4, p. 1726–1733, 1990

LI, You *et al.* Fine mapping identifies independent HLA associations in autoimmune hepatitis type 1. **JHEP Reports: Innovation in Hepatology**, v. 6, n. 1, p. 100926, 2024.

LI, X.-D. *et al.* Genetic interaction between NS4A and NS4B for replication of Japanese encephalitis virus. **The Journal of general virology**, v. 96, n. 6, p. 1264–1275, 2015.

LIM, D.-W.; CHOI, M.-S.; KIM, S.-M. Bioinformatics and connectivity map analysis suggest viral infection as a critical causative factor of hashimoto's thyroiditis. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 2, p. 1157, 2023.

LIN, C. *et al.* Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. **Journal of virology**, v. 67, n. 4, p. 2327–2335, 1993.

LIU, X. *et al.* Liu *et al.* suspect that Zhu *et al.* (2015) may have underestimated dissolved organic nitrogen (N) but overestimated total particulate N in wet deposition in China. **The Science of the total environment**, v. 520, p. 300–301, 2015.

LOBIGS, M.; LEE, E. Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding Flavivirus membranes. **Journal of virology**, v. 78, n. 1, p. 178–186, 2004.

LODEIRO, M. F.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. **Journal of virology**, v. 83, n. 2, p. 993–1008, 2009.

LOPES, O. de S. *et al.* Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American Journal of Epidemiology**, v. 107, n. 5, p. 444-449, 1978.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista pan-amazonica de saude**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

LOWE, R. *et al.* The Zika virus epidemic in Brazil: From discovery to future implications. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 96, 2018.

LUNARDELLI, Victória Alves Santos *et al.* Diagnostic and vaccine potential of Zika virus envelope protein (E) derivates produced in bacterial and insect cells. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1071041, 2023.

LUNDEGAARD, C. *et al.* NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W509–W512, 2008.

LUNDEGAARD, C.; NIELSEN, M.; LUND, O. The validity of predicted T-cell epitopes. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 537–538, 2006.

MACKENZIE, J. M. *et al.* Subcellular localization and some biochemical properties of the Flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**, v. 245, n. 2, p. 203–215, 1998.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232–240, 1996.

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, 2024.

MALONEY, B. E. *et al.* Identification of the flavivirus conserved residues in the envelope protein hinge region for the rational design of a candidate West Nile live-attenuated vaccine. **npj vaccines**, v. 8, n. 1, p. 172, 2023.

MANGALA PRASAD, Vidya *et al.* Visualization of conformational changes and membrane remodeling leading to genome delivery by viral class-II fusion machinery. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4772, 2022.

MONDOTTE, Juan A. *et al.* Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of virology**, v. 81, n. 13, p. 7136-7148, 2007.

MANI, H. *et al.* Comparison, analysis, and molecular dynamics simulations of structures of a viral protein modeled using various computational tools. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 9, p. 1004, 2023.

MANOCK, S. R. *et al.* Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon Basin of Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p.146-151, 2009.

MATZARAKI, V. *et al.* The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. **Genome biology**, v. 18, n. 1, 2017.

MCAULEY, Alexander J. *et al.* Recovery of West Nile virus envelope protein domain III chimeras with altered antigenicity and mouse virulence. **Journal of virology**, v. 90, n. 9, p. 4757–4770, 2016.

MCKECHNIE, J. L. *et al.* HLA upregulation during dengue virus infection suppresses the natural killer cell response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 268, 2019.

MCMAHON, H. T.; GALLOP, J. L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 590–596, 2005.

MEDHASI, S.; CHANTRATITA, N. Human leukocyte antigen (HLA) system: Genetics and association with bacterial and viral infections. **Journal of immunology research**, v. 2022, p. 1–15, 2022.

MEDLIN, S. *et al.* Serosurvey of selected arboviral pathogens in free-ranging, two-toed sloths (Choloepus hoffmanni) and three-toed sloths (Bradypus variegatus) in Costa Rica, 2005–07. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 4, p. 883-892, 2016.

MENEZES, Carla *et al.* O desequilíbrio da resposta TH1/TH2 na patogênese do vírus Zika: um paradoxo imunológico. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica** , v. 133, n. 12, p. e70117, 2025.

MILHIM, B. H. G. A. *et al.* Fatal outcome of Ilheus virus in the cerebrospinal fluid of a patient diagnosed with encephalitis. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 957, 2020.

MILLER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 363–374, 2008.

MIZUTA, K. *et al.* Longitudinal epidemiology of viral infectious diseases combining virus isolation, antigenic analysis, and phylogenetic analysis as well as seroepidemiology in Yamagata, Japan, between 1999 and 2018. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 72, n. 4, p. 211–223, 2019.

MONTEIRO, Sérgio Pereira *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, 2012.

MORALES, M. A. *et al.* Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers

(Alouatta caraya) of Northeastern Argentina. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005351, 2017.

MORITA, E.; SUZUKI, Y. Membrane-associated Flavivirus replication complex-its organization and regulation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1060, 2021.

MORRIS, P. *et al.* An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 551–554, 1994.

MOURA REIS, L. A.; NUNES NETO, J. P. Ilheus virus: Revisão sobre um Arbovirus Emergente / Ilheus virus: emerging arbovirus review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 37675–37695, 2021.

NAIK, N. G.; WU, H.-N. Mutation of putative N-glycosylation sites on dengue virus NS4B decreases RNA replication. **Journal of virology**, v. 89, n. 13, p. 6746–6760, 2015.

NASSAR, E. S. *et al.* Human disease caused by an arbovirus closely related to Ilheus virus: report of five cases. **Intervirology**, v. 40, p. 247-252, 1997.

NEUMANN-HAEFELIN, Christoph *et al.* Absence of viral escape within a frequently recognized HLA-A26-restricted CD8+ T-cell epitope targeting the functionally constrained hepatitis C virus NS5A/5B cleavage site. **The Journal of General Virology**, v. 88, n. Pt 7, p. 1986–1991, 2007.

OFFERDAHL, D. K. *et al.* A three-dimensional comparison of tick-borne Flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47912, 2012.

OLAFSDOTTIR, Thorunn A. *et al.* HLA alleles, disease severity, and age associate with T-cell responses following infection with SARS-CoV-2. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 914, 2022.

OPAS. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALT ORGANIZATION. **Guidelines for surveillance of Zika virus disease and its complications**. Washington, DC, 2016.

PALANISAMY, N.; LENNERSTRAND, J. Computational prediction of Usutu virus E protein B cell and T cell epitopes for potential vaccine development. **Scandinavian journal of immunology**, v. 85, n. 5, p. 350–364, 2017.

PARHAM, P. *et al.* Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 11, p. 4005–4009, 1988.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e2706, 2014.

PAUVOLID-CORRÊA, A. *et al.* Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, p. e2318, 2013.

PERERA-LECOIN, M. *et al.* Flavivirus entry receptors: an update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69–88, 2013.

PÉREZ-RUBIO, Gloria *et al.* Role of the host genetic susceptibility to 2009 pandemic influenza A H1N1. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 344, 2021.

PETERSON, A. J. *et al.* Unleashing nature's allies: Comparing the vertical transmission dynamics of insect-specific and vertebrate-infecting flaviviruses in mosquitoes. **Viruses**, v. 16, n. 9, 2024.

PEREIRA, L. E. *et al.* Arbovírus Ilheus em aves silvestres (Sporophila caerulescens e Molothrus bonariensis). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 119-123, 2001.

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

PINHEIRO, F. P. *et al.* Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. **Fundação Serviços de Saúde Pública**, v. 1, p. 375–408, 1986.

PINHEIRO, F. P. *et al.* Diagnóstico e tratamento das doenças infectiosas e parasitárias. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A**. v. 19, p. 291-302., 1983.

PLANTE, K. S. *et al.* Potential of Ilhéus virus to emerge. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. e27934, 2024.

PŁASZCZYCA, A. *et al.* A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 5, p. e1007736, 2019.

PRÍAS-LANDÍNEZ, E. *et al.* Encuesta serológica de virus transmitidos por artrópodos. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 70, p. 134-141, 1970.

PROUTSKI, V. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 6, p. 1194–1202, 1997.

QUONG, M. W.; ROMANOW, W. J.; MURRE, C. E protein function in lymphocyte development. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 301–322, 2002.

RAGHAVAN, M. *et al.* Strategies for the measurements of expression levels and half-lives of HLA class I allotypes. **Human immunology**, v. 80, n. 4, p. 221–227, 2019.

RICE, C. M. *et al.* Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for Flavivirus gene expression and evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 229, n. 4715, p. 726–733, 1985.

RICE, C. M. *et al.* os vírus e sua replicação. Em: Fields BN. p. 931–959, 1996.

RANGEL, Margarita V. *et al.* Structurally conserved domains between flavivirus and alphavirus fusion glycoproteins contribute to replication and infectious-virion production. **Journal of Virology**, v. 96, n. 2, p. e01774-21, 2022.

ROEHRIG, John T. *et al.* Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. **Virology**, v. 441, n. 2, p. 114-125, 2013.

ROBSON, K. J. *et al.* HLA and kidney disease: from associations to mechanisms. **Nature reviews. Nephrology**, v. 14, n. 10, p. 636–655, 2018.

ROMANO-LIEBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2000.

ROMOSER, W. S.; BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. **Biologia dos Vetores de Doenças**. Niwot, CO, EUA: University Press of Colorado, 1996.

ROOSENDAAL, J. *et al.* Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. **Journal of virology**, v. 80, n. 9, p. 4623–4632, 2006.

ROSEMBERG, S. Neuropathology of São Paulo south coast epidemic encephalitis (Rocio flavivirus). **Journal of the Neurological Sciences**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 1980.

RUSSELL, D. L.; DALRYMPLE, J. M.; JOHNSTON, R. E. Sindbis virus mutations which coordinately affect glycoprotein processing, penetration, and virulence in mice. **Journal of virology**, v. 63, n. 4, p. 1619–1629, 1989.

RYAN, S. O.; COBB, B. A. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 3, p. 425–441, 2012.

SAIVISH, M. V. *et al.* Detection of Rocio virus SPH 34675 during dengue epidemics, Brazil, 2011-2013. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 4, p. 797–799, 2020.

SAIVISH, M. V. *et al.* Rocio virus: An updated view on an elusive Flavivirus. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2293, 2021.

SAMSA, M. M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000632, 2009.

SELIGMAN, Stephen J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 27, 2008.

SHAPIRO, J. *et al.* Localization of endogenous furin in cultured cell lines. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 45, n. 1, p. 3–12, 1997.

SHARMA, A. *et al.* In-silico immunoinformatic analysis of SARS-CoV-2 virus for the development of putative vaccine construct. **Immunobiology**, v. 226, n. 5, p. 152134, 2021.

SHI, P.-Y. *et al.* Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3‘ terminus of the Flavivirus genomic RNA. **Biochemistry**, v. 35, n. 13, p. 4222–4230, 1996.

SHIN, M. *et al.* Vaccination with a Zika virus envelope domain III protein induces neutralizing antibodies and partial protection against Asian genotype in immunocompetent mice. **Tropical medicine and health**, v. 50, n. 1, p. 91, 2022.

SHRESTHA, B. *et al.* Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. **Journal of virology**, v. 80, n. 11, p. 5338–5348, 2006.

SHUMAN, S. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. Em: **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. Elsevier, p. 1–40, 2000.

SILVA, J. R. *et al.* A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 414-417, 2014.

SIMMONDS, P. *et al.* **Perfil de taxonomia do vírus ICTV: Flaviviridae**. Journal of General Virology, v. 98, p. 2-3, 2017.

SLON CAMPOS, Jose L. *et al.* DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. **PloS One**, v. 12, n. 7, p. e0181734, 2017.

SMITH, D. R. Waiting in the wings: The potential of mosquito transmitted flaviviruses to emerge. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 405-422, 2016.

SOMMER, S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. **Frontiers in zoology**, v. 2, n. 1, p. 16, 2005.

SOUTHAM, C. M.; MOORES, A. E. Anti-virus antibody studies following induced infection of man with West Nile, Ilhéus, and other viruses. **The Journal of Immunology**, v. 72, n. 6, p. 446-462, 1954.

SPENCE, L. *et al.* Isolation of Ilhéus virus from human beings in Trinidad, West Indies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 6, p. 504-509, 1962.

SPUUL, P. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. **Journal of virology**, v. 84, n. 15, p. 7543–7557, 2010.

SRIVASTAVA, V. K. *et al.* A bioinformatics approach for the prediction of immunogenic properties and structure of the SARS-COV-2 B.1.617.1 variant spike protein. **BioMed research international**, v. 2021, n. 1, p. 7251119, 2021.

STETTLER, Karin *et al.* Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016.

STRAATMANN, A. *et al.* Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n.6, p. 511–515, nov. 1997.

STADLER, K. *et al.* Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–8481, 1997.

SUN, P. *et al.* A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 260, 2020.

TAPIAS, P. C.; CASTIBLANCO, J.; ANAYA, J. M. **Autoimunidade: da bancada à cabeceira**. Bogotá (Colômbia: El Rosario University Press, 2013.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Pesquisa de anticorpos contra arbovírus e o vírus vacinal da febre amarela em uma amostra da população de Rio Branco, antes e três meses após a vacina 17D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 2004.

TAVARES-NETO, J. *et al.* Pesquisa de anticorpos para arbovírus no soro de residentes no povoado de Corte de Pedra, Valença, Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 351-358, 1986.

TIRIBA, A. de C. Epidemia de encefalite atribuída a arbovirus ocorrida no litoral Sul do Estado de S. Paulo, em 1975: contribuição para o estudo clínico. 1975. Tese (Livre- docência) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1975.

TRÄGÄRDH, L. *et al.* Complete amino acid sequence of pooled papain-solubilized HLA-A, -B, and -C antigens: relatedness to immunoglobulins and internal homologies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 2, p. 1129–1133, 1980.

UEHARA, H. *et al.* Primary structure of murine major histocompatibility alloantigens: amino acid sequence of the cyanogen bromide fragment Ia (positions 139-228) from the H-2Kb molecule. **Biochemistry**, v. 19, n. 26, p. 6182–6188, 1980.

VAN DER MERWE, P. A.; DAVIS, S. J. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 659–684, 2003.

VANEY, Marie-Christine; REY, Felix A. Class II enveloped viruses. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1451-1459, 2011.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Arboviroses. LEÃO, R. N. Q. (Ed). MedicinaTropical e infectologia da Amazônia**. Belém: Samauma**, p. 481-504, 2013.

VAUGHAN, Kerrie *et al.* Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. **Viral Immunology**, v. 23, n. 3, p. 259–284, 2010.

VENEGAS, E. A. *et al.* Ilheus virus infection in human, Bolivia. **Journal of Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 516-518, 2012.

VIEIRA, C. J. S. P. *et al.* Detection of Ilheus virus in mosquitoes from southeast Amazon, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 7, p. 424-427, 2019.

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, 2022.

VILLALAÍN, José. Phospholipid binding of the dengue virus envelope E protein segment containing the conserved His residue. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1865, n. 7, p. 184198, 2023.

VILLORDO, S. M.; GAMARNIK, A. V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. **Virus research**, v. 139, n. 2, p. 230–239, 2009.

VISHNUBHOTLA, Ravikanth *et al.* High-resolution HLA genotyping identifies alleles associated with severe COVID-19: A preliminary study from India. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 9, n. 4, p. 1781–1785, 2021.

WANG, D.-P. *et al.* Crystal structure of the Ilheus virus helicase: implications for enzyme function and drug design. **Cell & bioscience**, v. 12, n. 1, p. 44, 2022.

WANG, P. *et al.* A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 4, p. e1000048, 2008.

WANG, P. *et al.* Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, 2010.

WANZELLER, A. L. M. *et al.* Isolation of flaviviruses and alphaviruses with encephalitogenic potential diagnosed by Evandro Chagas Institute (Pará, Brazil) in the period of 1954–2022: Six decades of discoveries. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 935, 2023.

WELSCH, S. *et al.* Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 365–375, 2009.

WEINGARTEN-GABBAY, Shira *et al.* The HLA-II immunopeptidome of SARS-CoV-2. **Cell Reports**, v. 43, n. 1, p. 113596, 2024.

WEN, Dan *et al.* N-glycosylation of viral E protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. **Mbio**, v. 9, n. 1, p. 10.1128/mbio. 00046-18, 2018.

WHITE, Judith M. *et al.* Viral membrane fusion: a dance between proteins and lipids. **Annual review of virology**, v. 10, n. 1, p. 139-161, 2023.

WESTAWAY, E. G. *et al.* Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **Journal of virology**, v. 71, n. 9, p. 6650–6661, 1997.

WILLIAMS, A.; PEH, C. A.; ELLIOTT, T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. **Tissue antigens**, v. 59, n. 1, p. 3–17, 2002.

WU, Kuen-Phon *et al.* Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein: Solution structure of the domain iii of the Japanese encephalitis virus envelope protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 46007–46013, 2003.

XIONG, Huaping *et al.* HLA-B alleles B*15:01 and B*15:02: opposite association with hepatitis C virus infection in Chinese voluntary blood donors. **Intervirology**, v. 58, n. 2, p. 80–87, 2015.

VILLALAÍN, José. Phospholipid binding of the dengue virus envelope E protein segment containing the conserved His residue. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1865, n. 7, p. 184198, 2023.

YOU, S.; PADMANABHAN, R. A novel in vitro replication system for dengue virus. **The journal of biological chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33714–33722, 1999.

YOUN, S. *et al.* Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. **Journal of virology**, v. 86, n. 13, p. 7360–7371, 2012.

YOUNG, Christian L. *et al.* Protection of swine by potent neutralizing anti-Japanese encephalitis virus monoclonal antibodies derived from vaccination. **Antiviral Research**, v. 174, n. 104675, p. 104675, 2020.

YU, I.-M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2008.

ZENG, L.; FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3′-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7510–7522, 1998.

ZHANG, G.; ZHANG, J.; SIMON, A. E. Repression and derepression of minus-strand synthesis in a plus-strand RNA virus replicon. **Journal of virology**, v. 78, n. 14, p. 7619–7633, 2004.

ZHANG, R. *et al.* A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 164–168, 2016.

ZHANG, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature structural & molecular biology**, v. 10, n. 11, p. 907–912, 2003.

ZHANG, Y. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure (London, England: 1993)**, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, 2004.

ZHENG, A. *et al.* A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 3877, 2014.

ZHENG, A.; UMASHANKAR, M.; KIELIAN, M. In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001157, 2010.

ZMURKO, J.; NEYTS, J.; DALLMEIER, K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. **Reviews in medical virology**, v. 25, n. 4, p. 205–223, 2015.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Projeto de pesquisa financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob a forma de uma bolsa de estudos fornecida ao mestrando.

ANEXO 1

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A577EAD

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	**A577EAD**
Usuário:	**Carlos Alberto Marques de Carvalho**
CPF/CNPJ:	**115.522.647-00**
Objeto do Acesso:	**Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:	**Pesquisa**

Espécie

Orthoflavivirus ilheusense

Título da Atividade:	**Análise in Silico da Propensão Antigênica do Ectodomínio da Proteína de Fusão dos Vírus Ilhéus e Rocio**

Equipe

Carlos Alberto Marques de Carvalho	**UEPA**
João Vitor dos Santos Benjamin	**UEPA**

Data do Cadastro:	**08/03/2026 20:14:15**
Situação do Cadastro:	**Concluído**

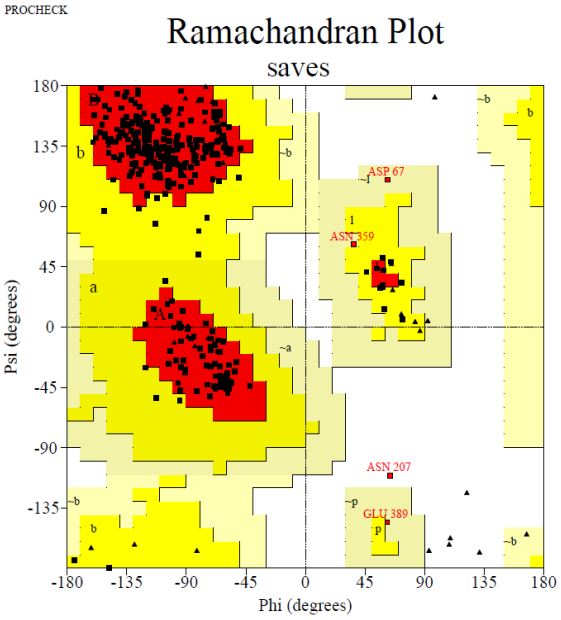
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **20:14** de **08/03/2026**.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO - SISGEN

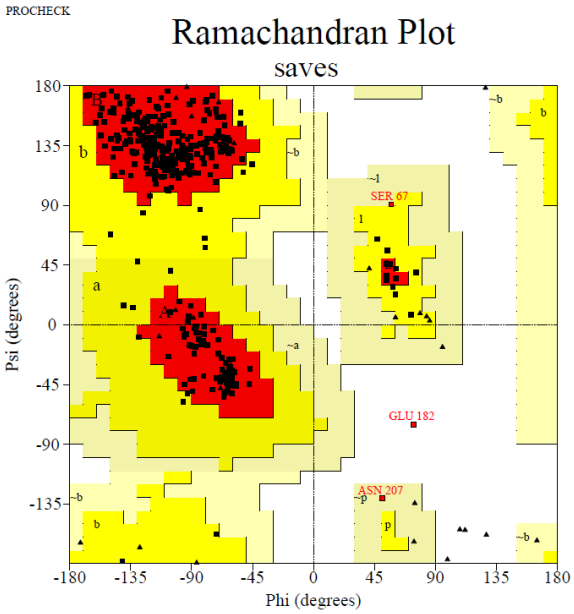
ANEXO 2

Diagramas de Ramachandran dos modelos tridimensionais refinados do ectodomínio da proteína E de ILHV e ROCV.

ILHV



ROCV



ANEXO 3

Artigo de dissertação de mestrado submetido (2026) na revista Computational Biology and Chemistry.



Confirmação de coautoria do artigo submetido à revista Computational Biology and Chemistry.

Externo Caixa de entrada ×

Computational Biology and Chemistry <em@editorialmanager.com> 9 de mar. de 2026, 18:50

para mim

Esta é uma mensagem automática.

Revista: Computational Biology and Chemistry
Título: Análise in silico da propensão antigênica do ectodomínio da proteína de fusão dos vírus Ilheus e Rocio
Autor correspondente: Carlos Alberto M. Carvalho
Coautores: João Vitor S. Benjamin
Número do manuscrito: **CBAC-D-26-01188**

Prezado João Vitor S. Benjamin,

O autor correspondente, Carlos Alberto M. Carvalho, indicou você como autor colaborador do seguinte artigo submetido através do sistema de submissão online da Elsevier para a revista Computational Biology and Chemistry.

Título da submissão: Análise in silico da propensão antigênica do ectodomínio da proteína de fusão dos vírus Ilheus e Rocio

A Elsevier solicita que todos os autores confirmem sua coautoria, concordando com a publicação deste artigo caso seja aceito.

Por favor, leia a seguinte declaração e confirme sua concordância clicando neste link: Sim, sou afiliado. Eu, por meio

deste, autorizo e concedo meu consentimento irrevogável ao autor correspondente do manuscrito para: (1) celebrar um contrato de publicação com a Elsevier em meu nome, no formulário pertinente disponível em http://www.elsevier.com/copyright ; e (2) a menos que eu seja funcionário do governo dos EUA, transferir meus direitos autorais ou conceder uma licença de direitos