

ANÁLISE DE EPÍTOPOS DAS PROTEÍNAS NS1 E E DOS VÍRUS ZIKA, FEBRE AMARELA E DENGUE PARA PROPOSIÇÃO DE TESTE DE DIAGNÓSTICO

Data de aceite: 01/09/2023

Stefanny Paula Silva Souza

Universidade Federal de Jataí – UFJ,
Instituto de Ciências da Saúde – ICS
Jataí-Goiás

Marcos Lazaro Moreli

Universidade Federal de Jataí – UFJ,
Instituto de Ciências da Saúde – ICS
Jataí-Goiás

RESUMO: Identificar e selecionar epítomos adequados é um esforço demorado e caro que requer uma triagem experimental cuidadosa. Uma opção é usar a previsão computacional. Usou-se o software BV-BRC 3.26.4. Nele é possível selecionar genomas parciais e completos, ver estruturas, funções de vários vírus e bactérias que foram anotados. As sequências dos epítomos de DENV, FEBRE AMARELA e ZIKA das proteínas E e NS1 estavam em sincronização com o software IEDB. Posteriormente analisamos esses epítomos no NetMHCpan - 4. Usou-se a sequência em forma de fasta. Foram escolhidos 12 alelos pois são mais representativos para a população em geral. Após a obtenção das sequências e sua interação com MHC que tiveram ligação forte, realizou-se um modelo 3D através do software SWISS-MODEL.

Não foi encontrado nenhum peptídeo capaz de se ligar fortemente a algum alelo selecionado para os epítomos NS1 dos vírus Denv (1,2,3,4), Febre Amarela e Zika. Já na proteína E dos vírus pode-se observar uma ligação forte para Febre Amarela e uma ligação forte para Zika. Os resultados obtidos são promissores mesmo que não se obteve uma sequência reconhecida para Denv, pois pode-se usar esses achados para um teste como forma de exclusão de outros flavivírus do estudo.

PALAVRAS-CHAVE: *Software, Reatividade cruzada, Epítomos.*

ABSTRACT: Identifying and selecting suitable epitopes is a time-consuming and expensive effort that requires careful experimental screening. One option is to use computer prediction. used the BV-BRC software 3.26.4. It is possible to select partial and complete genomes, see structures, functions of various viruses and bacteria that have been annotated. The epitope sequences of DENV, YELLOW FEVER and ZIKA of the E and NS1 proteins were in sync with the IEDB software. Later we analyzed these epitopes in NetMHCpan - 4. We used the fasta-shaped sequence. 12 alleles were chosen because they are more

representative for the general population. After obtaining the sequences and their interaction with MHC that had strong connection, a 3D model was created using the SWISS-MODEL software. Was not found no peptide capable of binding strongly to any selected allele for NS1 epitopes of Denv(1,2,3,4), Yellow Fever and Zika viruses. In the E protein of viruses, one can observe a strong link to Yellow Fever and a strong link to Zika. The results obtained are promising even if we did not obtain a recognized sequence for Denv, because we can use these findings for testing as a means of excluding other flaviviruses from the study.

1 | INTRODUÇÃO

Os flavívirus da família Flaviviridae consistem em mais de 70 vírus, incluindo muitos que se espalham por transmissão de artrópodes. São vírus de RNA simples de 11 kb (FALCONAR *et al.*, 2013) [1], em sentido positivo com um genoma de RNA organizado em três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). Entre eles, a NS1 que fornece um método alternativo para distinguir Flavívirus infecciosos pois é uma proteína conservada entre os flavívirus que desempenha um papel importante na replicação viral e na indução de respostas imunes do hospedeiro.

Uma vez que a NS1 secretada (sNS1) induz uma resposta imune, ela pode ser usada como um potencial marcador diagnóstico para infecções causadas por Flavívirus (PARK *et al.*, 2020) [2], pois contém substâncias altamente patogênicas que podem causar encefalite ou febre hemorrágica, caracterizando em humanos doenças altamente agressivas. Uma combinação de alta densidade populacional, infraestrutura de saúde pública fraca, redes de viagens em expansão e mudanças nos padrões climáticos se combinaram para aumentar o contato vetor-humano, resultando em surtos mais frequentes e generalizados (MERBAH *et al.*, 2020) [3].

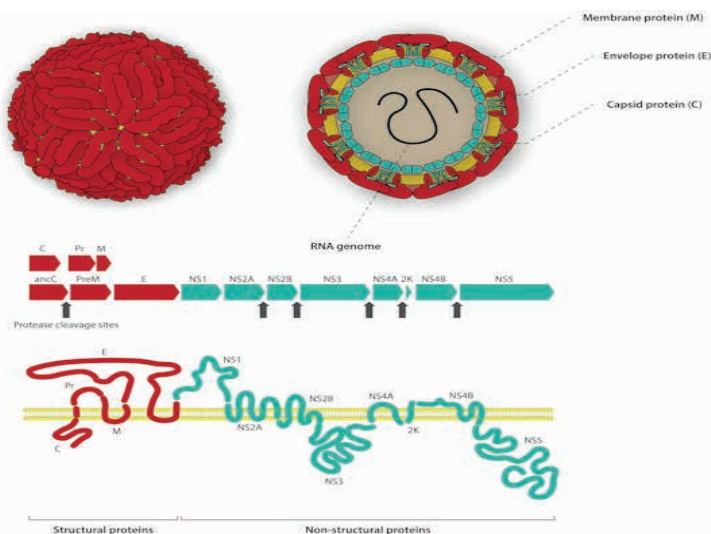


Figura 1- Exemplificação das proteínas estruturais e não estruturais dos Flavivirus.

O frequente crescimento e a disseminação geográfica dos surtos de Flavivírus resultaram em morbidade e mortalidade generalizadas (MERBAH *et al.*, 2020) [3]. O vírus da dengue (DENV) é o vírus humano transmitido por vetores mais importante do mundo, infectando cerca de 5 a 100 milhões de pessoas em 100 países e causando uma doença febril autolimitada chamada dengue (DF), às vezes associada a sangramentos. Cerca de 500.000 casos resultam na forma mais grave e com risco de vida, conhecida como dengue grave (SDD) ou síndrome da febre hemorrágica da dengue/choque da dengue (FHD), devido ao extravasamento de plasma, sangramento grave, choque e falência de órgãos (DSS). Até 12.500 pessoas (2,5% de todos os casos de DF) morrem a cada ano de SDD (DHF/DSS). Quatro sorotipos de DENV (DENV-1 a DENV4) foram identificados, cada um causando SDD (DHF/DSS) (FALCONAR *et al.*, 2013) [1].

O vírus Zika foi originalmente isolado de macacos *rhesus* na floresta Zika de Uganda. O ZIKV não foi inicialmente investigado em detalhes, e aproximadamente 80% das infecções são assintomáticas, e aqueles que desenvolvem sintomas são frequentemente diagnosticados com doenças febris semelhantes, como o vírus da dengue (DENV). A rápida e disseminada infecção pelo ZIKV no Brasil foi determinada por um aumento de mais de 28 vezes no número de bebês nascidos com microcefalia na região. A epidemia levou a uma investigação mais aprofundada dos perigos da infecção pelo ZIKV, como danos neurológicos graves em bebês nascidos de mães infectadas e síndrome de Guillain-Barré e outras complicações de saúde em adultos infectados (PAWLEY *et al.*, 2019) [4].

A infecção de febre amarela em humanos pode resultar em infecção inaparente até doença grave de alta letalidade (20 - 50%), provocando grande preocupação de saúde pública durante séculos. Devido à expansão da circulação do vírus da febre amarela na América Latina e na África, vários países incluíram a vacina contra a febre amarela (YFV) em seus programas regulares de imunização ou realizaram campanhas de vacinação (FERNANDES-MONTEIRO *et al.*, 2015) [5].

Embora amplamente utilizado, o sorodiagnóstico pode ser problemático, devido a resultados falsos positivos com reatividade cruzada, enquanto outros Flavivírus se espalham juntos (HENRIQUE *et al.*, 2020) [6]. Desse modo, é necessário desenvolver outras possibilidades para resolver esses problemas de reatividade cruzada (PARK *et al.*, 2020) [2]. A interpretação de análises em larga escala depende de métodos comparativos e preditivos nos quais os bancos de dados biológicos desempenham um papel fundamental. As ferramentas de bioinformática tornaram-se ferramentas indispensáveis para o processamento e análise de dados ômicos populares de hoje.

Dados brutos relacionados a artigos publicados são frequentemente submetidos a repositórios, enquanto bancos de dados especializados são desenvolvidos para moldar o conhecimento tácito revelado nos dados. Com base nessa interoperabilidade, extensos procedimentos automatizados são implementados para coletar e reunir informações do banco de dados e apoiar a formulação de hipóteses novas e testáveis (MERCIER *et al.*,

2019) [7]. Identificar e selecionar epítomos adequados é um esforço demorado e caro que requer uma triagem experimental cuidadosa. Portanto, uma estratégia mais rápida e barata precisa ser desenvolvida para resolver esse obstáculo. Uma opção é usar a previsão computacional, e existem muitas ferramentas de bioinformática disponíveis (CHEN *et al.*, 2011) [8]. Concluindo, ciência, tecnologia e tecnologia da informação são, sem dúvida, ferramentas importantes para o progresso científico (BOTTASSO *et al.*, 2021) [9].

Os flavivírus foram originalmente classificados como *Togavírus* com base em avaliações sorológicas iniciais, mas foram separados de *Togavírus* para família *Flaviviridae* em 1984 com base em diferenças na estrutura, sequência gênica e estratégia de replicação. Desde então, descrições do genoma viral, estrutura viral e biologia viral identificaram diferenças significativas entre os Flavivírus e suas contrapartes históricas na família *Togaviridae*. Além disso, alguns vírus foram identificados como flavivírus “não vetoriais”, e vários flavivírus específicos de insetos (ISFs) também foram identificados (HOLBROOK, M. R., 2017) [10].

As infecções por dengue ocorrem em mais de 100 países na Ásia-Pacífico, nas Américas e no Oriente Médio. Na África, as infecções globais continuam a aumentar. No entanto, as mudanças epidemiológicas nas Américas são mais marcantes. Durante a maior parte das décadas de 1950, 1960 e 1970, a dengue era rara nas Américas porque o mosquito vetor, *Aedes aegypti*, foi erradicado de grande parte da América Central e do Sul. Os programas de erradicação cessaram no início da década de 1970 e a espécie começou a reinadir os países de onde foi erradicada. Na década de 1990, o *Aedes aegypti* já havia quase recuperado sua distribuição geográfica antes do início da erradicação. Novas cepas e sorotipos do vírus da dengue foram introduzidos (DEN-1 em 1977, nova cepa DEN-2 em 1981, DEN-4 em 1981 e nova cepa DEN-3 em 1994) Além disso, muitos países da região passaram de não endêmicos ou de baixa endemia para altamente endêmicos (DICK O.B., 2012) [11].

DICK (2012) [11] afirma que com a distribuição global do vírus da dengue e *Aedes aegypti* nos trópicos em 1997; mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem agora em áreas endêmicas de dengue. Atualmente, a dengue causa mais doenças e mortes em humanos do que em qualquer outro arbovírus. Existem aproximadamente 100 milhões de casos de dengue e centenas de milhares de casos de dengue hemorrágica a cada ano, dependendo da atividade epidêmica. A era moderna da pesquisa da dengue começou em 1943-44, quando o vírus da dengue foi isolado pela primeira vez e os testes laboratoriais de diagnóstico subsequentes se tornaram disponíveis. Embora a sorotipagem por teste retrospectivo de anticorpos seja possível, a maioria das descrições epidemiológicas desse período são baseadas em características clínicas e epidemiológicas (aproximadamente 1 milhão na década de 1980 para 4,7 milhões em 2000-7).

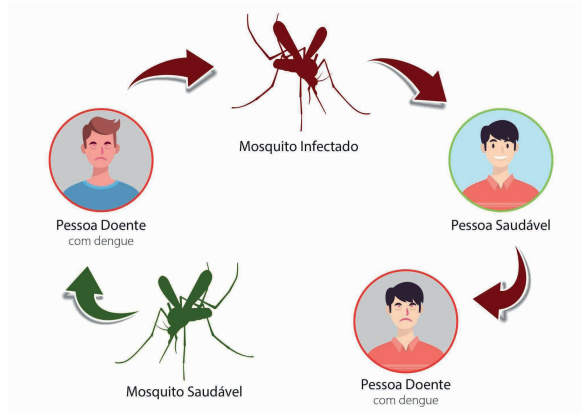


Figura 2 - Esquema representativo do ciclo de transmissão do vírus da dengue.

Os tráfegos simultâneos e/ou sequências de DENV 1-4 devem considerar a genética viral e do hospedeiro como fatores de risco populacionais potencialmente importantes para dengue grave, pois a infecção secundária com DENV xenogênico pode aumentar a probabilidade de doença grave (MESSINA *et al*, 2014) [12]. O tratamento é puramente sintomático e requer um alto nível de atenção ao paciente; quando indicado, O tratamento é puramente sintomático e requer um alto nível de cuidado ao paciente. Se necessário, os pacientes podem ser hospitalizados para facilitar a reposição de líquidos e as transfusões de sangue.

Há esforços crescentes para encontrar vacinas e medicamentos antivirais que possam prevenir e controlar essa infecção. Os maiores problemas são a sensibilidade e o custo dos exames diagnósticos, que dificultam o tratamento imediato dos sintomas, bem como o alto custo da assistência à saúde dos pacientes com dengue e da vigilância epidemiológica da doença (SALLES *et al*, 2018) [13].

O Ministério da Saúde brasileiro recomenda os seguintes protocolos. Todos os pacientes com suspeita de DF devem ser informados e uma amostra de sangue coletada para diagnóstico. Até oito dias (de preferência cinco dias) após o início dos sintomas, as amostras dos pacientes são testadas para dengue por ELISA para NS1 e por qRT-PCR para detecção e sorotipagem do genoma do DENV. As amostras são testadas para IgM por ELISA 8 a 15 dias após o aparecimento dos sintomas. Após 15 dias, o soro foi verificado para IgG por ELISA. Amostras negativas para o antígeno NS1 não descartam infecção por dengue e devem ser confirmadas por teste de IgM/IgG. Amostras negativas para dengue serão triadas por RT-PCR para patógenos como Chikungunya e Zika para diagnóstico diferencial. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a sorotipagem de todas as amostras suspeitas de dengue com o protocolo de PCR Lanciotti *et al.*, que é considerado o protocolo padrão ouro para identificação de sorotipos pelos métodos PCR e qPCR (SALLES *et al*, 2018) [13].

No gênero *Flavivirus*, o ZIKV é um vírus transmitido por mosquitos que está

relativamente intimamente relacionado a outros flavivírus transmitidos por mosquitos de importância médica e de saúde pública global. A doença humana causada pela infecção pelo ZIKV foi relatada pela primeira vez durante um surto de icterícia na Nigéria em 1954, onde a infecção foi confirmada em três pacientes por isolamento do vírus ou níveis elevados de anticorpos séricos, e a relação entre o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes do ZIKV e icterícia foi observada (SONG *et al*, 2017) [14].

Desde então, até o início dos anos 2000, dezenas de casos de doença humana leve associada ao ZIKV foram documentados em países africanos e asiáticos. No entanto, em 2007, o vírus Zika causou o primeiro grande surto fora da África e da Ásia na ilha de Yap, uma doença relativamente leve caracterizada por febre, erupção cutânea, dor nas articulações e conjuntivite (SONG *et al*, 2017) [14]. Durante este surto, estima-se que ~73% dos 6.892 residentes de Yap com idade ≥ 3 anos foram infectados com ZIKV, e ~18% das pessoas infectadas tiveram uma doença clínica que provavelmente foi atribuída à infecção por ZIKV.

No início de 2015, foi detectada a primeira transmissão autóctone do ZIKV na região nordeste do Brasil em associação com um surto de doença exantemática aguda. No final de 2015, a atividade do ZIKV expandiu-se para pelo menos 14 estados brasileiros com estimativa de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos. Notou-se no Brasil que o número de recém-nascidos com microcefalia aumentou nas áreas afetadas pelo ZIKV até setembro de 2015. Desde o seu surgimento no Brasil, o ZIKV se espalhou a um ritmo alarmante em grande parte da América Central e do Sul e no Caribe, e a possibilidade de que a microcefalia esteja ligada ao ZIKV aumentou, levando a Organização Mundial da Saúde a declarar uma “emergência de saúde pública de caráter internacional” de Fevereiro a Novembro de 2016 (SONG *et al*, 2017) [14].

O ZIKV é transmitido principalmente aos seres humanos pela picada de um mosquito infectado, mas também pode ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez, por contato sexual, amamentação ou transfusões de sangue. Vários modos de transmissão do ZIKV dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle para um patógeno com dois ciclos de transmissão distintos: circulação silvestre associada à manutenção do ZIKV entre primatas e mosquitos da floresta; e circulação urbana associada à transmissão do ZIKV entre humanos e mosquitos urbanos nas cidades (SONG *et al*, 2017) [14].



Figura 3 - Ciclo ilustrativo da transmissão do vírus da Zika.

O vírus da Febre Amarela e seu mosquito vetor urbano originaram-se na África, onde vários primatas são infectados. É possível que já no século 16, o vírus e seu mosquito vetor tenham sido transportados da África Ocidental para o Caribe em navios. Mais tarde, tanto pelo vetor quanto pela cabotagem de pessoas infectadas, o vírus da febre amarela foi transportado e destruiu grande parte das regiões orientais das Américas. Por meio de outras conexões humanas, o mosquito vetor do vírus da febre amarela urbana se estabeleceu nas regiões subtropicais e tropicais mais orientais do mundo, incluindo Índia, Indonésia e Pacífico Sul. (CLEMENTS, A., N., HARBACH, R., E., 2017) [15].

Em 1897, a Comissão da Febre Amarela foi criada em Cuba para investigar a origem da febre amarela. Trabalhos anteriores de JC Nott e Carlos Finlay mostraram que os mosquitos podem espalhar a febre amarela entre humanos. A Comissão da Febre Amarela concluiu que os mosquitos são de fato portadores da doença. Membros da comissão e outros “voluntários” militares participaram de vários estudos de infecção humana para mostrar que os mosquitos transmitiam a doença de pacientes infectados para participantes saudáveis do estudo, em alguns casos ao custo de suas vidas. Esses estudos ajudaram a provar o papel dos mosquitos na disseminação da febre amarela e confirmaram as hipóteses de Nott e Finlay muitos anos antes (HOLBROOK, 2017) [10].



Figura 4 - Ciclo ilustrativo da transmissão do vírus da Febre Amarela

A doença causada pelo YFV pode ser subclínica, leve e inespecífica, ou grave com icterícia, hemorragia e morte. O primeiro estágio da doença, que se inicia 3 a 6 dias após a picada de um mosquito infeccioso, é inespecífico e pode incluir febre, mal-estar, tontura, náuseas e vômitos, cefaleia, dor lombos sacral e mialgia. A fase de remissão continua com a recuperação ou pode ser seguida por um período de intoxicação caracterizado por dor de cabeça, vômitos, icterícia, aumento do fígado e sangramento. Mais de 90% dos casos ocorrem na África Subsaariana. (HUANG *et al*, 2014) [16].

A reatividade cruzada de soros criados contra um flavivírus reconhecendo outro flavivírus foi bem documentada. Estudos de anticorpos monoclonais identificaram sítios de

reação cruzada nas glicoproteínas do envelope de diferentes espécies de flavivírus, mas as relações dentro e entre os soro complexos são inconsistentes. A reatividade cruzada do flavivírus resulta em resultados falso-positivos, mas a reatividade cruzada pode levar à proteção cruzada. (MANSFIELD *et al*, 2011) [17]. As respostas de anticorpos de reação cruzada aos epítomos da proteína capsídeo (C), envelope (E) e proteína precursora de membrana (prM) (HENRIQUES *et al.*, 2020) [6] compartilhada por todos os Flavivírus podem representar grandes problemas no diagnóstico sorológico em áreas onde vários Flavivírus estão circulando. Esses epítomos compartilhados induzem reatividade cruzada e podem levar a um aumento dramático na gravidade de infecções secundárias por meio de aprimoramento dependente de anticorpos, especialmente no caso de sorotipos de DENV. Por isso a importância da continuidade de se obter epítomos para diagnóstico e entendimento da patogênese desses Flavivírus (FERNANDES-MONTEIRO *et al.*, 2015) [5]. Esse trabalho teve como objetivo recuperar sequências de proteínas em bancos de dados e realizar análise através de *software* para prever a probabilidade de um possível teste sorológico que possa distinguir entre os três tipos de Flavivírus Dengue, Zika e Febre Amarela.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das sequências dos epítomos

Usou-se o *software* *BV-BRC* 3.26.4 (disponível em <https://www.bv-brc.org/>) que é um site de Documentação de Ajuda do Centro de Recursos de Bioinformática Bacteriana e Viral. O *BV-BRC* fornece um sistema de informação baseado na web projetado para apoiar o trabalho da comunidade de pesquisa biomédica em doenças infecciosas bacterianas e virais por meio da integração de informações vitais de patógenos com dados ricos e ferramentas de análise. *BV-BRC* combina os dados, a tecnologia e as extensas comunidades de usuários de dois centros de longa data: *PATRIC*, o sistema bacteriano e *IRD/ViPR*, os sistemas virais.

Nele é possível selecionar genomas parciais e completos, ver estruturas, funções de vários vírus e bactérias que foram anotados juntamente com metadados curados. As sequências dos epítomos de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, FEBRE AMARELA e ZIKA das proteínas E e NS1 estavam em sincronização com o *software* IEDB (disponível em: https://www.iedb.org/home_v3.php) que cataloga dados experimentais sobre epítomos de anticorpos e células T estudados em humanos, primatas não humanos e outras espécies animais no contexto de doenças infecciosas, alergia, autoimunidade e transplante. O *IEDB* também hospeda ferramentas para auxiliar na previsão e análise de epítomos, e de lá foram então retirados os dados, e posteriormente no *BV-BRC* buscou-se a sequência completa a fim de avaliar a estrutura em 3D.

Os critérios para selecionar os epítomos eram primeiramente ter sido positiva em

ensaios clínicos para células B, T e HLA testado em humanos, e com publicações, porém, a sequência de epítomos NS1 do DENV-4 apesar de não ter ensaios clínicos recentes, foi selecionado para ver se poderia ser usado para fim exemplificativo. O vírus Zika NS1 não foi encontrado proteínas dentro dos critérios propostos, sendo a única exceção. Verificou-se as regiões em que esses epítomos se encontravam na sequência, pois na modelagem seria possível verificar se esses epítomos estariam expostos para serem reconhecidos pelos anticorpos.

2.2 Análise de interação das proteínas com moléculas de MHC in silico

Posteriormente analisamos esses epítomos no *NetMHCpan* - 4.1 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>), que prevê a ligação de peptídeos a qualquer molécula de MHC de sequência conhecida usando redes neurais artificiais (ANNs). Usou-se a sequência em forma de fasta nesse programa e selecionou-se o comprimento de 10 dos peptídeos. Foram escolhidos 12 alelos pois são mais representativos para a população em geral e estima-se que esses supertipos de classe I forneçam cobertura de mais de 90% da população geral (WEISKOPF *et al.*, 2014) [18]. São eles: HLA-A01:01, HLA-A02:01, HLA-A24:02, HLA-A03:01, HLA-A26:01, HLA-B07:02, HLA-B27:05, HLA-B08:01, HLA-B39:01, HLA-B40:01, HLA-B58:01 e HLA-B15:01. O *score* para essa interação foi de $< 0,5$ para ligação forte (*SB*); até 2 para ligação fraca (*WB*) e maior que esse valor não foi considerado epítomo. Os alelos que não se obteve nenhum peptídeo estão somente traçados. Moléculas expressas por MHC têm papéis importantes nas respostas imunes e estão envolvidas na seleção de células T, respostas inflamatórias, indução de tolerância, produção de anticorpos e imunidade mediada por células T (FELÍCIO, 2013) [19].

2.3 Modelagem 3d das proteínas com score $< 0,5$

Após a obtenção das sequências e sua interação com MHC daquelas que tiveram ligação forte, realizou-se um modelo 3D para verificar se essa sequência era funcional. Esses dados foram extraídos através do *software SWISS-MODEL* (disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>), que é um servidor de modelagem de homologia de estrutura de proteínas totalmente automatizado. Para realizar uma modelagem é necessário inserir toda a sequência da proteína, pois nesse programa precisa-se de no mínimo 30 resíduos de aminoácidos.

3 | RESULTADOS

Ao selecionar-se as regiões específicas de cada vírus obteve-se as sequências listadas na tabela abaixo, e ao entrar no ID dessas sequências era possível ver as regiões em que esses epítomos estavam. Nos epítomos dos 4 tipos de Denv a literatura divergiu quanto a região dessas proteínas, o que pode ser explicado pelo fato de que compartilham

67 a 75% de homologia de sequência entre si, podendo a mesma sequência estar em mais de um subtipo do vírus (WEISKOPF *et al.*, 2014) [18].

VÍRUS	EPÍTOPOS NS1	EPÍTOPOS E	ID NS1	ID E	REGIÃO NS1	REGIÃO E
DENV-1	GEDGCWYGM	AKFKCVTKLEGKIVQ	19225	125145	1100/1108 1098/1106	112/126 117/131
DENV-2	KLTIMTGDIGKIMQA	LQMENKAWLV	195576	150399	860/874	479/488 231/240
DENV-3	AKIVTAETQNSSFII	ELKGMYSYAM	190705	13119	121/135 894/ 908	155/163
DENV-4	CLWPKTHTL	FLDLPL	164465	156552	223/231	186/191
F. AMARELA	GTHPF SRIR	GGFFTSVKGIGIHTVF	22688	238848	878/886	709/723
ZIKA	YSLECDPAVIGTAVK	FEATVRGAKRMAVLGDTAWD	863273	741402	969/983	411/430

Tabela 1. Sequência dos epítomos extraídos e a região de localização.

Apesar do *BV-BRC* dar a sequência associada a NS1 de DENV-1, nas literaturas de referência a sequência estava presente no DENV-3 como no 2, sendo em uma literatura o ensaio de liberação Elispot IFNg foi positiva para Denv 2 1100/1108 alelo HLA-B*40:01 e negativa para Denv 3 na região 1098/1116 alelo HLA-B*40:01.

Na proteína E do Denv 1 a região 112/126 o ensaio de liberação Elispot IFNg foi negativo ausente de alelos e na região 117/131 positiva para o alelo HLA-DRB1*11:01. Na região E de Denv 2 ocorreu a mesma situação, do 479/488 o ensaio de liberação Elispot IFNg foi negativo para HLA-A*02:01 e para 231/240 positivo para HLA-B*08:01. O INFG contribui para respostas inflamatórias agudas, especialmente crônicas, atraindo macrófagos e aumentando o número de fagócitos nos locais de inflamação (SILVEIRA *et al.*, 2009) [20].

Nas tabelas 2 e 3 observa-se os resultados obtidos após carregar as informações. Não foi encontrado nenhum peptídeo capaz de se ligar fortemente a algum alelo selecionado para os epítomos NS1 dos vírus Denv (1,2,3,4), Febre Amarela e Zika; se obteve apenas em alguns alelos ligações fracas. Os anticorpos podem estar associados a antígenos com diferentes afinidades, pode se ligar a um antígeno diferente do seu melhor antígeno complementar por ligação mais fraca a regiões semelhantes, mas não idênticas.

Já na proteína E dos vírus pode-se observar uma ligação forte para Febre Amarela e uma ligação forte para Zika. Algumas ligações fracas foram observadas nos demais alelos selecionados para prever essa interação, e nos alelos que não foram gerados nenhum peptídeo estão apenas traçados.

VÍRUS	DENV 1 NS1	DENGUE 2 NS1	DENGUE 3 NS1	DENGUE 4 NS1	F. AMARELA NS1	ZIKA NS1
ALELO HLA-B*40:01	Ligante Fraco	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-A*03:01	Nenhum Ligante	Ligante Fraco	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-A*01:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Ligante Fraco	—	—	—
ALELO HLA-A02:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-A24:02	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-A26:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B07:02	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B27:05	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B08:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B39:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B58:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—
ALELO HLA-B15:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	—

Tabela 2. Alelos da proteína NS1 dos vírus e possíveis ligantes.

VÍRUS	DENV 1 E	DENGUE 2 E	DENGUE 3 E	DENGUE 4 E	F. AMARELA E	ZIKA E
ALELO HLA-B*40:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-A*03:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-A*01:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-A02:01	Nenhum Ligante	Ligante Fraco	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-A24:02	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Ligante Fraco	Não Ligante
ALELO HLA-A26:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Ligante Fraco	Nenhum Ligante
ALELO HLA-B07:02	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-B27:05	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-B08:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	—	—	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante

ALELO HLA-B39:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	_____	_____	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante
ALELO HLA-B58:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	_____	_____	Ligante Fraco	Ligante Forte
ALELO HLA-B15:01	Nenhum Ligante	Nenhum Ligante	_____	_____	Ligante Forte	Nenhum Ligante

Tabela 3. Alelos da proteína E dos vírus e possíveis ligantes.

Ao fazer essa predição entre alelos e epítopos o resultado é exibido da seguinte forma apresentada na imagem abaixo:

Submissão	Instruções	Formato de saída	Visualizador de motivos	Abstrato	Conjuntos de dados de avaliação	Histórico de versões
321 HLA-A*24:02	LFKEDGCVW	LFKEDGCVW	0 1 1 0 0	LFKEDGCVW	gi_undefined_DV 0.0000200	10.000
322 HLA-A*24:02	RFKGEDGCVW	RFKEDGCVW	0 3 1 0 0	RFKGEDGCVW	gi_undefined_DV 0.0008280	11.826
323 HLA-A*24:02	FKGEDGCVWG	FKGEDGCVWG	0 6 1 0 0	FKGEDGCVWG	gi_undefined_DV 0.0000020	80.000
324 HLA-A*24:02	KGEDGCVWGM	KGEDGCVWGM	0 8 1 0 0	KGEDGCVWGM	gi_undefined_DV 0.0000750	29.000
325 HLA-A*24:02	GEDGCVWGM	GEDGCVWGM	0 0 0 0 0	GEDGCVWGM	gi_undefined_DV 0.0000020	80.000
326 HLA-A*24:02	EDGCVWGMEI	EDGCVWGMEI	0 3 1 0 0	EDGCVWGMEI	gi_undefined_DV 0.0000080	56.667
327 HLA-A*24:02	DGCWYGMEIR	DGCWYGMEIR	0 8 1 0 0	DGCWYGMEIR	gi_undefined_DV 0.0000040	67.500
328 HLA-A*24:02	GCWYGMEIRP	GCWYGMEIRP	0 1 1 0 0	GCWYGMEIRP	gi_undefined_DV 0.0000490	33.500
329 HLA-A*24:02	CWYGMEIRPV	CWYGMEIRPV	0 4 1 0 0	CWYGMEIRPV	gi_undefined_DV 0.0004290	15.319
330 HLA-A*24:02	WYGMEIRPVK	WYGMEIRPVK	0 2 1 0 0	WYGMEIRPVK	gi_undefined_DV 0.0007240	12.500
331 HLA-A*24:02	YGMEIRPVKE	YGMEIRPVKE	0 5 1 0 0	YGMEIRPVKE	gi_undefined_DV 0.0000130	50.000
332 HLA-A*24:02	GMEIRPVKEK	GMEIRPVKEK	0 2 1 0 0	GMEIRPVKEK	gi_undefined_DV 0.0000150	48.000
333 HLA-A*24:02	MEIRPVKEKE	MEIRPVKEKE	0 3 1 0 0	MEIRPVKEKE	gi_undefined_DV 0.0000050	65.000
334 HLA-A*24:02	EIRPVKEKEE	EIRPVKEKEE	0 7 1 0 0	EIRPVKEKEE	gi_undefined_DV 0.0000020	80.000
335 HLA-A*24:02	IRPVKEEKEN	IRPVKEEKEN	0 2 1 0 0	IRPVKEEKEN	gi_undefined_DV 0.0000020	80.000
336 HLA-A*24:02	RPVKEEENLV	RPVKEEENLV	0 1 1 0 0	RPVKEEENLV	gi_undefined_DV 0.0003060	17.467
337 HLA-A*24:02	PVKEEENLV	PVKEEENLV	0 5 1 0 0	PVKEEENLV	gi_undefined_DV 0.0000080	56.667
338 HLA-A*24:02	VKEEENLVK	VKEEENLVK	0 1 1 0 0	VKEEENLVK	gi_undefined_DV 0.0000050	65.000
339 HLA-A*24:02	KEEENLVKS	KEEENLVKS	0 3 1 0 0	KEEENLVKS	gi_undefined_DV 0.0000060	60.000
340 HLA-A*24:02	EKEENLVKSM	EKEENLVKSM	0 8 1 0 0	EKEENLVKSM	gi_undefined_DV 0.0000470	34.000
341 HLA-A*24:02	KEENLVKSMV	KEENLVKSMV	0 1 1 0 0	KEENLVKSMV	gi_undefined_DV 0.0000240	42.000
342 HLA-A*24:02	EENLVKSMVS	EENLVKSMVS	0 4 1 0 0	EENLVKSMVS	gi_undefined_DV 0.0000010	90.000
343 HLA-A*24:02	ENLVKSMVSA	ENLVKSMVSA	0 1 1 0 0	ENLVKSMVSA	gi_undefined_DV 0.0000030	70.000

Protein gi_undefined_DV. Allele HLA-A*24:02. Number of high binders 2. Number of weak binders 7. Number of peptides 343

Figura 5. Resultado da busca se uma sequência no software.

Submissão	Instruções	Formato de saída	Visualizador de motivos	Abstrato	Conjuntos de dados de avaliação	Histórico de versões	Transferências
230 HLA-A*01:01	TLWSNGVLES	TLWSNGVLES	0 6 1 0 0	TLWSNGVLES	gi_undefined_DV 0.0005000	27.743	
231 HLA-A*01:01	LWSNGVLESE	LWSNGVLESE	0 1 1 0 0	LWSNGVLESE	gi_undefined_DV 0.0001440	50.161	
232 HLA-A*01:01	WSNGVLESEM	WSNGVLESEM	0 5 1 0 0	WSNGVLESEM	gi_undefined_DV 0.0043860	7.802	
233 HLA-A*01:01	SNVLESEMI	SNVLESEMI	0 2 1 0 0	SNVLESEMI	gi_undefined_DV 0.0001510	49.143	
234 HLA-A*01:01	NGVLESEMII	NGVLESEMII	0 1 1 0 0	NGVLESEMII	gi_undefined_DV 0.0002020	43.545	
235 HLA-A*01:01	GVLESEMIIIP	GVLESEMIIIP	0 2 1 0 0	GVLESEMIIIP	gi_undefined_DV 0.0000860	60.734	
236 HLA-A*01:01	VLESEMIIIPK	VLESEMIIIPK	0 8 1 0 0	VLESEMIIIPK	gi_undefined_DV 0.0013340	15.779	
237 HLA-A*01:01	LESEMIIIPKI	LESEMIIIPKI	0 1 1 0 0	LESEMIIIPKI	gi_undefined_DV 0.0007700	21.790	
238 HLA-A*01:01	ESEMIIIPKIY	ESEMIIIPKIY	0 8 1 0 0	ESEMIIIPKIY	gi_undefined_DV 0.5797560	0.229	<= SB
239 HLA-A*01:01	SEMIIPKIYV	SEMIIPKIYV	0 0 0 0 0	SEMIIPKIYV	gi_undefined_DV 0.0009760	18.947	
240 HLA-A*01:01	EMIIIPKIYGG	EMIIIPKIYGG	0 1 1 0 0	EMIIIPKIYGG	gi_undefined_DV 0.0000330	78.182	
241 HLA-A*01:01	MIIPIKIYGGP	MIIPIKIYGGP	0 7 1 0 0	MIIPIKIYGGP	gi_undefined_DV 0.0000540	69.667	
242 HLA-A*01:01	IIPKIYGGPI	IIPKIYGGPI	0 8 1 0 0	IIPKIYGGPI	gi_undefined_DV 0.0000520	70.385	
243 HLA-A*01:01	IPKIYGGPIS	IPKIYGGPIS	0 3 1 0 0	IPKIYGGPIS	gi_undefined_DV 0.0000340	77.727	
244 HLA-A*01:01	PKIYGGPISQ	PKIYGGPISQ	0 1 1 0 0	PKIYGGPISQ	gi_undefined_DV 0.0000980	58.200	
245 HLA-A*01:01	KIYGGPISQH	KIYGGPISQH	0 7 1 0 0	KIYGGPISQH	gi_undefined_DV 0.0037150	8.616	
246 HLA-A*01:01	IYGGPISQHN	IYGGPISQHN	0 1 1 0 0	IYGGPISQHN	gi_undefined_DV 0.0000690	65.000	
247 HLA-A*01:01	YGGPISQHNY	YGGPISQHNY	0 4 1 0 0	YGGPISQHNY	gi_undefined_DV 0.1760270	0.833	<= WB
248 HLA-A*01:01	GGPISQHNRY	GGPISQHNRY	0 0 0 0 0	GGPISQHNRY	gi_undefined_DV 0.0006560	23.880	
249 HLA-A*01:01	GPISQHNRYR	GPISQHNRYR	0 6 1 0 0	GPISQHNRYR	gi_undefined_DV 0.0000970	58.400	
250 HLA-A*01:01	PISQHNRYRP	PISQHNRYRP	0 8 1 0 0	PISQHNRYRP	gi_undefined_DV 0.0000080	94.286	
251 HLA-A*01:01	ISQHNRYRPGY	ISQHNRYRPGY	0 6 1 0 0	ISQHNRYRPGY	gi_undefined_DV 0.0771270	1.520	<= WB
252 HLA-A*01:01	SQHNRYRPGYF	SQHNRYRPGYF	0 2 1 0 0	SQHNRYRPGYF	gi_undefined_DV 0.0024450	11.015	
253 HLA-A*01:01	QHNRYRPGYFT	QHNRYRPGYFT	0 1 1 0 0	QHNRYRPGYFT	gi_undefined_DV 0.0001390	50.968	
254 HLA-A*01:01	HNRYRPGYFTQ	HNRYRPGYFTQ	0 3 1 0 0	HNRYRPGYFTQ	gi_undefined_DV 0.0002450	39.846	
255 HLA-A*01:01	NYRPGYFTQT	NYRPGYFTQT	0 5 1 0 0	NYRPGYFTQT	gi_undefined_DV 0.0000890	62.143	
256 HLA-A*01:01	YRPGYFTOTA	YRPGYFTOTA	0 8 1 0 0	YRPGYFTOTA	gi_undefined_DV 0.0002420	40.077	

Figura 6. Resultado de busca mostrando ligantes forte e fraco.

Ao se buscar um modelo 3D alguns parâmetros são importantes para escolher o ideal. A cobertura e a semelhança de sequência quanto mais próximo de 1 melhor a modelagem. Para a proteína E do Zika a cobertura foi de 0,99 e a semelhança foi de 0,62.

As regiões em azul são as melhores sequenciadas e em vermelho as que ficaram fora dos padrões definidos pelo programa.

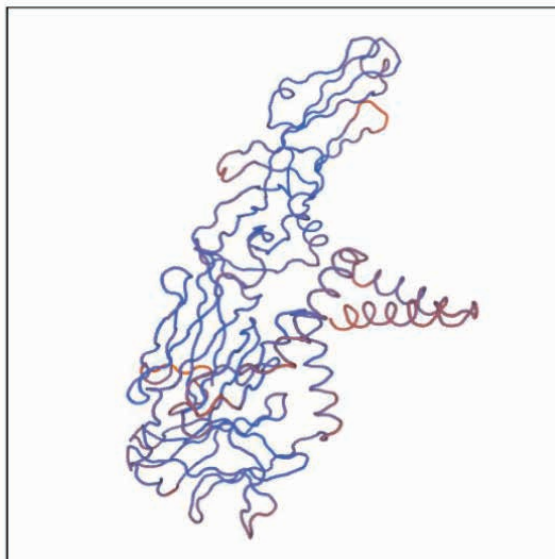


Figura 7. Imagem 3D da sequência de epítomos da proteína E do Zika.

Para a proteína E da Febre Amarela a cobertura foi de 0,81 e a semelhança de sequência de 0,61. As regiões em azul são as melhores sequenciadas e em vermelho as que ficaram fora dos padrões definidos pelo programa

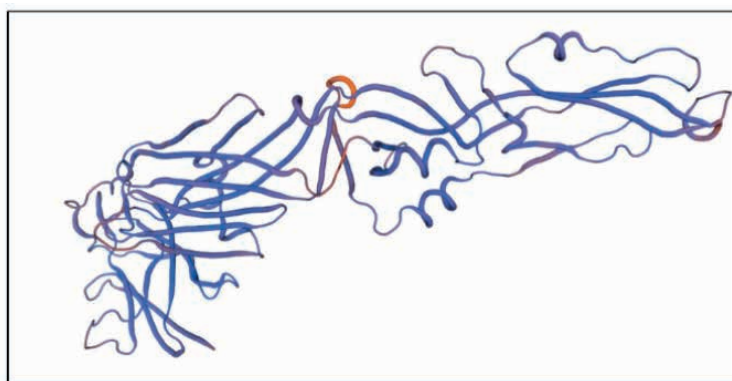


Figura 8. Imagem 3D da sequência de epítomos da proteína E da Febre Amarela.

Percebe-se que os epítomos para proteína E de Zika e Febre Amarela obtiveram valores menores que o *score* selecionado, e pode-se dizer que esse resultado é extremamente promissor pelas reações cruzadas entre esses Flavivírus em testes já existentes no mercado. A glicoproteína do envelope do flavivírus é o principal antígeno responsável por induzir respostas de anticorpos neutralizantes (MANSFIELD *et al.*, 2011)

[17]. Está envolvida na ligação de partículas virais aos receptores da célula hospedeira, além disso, a proteína também está envolvida na fusão da membrana (SILVEIRA *et al.*, 2019) [20]. Em buscas feitas nesses softwares não foi identificado nenhum epítipo promissor para os subtipos da Dengue, porém pode-se considerar essas sequências de Zika e Febre Amarela para desenvolver um teste como forma de exclusão desses vírus.

Vale ressaltar que indivíduos com resposta imunológica para Febre amarela adquirida pela vacinação podem ter diagnóstico falso-positivos para outros flavivírus devido a semelhança entre essas regiões que ativam uma resposta imune no organismo. Por isso a importância de se obter alternativas para minimizar essa problemática.

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são promissores mesmo que não se obteve uma sequência reconhecida para Denv – 1,2,3 e 4 pois pode-se usar esses achados para um teste como forma de exclusão de outros flavivírus do estudo. Para que o teste fique mais completo e dentro do que foi proposto dinâmicas moleculares precisam de mais tempo para serem desenvolvidas para confirmar se essas estruturas estão na forma solúvel das estruturas do hexâmero e se elas estão expostas para serem reconhecidas pelos anticorpos.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa fez parte do trabalho de conclusão de curso e teve o financiamento do CNPq processo 311347/2019 - Bolsa produtividade.

REFERÊNCIAS

1. FALCONAR, A. K. L.; ROMERO-VIVAS, C. M. E. **Um ensaio dot-blot simples, barato, robusto e sensível para detecção igual da glicoproteína não estrutural-1 de todos os sorotipos da dengue.** Virology journal. Biomed Central, 10:126, 2013.
2. PARK, C.; BOKKIM, W.; CHO, S. Y.; OH, E. J.; LEE, H.; KANG, K.; LEE, Y.; LEE, D. G. **Um método simples para o projeto e desenvolvimento de proteínas recombinantes de Flavivirus NS1 usando uma abordagem In Silico.** BioMed Research International, Hindawi. 2020.
3. MERBAH, M.; WOLLEN-ROBERTS, S.; SHUBIN, Z.; LI, Y.; BAI, H.; DUSSUPT, V.; MENDEZ-RIVERA, L.; SLIKE, B.; KREBS, S. J.; MODJARRAD, K.; MICHAEL, N. L.; ROLLAND, M. **Um ensaio multiplex de alto rendimento para caracterizar imunoglobulinas específicas de flavivírus.** Elsevier, BV 487. 2020.
4. PAWLEY, D. C.; RICCIARDI, M. J.; DIKICI, M.; DEO, S. K.; DAUNERT, S. **Detecção direta altamente sensível e seletiva de partículas do zika vírus em fluidos corporais humanos para o diagnóstico precoce preciso da infecção.** ACS Omega 4, 6808 – 6818, 2019.

5. FERNANDES-MONTEIRO, A. G.; TRINDADE, G. F.; YAMAMURA, A. M.; MOREIRA, O. C.; PAULA, V. S.; DUARTE, A. C. M.; BRITTO, C. U.; SHEILA, E.; LIMA, M. B. **Novas abordagens para a padronização e validação de um ensaio qPCR em tempo real usando sondas TaqMan para quantificação do vírus da febre amarela em amostras clínicas com parâmetros de alta qualidade.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 11: 7, 1865–187. Julho, 2015.
6. HENRIQUES, D. F.; NUNES, J. A.; ANJOS M. V.; MELO, J. M.; ROSÁRIO, W. O.; AZEVEDO, S. S. R.; CHIANG, J. O.; MARTINS, L. C.; SÁNTOS, F. B.; CASSEB, M. N. L.; Vasconcelos, P. F. C.; RODRIGUES, S. G. **Avaliação de ensaios de imunoabsorção enzimática de captura específica de imunoglobulina M e testes comerciais para diagnóstico de flavivírus por um laboratório de referência nacional.** *Journal of Virological Methods*. 286. 2020.
7. MERCIER, P. L.; MARIETHOZ, J.; BONNARDEL, F.; IMBERTY, A.; LISACEK, F. **Uma visão de bioinformática das interações glicano-vírus.** *Vírus*. 11, 374. 2019.
8. CHEN, P.; RAYNER, S.; HU, K. **Avanços das Ferramentas de Bioinformática Aplicadas em Vírus Previsão de epítops.** *Virologica Sinica, Instituto Wuhan de Virologia*. Fevereiro, 2011.
9. BOTTASSO, O.; PEREZ, D. M. R.; MORETTI, E.; **CARTA AO COMITÊ DE REDAÇÃO.** *Medicina*. Volume 81 - Nº 6, 1091-1092. Buenos Aires: 2021.
10. HOLBROOK, M. R. **Perspectivas Históricas da Pesquisa de Flavivírus.** *Vírus*. 9, 97. 2017.
11. DICK, O. B.; SAN MARTÍN, J. L.; MONTOYA, R. H.; DIEGO, J. D.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. **Revisão: A história dos surtos de dengue nas Américas.** *Sou. J. Trop. Med.* v. 87, n. 4, 584–593, 2012.
12. MESSINA, A. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. P.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R. E.; BATALHA, K. E.; SIMMONS, C. P.; HAY, S. I. **Disseminação global dos tipos de vírus da dengue: mapeando a história de 70 anos.** *Tendências em Microbiologia*, v. 22, n. 3, Mar. 2014.
13. SALLES, T. S.; SÁ-GUIMARÃES, T. E.; ALVARENGA1, E. S. L.; GUIMARÃES-RIBEIRO, V.; MENESES, D. F.; SALLES, P. F. C.; SANTOS, C. R.; MELO, A. C. A.; SOARES, M. R.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, M. F. **História, epidemiologia e diagnóstico da dengue nos contextos americano e brasileiro: uma revisão.** *Vendas et al. Parasitas e Vetores*, v. 264, n. 11. 2018.
14. SONG, B. H.; YUN, S. I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y. M. **Zika vírus: história, epidemiologia, transmissão e apresentação clínica.** *Revista de Neuroimunologia*, v. 308, p. 50–64. 2017.
15. CLEMENTS, A. N.; HARBACH, R. E. **História da descoberta do modo de transmissão do vírus da febre amarela.** *Jornal de Ecologia Vetorial*, v. 2, p. 208-222, Dez. 2017.
16. HUANG, Y. J. S.; STEPHEN HIGGS, S.; HORNE, K. M.; VANLANDINGHAM, D. L. **Interações Flavivírus-Mosquito.** *Vírus*, v. 6, p. 4703-4730. 2014.
17. MANSFIELD, K. L.; HORTON, D. L.; JOHNSON, N., LI, L.; BARRETT, A.; SMITH, D. J.; GALBRAITH, S. E.; SOLOMON, T.; FOOKS, A. R. **Reatividade cruzada de anticorpos induzida por flavivírus.** *Revista de Virologia Geral*, n. 92, p. 2821–2829. 2011.

18. WEISKOPF, D.; ANGELO, M. A.; SIDNEY, J.; PETERS, B.; SHRESTA, S.; SETTE, A. **Alterações da imunodominância em função do sorotipo do vírus da dengue e da infecção primária versus secundária.** Sociedade Americana de Microbiologia, Revista de Virologia, v. 88, n. 19, p. 11383-11394, 1 Out. 2014.
19. FELÍCIO, L. P. **Variabilidade e história evolutiva do gene HLA-E.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Goiás. f. 77. 2013
20. SILVEIRA, D. M.; FRANCO, C. M.; NASCIMENTO, I. L. O.; SALOMÃO, M. F. L.; ARAUJO, T. M. **Pesquisa de interferon gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida.** v. 14, n. 2, p. 39-44, Maringá, mar./abr. 2009.
21. TRIVIÑO, N. H.; MONTAÑA, D.; CASTELLANOS, J. E. **Reatividade cruzada dos soros da dengue e febre-amarela; desafios para o diagnóstico.** Revista de Salud Pública· Volume 10 (2). Maio, 2008.