

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

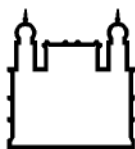
Fundação Oswaldo Cruz

**“MAPEAMENTO DE EPITOPOS DE PROTEÍNAS POTENCIALMENTE  
IMUNOGÊNICAS DOS VÍRUS DENGUE TIPOS 1, 2 E 3  
RESPONSÁVEIS PELO DESENCADEAMENTO  
DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL”**

por

**THATIANE SANTOS DE SIMONE**

Rio de Janeiro  
Fevereiro, 2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***THATIANE SANTOS DE SIMONE***

**“MAPEAMENTO DE EPITOPOS DE PROTEÍNAS POTENCIALMENTE  
IMUNOGÊNICAS DOS VÍRUS DENGUE TIPOS 1, 2 E 3 RESPONSÁVEIS  
PELO DESENCADEAMENTO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL”**

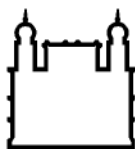
Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Salvatore Giovanni De Simone  
Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr

Rio de Janeiro  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS - FIOCRUZ**





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Autora: Thatiane Santos De Simone**

**Título da tese: “Mapeamento de epitopos de proteínas potencialmente imunogênicas dos vírus dengue tipos 1, 2 e 3 responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral”**

**Orientadores: Dr. Salvatore Giovanni De Simone;**  
**Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr.**

Aprovada em: 26/02/2010.

**EXAMINADORES:**

Dr. Luiz Anastácio Alves - PRESIDENTE  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ

Dra Cristiane Dinis Ano Bom  
Instituto de Química - UFRJ - RJ

Dra. Flávia Barreto dos Santos  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ

**SUPLENTES:**

Dra. Dilvani Oliveira Santos  
Instituto de Biologia – UFF - RJ

Dra. Joseli de Oliveira Ferreira  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2010.

Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica de proteínas e peptídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, sob a orientação dos Dr. Salvatore Giovanni De Simone e Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr



*Depois de algum tempo você percebe a diferença, a sutil diferença de que amar não significa apoiar-se e que companhia nem sempre significa segurança.*

*Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.*

*Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que as vejamos.*

*Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando todas as conseqüências e aprende que paciência é uma virtude que requer muita prática.*

*Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.*

*Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se e que a maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.*

*Não importa onde já chegou, mas para onde se está indo, e descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser.*

*Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.*

*A vitória não vem de supetão, é conquistada em etapas.*

*E assim, você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.*

*Shakespeare*



## ***Agradecimentos***

Agradeço aos Drs. Salvatore Giovanni De Simone e Hermann Gonçalves Schatzmayr, meus orientadores, pela colaboração que resultou na minha decisão de entrar neste desafio. Através de vocês pude conciliar a virologia à bioquímica e me especializar em tecnologias até então pouco difundidas no país. Agradeço pela liberdade de ação e pela confiança em meu trabalho, que fortaleceram o caráter científico e o desenvolvimento pessoal.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, ao Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela colaboração e ao suporte prestado ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Floriano Paes da Silva Junior, pela amizade, disponibilidade e por todas as observações e sugestões na parte revisional, que foram indispensáveis para o enriquecimento deste estudo.

Ao Dr. Luiz Anastácio Alves, Dra. Cristiane Dinis Ano Bom, Dra. Joseli de Oliveira Ferreira, Dra. Flavia Barreto dos Santos e Dra. Dilvani Oliveira Santos pela disponibilidade e participação na avaliação final de defesa de doutorado, cujas sugestões certamente ampliarão a qualidade da tese.

A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Proteína e Peptídeos pela receptividade acolhedora e harmoniosa, pela convivência extremamente agradável, pela amizade e por estar sempre me ensinando alguma coisa.

As minhas pupilas Danielle Regina de Almeida de Brito e Cunha, Marilúcia Sobrado Pina e Letícia Matias Raposo, pela companhia na maior parte da execução desta tese. Agradeço por ter tido vocês como “filhas científicas”, por saber que posso contar com cada uma de vocês em tudo o que precisar e pela amizade, que será eterna.

A bióloga Paloma Napoleão Pego pela ajuda imprescindível nos experimentos. Agradeço a Deus por você ter feito parte desta caminhada, por sua disponibilidade irrestrita, compreensão e cumplicidade, me acompanhando a qualquer dia e hora para a conclusão dos experimentos.

A mestra Ana Carolina Rennó Soderó, pela amizade, incentivo, disponibilidade e pelo auxílio valioso durante a realização deste trabalho, transmitindo suas experiências para que pudesse concluir a parte computacional desta tese.

A mestra Jessica Joy Mokfienski pela disponibilidade em compartilhar a utilização de algumas metodologias, que foram importantes para que este estudo se tornasse possível.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Flavivírus pela amizade, em especial a Dra Rita Maria Ribeiro Nogueira, por poder contar com seu profissionalismo exemplar. Agradeço por toda a ajuda prestada durante a tese e por todos os conselhos, que foram importantes na execução deste trabalho.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram: tios, tias, primos...

Agradeço aos meus pais Luigi e Lucia Vania De Simone, por todas as oportunidades que me foram dadas, por compreenderem a minha ausência em muitos momentos no decorrer dos últimos anos e pelo incentivo, que foram vitais para o alcance de meus objetivos.

Ao meu avô Severiano Barros da Silva, que me incentivou e apoiou até onde Deus permitiu. Sua confiança em mim me inspirou a buscar vãos que jamais pensei em conquistar. Sou feliz por ter tido o prazer de ser a sua neta.

A minha avó Dirce Louzada da Silva, que me surpreende a cada dia, com sua vitalidade e disposição invejáveis, e que é a presença indispensável em todas as minhas conquistas. Agradeço por todo o incentivo, força e amor incondicional. Espero continuar sendo sempre “o orgulho da vovó”.

Ao David Epifanio de Oliveira, meu companheiro de todas as horas, segue meu agradecimento mais que especial. Sem sua insistência, estímulo e confiança não teria atingido mais um degrau desta busca pelo conhecimento. Agradeço por você fazer parte da minha vida desde sempre, pela paciência nas minhas horas instáveis e pelo amor grandioso que se renova a cada dia.

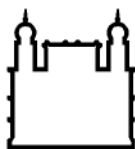
No decorrer deste período, em função desta pesquisa ou mesmo por obra do destino, tive a oportunidade de conhecer muitas outras pessoas interessantes que me ofereceram ajuda, além de ter o prazer de compartilhar da amizade. A todas estas pessoas ofereço a minha gratidão, pois este trabalho é também fruto de nossas trocas e, por isso, é obra de todos nós.



“Determinação coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superar os obstáculos. Porém, independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

*Dalai Lama*

*A todos aqueles que de alguma forma me apoiaram  
para a realização e conclusão desta etapa  
e, em especial, ao meu avô Severiano “in memoriam”  
dedico a realização deste sonho.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

De Simone TS. “Mapeamento de epitopos de proteínas potencialmente imunogênicas dos vírus dengue tipos 1, 2 e 3 responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral”. Rio de Janeiro; 2010 [Tese de doutorado – Instituto Oswaldo Cruz].

### RESUMO

Este estudo apresenta os resultados da identificação de epitopos consecutivos responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral em todas as proteínas estruturais (C, prM / M e E) e não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) dos vírus dengue (DENV) tipos 1, 2 e 3 circulantes no Brasil.

A metodologia de síntese paralela de peptídeos (do inglês *Spot synthesis*) foi utilizada para a construção de uma biblioteca composta por 2007 peptídeos e, a triagem utilizando pool de soros de pacientes com dengue, previamente confirmados através de técnicas laboratoriais, permitiu a identificação de 96 epitopos para os DENV-1, 103 epitopos para os DENV-2 e 106 epitopos para os DENV-3. Tais resultados foram comparados com métodos computacionais que permitem a predição de regiões imunogênicas (DNASTAR e IEDB) e demonstrou que, apesar de serem considerados bons indicadores de antigenicidade de uma proteína, os métodos computacionais requerem mais do que um parâmetro de predição para a confiabilidade dos resultados. Por sua vez, a síntese paralela provou ser altamente sensível e eficiente no mapeamento de epitopos consecutivos, permitindo a síntese em nano-escala de um grande número de peptídeos, de forma simultânea e reprodutível.

A fim de avaliar a capacidade em discriminar as infecções causadas pelos sorotipos de dengue daqueles negativos para esta patologia, foi realizado um teste de reação cruzada dos peptídeos identificados com pool de soros de pacientes com DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, seguido pela avaliação utilizando pool de soros negativos para dengue, pool de soros de voluntários previamente vacinados para a febre amarela e pool de soros de pacientes com rubéola, sarampo, leptospirose, malária, varíola e indicaram a existência de um total de 195 epitopos comuns ao grupo dengue e 3 epitopos específicos para os DENV-1, 9 para os DENV-2 e 11 para os DENV-3. A modelagem molecular das proteínas dos DENV permitiu a confirmação da localização dos epitopos na superfície da molécula.

Esses resultados constituem a primeira descrição completa de epitopos contínuos dos DENV e poderão contribuir para a compreensão da interação anticorpo-epitopo em nível molecular e, conseqüentemente, a patogenicidade do dengue, bem como servir de base para a construção racional de vacinas preventivas e para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico vírus-específicos.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

De Simone TS. Epitope mapping of proteins potentially immunogenic of dengue viruses type 1, 2 and 3 responsible for the humoral immune response - Rio de Janeiro; 2010 [Ph.D. thesis – Oswaldo Cruz Institute].

### **ABSTRACT**

This study presents the results of the identification of continuous epitopes responsible for unchain the humoral immune response in all structural proteins (C, prM/M and E) and non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5) of dengue viruses (DENV) types 1, 2 and 3 circulating in Brazil.

The Spot synthesis method was used to construct a library consisting of 2007 peptides, and by screening with pool of sera from patients with dengue, that were previously confirmed by laboratory techniques, allowed the identification of 96 epitopes to DENV-1, 103 epitopes to DENV-2 and 106 epitopes to DENV-3. These results were compared to computational methods that allow the prediction of immunogenic regions (DNASTAR and IEDB programs) and have demonstrated that, although they are considered good indicators of antigenicity of a protein, computational methods require more than one parameter for predicting the reliability of results. However, the parallel synthesis proved to be highly sensitive and efficient to map continuous epitopes, allowing the synthesis of nano-scale to large numbers of peptides simultaneously and with reproducibility.

In order to evaluate the ability to discriminate the infections caused by dengue serotypes from negative cases, we performed a cross-reaction test using peptides identified in this study with a pool of sera from patients infected by DENV-1, DENV-2 or DENV-3, followed by evaluation using pool of negative sera for dengue, pool of volunteers sera previously vaccinated for yellow fever and pool of sera from patients with rubella, measles, leptospirosis, malaria, smallpox and have indicated a total of 203 epitopes specific to dengue group and 3 epitopes specific to DENV-1, 9 to DENV-2 and 11 to DENV-3. Molecular modeling of dengue proteins confirmed that epitopes were located on the molecular surface.

These results constitute the first complete description of continuous epitopes of DENV and may contribute to the understanding of the interaction of antibody-epitope at the molecular level and consequently the pathogenicity of dengue, as well as providing the basis for the rational construction of preventive vaccines and the development of virus-specific serological diagnosis tests.

# ÍNDICE GERAL

---

|   |       |
|---|-------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | XVII  |
| ÍNDICE DE QUADROS.....  | XXII  |
| ABREVIATURAS.....   | XXIII |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 01    |
| 1.1. HISTÓRICO.....   | 01    |
| 1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES PELOS DENV.....                                | 04    |
| 1.2.1. DENGUE NO BRASIL .....   | 05    |
| 1.3. AGENTE ETIOLÓGICO.....   | 08    |
| 1.3.1. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS .....  | 11    |
| 1.3.2. PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAIS .....  | 13    |
| 1.4. REPLICAÇÃO VIRAL.....  | 15    |
| 1.5. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA.....  | 17    |
| 1.6. RESPOSTA IMUNE.....  | 20    |
| 1.7. PATOGÊNESE DAS INFECÇÕES PELOS DENV.....                                   | 21    |
| 1.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....   | 22    |
| 1.9. PREVENÇÃO E CONTROLE .....   | 24    |
| 1.10. DO GENOMA AO IMUNOMA .....  | 25    |
| 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....   | 28    |
| 3. OBJETIVOS.....   | 29    |
| 3.1. OBJETIVO GERAL .....   | 29    |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 29    |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 30    |
| 4.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3 .....      | 30    |
| .....   |       |
| 4.1.1. SELEÇÃO DE SEQÜÊNCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS DOS DENV .....            | 30    |
| 4.1.2. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQÜÊNCIAS DE PROTEÍNAS .....                    | 30    |
| 4.1.3. DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS ..... | 30    |
| 4.1.4. LOCALIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS .....              | 32    |
| 4.2. SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS.....                            | 33    |

# ÍNDICE GERAL

---

|  |     |
|--|-----|
| 4.3. AMOSTRAS CLÍNICAS .....   | 34  |
| 4.3.1. CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....   | 35  |
| 4.3.1.1. ISOLAMENTO VIRAL.....   | 35  |
| 4.3.1.2. TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....   | 36  |
| 4.3.1.3. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-PCR.....   | 36  |
| 4.3.1.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS IGG (G-ELISA) PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE PACIENTES COM DENGUE.....                          | 37  |
| 4.3.1.5. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS IGG (G-ELISA) PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE PACIENTES COM OUTRAS PATOLOGIAS.....               | 38  |
| 4.4. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE A POTENCIAIS EPITOPOS.....   | 39  |
| 5. RESULTADOS.....   | 40  |
| 5.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....  | 40  |
| 5.2. PREDIÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS.....   | 40  |
| 5.3. COMPARAÇÃO DAS PREDIÇÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS – ESCALA DE ANTIGENICIDADE.....   | 47  |
| 5.4. IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS CONSECUTIVOS DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS..... | 53  |
| 5.5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO EXPERIMENTAL DA SÍNTESE PARALELA E MÉTODO COMPUTACIONAL DE PREDIÇÃO DE EPITOPOS.....                                  | 67  |
| 5.6. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPITOPOS ESPECÍFICOS E COMUNS AO GRUPO DENGUE E O GÊNERO <i>FLAVIVIRUS</i> .....  | 68  |
| 5.7. LOCALIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS.....  | 96  |
| 6. DISCUSSÃO.....  | 101 |
| 7. CONCLUSÃO.....  | 112 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 113 |

# ANEXOS

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>ANEXO 1:</b> REGIÕES PROPENSAS AO RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS PARA CADA PROTEÍNA DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, BASEADO EM PARÂMETROS DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA, ACESSIBILIDADE E SOLUBILIDADE, DE ACORDO COM O PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR (VERSÃO 4.0).....   | 138 |
| <b>ANEXO 2:</b> ÍNDICE DE ANTIGENICIDADE (ESCALA DE JAMESON & WOLF) DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....  | 144 |
| <b>ANEXO 3:</b> REGIÕES IMUNOGÊNICAS COM PROPENSÃO À ANTIGENICIDADE DETERMINADA ATRAVÉS DA ESCALA DE KOLASKAR & TONAGONKAR PARA AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....   | 152 |
| <b>ANEXO 4:</b> REGIÕES COM PROPENSÃO À ANTIGENICIDADE DETERMINADA ATRAVÉS DA ESCALA DE BEPIRED DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....  | 158 |
| <b>ANEXO 5:</b> ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE CADA SOROTIPO DOS DENV E A PROTEÍNA 1R6R, SELECIONADA COMO MODELO PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA C.....  | 164 |
| <b>ANEXO 6:</b> ALINHAMENTO MÚLTIPLO, REALIZADO ATRAVÉS DO PROGRAMA CLUSTALW, ENTRE CADA SOROTIPO DOS DENV E A PROTEÍNA 3C6D, SELECIONADA COMO MOLDE PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA PRM/M.....  | 166 |
| <b>ANEXO 7:</b> ALINHAMENTO MÚLTIPLO, REALIZADO ATRAVÉS DO PARÂMETRO CLUSTALW, ENTRE CADA SOROTIPO DOS DENV E AS DIFERENTES PROTEÍNAS SELECIONADAS COMO MODELO PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA E DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3. (A) ALINHAMENTO ENTRE AS PROTEÍNAS 1TGE, 1TG8 E DENV-1; (B) ALINHAMENTO ENTRE 1UZG, 2HG0 E DENV-2 E (C) ALINHAMENTO ENTRE 1TG8 E DENV-3.....   | 168 |
| <b>ANEXO 8:</b> ALINHAMENTO MÚLTIPLO, REALIZADO ATRAVÉS DO PARÂMETRO CLUSTALW, ENTRE CADA SOROTIPO DOS DENV E AS DIFERENTES PROTEÍNAS SELECIONADAS COMO MODELO PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA NS3 DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3. (A) ALINHAMENTO ENTRE AS PROTEÍNAS 2Z83, 2V80 E DENV-1; (B) ALINHAMENTO ENTRE AS PROTEÍNAS 2Z83, 2V80 E DENV-2 E (C) ALINHAMENTO ENTRE 2V80 E DENV-3. EM DESTAQUE, MOTIVO DE SEQUÊNCIAS DAS ATIVIDADES DE HELICASE, RTPASE E NTPASE DA PROTEÍNA NS3..... | 172 |

# ANEXOS

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>ANEXO 9:</b> ALINHAMENTO MÚLTIPLO, REALIZADO ATRAVÉS DO PARÂMETRO CLUSTALW, ENTRE CADA SOROTIPO DOS DENV E A PROTEÍNA 2P3Q SELECIONADA COMO MODELO PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA PROTEÍNA NS5 DOS DENV-1 (A), DENV-2 (B) E DENV-3 (C).....  | 176 |
| <b>ANEXO 10:</b> SUBMISSÃO DE SOLICITAÇÃO DE DEPOSITO DE PATENTE AO NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ DA INVENÇÃO “CARACTERIZAÇÃO DE EPITOPOS RESPONSÁVEIS PELA IMUNIDADE HUMORAL DAS PROTEINAS ESTRUTURAIIS E NÃO ESTRUTURAIIS DOS VIRUS DENGUE TIPOS 1, 2 E 3 PARA DIAGNÓSTICO E VACINAÇÃO” ..... | 178 |



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1.</b> DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ÁREAS INFESTADAS COM <i>Aedes Aegypti</i> .....   | 4  |
| <b>FIGURA 2:</b> NÚMERO DE CASOS DE DENGUE E DH REPORTADOS NO BRASIL, 1986 – 2009  | 7  |
| <b>FIGURA 3:</b> RECONSTRUÇÃO POR CRIOELETROMICROSCOPIA DE UMA PARTÍCULA DE DENV IMATURA E MADURA EM PH 7,0 E DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA COMPOSIÇÃO DE UMA PARTÍCULA IMATURA E MADURA DE DENV.....  | 9  |
| <b>FIGURA 4:</b> DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO GENOMA DOS DENV E TOPOLOGIA DE MEMBRANA DA POLIPROTEÍNA DURANTE O PROCESSO DE TRADUÇÃO VIRAL NO LÚMEN DO RETICULO ENDOPLASMÁTICO E CITOPLASMA, RESULTANDO NA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS C, PRM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5.....  | 10 |
| <b>FIGURA 5:</b> ESTRUTURA DO DÍMERO DA PROTEÍNA E DOS <i>FLAVIVÍRUS</i> (PARTÍCULA MADURA) DE ACORDO COM O MODELO EM <i>RIBBON</i> . IMAGEM DE RECONSTRUÇÃO POR CRIOELETROMICROSCOPIA MOSTRANDO A DISPOSIÇÃO DOS DÍMEROS DA PROTEÍNA E NA SUPERFÍCIE VIRAL.....   | 12 |
| <b>FIGURA 6:</b> FIGURA ESQUEMÁTICA DE INOCULAÇÃO DO VÍRUS DENGUE PELO MOSQUITO VETOR NO SISTEMA TEGUMENTAR DO HOSPEDEIRO.....   | 15 |
| <b>FIGURA 7:</b> DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA REPLICAÇÃO DOS DENV E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO MECANISMO DE REPLICAÇÃO DOS VÍRUS DENGUE NAS CÉLULAS DO HOSPEDEIRO .....  | 17 |
| <b>FIGURA 8:</b> FLUXOGRAMA DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO DENGUE .....   | 18 |
| <b>FIGURA 9:</b> INTERAÇÃO ENTRE FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS GRAVES DO DENGUE – HIPÓTESE INTEGRAL .....   | 22 |
| <b>FIGURA 10:</b> PRINCÍPIO DA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANA. A: INSERÇÃO DE RESÍDUOS EM MEMBRANA DE CELULOSE FORMANDO GOTAS REGULARES. B: FIGURA ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS, ENVOLVENDO CICLOS SUCESSIVOS DE LAVAGEM, ACOPLAMENTO E DESPROTEÇÃO DE CADA RESÍDUO À SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS NASCENTE..... | 27 |
| <b>FIGURA 11:</b> FÓRMULA MATEMÁTICA UTILIZADA PELO PARÂMETRO DE JAMESON & WOLF PARA A DETERMINAÇÃO DE REGIÕES COM PROPENSÃO À ANTIGENICIDADE.....   | 31 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 12:</b> FÓRMULA MATEMÁTICA UTILIZADA PELA ESCALA DE KOLASKAR & TONGAONKAR PARA A DETERMINAÇÃO DE REGIÕES COM PROPENSÃO À ANTIGENICIDADE.....   | 32 |
| <b>FIGURA 13:</b> MATRIZ DE IDENTIDADE PARA TODAS AS SEQUÊNCIAS DE PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, OBTIDA ATRAVÉS DO PROGRAMA BIOEDIT (VERSÃO 7.0.4.1).....   | 39 |
| <b>FIGURA 14:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DE CAPSÍDEO/CAPSÍDEO ANCORADA E PRÉ-MEMBRANA/MEMBRANA DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO EM ELEMENTOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E EM PARÂMETROS DE HIDROFILICIDADE E ACESSIBILIDADE DE CADA AMINOÁCIDO, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR..... | 40 |
| <b>FIGURA 15:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DE ENVELOPE E NÃO ESTRUTURAL 1 DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO EM ELEMENTOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E EM PARÂMETROS DE HIDROFILICIDADE E ACESSIBILIDADE DE CADA AMINOÁCIDO, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR.....                           | 41 |
| <b>FIGURA 16:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 2A E 2B DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO EM ELEMENTOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E EM PARÂMETROS DE HIDROFILICIDADE E ACESSIBILIDADE DE CADA AMINOÁCIDO, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR.....  | 42 |
| <b>FIGURA 17:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 3 E 4A DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO EM ELEMENTOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E EM PARÂMETROS DE HIDROFILICIDADE E ACESSIBILIDADE DE CADA AMINOÁCIDO, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR.....   | 43 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 18:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 4B E 5 DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO EM ELEMENTOS DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E EM PARÂMETROS DE HIDROFILICIDADE E ACESSIBILIDADE DE CADA AMINOÁCIDO, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE COMPUTAÇÃO DNASTAR..... | 44 |
| <b>FIGURA 19:</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, CONTENDO REGIÕES COM PROBABILIDADE DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS BASEADO NO ÍNDICE DE ANTIGENICIDADE DETERMINADA PELO PARÂMETRO DE ANTIGENICIDADE DE JAMESON & WOLF.....   | 46 |
| <b>FIGURA 20:</b> REVELAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS MEMBRANAS CELULÓSICAS CONTENDO PEPTÍDEOS DO DENV-1 SINTETIZADOS (10 MERS) PELA TÉCNICA DE SÍNTESE PARALELA. ....   | 54 |
| <b>FIGURA 21:</b> REVELAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS MEMBRANAS CELULÓSICAS CONTENDO PEPTÍDEOS DO DENV-2 SINTETIZADOS (10 MERS) PELA TÉCNICA DE SÍNTESE PARALELA. ....   | 55 |
| <b>FIGURA 22:</b> REVELAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS MEMBRANAS CELULÓSICAS CONTENDO PEPTÍDEOS DO DENV-3 SINTETIZADOS (10 MERS) PELA TÉCNICA DE SÍNTESE PARALELA. ....   | 56 |
| <b>FIGURA 23:</b> CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PREDITIVOS (COMPUTACIONAIS) E EXPERIMENTAIS (SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS) DE DETERMINAÇÃO DE EPITOPOS DOS DENV.....   | 67 |
| <b>FIGURA 24:</b> ESTRUTURA DAS DIFERENTES PROTEÍNAS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS ELUCIDADAS POR DIFERENTES METODOLOGIAS QUE FORAM UTILIZADAS COMO MOLDE PARA A CONSTRUÇÃO DOS MODELOS-3D DAS PROTEÍNAS DOS DENV.....  | 79 |
| <b>FIGURA 25:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA C DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, GERADA POR MODELAGEM POR HOMOLOGIA, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS PELA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS.....   | 82 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 26:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA “PR” DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, GERADA PELO PROGRAMA MODELLER E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS PELA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS..... | 83 |
| <b>FIGURA 27:</b> ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA PRM-M (MODELLER VERSÃO 9V4), RESSALTANDO AS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.....  | 84 |
| <b>FIGURA 28:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA E DOS DENV-1 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE.....                          | 86 |
| <b>FIGURA 29:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA E DOS DENV-2 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE.....                          | 87 |
| <b>FIGURA 30:</b> FIGURA 28: ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA E DOS DENV-3 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE.....               | 88 |
| <b>FIGURA 31:</b> ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA E (MODELLER VERSÃO 9V4), RESSALTANDO AS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.....  | 90 |
| <b>FIGURA 32:</b> LOCALIZAÇÃO-3D DOS DOMÍNIOS CARBOXI-TERMINAIS PROTEÍNA NS3 DO DENV-1, GERADA POR MODELAGEM POR HOMOLOGIA.....   | 91 |
| <b>FIGURA 33:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS3 DOS DENV-1 GERADA POR MODELAGEM POR HOMOLOGIA, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS PELA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS.....   | 93 |
| <b>FIGURA 34:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS3 DOS DENV-2 GERADA POR MODELAGEM POR HOMOLOGIA, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS PELA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS.....   | 94 |
| <b>FIGURA 35:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS3 DOS DENV-3 GERADA POR MODELAGEM POR HOMOLOGIA, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS PELA SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS.....   | 95 |

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>FIGURA 36:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS5 DOS DENV-1 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE..... | 97  |
| <b>FIGURA 37:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS5 DOS DENV-2 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE..... | 98  |
| <b>FIGURA 38:</b> ESTRUTURA-3D DA PROTEÍNA NS5 DOS DENV-3 GERADA PELO PROGRAMA MODELLER (VERSÃO 9V4) E ANALISADA ATRAVÉS DO PROGRAMA SWISS-PDB-VIEWER, DESTACANDO POR CORES OS EPITOPOS IDENTIFICADOS EXPERIMENTALMENTE..... | 99  |
| <b>FIGURA 39:</b> ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA NS5 (MODELLER VERSÃO 9V4), RESSALTANDO AS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.....   | 100 |

# ÍNDICE DE QUADROS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>QUADRO 1:</b> OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A TIPAGEM DOS VÍRUS DENGUE.....  | 36 |
| <b>QUADRO 2:</b> DETERMINAÇÃO DAS POSSÍVEIS REGIÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, ATRAVÉS DA GERAÇÃO DE UM CONSENSO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PELO PARAMETRO DE ANTIGENICIDADE DOS PROGRAMAS DE COMPUTAÇÃO DNASTAR E IEDB.....   | 48 |
| <b>QUADRO 3:</b> RELAÇÃO DOS EPITOPOS B LINEARES DE TODAS AS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3 IDENTIFICADOS, EMPREGANDO MISTURA DE SOROS DE PACIENTES ESPECÍFICOS A CADA SOROTIPO. OS PEPTÍDEOS FORAM SINTETIZADOS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SÍNTESE PARALELA CONTENDO 10 A 15 AMINOÁCIDOS COM SOBREPOSIÇÃO DE 5 RESÍDUOS. OS RESULTADOS FORAM RESULTANTES DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS EM DATAS INDEPENDENTES..... | 57 |
| <b>QUADRO 4:</b> IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS ESPECÍFICOS AOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3 E EPITOPOS COMUNS AO GRUPO DENGUE, ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DA MISTURA DE SOROS DE PACIENTES COM INFECÇÃO POR DENV-1, DENV-2 OU DENV-3, EM TESTE DE REAÇÃO CRUZADA.....  | 69 |
| <b>QUADRO 5:</b> EPITOPOS COMUNS AO GRUPO DENGUE QUE REAGIRAM COM MISTURA DE SOROS DE VACINADOS PARA FEBRE AMARELA.....  | 77 |
| <b>QUADRO 6:</b> NÚMERO DE ACESSO DAS PROTEÍNAS DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS, USADAS EM NOSSO ESTUDO PARA A MODELAGEM POR HOMOLOGIA DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....   | 78 |
| <b>QUADRO 7:</b> AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESTEREOQUÍMICA GERAL DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS OBTIDOS ATRAVÉS DO PROGRAMA PROCHECK (SERVIDOR SAVS - <a href="http://nihserver.mbi.ucla.edu/savs/">HTTP://NIHSERVER.MBI.UCLA.EDU/SAVS/</a> ).....  | 80 |

# ABREVIATURAS

---

|         |   |
|---------|---|
| aa      | RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS   |
| ABTS    | SUBSTRATO ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONICO)                              |
| ADE     | FACILITAÇÃO DA RESPOSTA DEPENDENTE DE ANTICORPOS  |
| BLAST   | FERRAMENTA PARA A PESQUISA DE ALINHAMENTO LOCAL (DO INGLÊS BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL) |
| C       | CAPSÍDEO  |
| cryoEM  | CRIOELETROMICROSCOPIA   |
| DCC     | QUADRO DE DENGUE COM COMPLICAÇÕES   |
| DCM     | DICLOROMETANO   |
| DENCO   | PROJETO PARA O CONTROLE DO DENGUE   |
| DENV    | VÍRUS DENGUE  |
| DENV-1  | VÍRUS DENGUE TIPO 1   |
| DENV-2  | VÍRUS DENGUE TIPO 2   |
| DENV-3  | VÍRUS DENGUE TIPO 3   |
| DENV-4  | VÍRUS DENGUE TIPO 4   |
| DC      | DENGUE CLÁSSICO   |
| DH      | DENGUE HEMORRÁGICO  |
| DMF     | DIMETILFORMAMIDA  |
| E       | ENVELOPE  |
| ECP     | EFEITO CITOPÁTICO   |
| Fc      | PORÇÃO CRISTALIZÁVEL DE ANTICORPOS  |
| Fmoc    | GRUPO FLUORENYLMETHOXYCARBONYL  |
| G-ELISA | ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS G  |
| HLA     | ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS   |
| HOBT    | N-HIDROXIBENZOTRIAZOL   |
| IFN     | INTERFERON  |
| IgM     | ANTICORPO DA CLASSE M   |
| IgG     | ANTICORPO DA CLASSE G   |
| IgA     | ANTICORPO DA CLASSE A   |
| IgE     | ANTICORPO DA CLASSE E   |
| IL      | INTERLEUCINA  |
| KCl     | CLORETO DE POTÁSSIO   |

# ABREVIATURAS

---

|           |  |
|-----------|--|
| KDa       | KILODÁLTONS  |
| M         | MEMBRANA   |
| MAC-ELISA | ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA DE ANTICORPOS M  |
| Mol       | MOLAR  |
| MTase     | RNA METILTRANSFERASE   |
| µg/ml     | MICROGRAMA POR MILILITRO   |
| NaCl      | CLORETO DE SÓDIO   |
| NC        | REGIÃO NÃO CODIFICANTE   |
| nmol      | NANOMOLAR  |
| NMP       | N-METIL-2-PIRROLIDONA  |
| NS        | NÃO ESTRUTURAL   |
| NTPase    | NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATASE   |
| PBS       | TAMPÃO FOSFATO-SALINO  |
| PDB       | BANCO DE DADOS DE PROTEINA (DO INGLÊS PROTEIN DATA BANK)   |
| PEAa      | PROGRAMA DE ERRADICAÇÃO DO <i>Aedes Aegypti</i>  |
| PEG       | PEGULADA   |
| PNCD      | PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DO DENGUE  |
| pH        | POTENCIAL HIDROGENIÔNICO   |
| Poli-A    | POLI-ADENILATO   |
| prM       | PRECURSOR GLICOSILADO DA PROTEÍNA DE MEMBRANA  |
| RdRp      | RNA-POLIMERASE-RNA-DEPENDENTE  |
| RE        | RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  |
| RMN       | RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR  |
| RNA       | ÁCIDO RIBONUCLEICO   |
| RTPase    | RNA TRIFOSFATASE   |
| RT-PCR    | TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE                                    |
| SAVS      | SERVIDOR DE ANÁLISE E VERIFICAÇÃO ESTRUTURAL (DO INGLÊS STRUCTURAL ANALYSIS AND VERIFICATION SERVER) |
| SCD       | SÍNDROME DO CHOQUE POR DENGUE  |
| ssRNA     | MOLÉCULA DE RNA FITA SIMPLES   |
| TBEV      | VÍRUS DA ENCEFALITE TRANSMITIDA POR CARRAPATO  |
| TBS       | TAMPÃO TRIS SALINA   |



# ABREVIATURAS

---

---

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| TFA | ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO   |
| TNF | FATOR DE NECROSE TUMORAL |
| TGN | TRANS GOLGI NETWORK      |
| UHA | UNIDADES HEMAGLUTINANTES |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO

O século XX foi marcado por transformações econômicas e sociais caracterizadas pelo rápido processo de urbanização (principalmente após a segunda guerra mundial) pelas mudanças de hábitos das populações, alterações ambientais nas cidades e no campo, migrações e pelo aumento do intercâmbio internacional (Waldman, 2000). Tais transformações alteraram o comportamento das doenças infecciosas em todo o mundo, propiciando condições adequadas para a emergência de novas doenças infecciosas, como o dengue, que ainda hoje é considerada a arbovirose humana de maior importância médica no mundo, em termos de morbidade e mortalidade (WHO, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a incidência do dengue tem aumentado de forma alarmante nas últimas décadas, onde mais de 2,5 bilhões de pessoas (dois quintos da população mundial) estão expostas ao risco de infecção. Estima-se que 50-100 milhões de casos de dengue clássico, 500 mil casos de dengue hemorrágico (DH) e 25 mil mortes são notificados anualmente em todo o mundo, como resultado da dispersão do mosquito vetor (Stephenson, 2008; WHO, 2009).

O agente etiológico desta doença é o vírus dengue (DENV), que é caracterizado por quatro sorotipos antigenicamente e filogeneticamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), dentro dos quais existem consideráveis variações genéticas intra-sorotipos, sendo filogeneticamente definidos como genótipos (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach & Rice, 2000).

A origem geográfica dos DENV tem sido objeto de inúmeras especulações. Apesar de permanecer incerta, estudos têm sugerido a origem Africana em virtude, principalmente, da procedência do mosquito vetor *Aedes aegypti* nesta região (Gubler, 1997; Gaunt *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2003). Outros estudos, entretanto, têm sugerido origem Asiática, particularmente devido à posição filogenética de cepas silvestres provenientes deste local e a alta prevalência de dengue nesta região (Gubler, 1997; Wang *et al.*, 2000; Wilder-Smith *et al.*, 2008; Weaver *et al.*, 2009). O que se sabe até o momento, é que independente de sua origem geográfica, a transmissão dos DENV ocorreu inicialmente através de um ciclo silvestre, envolvendo primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes*. A adaptação viral

a novas espécies, como no caso dos mosquitos *Ae. arboreal* ao *Ae. albopictus* e, posteriormente ao *Ae. Aegypti* contribuíram para o surgimento do ciclo urbano, no qual os humanos são os únicos hospedeiros a desenvolver as formas clínicas da infecção (Whitehead, 2007; Weaver *et al.*, 2009).

Não existe um consenso do início da transmissão dos DENV ao homem. Diversos estudos sugerem que o crescimento da urbanização, associado ao aumento do tráfego de pessoas do campo para as cidades, provavelmente resultaram na evolução do mosquito vetor, que os tornou intimamente associados aos humanos, garantindo o estabelecimento do ciclo urbano dos DENV (Gubler, 1997; 1998; Whitehead, 2007; Weaver *et al.*, 2009).

Embora os primeiros relatos de epidemias de uma enfermidade clinicamente compatível com dengue tenham sido descritos na Ásia, África e América do Norte em 1779 e 1780 (Siler *et al.*, 1926), em uma enciclopédia chinesa, há registros que apontam que esta doença tenha ocorrido na China no século III, durante a Dinastia Chin (265 a 420 D.C.). Esta enfermidade foi chamada pelos chineses de “veneno da água”, pois acreditavam que houvesse alguma associação entre insetos voadores e água. Descrições similares foram registradas nos séculos VII e X, durante as Dinastias Tang (610 D.C.) e Norte Sung (992 D.C.), respectivamente (Gubler, 1998).

O primeiro uso do termo “dengue” ocorreu em 1801 na Espanha, embora muitos nomes tenham sido atribuídos a esta doença até seu total estabelecimento (Rezende, 2004). A explicação aparentemente lógica de chamar-se “dengue” à doença segue duas vertentes, ambas com origem africana. Em quimbundo, *ndenge* significa menino, que subentende birra, choro ou manha. Outra versão dá a palavra dengue oriunda do Swahili, língua bantu da costa leste africana, na qual a expressão *ka dinga pepo* significa câimbras de início súbito (Rezende, 2004).

Sua introdução na literatura médica inglesa se deu entre 1827 e 1828, durante uma epidemia de exantema com artralgia ocorrida no Caribe e somente, em 1869, ele foi estabelecido pelo *London Royal College of Physicians* (Halstead, 1980). Este termo sobrepôs-se aos demais, passou para o inglês e francês e foi definitivamente consagrado quando incorporado à Nomenclatura Internacional das Doenças, do Conselho das Organizações Internacionais de Ciências Médicas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1983).

Graham (1903) foi o primeiro a documentar o envolvimento de mosquitos na transmissão do dengue. Este trabalho foi seguido por Bancroft (1906) que

identificou o mosquito *Ae. aegypti* como transmissor da doença, sendo confirmado por estudos subseqüentes (Siler *et al.*, 1926; Rosen *et al.*, 1954).

Após descartarem a participação de quaisquer bactérias e/ou protozoários e conseguirem a reprodução da doença em voluntários sadios, Ashburn & Craig (1907) demonstraram a natureza viral do agente etiológico, concluindo que a doença era causada por um “organismo” de tamanho ultramicroscópico e filtrável.

Os primeiros DENV foram isolados durante a segunda guerra mundial em março de 1944, a partir de soros de soldados que contraíram a infecção em Calcutá (Índia), Nova Guiné e Havaí (Sabin, 1952). Os vírus provenientes da Índia, do Havaí e de uma das cepas da Nova Guiné, por se mostrarem antigenicamente semelhantes, foram denominados de DENV-1 e a cepa Havaí considerada protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas distintas, permitindo a identificação de um novo tipo sorológico e foram classificadas como DENV-2, tendo a cepa Nova Guiné como protótipo.

Em 1956, durante a primeira epidemia conhecida de dengue hemorrágico (DH) ocorrida em Manila (Filipinas), dois novos vírus sorologicamente relacionados foram isolados a partir de sangue e macerado de mosquito. Estes vírus foram classificados como DENV-3 e DENV-4 (Hammon *et al.*, 1960) e as cepas H87 (DENV-3) e H241 (DENV-4) designadas protótipos.

Desde o final da Segunda Guerra Mundial, a incidência de casos de dengue e a emergência de suas formas mais graves intensificaram-se dramaticamente, constituindo um dos maiores problemas de Saúde Pública, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais (Young *et al.*, 2000). O crescimento populacional, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento das viagens contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e, conseqüentemente do vírus, permitindo o estabelecimento de uma pandemia que persiste até os dias atuais (Gubler, 1998; 2002; Gibbons & Vaughn, 2002).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES PELOS DENV

Ao longo dos séculos, tem-se registrado a ocorrência do dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas, atingindo áreas que seguem a distribuição geográfica do mosquito vetor: Ásia, Ilhas do Pacífico, África e as Américas (Figura 1 - WHO, 2009).

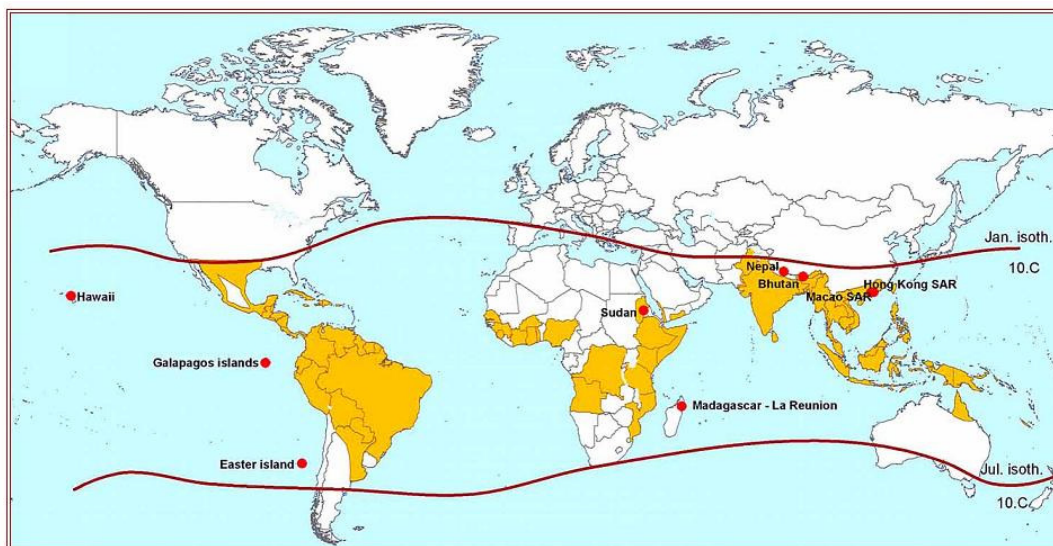


Figura 1: Distribuição geográfica das áreas infestadas com *Aedes aegypti* (em amarelo) – 2008 (adaptado de WHO, 2009).

Historicamente a Ásia tem sido a área mais afetada por epidemias de dengue, com os 4 sorotipos (DENV 1 → 4) circulando nos grandes centros urbanos da maioria dos países (Gubler, 1998). Nas ilhas do Pacífico, epidemias de dengue e casos esporádicos de dengue hemorrágico/síndrome do choque por dengue (DH/SCD) têm sido reportadas desde a década de 70, resultante de múltiplas introduções diretas dos DENV de várias localizações na Ásia, seguida de transmissão local (Gubler, 1997; Nuegoonpipat *et al.* 2004; Wilder-Smith *et al.*, 2008). Na África, embora casos esporádicos de DH/SCD tenham sido reportados (possivelmente devido à presença de um gene de resistência existente na população) um aumento das epidemias de dengue clássico foi observado nas últimas décadas em diversas regiões do país (Gubler & Trent, 1994; Gubler, 1998; Sang, 2007; WHO, 2009). Em virtude das epidemias não estarem associadas à mortalidade, o dengue não tem sido uma prioridade neste país e muitos casos não tem sido reportados, apesar de existir a co-circulação de 3 sorotipos virais (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) (WHO, 2009).

No Continente Americano, embora tenham sido descritas epidemias compatíveis com infecção pelos DENV desde 1780, os sorotipos envolvidos em tais epidemias só foram conhecidos a partir de 1953, quando foi isolada a primeira amostra de DENV-2 em Trinidad (Anderson *et al.*, 1956). Dez anos depois, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-3 em Porto Rico, sendo estes dois sorotipos responsáveis pelas epidemias ocorridas no continente nas décadas de 60 e 70 (PAHO, 1989; Gubler, 1992).

Durante a década de 70, houve uma tentativa, fracassada, de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* das Américas, o que resultou em uma reinfestação deste vetor pelo Continente e a re-introdução dos DENV-1 (1977), DENV-2 e DENV-4 (1981) e DENV-3 (1994) (Gubler, 1993).

Desde a re-introdução do DENV-2 em Cuba (1981), uma situação endêmica têm sido observada, refletida pelo aumento da densidade vetorial, a co-circulação de múltiplos sorotipos, o aumento na frequência da atividade do dengue e, conseqüentemente no registro de epidemias de DH em muitos países (Gubler, 1997, Teixeira *et al.*, 1999).

Em 2009, até a 37<sup>a</sup> semana epidemiológica, foi reportado nas Américas um total de 917.311 casos de dengue, incluindo 25.268 casos de DH/SCD e 371 óbitos. A co-circulação de dois sorotipos foi observada em 8 países e a múltipla circulação de 3 sorotipos em 6 países. Na Venezuela, Porto Rico, Peru e em El Salvador foi observada a co-circulação dos 4 sorotipos virais (PAHO, 2009).

### **1.2.1. DENGUE NO BRASIL**

No Brasil, os primeiros relatos de dengue datam de 1846 e descrevem surtos ocorridos simultaneamente nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e em localidades do norte do país (Mariano, 1917). Posteriormente, novos casos foram notificados no Paraná em 1890 (Reis, 1896), no Rio Grande do Sul em 1917 (Mariano, 1917) e no Rio de Janeiro em 1923 (Pedro, 1923).

O sucesso da Campanha Brasileira de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* iniciada em 1904, resultou na ausência de surtos de dengue no país por aproximadamente 30 anos, quando o declínio no controle do mosquito vetor, associado à introdução de novos sorotipos virais na América Central, resultou na reintrodução dos DENV no Brasil (Franco, 1961; Figueiredo, 1996; 2000; Schatzmayr, 2000).

Em 1981, em Boa Vista, Roraima, extremo norte do país, foi registrada a primeira epidemia de dengue laboratorialmente confirmada, acometendo cerca de 11.000 pessoas, onde foram isolados os DENV-1 e DENV-4 (Osanai *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 1988, 2000). Entretanto, foi a partir de 1986, que o dengue se tornou um problema de saúde pública, com a re-introdução do DENV-1 (1986), seguida do primeiro pico epidêmico ocorrido em 1986/1987, onde se estima que aproximadamente 90 mil indivíduos foram infectados por este sorotipo (Figura 2 - PAHO, 1986, 1987; Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1988; Figueiredo *et al.*, 1991).

Em 1990, ocorreu a introdução do DENV-2 (Nogueira *et al.*, 1990) e juntamente com a co-circulação do DENV-1, resultou no agravamento do quadro clínico e a notificação dos primeiros casos de DH/SCD do país (Zagne *et al.*, 1994; Nogueira *et al.*, 1999a).

A partir do ano de 1994, as epidemias de dengue deixam de apresentar picos bienais e passaram a apresentar aspecto anual, principalmente devido à dispersão do mosquito vetor pelo país (Figura 2 - Nogueira *et al.*, 1995; PAHO, 2009; Teixeira *et al.*, 2009).

Em 1998, ocorreu um aumento nas taxas de incidência de várias unidades federativas em virtude do alto índice de infestação do vetor, sendo o responsável por aproximadamente 85% dos números de casos de dengue notificados nas Américas (Vasconcelos *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2000). Ainda neste ano, o DENV-3 foi detectado na cidade de Limeira, estado de São Paulo, porém constituiu-se de um caso isolado (Rocco *et al.*, 2001).

Entretanto, em dezembro de 2000, esse mesmo sorotipo foi detectado no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, e, nos dois anos seguintes, este sorotipo foi o responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue já ocorrida no país, com cerca de 780.000 casos notificados (Figura 2 - Nogueira *et al.*, 2001; PAHO, 2002).

Após uma queda da incidência de notificações por aproximadamente 3 anos, a tendência de crescimento do número de casos retorna a partir do ano de 2005, onde em 2006, mais de 30.000 casos foram notificados (PAHO, 2006). Nos anos seguintes, este número é ainda mais alarmante, onde em 2008, mais de 730.000 casos de dengue foram notificados no país (PAHO, 2008).

O aumento das formas graves da doença, observado principalmente a partir do ano de 2007, reflete o número de casos notificados (Figura 2). Outro importante acontecimento relacionado ao aumento do número de casos de dengue clássico (DC) e DH no Brasil é que até 2006, a notificação dos casos predominava na faixa etária de 20 a 40 anos de idade, porém nos anos seguintes, verificou-se que mais que 50% dos casos ocorreram em menores de quinze anos de idade (Barreto & Teixeira, 2008).

De 1986 a 37ª semana epidemiológica de 2009, o dengue apresentou aproximadamente 5,8 milhões de casos notificados, o que correspondeu a cerca de 70% dos casos notificados nas Américas (PAHO, 2009). Três sorotipos co-circulam no país (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) e a entrada de um novo sorotipo não está descartada, uma vez que a circulação dos quatro sorotipos nos países vizinhos tem sido freqüentemente observada (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1990; 2001; 2002a; De Simone *et al.*, 2004; PAHO, 2004; PAHO 2008).

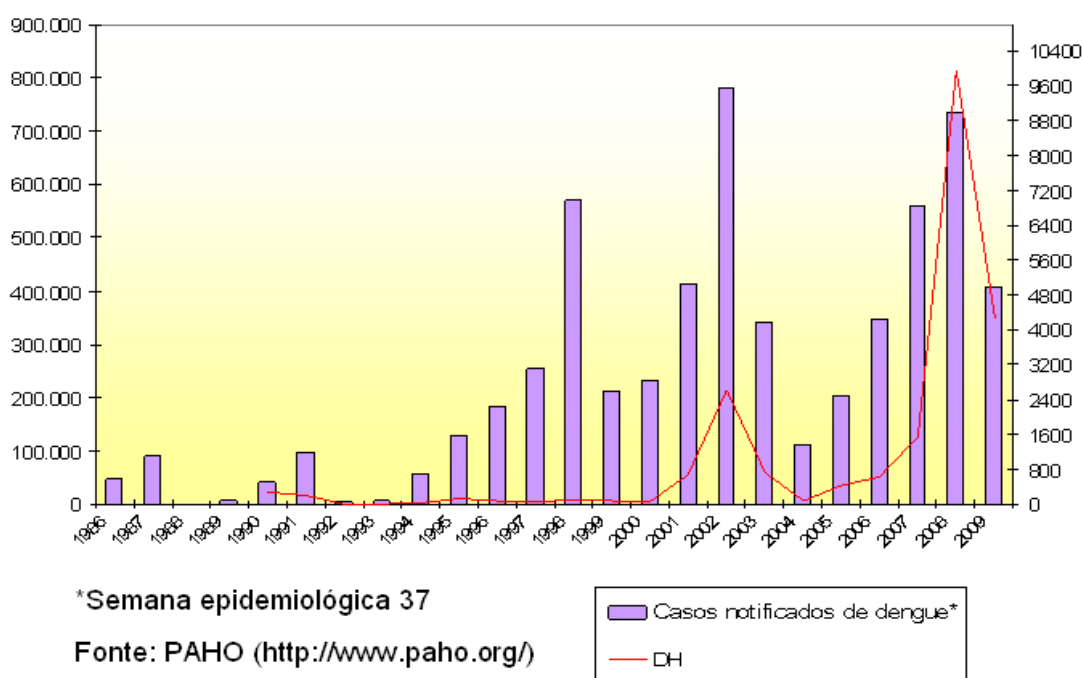


Figura 2: Número de casos de dengue e DH reportados no Brasil, 1986 – 2009\*



### 1.3. AGENTE ETIOLÓGICO

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, que reúne 55 espécies divididas em 11 grupos sorologicamente relacionados (8 transmitidos por mosquitos, 2 por carrapatos e 1 sem vetor conhecido) e 2 grupos que não se classificam dentro destes sorogrupos (ICTVdB, 2006).

Morfologicamente, são descritos como esféricos e envelopados, com diâmetro de aproximadamente 500 ângstroms e genoma constituído por uma molécula de RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva (Kuhn *et al.*, 2002). O RNA viral é envolto por múltiplas cópias da proteína de capsídeo (C) formando um nucleocapsídeo eletrodenso de simetria icosaédrica, que por sua vez é englobado por um envelope, constituído por uma bicamada lipídica derivada do retículo endoplasmático da célula hospedeira. A porção externa da superfície viral apresenta pequenas projeções na superfície, representadas pelas proteínas estruturais de membrana (M) e de envelope (E), que formam estruturas ancoradas na membrana viral (Heinz & Allison, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003).

O comportamento das proteínas E, pré-membrana/membrana (prM/M) e M durante o processo de maturação viral confere diferenças conformacionais na estrutura das formas imaturas e maduras dos DENV. Nas formas imaturas, as proteínas prM e E apresentam 90 heterodímeros que se estendem formando espículas na superfície da partícula - Figuras 3A e 3C. Entretanto, em partículas maduras, as proteínas E e M apresentam 90 homodímeros cada uma, que contornam a bicamada lipídica proporcionando aspecto homogêneo à superfície (Figuras 3B e 3D - Zhang *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2004).

A maturação ocorre imediatamente antes ou logo após a extrusão viral da célula hospedeira e sugere-se que este processo é dirigido predominantemente por alterações conformacionais da proteína E em virtude do pH (Perera e Kuhn, 2008).

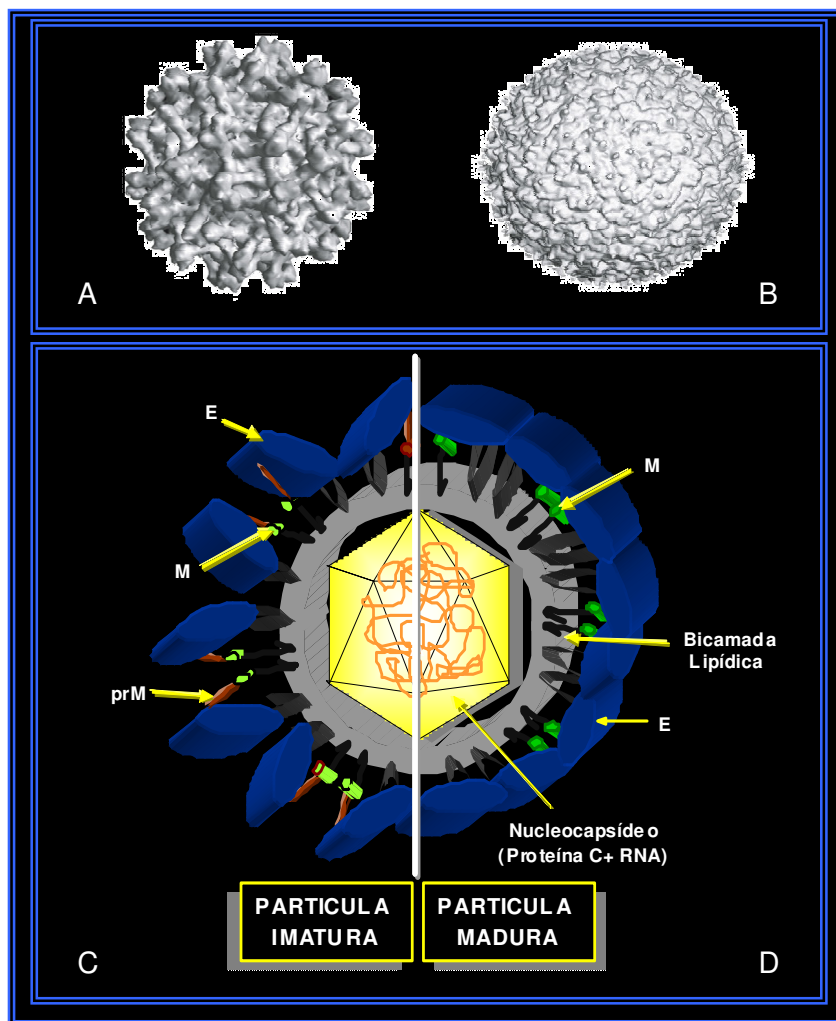


Figura 3: Reconstrução por crio-eletromicroscopia (cryoEM) de uma partícula de DENV imatura (A) e madura (B) em pH 7,0 (Perera & Kuhn, 2008) e diagrama esquemático da composição de uma partícula imatura (C) e madura (D) de DENV (adaptado de Heinz & Allison, 2001).

O genoma viral possui cerca de 11 Kilobases e peso molecular de aproximadamente  $4 \times 10^6$  daltons. A extremidade 5' apresenta um capeamento do tipo I ( $7^{\text{Me}}\text{GpppN}_2'\text{OMe}\dots$ ), que protege o RNA mensageiro da degradação por 5' exoribonucleases (Schuman, 2001; Egloff *et al.*, 2007), enquanto que a extremidade 3', não apresenta cauda de poliadenilato (cauda poli-A) (Figura 4A - Rice *et al.*, 1986).

Dois regiões não-codificantes (NC) são encontradas nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A NC-5' é relativamente mais curta (95-132 bases) que a NC-3' (400-700 bases) e, apesar de não apresentarem função definida, especula-se que estejam envolvidas no processo de tradução do genoma viral (Chambers *et al.*, 1990; Proutski *et al.*, 1997; Markoff, 2003).

Entre essas regiões, observa-se apenas uma única fase aberta de leitura, do inglês *Open Reading Frame*, que codifica uma poliproteína única de aproximadamente 3.388 aa, que ao ser clivada por proteases celulares e virais, origina 10 diferentes proteínas (3 estruturais e 7 não estruturais) (Figura 4b - Chambers *et al.*, 1990).

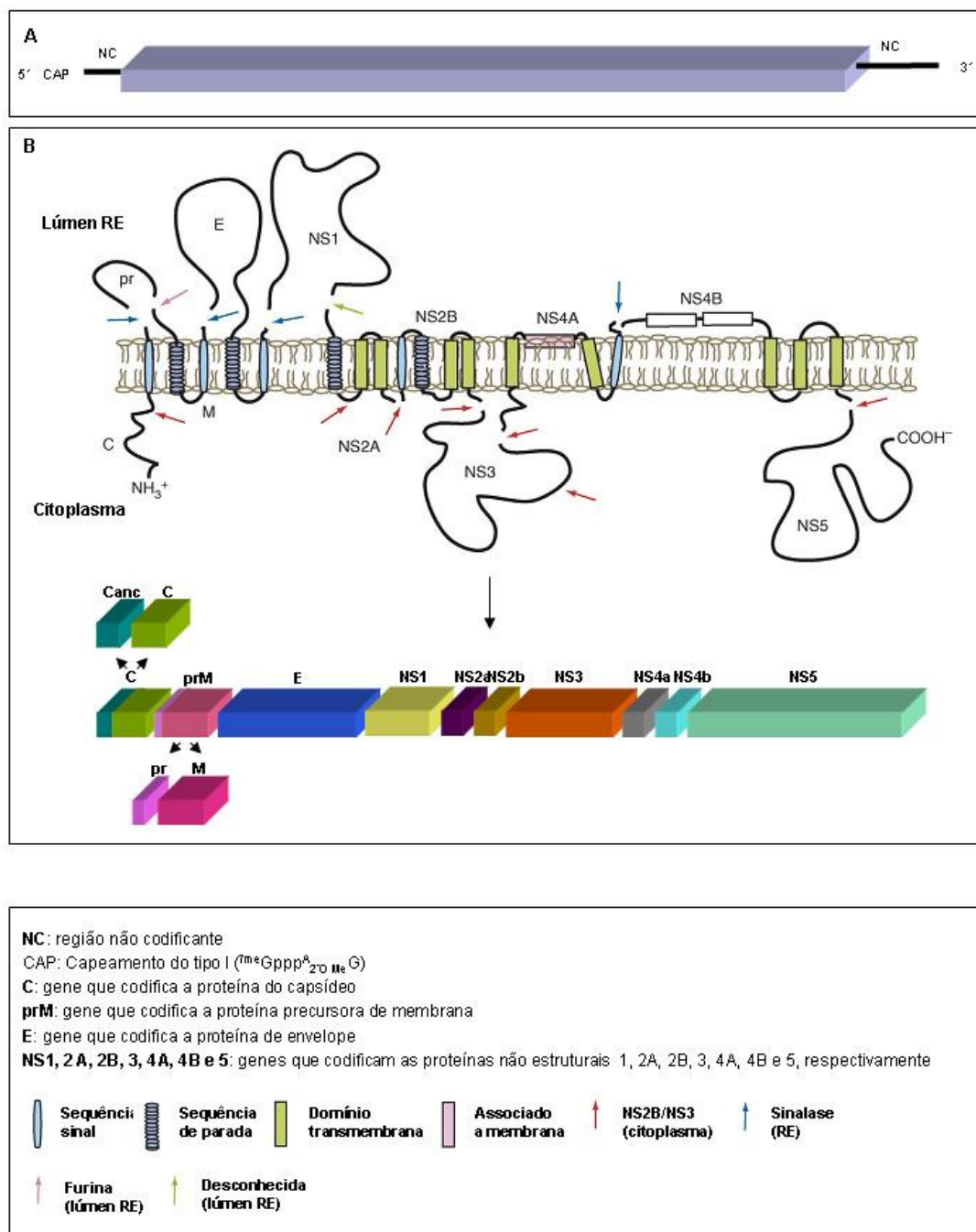


Figura 4: Diagrama esquemático do genoma dos DENV (A) e topologia de membrana da poliproteína (B) durante o processo de tradução viral no lúmen do retículo endoplasmático (RE) e citoplasma, resultando na produção das proteínas C, prM/M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

### 1.3.1. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

As proteínas estruturais são compostas pelas proteínas C, M e E e são assim chamadas por formar o componente estrutural da partícula viral.

O gene que origina a proteína C está localizado na porção 5' do genoma viral e é o primeiro a ser traduzido. A clivagem da poliproteína nascente dá origem à proteína de capsídeo parcialmente processada (proteína C ancorada), que contém 114 resíduos de aa, que ao sofrer posterior clivagem por proteases virais origina a proteína C madura, contendo 100 resíduos de aa e peso molecular em torno de 11 kDa (Lindenbach e Rice, 2001).

A proteína madura contém um domínio hidrofóbico interno conservado entre os *Flavivirus*, que pode estar associada com a membrana do retículo endoplasmático (RE) e uma porção hidrofílica, carregada positivamente, que é capaz de interagir com o ssRNA viral. Acredita-se que esta interação facilita a montagem do nucleocapsídeo viral, que ocorre no lúmen do RE (Ma *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007).

A proteína M é sintetizada como um precursor glicosilado denominado de prM, que apresenta cerca de 22 kDa. Uma clivagem proteolítica específica imediatamente antes ou logo após a extrusão viral da célula hospedeira, dá origem ao fragmento “pr” e à proteína M. Estudos em partículas imaturas mostraram que o fragmento “pr” previne que a proteína E sofra mudanças conformacionais prematuras que ocasionariam a fusão do vírus com o RE e complexo de golgi da célula hospedeira, durante o processo de replicação viral (Lindenbach e Rice, 2001). A proteína M apresenta cerca de 8 kDa e, apesar de sua função não estar totalmente esclarecida, parece ser essencial na organização da estrutura viral (Zhang *et al.*, 2003).

A proteína E (51-60 kDa) é o maior componente estrutural do vírus (Chambers *et al.*, 1990). É a responsável pelas principais atividades biológicas do ciclo viral, tais como a montagem da partícula viral, fusão e interação com receptores específicos existente na superfície da célula do hospedeiro, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes e apresentar atividade hemaglutinante (Chambers *et al.*, 1990; Putnak *et al.*, 1997).

Baseado na similaridade de seqüência, perfis de hidrofobicidade semelhantes e a conservação dos resíduos de cisteína que formam as pontes dissulfeto, foi

sugerido que todos os *Flavivirus* apresentassem a mesma arquitetura básica (Seligman e Bucher, 2003). Desta forma, a estrutura da proteína E de todos os *Flavivirus* foi determinada por cristalografia de raio X utilizando o vírus da encefalite transmitida por carrapato como protótipo (do inglês *Tick-bone encephalitis vírus – TBEV*).

A proteína madura é composta por 90 homodímeros (180 monômeros), onde cada monômero é constituído por 3 domínios: I, II e III (Leitmeyer *et al.*, 1999). Acredita-se que o domínio I, localizado na região central da molécula (posição 50-125 aa) esteja relacionado com eventos de endocitose viral (Lai *et al.*, 2008). O domínio II (posição 200-250 aa) contém os peptídeos de fusão dos *Flavivirus* (98-110 aa) e desta forma, sugere-se que este domínio esteja envolvido na fusão de membrana, além do processo de dimerização dos monômeros da proteína E (Roehrig *et al.*, 1998; Allison *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2008). O domínio III (C-terminal) por ser eficiente em neutralizar a infectividade de *Flavivirus*, e conseqüentemente estar envolvido na ligação com o receptor, é denominado de domínio imunoglobulina-like (Figura 5 - Leitmeyer *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2002, Crill *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005e Modis *et al.*, 2004; Zulueta *et al.*, 2006).

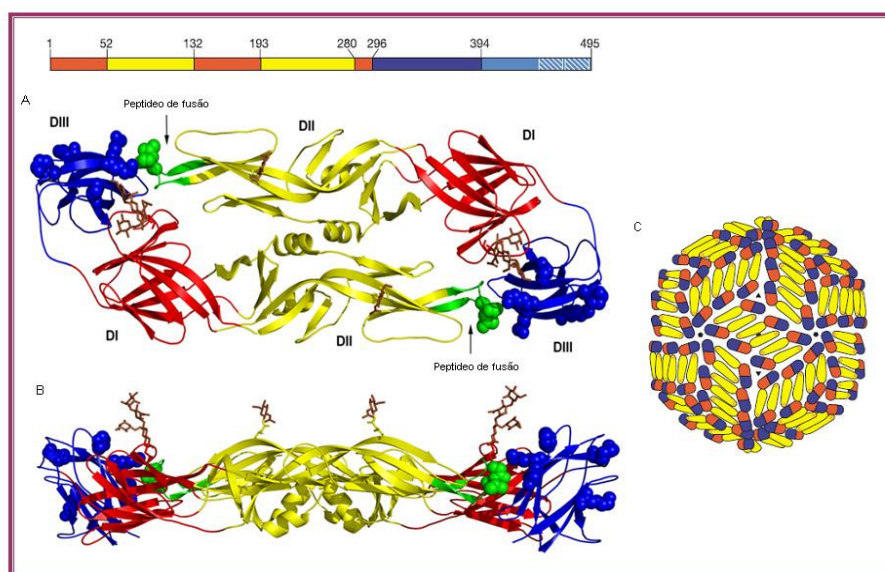


Figura 5: Estrutura do dímero da proteína E dos *Flavivirus* (partícula madura) de acordo com o modelo em *ribbon*. (A) Vista frontal e (B) Vista lateral. Os domínios I, II e III de cada monômero da proteína E estão representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente; (C) Imagem de reconstrução por crioeletromicroscopia (cryoEM) mostrando a disposição dos dímeros da proteína E na superfície viral (Adaptado de Kuhn *et al.*, 2002, Crill *et al.*, 2004 e Modis *et al.*, 2004).

### 1.3.2. PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAIS

As proteínas não estruturais (NS) são compostas por 7 diferentes proteínas (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) que contribuem para o processo de replicação viral, que ocorre no chamado “complexo replicase” associado à membrana, localizado na região perinuclear da célula alvo. O complexo replicase tem sido extensivamente caracterizado em vários *Flavivirus* e é formado pelas proteínas NS1, NS2a, NS3, NS4a e NS5 e possivelmente por algumas proteínas celulares ainda não conhecidas e desempenham inúmeras funções enzimáticas, incluindo protease, helicase, metiltransferase e RNA-polimerase-RNA-dependente (Westaway *et al.*, 1997; Ta e Vрати, 2000; Brooks *et al.*, 2002).

A proteína NS1 (40-50 kDa) é sintetizada no RE rugoso e está envolvida na morfogênese da partícula viral (Lindenbach e Rice, 2001). Esta proteína está presente intracelularmente na região perinuclear ou associada à superfície celular e também pode ser secretada extracelularmente. Em solução, a NS1 forma uma estrutura hexamérica e acumula-se no soro em grande quantidade (até 50 µg/ml), sendo observados em soros de indivíduos infectados por dengue desde o primeiro dia do surgimento dos sintomas, permanecendo detectável até o nono dia (Shu *et al.*, 2000; Alcon *et al.*, 2002, Libraty *et al.*, 2002, Avirutnan *et al.*, 2006). Por este motivo, especula-se sua utilização como ferramenta para a detecção precoce do dengue (Valdés *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006). Além disso, sua contribuição na patogênese do dengue tem sido investigada, visto que em crianças que desenvolveram as formas mais graves da doença apresentaram níveis elevados de NS1 no plasma. Este fato tem sido relacionado à ativação do sistema complemento por esta proteína através de sua ligação direta com células endoteliais, podendo assim, estabelecer o “foci” para a formação de imunocomplexos levando a ativação do complemento, citólise endotelial e extravasamento plasmático (Young *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Avirutnam *et al.*, 2006).

A proteína NS2a tem cerca de 20 kDa e é a primeira das quatro proteínas (NS2a, NS2b, NS4a e NS4b) encontradas nas regiões NS2 e NS4 da poliproteína. Pouco se conhece sobre a função desta proteína, mas acredita-se que a mesma esteja envolvida na coordenação da mudança entre a replicação e o empacotamento do RNA (Khromykh *et al.*, 2001).

As proteínas NS2b, NS3 e NS5, têm sido implicadas como alvos inibitórios potenciais para agentes antivirais, uma vez que apresentam importante papel na replicação viral (Tomlinson *et al.*, 2009).

A NS2b (27 kDa) apresenta um domínio central hidrofílico conservado de aproximadamente 40 aa, que é responsável por ativar o domínio protease NS3 *in vivo* e *in vitro*, formando a protease viral NS2b/NS3, que atua no processamento dos sítios de clivagem das junções NS2a-NS2b, NS2b-NS3, NS3-NS4a e NS4b-NS5 (Murthy *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Erbel *et al.*, 2006).

A proteína NS3 tem cerca de 70 kDa, é a segunda maior proteína viral e altamente conservada entre os *Flavivirus*. Baseado em similaridades com diversas serino-proteases virais e celulares, verificou-se que 180 resíduos de aa localizados na porção amino-terminal compõem uma serino-protease tripsina-símile, cuja tríade catalítica (His51, Asp75 e Ser135) é altamente conservada entre os *Flavivirus*. Esta porção ao ser ativada pela proteína NS2b, forma o complexo NS2b/NS3 que cliva a poliproteína viral durante o processamento viral (Rice, 1996). Além deste domínio, localizado a  $\frac{3}{4}$  da porção carboxi-terminal, a proteína NS3 contém motivos conservados compatíveis com atividades de helicase, que está implicada no desenovelamento do RNA intermediário dupla fita. A NS3 também interage com a proteína NS5 e esta interação pode facilitar a localização do complexo replicase viral para as membranas do RE onde a replicação do genoma ocorre (Murthy *et al.*, 1999).

As proteínas NS4a e NS4b são pequenas como as NS2a e 2b e pouco conservadas entre os *Flavivirus*. Tais proteínas são pouco caracterizadas e suas funções no ciclo de replicação viral ainda não estão esclarecidas. A proteína NS4a (aproximadamente 16 kDa) se associa com a membrana via regiões hidrofóbicas, constituindo o complexo de replicação viral e sugere-se que durante o processamento, a porção carboxi-terminal da NS4a atua como seqüência sinal para a movimentação da proteína NS4b (aproximadamente 28 kDa) no lúmen do RE (Miller *et al.*, 2007).

A NS5 é considerada a maior proteína viral (104 kDa) e contém 3 domínios que apresentam atividades enzimáticas que são cruciais para o ciclo replicativo viral. O domínio amino-terminal, tem sido identificado como atividade de RNA metiltransferase (MTase), baseada em similaridades com metiltransferases de diversas espécies (posição 1-296 aa). Esta porção está envolvida no capeamento

do genoma de RNA viral (Miller *et al.*, 2007). A porção carboxi-terminal, localizada a partir do resíduo 455 até o final da seqüência, devido à existência de 8 motivos de seqüências altamente conservadas reconhecida por diversas RNA-polimerase-RNA-dependente (RdRp) é considerada a RNA polimerase viral (Forwood *et al.*, 1999). Entre estas regiões, especula-se que um domínio central (320-405 aa) interaja com o núcleo da célula hospedeira, porém sem função determinada até o momento. De forma interessante, um segmento de 20 resíduos de aa altamente conservados entre os *Flavivirus* tem sido identificado nesta região, cuja associação com a proteína NS3 (posição 303-618 aa) exerce papel na modulação das atividades enzimáticas virais (Brooks *et al.*, 2002).

#### 1.4. REPLICAÇÃO VIRAL

A fêmea do mosquito vetor infectada ao picar o indivíduo sadio inocula os DENV nos vasos sanguíneos e, possivelmente, na derme e epiderme. Por este motivo, as células de Langerhans, que são localizadas no epitélio, foram consideradas células-alvo para a infecção viral, além dos monócitos, macrófagos, células NK, linfócitos B e T, hepatócitos e células endoteliais (Figura 6 - Kurane *et al.*, 1990; Gordon, 1998; Diamond *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Moreno-Altamirano *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003; Navarro-Sanchez *et al.*, 2005; Suksanpaisan *et al.*, 2007).

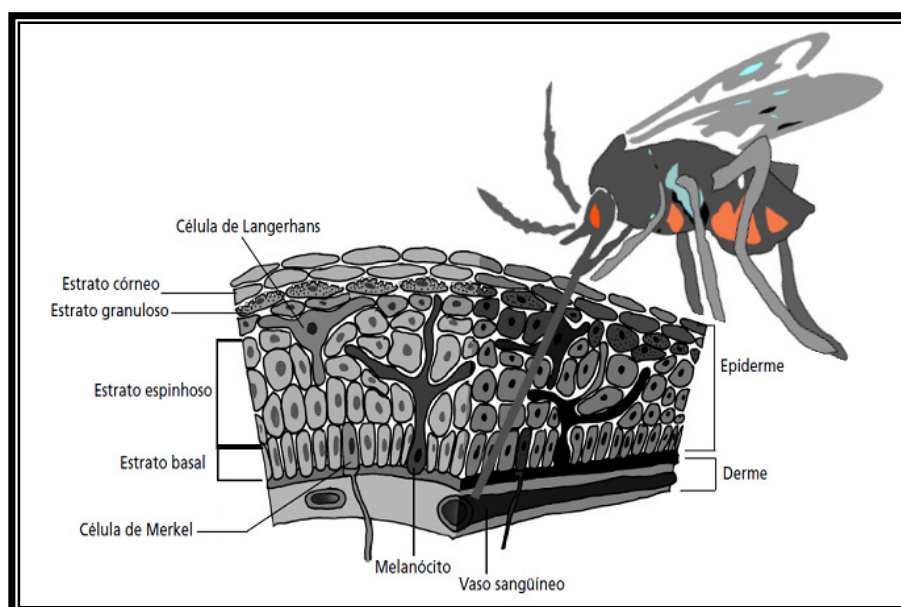


Figura 6: Figura esquemática de inoculação do vírus dengue pelo mosquito vetor no sistema tegumentar do hospedeiro (adaptado de Navarro-Sanchez *et al.*, 2005)



A entrada dos vírus ocorre por fagocitose ou endocitose, através da ligação de alta afinidade e especificidade da proteína E com receptores existentes na membrana plasmática (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005; Van der Schaar *et al.*, 2009).

Devido à grande quantidade de hospedeiros, os *Flavivirus* se ligam a receptores ubíquos na superfície das moléculas ou utilizam múltiplos receptores para mediar sua internalização nas células hospedeiras, como o sulfato de heparana, expressos em muitos tipos celulares, ICAM-3, expressos em células dendríticas imaturas, integrinas  $\alpha\beta 3$  presentes em células de mamíferos e, mais recentemente, receptor de manose, descritos em macrófagos (Liu *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008; van der Schaar *et al.*, 2009).

Ao penetrar nas células, os vírus se encontram em vesículas pré-lisossomais, que por apresentarem baixo pH, proporcionam uma mudança conformacional irreversível na proteína de envelope do vírus, de dímero para trímero, favorecendo a fusão do envelope do vírus à membrana endossomal da célula do hospedeiro resultando na liberação do RNA genômico no citoplasma da célula. O RNA, de polaridade positiva, é infeccioso e se comporta como RNA mensageiro, dando início a tradução da poliproteína que ocorre no retículo endoplasmático rugoso, próximo à membrana nuclear (Henchal *et al.*, 1987).

A montagem do vírion se dá inicialmente como partículas imaturas contendo a proteína prM associada não covalentemente a proteína E em um complexo heterodimérico (Navarro-Sánchez *et al.*, 2005). A proteólise do prM leva a formação de homodímeros da proteína E e M na partícula viral, e os vírus assim formados acumulam-se em vesículas exocíticas, que se abrem posteriormente na membrana plasmática da célula, liberando as partículas virais (Figura 7 - Chambers *et al.*, 1990).

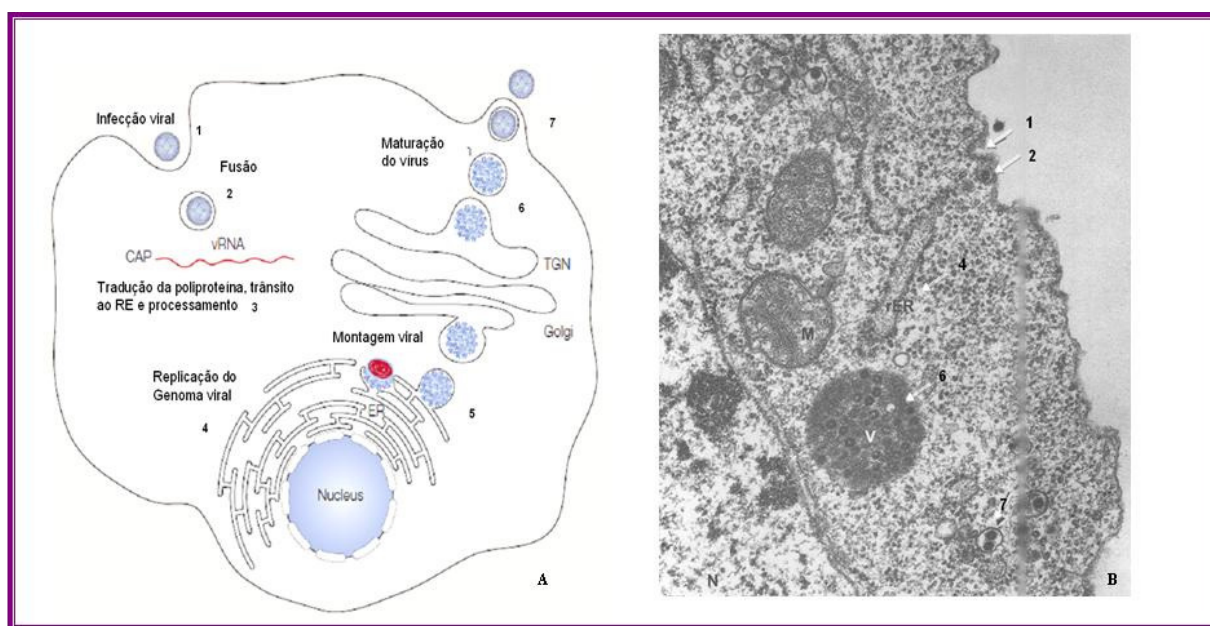


Figura 7: Diagrama esquemático da replicação dos DENV (A) e microscopia eletrônica explicitando o mecanismo de replicação dos vírus dengue nas células do hospedeiro (B): 1. Endocitose; 2. Endossoma; 3. RNA viral no citoplasma; 4. Tradução e síntese de proteínas virais específicas no retículo endoplasmático; 5. Montagem do vírus; 6. Maturação viral; 7. Exocitose (Adaptado de Barth, 2000 e Mukhopadhyay *et al.*, 2005)

### 1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O período de incubação da doença, que varia de 3 a 14 dias, é caracterizado pela replicação viral em células alvo do hospedeiro, com conseqüente disseminação viral por todo o organismo (Figueiredo, 1999; Vaughn, 2005).

Um amplo espectro clínico é observado durante as infecções por dengue, que variam desde casos assintomáticos às formas graves, como o dengue hemorrágico e a síndrome do choque por dengue (DH/SCD) – Figura 8.

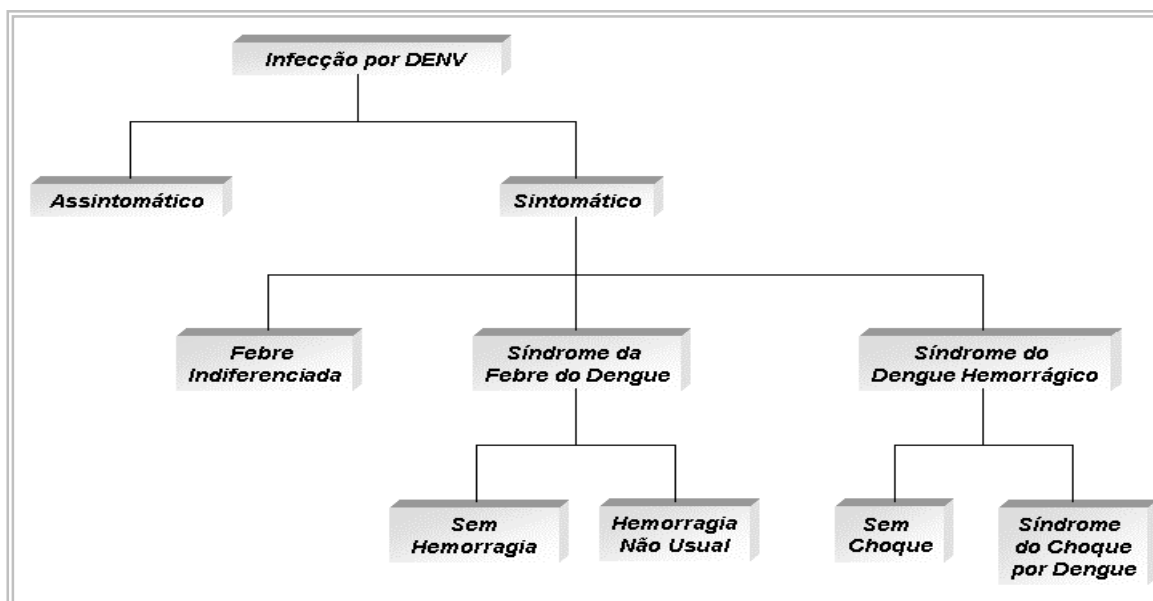


Figura 8: Fluxograma das manifestações clínicas do dengue (Adaptado de Deen *et al.*, 2006)

A infecção por dengue pode ser assintomática ou acompanhada por um estado febril inespecífico de curta duração, com faringite, rinite e/ou tosse branda. Apesar de menos freqüentes (variam de 29-56%), tais sintomas dificultam o diagnóstico exclusivamente em bases clínicas (Gibbons & Vaughn, 2002).

A forma branda da doença, conhecida como dengue clássico (ou febre do dengue), é caracterizada por febre de início súbito, dor retro-orbitária, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração, podendo ocorrer inclusive alterações gastrointestinais (náuseas e vômitos) e linfadenopatias (WHO, 1997; Rigau-Pèrez *et al.*, 1998).

A febre persiste, em média, por cinco a sete dias e, paralelamente à diminuição da febre pode aparecer exantema maculopapular ou morbiliforme, nas primeiras 24 horas do período febril ou no período de defervescência. Em 5 a 30% dos casos podem ocorrer manifestações hemorrágicas, tornando importante a diferenciação desses casos de dengue clássico com complicações hemorrágicas dos casos classificados como DH (Coffey *et al.*, 2009).

Os sinais de alerta para o agravamento do quadro costumam ocorrer na fase de remissão da febre e se caracterizam por dores abdominais fortes e contínuas; vômitos persistentes; hipotensão postural; diferença entre as pressões máxima e mínima menor do que 20 mmHg; fígado e baço dolorosos; vômitos hemorrágicos ou presença de sangue nas fezes (melena); extremidades das mãos e dos pés frias e

azuladas; pulso rápido e fino; agitação e/ou letargia; diminuição do volume urinário; diminuição súbita da temperatura do corpo; desconforto respiratório (SVS/MS, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, quatro graus de severidade da doença foram definidos para as formas graves do dengue. Os Graus I e II são considerados quadros de DH, enquanto que os Graus III e IV constituem o estágio de choque da doença (WHO, 1997).

Os sintomas do DH/SCD se mostram semelhantes aos do dengue clássico em fase inicial da doença (WHO, 1997). Fenômenos hemorrágicos podem ser verificados através da positividade da prova do laço, hematomas, petéquias, epistaxes e gengivorragias. Hepatomegalia dolorosa, de tamanho variável, pode surgir no início da fase febril. O aumento da permeabilidade vascular resulta na perda do volume de fluido intravascular, com conseqüente queda da contagem de plaquetas ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ), aumento em 20% do hematócrito e hipotensão (Mc-Bride *et al.*, 2000).

Em alguns casos, o estado do paciente pode se agravar repentinamente, evoluindo para a síndrome do choque por dengue (SCD), que é resultante de uma perda crítica do plasma e se caracteriza quando surgem sinais de insuficiência circulatória, tais como: pele fria e congestionada, inquietação e baixa pressão do pulso ( $< 20 \text{ mm Hg}$ ) (WHO, 1997). O paciente pode recuperar-se rapidamente após terapia antichoque apropriada. No entanto, o choque não-tratado adequadamente pode evoluir com acidose metabólica e graves sangramentos gastrintestinais e em outros órgãos, e o paciente pode evoluir para o óbito em 12 a 24 horas. Geralmente, a convalescença dos pacientes com DH, com ou sem choque, é de curta duração e sem maiores problemas (WHO, 1997).

O envolvimento de alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a  $50.000/\text{mm}^3$ ; derrames cavitários e leucometria global igual ou inferior a  $1.000 \text{ mm}^3$  em sintomas de dengue e DH/SCD, se tornaram mais evidentes nos últimos anos, porém não se enquadram na classificação definida pela OMS. Tais sintomas fazem parte do quadro de dengue com complicações (DCC), definido pelo Ministério da Saúde/BR, que inclui também as manifestações clínicas menos freqüentes, como as neurológicas e psíquicas, paresias, paralisias e encefalite (Miagostovich *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997; Thisyakorn *et al.*, 1999; Angibaud *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2002b; Soares *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2007; Chen & Lee, 2007; SVS/MS, 2008).

Em 2006, um programa da Organização Mundial da Saúde para a pesquisa e treinamento em doenças tropicais (TDR), em parceria com diferentes Instituições da Europa e países de doenças endêmicas (DEC), iniciou o projeto “Dengue Control” (DENCO), a fim de re-avaliar a classificação e manejo dos casos de dengue. Os primeiros resultados devem ser divulgados em 2010 e apresentam como propósito o estabelecimento de uma classificação clínica mais fácil do dengue para o diagnóstico precoce, triagem e o manejo do paciente (SVS/MS, 2008).

## 1.6. RESPOSTA IMUNE

O início do desaparecimento dos sintomas em indivíduos com dengue coincide com uma vigorosa resposta imune. Tal resposta influencia na replicação viral, e conseqüentemente, na severidade da doença (Monath, 1986).

Tanto em infecções do tipo primária quanto seqüencial pelos DENV, anticorpos contra as proteínas E e NS1 são as mais freqüentemente detectadas (Young *et al.*, 2000; Alcon *et al.*, 2002, Libraty *et al.*, 2002).

Alguns autores tem reportado uma significativa resposta de anticorpos anti-NS3 e anti-NS5 em casos primários e secundários de dengue, sendo mais proeminente nestes últimos (Valdés *et al.*, 2000). Anticorpos anti-C, prM/M e NS4a são menos prevalentes em soros de pacientes, mas podem ser identificados, principalmente em soros de pacientes com infecção seqüencial por dengue (Churdboonchart *et al.*, 1991; Se-Thoe *et al.*, 1999; Valdes *et al.*, 2000, Cardoso *et al.*, 2002; Vásquez *et al.*, 2002).

Apesar do aparecimento e da persistência dos anticorpos variar consideravelmente entre os pacientes, as infecções pelos DENV induzem a produção de anticorpos da classe M (IgM), que são transitórios e indicativos de infecção recente, apesar de poderem persistir no organismo por até 90 dias após o início dos sintomas. Outro anticorpo também muito observado é o da classe G (IgG), que persiste por toda a vida do hospedeiro e é um excelente marcador de infecções seqüenciais, desde que altos níveis sejam detectados no organismo (Nogueira *et al.*, 1992; Sang *et al.*, 1998; Miagostovich *et al.*, 2001; WHO, 2009).

A presença de outros marcadores sorológicos, como os da classe A (IgA) e E (IgE) em soros de pacientes também têm sido observadas, porém pouco se sabe a respeito da resposta imunológica envolvendo estes anticorpos (Talarmin *et al.*, 1998; Groen *et al.*, 1999; Koraka *et al.*, 2001; Vasquez *et al.*, 2004).

A resposta imune celular ocorre sob estímulo principalmente das proteínas E, NS1 e NS3 (Chambers *et al.*, 1990; Kurane *et al.*, 1992). Os linfócitos T participam ativamente na resposta imune, reduzindo o número de células infectadas com o vírus conferindo proteção contra reinfecção (Monath & Heinz, 1996; Libraty *et al.*, 2002). Os linfócitos T auxiliares atuam na presença das células infectadas com dengue que expressam receptores de antígenos leucocitários humanos (HLA) tipo II, produzindo interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos, enquanto que os linfócitos T citotóxicos provocam a lise diretamente das células infectadas pelos DENV, que expressam receptores HLA tipo I (Monath, 1994).

Em infecções primárias, os DENV levam a produção de linfócitos T de memória (Mathew *et al.*, 1999). Entretanto, quando o indivíduo adquire infecção seqüencial, ocorre a ativação cruzada destes linfócitos, que pode amplificar a reação ao facilitar a penetração do sorotipo infectante em macrófagos. Nestes casos, a chance do indivíduo desenvolver as formas mais graves da doença é 100x maior (Rothman, 2010).

### **1.7. PATOGÊNESE DAS INFECÇÕES PELOS DENV**

Os fatores que contribuem para o aparecimento das formas graves da doença não são completamente compreendidos. Desta forma, nas últimas décadas, inúmeras hipóteses foram sugeridas com a tentativa de associar diferentes fatores de risco à gravidade da doença. Embora nenhuma hipótese seja excludente, a mais aceita é a da facilitação da resposta dependente de anticorpos (ADE), que preconiza uma associação entre re-infecções e o aparecimento de DH/SCD (Halstead, 1988; Thein *et al.*, 1997; McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000; Vaughn *et al.*, 2000).

Guzman & Kouri (2003) documentaram que a seqüência de epidemias causadas por sorotipos distintos foram associadas com casos de DH, como foi o caso de infecção por DENV-3 seguida por DENV-2 em El Salvador (2000); DENV-1 seguida por DENV-2 em Cuba (1981) e DENV-1 seguida por DENV-2 (1990) e DENV-2 seguida por DENV-3 no Brasil (2001).

A variação da virulência das cepas virais tem sido sugerida como um fator para o aparecimento de formas mais graves da doença. Esta hipótese tem sido suportada há décadas e tem sido demonstrada pela introdução de novas variantes genotípicas (principalmente de DENV-2 e DENV-3), resultando em grandes

epidemias de DH/SCD (Pinheiro & Corber, 1997; Rico-Hesse *et al.*, 1997; Leitmeyer *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Miagostovich *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009).

Fatores de risco individuais, epidemiológicos e virais também têm sido considerados na patogenia do dengue. A hipótese integral, proposta por Kouri e colaboradores (1987), sugere que a interação entre estes grupos de fatores promoveria condições para o aparecimento das formas mais graves da doença – Figura 9.

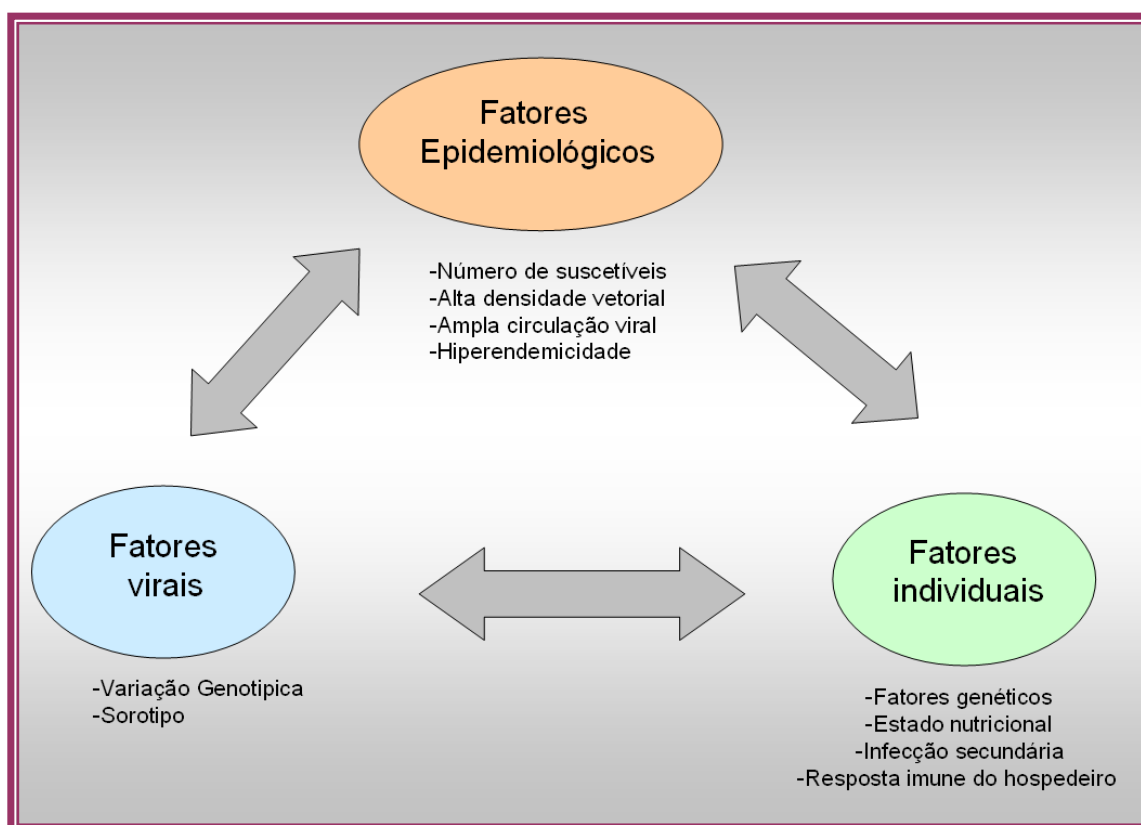


Figura 9: Interação entre fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves do dengue – Hipótese integral (adaptado de Guzmán & Kouri, 2002)

### 1.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial das infecções pelos DENV é realizado através do isolamento viral e/ou detecção do ácido nucleico viral; pela detecção de antígenos virais em tecidos, de técnicas sorológicas para demonstração de anticorpos específicos (IgM/ IgG) e captura de antígeno viral.

Para a detecção viral, o isolamento viral em cultura de células tem sido considerado o “padrão ouro”, embora esta metodologia tenha sido gradualmente

substituída por técnicas de biologia molecular. Este fato é principalmente devido ao tempo necessário para a detecção, além da necessidade da realização do teste de imunofluorescência, seja para a detecção viral, já que nem todos os DENV produzem efeito citopático (ECP) em cultura de células, ou para a identificação do sorotipo viral, através da utilização de anticorpos monoclonais tipo-específico (Gubler *et al.*, 1984).

Nas últimas décadas, diversas metodologias de biologia molecular vêm sendo utilizadas para o diagnóstico do DENV (Shu & Huang, 2004). Estas metodologias detectam, caracterizam e muitas vezes quantificam o sorotipo infectante e podem confirmar um diagnóstico em situações em que o material disponível não é adequado para o isolamento viral (Morita *et al.*, 1991; Lanciotti *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1998).

A metodologia de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) é considerada uma metodologia rápida, podendo ser usada para detecção e caracterização do genoma em amostras clínicas humanas, biópsias ou tecidos de autópsia (Deubel *et al.*, 1992; Lanciotti *et al.*, 1992; Shu & Huang, 2004). A metodologia de PCR em tempo real tem sido aplicada com sucesso na detecção dos DENV em amostras agudas. É considerada uma metodologia rápida, sensível, com baixo nível de contaminação, já que a mesma é automatizada, e permite a quantificação dos resultados obtidos (Callahan *et al.*, 2001; Drosten *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2006).

A detecção de antígenos virais pode ser realizada por meio de métodos imunohistoquímicos em casos com evolução fatal, através de amostras de tecidos fixados em formalina, permitindo, desta forma, o estudo de blocos arquivados por longos períodos (Hall *et al.*, 1991; Miagostovich *et al.*, 1997).

Várias técnicas sorológicas têm sido descritas para o diagnóstico da infecção por dengue, das quais o ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) tem se mostrado extremamente útil, tanto para o diagnóstico individual de dengue como para estudos epidemiológicos (Kuno *et al.*, 1987; Lam *et al.*, 1987). Ensaio imunoenzimáticos de detecção de anticorpos da classe IgG (G-ELISA) (Chungue *et al.*, 1989; Miagostovich *et al.*, 1999) vêm sendo cada vez mais utilizados para a caracterização da resposta imune de dengue, servindo como uma alternativa ao teste de inibição da hemaglutinação (IH) descrita por Clarke & Casals (1958).



A utilização de testes rápidos para o diagnóstico de dengue tem demonstrado útil para o diagnóstico de infecções por dengue, devido a rapidez e facilidade de execução, podendo ser utilizado em lugares em que a rotina laboratorial é inadequada e sem a utilização de equipamentos sofisticados (Cuzzubo *et al.*, 2001; McBride *et al.*, 2009). Nos últimos anos, diversos testes comerciais tornaram-se disponíveis para o diagnóstico de dengue, tanto para a detecção de anticorpos IgM e/ou IgG, como para a caracterização da resposta imune (se primária ou seqüencial) e mais recentemente, para a captura de proteína viral em soros ou plasma (Kuno *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Cuzzubo *et al.*, 2001; Blacksell, 2005; Videira *et al.*, 2005; Dussart *et al.*, 2006; Kumarasamy *et al.*, 2007; Lapphra *et al.*, 2008; McBride, 2009; Zainah *et al.*, 2009).

### **1.9. PREVENÇÃO E CONTROLE**

O desenvolvimento de vacinas anti-DENV iniciou-se na década de 40 e, apesar de inúmeros estudos e de ser considerada prioridade pela Organização Mundial de Saúde, ainda não está disponível uma vacina preventiva eficaz (Sabin & Schlesinger, 1945; WHO, 2002; Innis *et al.*, 2003).

A dificuldade na obtenção de uma vacina contra os DENV se deve a necessidade da vacina imunizar contra os quatro sorotipos virais com alta eficiência, já que a infecção por um sorotipo de dengue induz imunidade homóloga, além da inexistência de um modelo animal capaz de reproduzir as formas clínicas da infecção (WHO, 2002).

Atualmente, diferentes estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas para dengue, sendo quatro destas voltadas para a produção de vacinas quiméricas, através da inserção de genes prM e E de DENV em vírus atenuados e os outros dois voltados para a obtenção de vacinas atenuadas, através de passagens em cultura de células não-humanas (Bricks, 2004; Blaney Jr *et al.*, 2006; Girard, 2009). Destas, a estratégia empregando vírus vivo atenuado através de passagens em culturas de células é a que se encontra em fase II, que comparada com as outras estratégias, é considerada a mais adiantada (Edelman *et al.*, 2003; WHO, 2009).

Enquanto uma vacina eficaz não está disponível, as medidas de controle ao vetor consistem no principal instrumento para a prevenção da infecção pelos DENV,

além da melhoria dos serviços de saneamento básico e a rápida identificação dos pacientes que apresentem formas clínicas graves da doença (Funasa, 2002a).

Em 2002, diante da tendência de incremento da incidência e do elevado risco de aumento dos casos de DH, a Fundação Nacional de Saúde instituiu o Programa Nacional de Combate a dengue (PNCD) visando, entre outros fatores, a elaboração de programas permanentes para o combate ao mosquito vetor (Funasa, 2002b). Assim, durante aquele ano, foi criado o dia nacional de mobilização contra o dengue (Dia D) cujo objetivo principal foi fazer com que a população incorporasse em seu dia-a-dia os hábitos necessários para eliminar os criadouros do mosquito vetor e desde então, vem ocorrendo anualmente no mês de novembro (Coelho, 2008).

#### **1.10. DO GENOMA AO IMUNOMA**

Vencida a etapa do seqüenciamento genômico e, conseqüentemente o conhecimento da seqüência completa dos genes, a ciência começou nova e desafiadora escalada, que incluiu etapas fundamentais a serem cumpridas para que das ciências genômicas se extraíam todos os avanços diagnósticos, preventivos e terapêuticos esperados (Braga-neto & Marques-Júnior, 2006). A proteômica, peptidômica e a imunômica são alguns dos novos ramos científicos pós-genômicos que os grandes centros de pesquisa do mundo e as empresas mais avançadas de biotecnologia começam a construir (Willians & Hochstrasser, 1997; Soloviev, 2007; 2010).

A proteômica complementa a genômica e se propõe a analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido num dado momento, sendo conhecido como proteoma. Visto que o mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes proteomas em resposta à ação de drogas, infecção por patógenos, poluição e diferentes tipos de estresses abióticos, o proteoma visa o estudo da estrutura, função e o controle dos sistemas biológicos pela análise de várias propriedades das proteínas (Willians & Hochstrasser, 1997; Wilkins *et al.*, 1997).

A peptidômica surgiu como complemento da proteômica, permitindo a análise sistemática do conteúdo peptídico em uma célula, organela, tecido ou organismo e desta surgiu a imunômica, que compreende o campo de investigação relacionado à interface existente entre o sistema imune do hospedeiro e as proteínas/peptídeos derivados de patógenos ou de si mesmo (Soloviev, 2010).

A imunômica tem representado uma ligação entre a informática, genômica, proteômica, peptidômica, imunologia e medicina clínica e inúmeras metodologias tem sido desenvolvidas nas últimas décadas com o intuito de identificar regiões imunogênicas capazes de desencadear a resposta humoral (Soloviev & Finch, 2005; Soloviev *et al.*, 2007). Tais regiões podem ser classificadas como consecutivas, que são aquelas formadas por resíduos dispostos seqüencialmente de maneira linear ou não consecutivas, que são formadas por resíduos distantes entre si em sua estrutura primária, porém se aproximam linearmente em sua estrutura tridimensional (Korber *et al.*, 2006).

Em 1990, a técnica de síntese paralela de peptídeos em membranas de celulose (do inglês *Spot synthesis*) foi apresentada por Frank e colaboradores à comunidade científica, oferecendo a oportunidade de sintetizar e realizar a triagem de um grande número de peptídeos sintéticos de forma simultânea (Frank, 1992). Com a introdução de um equipamento semi-automatizado (Frank, 1996), esta técnica combinou a vantagem de um procedimento experimental fácil e confiável a flexibilidade fornecida através de sua adaptação a diferentes métodos de revelação e baixo custo.

Dentre as diferentes aplicações da metodologia de síntese paralela de peptídeos em membrana destaca-se o mapeamento de epitopos consecutivos, cujo principio consiste em dispensar gotas de aminoácidos em uma superfície planar de uma membrana porosa (Reineke *et al.*, 2001; Laune *et al.*, 2002; Chávez-Olórtegui *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2002; Machado de Ávila, 2004; Mendes *et al.*, 2004). De acordo com a capacidade de absorção da membrana e o volume das gotas dispensadas, diferentes compartimentos de reação química individual são formados, de modo que cada gota seja correlacionada com uma escala particular de síntese previamente definida (Figura 10a - Frank *et al.*, 1996; Gausepohl & Behn, 2002).

A síntese ocorre através de ciclos que se repetem até que todos os resíduos que compõem a seqüência de peptídeos sejam adicionados. Cada resíduo corresponde a um ciclo e é constituído pela desproteção do grupamento amino protetor do resíduo previamente acoplado à membrana seguido pelo acoplamento do novo resíduo (ativado em seu grupamento carboxi-terminal) à seqüência peptídica (Figura 10b - Frank, 2002).

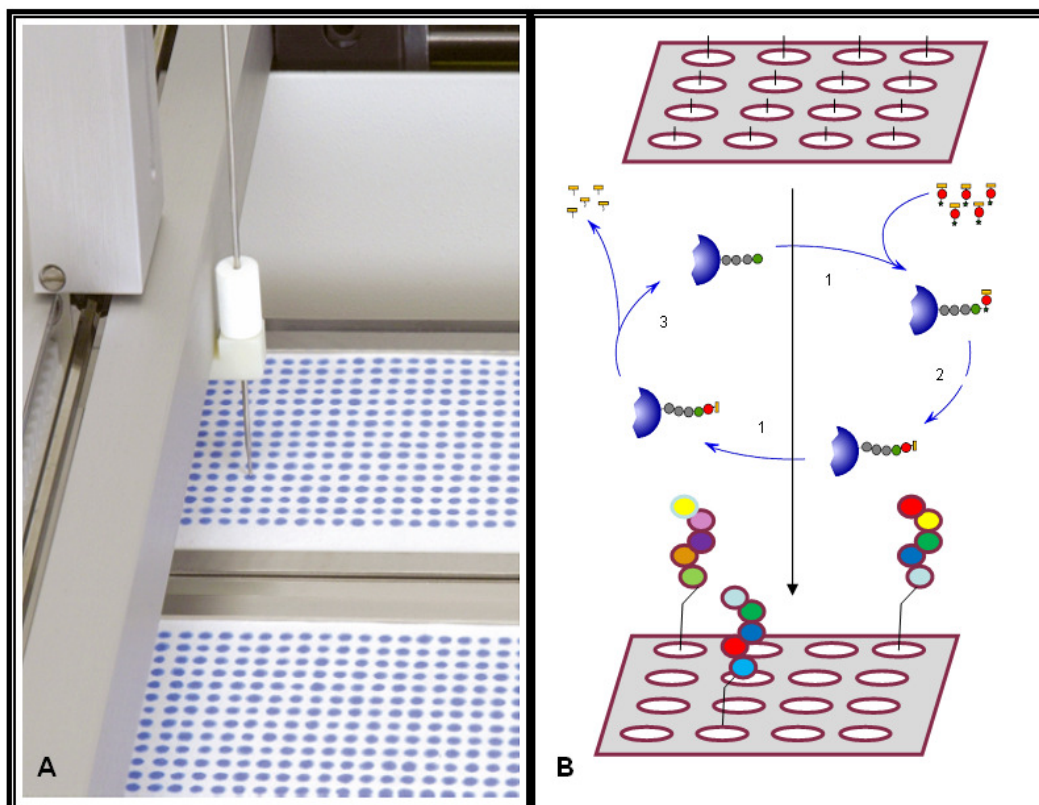


Figura 10: Princípio da síntese paralela de peptídeos em membrana. A: Inserção de resíduos em membrana de celulose formando gotas regulares. B: Figura esquemática da síntese de peptídeos, envolvendo ciclos sucessivos de lavagem (1), acoplamento (2) e desproteção (3) de cada resíduo (círculos coloridos) à sequência de peptídeos nascente (Adaptado de Frank, 1996; 2002).

A identificação de epítomos consecutivos responsáveis por desencadear a resposta imune humoral constitui uma importante ferramenta na caracterização da especificidade de anticorpos, especialmente para utilização em estratégias terapêuticas, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas e atuar como ferramentas de diagnóstico para inúmeras doenças (Reineke *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A dificuldade na compreensão da patogenia do dengue, principalmente devido à ausência de um modelo animal capaz de reproduzir clinicamente a infecção, associadas às limitadas opções para a prevenção e controle das epidemias, tornaram imprescindíveis à disponibilidade de metodologias de diagnóstico rápido para a identificação da doença, já que até o momento, ainda não está disponível uma vacina eficaz nem foi descrita uma terapia efetiva antiviral (WHO, 2002; Crance *et al.*, 2003).

Enquanto a resposta celular apresenta importante papel na resposta imune causada pelos DENV, a resposta humoral é considerada um fator crítico para a imunidade protetora (Pang, 2003; Halstead *et al.*, 2005; Hombach *et al.*, 2007). Desta forma, a identificação de determinantes antigênicos de proteínas responsáveis pela ativação da imunidade humoral constitui a chave do conhecimento da imunogenicidade de cada proteína viral. Neste contexto, estas informações podem servir como base para o desenvolvimento de testes de diagnóstico, além de fornecer subsídios para o planejamento de futuras vacinas (Nelson, 2000).

Avanços na tecnologia de peptídeos têm permitido a identificação de epítomos em proteínas nativas através do estudo de peptídeos sintéticos (Machado *et al.*, 2004; AnandaRao *et al.*, 2005). Apesar das proteínas E e NS1 terem sido descritas como as mais imunogênicas dos DENV, pouco se sabe a respeito da antigenicidade das demais. Epítomos imunogênicos destas proteínas têm sido identificados, utilizando diferentes metodologias, e a maioria são descritas como não consecutivos, embora epítomos consecutivos sejam capazes de induzir resposta por anticorpos neutralizantes (Roehrig *et al.*, 1990; Jianmin *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2002).

Em nossa proposta tivemos como objetivo aprofundar o conhecimento da imunologia molecular dos DENV, através da identificação dos determinantes antigênicos de todas as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 responsáveis pelo desencadeamento da imunidade humoral, através da metodologia de síntese paralela de peptídeos em membranas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Mapear e caracterizar epitopos de proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar, computacionalmente, possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, a partir de amostras Brasileiras previamente caracterizadas pelo seqüenciamento do genoma viral, disponíveis no GenBank
- Padronizar metodologias para a síntese de peptídeos em microescala (síntese paralela de peptídeos e “immunoblotting”)
  - Identificar peptídeos imunogênicos consecutivos de todas as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da síntese paralela de peptídeos em membranas
- Construir modelos tridimensionais através da modelagem por homologia para a caracterização dos epitopos identificados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3**

#### **4.1.1. SELEÇÃO DE SEQÜÊNCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS DOS DENV**

As seqüências completas das proteínas estruturais e não-estruturais utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de seqüências nucleotídicas brasileiras depositadas no banco de dados GenBank no National Center for Biotechnology Information, USA, disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>, sob códigos AA020974 (DENV-1), AAL96681 (DENV-2) e AAT79552 (DENV-3).

#### **4.1.2. ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQÜÊNCIAS DE PROTEÍNAS**

O alinhamento múltiplo das proteínas dos DENV para a seleção de regiões comuns e específicas dos 3 sorotipos virais foi realizado utilizando o algoritmo clustalW2 do programa Biological sequence alignment editor for windows 95/98/NT/2K/XP (BioEdit) versão 7.0.9.0., disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>.

#### **4.1.3. DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS**

A determinação de possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos anti-DENV foi realizada através da correlação de 3 índices de propensão a antigenicidade: escalas de Jameson & Wolf, Kolaskar & Tongaonkar e Bepipred.

A escala de Jameson & Wolf (Jameson & Wolf, 1986) determina a propensão à antigenicidade de uma proteína através da associação de diferentes parâmetros físico-químicos como a hidrofiliicidade, acessibilidade, a flexibilidade da cadeia e os elementos da estrutura secundária presentes (Figura 11 - Chou & Fasman, 1974; Kate & Doolittle, 1982; Emini *et al*, 1985; Karplus & Schultz, 1985).

$$A_i = \sum 0,3 H + 0,15 S + 0,15 F + 0,2 (CF) + 0,2 (GOR)$$

H: hidrofiliçidade (Kyte & Doolittle)  
F: flexibilidade (Karplus & Schultz)  
S: acessibilidade (Emini)  
CF: estrutura secundária (Chou & Fasman)  
GOR: estrutura secundária (Garnier, Osgusthorpe & Robson)

Figura 11: Fórmula matemática utilizada pelo parâmetro de Jameson & Wolf para a determinação de regiões com propensão à antigenicidade (Jameson & Wolf, 1986)

A utilização do programa computacional DNASTAR Lasergene versão Windows (DNASTAR Inc., Madison, WI, US) permitiu a determinação de possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos através do índice de antigenicidade (Jameson & Wolf), além de parâmetros físico químicos, como a acessibilidade ao solvente (escala de Emini), hidrofiliçidade (escala de Kate & Doolittle), flexibilidade (escala de Karplus & Schultz) e elementos de estrutura secundária (escala de Chou & Fasman).

A escala de Emini (Emini *et al*, 1985) é utilizada para a determinação da acessibilidade. Baseado em proteínas de estrutura tridimensional conhecidas, esta escala prediz que os resíduos acessíveis devem ser aqueles com uma superfície solvatada pela água maior que 20Å.

A escala de Kate & Doolittle (Kate & Doolittle, 1982) baseia-se em escalas de solubilidade determinadas em cada resíduo para a predição de regiões de reconhecimento por anticorpos. Valores positivos determinam maior propensão do resíduo em apresentar características polares, enquanto que valores negativos tendenciam caráter apolares, e variam de +3,0 a -3,4, respectivamente.

A escala de Karplus & Schultz (Karplus & Schultz, 1985) determina valores de flexibilidade de um resíduo, que é dependente tanto de sua característica intrínseca quanto os resíduos localizados na cadeia lateral.

A escala de Chou & Fasman (Chou & Fasman, 1974) determina valores de propensão do resíduo em gerar uma estrutura secundária (alfa hélice, beta pregueada ou alça) em um ambiente tridimensional.

Através do programa de computação Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) - [http://tools.immune epitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immune epitope.org/tools/bcell/iedb_input), a predição de regiões de reconhecimento por anticorpos baseada em parâmetros de antigenicidade foi determinada pelas escalas de Kolaskar & Tongaonkar e bepipred.



A escala de Kolaskar & Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990) determina o índice de antigenicidade baseado na solubilidade do resíduo e na frequência de ocorrência em segmentos de epítomos previamente conhecidos (Figura 12).

$$A_p = f_{ag} / f_s$$

*A<sub>p</sub>* : Propensão a antigenicidade  
*f<sub>ag</sub>* : frequência da ocorrência do aminoácidos em epítomos.  
*f<sub>s</sub>* : frequência da ocorrência do aminoácido na superfície da proteína. Essa frequência é determinada utilizando-se os valores de solubilidade (Parker e Karplus) e acessibilidade (Emini).

Figura 12: Fórmula matemática utilizada pela escala de Kolaskar & Tongaonkar para a determinação de regiões com propensão à antigenicidade (Kolaskar & Tongaonkar, 1990)

A escala bepiped (Larsen *et al.*, 2006) utiliza o parametro Antijen, que é resultante da combinação do modelo de Markov (Larsen *et al.*, 2006) e a escala de propensidade (Parker *et al.*, 1986), estabelecendo uma correlação entre as estruturas primária e secundária de uma proteína.

#### 4.1.4. LOCALIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS

A localização dos peptídeos imunogênicos foi obtida pela construção de um modelo tridimensional da proteína através de modelagem por homologia (Nayeem, 2006; Santos Filho & Alencastro, 2003). Tal processo consistiu de quatro etapas principais: identificação de uma ou mais proteínas-molde; alinhamento entre as seqüências da proteína-alvo e da(s) proteína(s) de referência; construção do modelo e validação do modelo.

As proteínas-molde para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foram obtidas em banco de dados de estrutura de proteínas (PDB – disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/>) através de uma busca utilizando as opções-padrão do algoritmo BLASTP (Altschul *et al.*, 1997).

O alinhamento das proteínas foi obtido utilizando o algoritmo clustalW2 e a construção dos modelos tridimensionais foi obtida através do programa MODELLER – versão 9v4 (disponível em <http://salilab.org/modeller/>), cuja visualização foi realizada através do programa Swiss-PDB-Viewer versão 3.7 (disponível em <http://www.expasy.org/spdbv/>).

A avaliação da qualidade dos modelos obtidos foi realizada de acordo com a qualidade estereoquímica geral através do programa de análises estruturais e servidor de validação (SAVS - disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) utilizando os algoritmos Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) e Prove (Pontius *et al.*, 1996).

#### 4.2. SÍNTESE PARALELA DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS

A síntese paralela de peptídeos consecutivos foi realizada em membranas de celulose amino-funcionalizadas conjugadas ao espaçador polietilenoglicol (PEG), disponível comercialmente (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Koeln, Alemanha), através da estratégia 9-fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc), utilizando o sintetizador semi-automático AutoSpot modelo Abimed - ASP222 (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Koeln, Alemanha), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

A síntese iniciou-se pela ativação da membrana com piperidina em N, N-Dimetilformamida (DMF) (20% v/v), permitindo a exposição do grupamento N-terminal. O acoplamento dos aminoácidos ocorreu após a ativação com solução 0,5 mmol/ml de Hidroxibenzotriazol (HOBt) em 1-metil-2-pirrolidona (NMP), seguido da solução 1,1 mmol/ml de N,N, Diisopropylcarbodiimida (DIC) em NMP, que reagiu com o grupamento amino livre do aminoácido anterior, propiciando o alongamento da cadeia peptídica no sentido C-terminal ao N-terminal.

O plano de distribuição dos aminoácidos, assim como a determinação dos protocolos foram definidos e padronizados ao nosso sistema, de acordo com o programa de computação Multi pep versão Windows, de modo que cada aminoácido Fmoc com sua porção carboxi ativada foi adicionado ao *spot* correspondente.

Após lavagens manuais das membranas com solução de anidrido acético em DMF (2% v/v), o ciclo recomeça com a retirada do grupamento protetor Fmoc do aminoácido acoplado, com a utilização de solução de piperidina em DMF (20% v/v) e metanol. Este processo é monitorado pela utilização da solução de azul de bromofenol 0,001% (p/v) em DMF que colore os grupamentos amino livres.

No último ciclo, os grupamentos de proteção das cadeias laterais, assim como o Fmoc existente no último aminoácido foram removidos pelo tratamento com solução de ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano (DCM) e triisopropilsilano

(1:1:0,05 v/v). As membranas foram armazenadas a 4°C sob proteção da luz, por no máximo 3 dias.

Todas as matérias-primas utilizadas nesta metodologia foram da marca Fluka (Distribuidor Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, US).

#### **4.3. AMOSTRAS CLÍNICAS**

Para a avaliação da resposta anti-dengue a epítopos antigênicos, soros de 75 pacientes foram agrupados em diferentes painéis, de acordo com a prévia caracterização sorológica. Os soros pertencentes aos painéis 1 ao 4 foram provenientes da soroteca existente no laboratório de Flavivírus - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil) e obtidos no período de 1986 a 2005 de diferentes centros de saúde, hospitais da rede pública e clínicas particulares de todo o país. Os soros pertencentes ao painel 5 e 6 foram gentilmente cedidos por diferentes laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil).

**Painel 1:** soros de indivíduos (n = 10) negativos para todas as metodologias analisadas.

**Painel 2:** soros de indivíduos (n = 10) com DENV-1, cuja infecção foi previamente confirmada através do isolamento viral e/ou RT-PCR e pela soroconversão do anticorpo IgG.

**Painel 3:** soros de indivíduos (n = 10) com DENV- 2, cuja infecção foi confirmada laboratorialmente através do isolamento viral e/ou RT-PCR e pela soroconversão do anticorpo IgG.

**Painel 4:** soros de indivíduos (n = 10) com DENV- 3, cuja infecção foi confirmada laboratorialmente através do isolamento viral e/ou RT-PCR e pela soroconversão do anticorpo IgG.

**Painel 5:** soros de indivíduos que apresentaram sinais e sintomas similares a dengue, com infecção por sarampo (n = 5), rubéola (n = 5), leptospirose (n = 5), malária (n = 5) e varíola (n = 5), previamente confirmadas através de positividade em ensaios sorológicos.

**Painel 6:** Soros de indivíduos (n = 10) vacinados para febre amarela, com nível de anticorpo IgG anti-febre amarela igual ou superior a 1:160.

A autorização para a utilização de soros humanos nesta pesquisa foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/FIOCRUZ) através de parecer favorável número 306/06.

#### **4.3.1. CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS CLÍNICAS**

A caracterização laboratorial tanto das amostras negativas como positivas para dengue foi realizada no laboratório de Flavivirus, através do isolamento viral e técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para a detecção e identificação do sorotipo viral, pela metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para a detecção do ácido nucleico viral e através do ensaio imunoenzimático, que permite a demonstração de anticorpos IgG específicos no soro do paciente (G-ELISA). No caso de amostras oriundas de outras patologias, a caracterização sorológica foi realizada através do G-ELISA, utilizando kit comercial Panbio Diagnostico (Queensland, AUS).

##### **4.3.1.1. ISOLAMENTO VIRAL**

Como sistema para isolamento do vírus, foi utilizado culturas de células do mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978).

Resumidamente, as células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 2,0 ml de meio Leibovitz (L-15), com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB.

Os soros foram diluídos 1/10 em meio L-15, 0,1 ml foram inoculados na monocamada celular e foram incubados à temperatura de 28°C. As culturas foram observadas diariamente, por um período de até dez dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Germany), com aumento de até 800 vezes. Para cada grupo de soros inoculados, foram incluídos controles de vírus e de células.

#### 4.3.1.2. TÉCNICA DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

As culturas que não apresentaram ECP após o 10<sup>o</sup> dia de inoculação foram testadas com fluido hiperimune de camundongo para dengue para detecção dos DENV, sendo as reações negativas consideradas como isolamento negativo. As culturas que apresentaram reação positiva pela IFI para detecção ou pela observação de ECP característico (sincícios), foram processadas pela técnica de IFI para a tipagem viral, empregando-se, neste caso, anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler *et al.*, 1984), gentilmente cedidos pelo Dr. Gubler (CDC Colorado, US).

#### 4.3.1.3. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-PCR

O RNA viral foi extraído pelo método da sílica, de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990) ou utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., CA, US), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Para detecção e tipagem dos DENV foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (1992).

Durante a transcrição reversa e primeira etapa de amplificação, foram utilizados iniciadores consensuais de 511 pares de base (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as sequências dos genes C e prM. Na segunda etapa de amplificação (ou procedimento *semi-nested*), foram utilizados iniciadores com tamanhos específicos para amplificar cada um dos quatro sorotipos de dengue, denominados de TS1, TS2, TS3 e TS4, respectivamente (Quadro 1).

Quadro 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase para a tipagem dos vírus dengue

| <b>Oligonucleotídeo iniciador*</b><br>(Sentido do primer) | <b>Sequência</b>                       | <b>Posição No genoma</b> | <b>Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])</b> |
|---|--|--------------------------|--|
| <b>D1 (+)</b>   | 5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'    | 134-161                  | 511 (D1 + D2)                                      |
| <b>D2 (-)</b>   | 5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC- 3' | 616-644                  |  |
| <b>TS1 (-)</b>  | 5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'            | 568-586                  | 482 (D1 + TS1)                                     |
| <b>TS2 (-)</b>  | 5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'          | 232-252                  | 119 (D1 + TS2)                                     |
| <b>TS3 (-)</b>  | 5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'         | 400-421                  | 290 (D1 + TS3)                                     |
| <b>TS4 (-)</b>  | 5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'        | 506-527                  | 392 (D1 + TS4)                                     |

#### **4.3.1.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS IgG (G-ELISA) PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE PACIENTES COM DENGUE**

A metodologia utilizada foi descrita por Miagostovich *et al.* (1999). Resumidamente, microplacas de poliestireno de fundo chato Immulon II (Dynatec Labs., VA, US) foram sensibilizadas com fluído ascítico hiperimune, que é uma mistura contendo partes iguais de anticorpo anti-DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CDC, Atlanta, USA) diluído 1/5000 em tampão Carbonato/ Bicarbonato 0,1M pH 9,6. Após incubação de 2 a 8 °C por no mínimo 18 horas em câmara úmida e lavagem com PBS pH 7,4, os poços foram bloqueados adicionando-se diluente padrão. Após incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C, 0,075 ml de 32 UHA/0,05 ml de uma mistura de antígeno (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) diluída em diluente padrão, foram aplicadas a cada poço e as placas foram então incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Após lavagens com PBS pH 7,4, foram realizadas diluições seriadas na razão 4 até o último poço, transferindo e misturando 0,025 ml da amostra. Após incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C, seguida por lavagens com PBS pH 7,4 e com diluente padrão, 40 µl de anticorpo IgG anti-humano conjugado à peroxidase (Sigma), diluído em diluente para conjugado na proporção 1:4000, foram adicionados. Após incubação em câmara úmida por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS pH 7,4 e 0,1 ml de substrato, resultante da mistura com igual volume de sulfonato de 2,2'-azino-di(3-etil-bentiazolina) (ABTS) e peróxido de hidrogênio (Kirkegaard & Perry Labs., Gaithersburg, USA) foi adicionado a cada poço. Após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente sob proteção da luz, foi realizada a leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 405 nm (Microelisa Reader/ Biomedicals, Inc., Livermore, USA), sendo as amostras com densidade óptica que se apresentaram iguais ou acima de 0.15 consideradas positivas.

#### **4.3.1.5. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS IgG (G-ELISA) PARA A CARACTERIZAÇÃO DE SOROS DE PACIENTES COM OUTRAS PATOLOGIAS**

A metodologia foi realizada de acordo com instruções do fabricante (Panbio Diagnostico - Queensland, AUS). Em microplacas previamente sensibilizadas com antígeno de dengue tipos 1 a 4, foi adicionado 0,1 ml de soro de paciente diluído 1/10 em diluente de soro (tampão tris salina pH 7,2 a 7,6, contendo tween 20 e 0,1% de preservativo proclin) em cada um dos orifícios da microplaca. Após incubação por 30 minutos a 37 °C as placas foram lavadas por 6 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7.2-7.6 contendo Tween 20 e 0.1% de preservativo proclin) e em seguida, foi adicionado 0,1 ml de anticorpo anti-IgG humano conjugado a peroxidase em cada orifício. Seguindo a incubação por 30 minutos a 37 °C e lavagem por 6 vezes consecutivas com tampão de lavagem, as microplacas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) com 0,1ml de substrato (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine e peróxido de hidrogênio em tampão citrato-ácido cítrico pH 3.5-3.8). A adição de 0,1ml de solução de parada da reação após este período resultou na alteração da coloração azul em amarela, permitindo a leitura em densitômetro, com comprimento de onda de 450nm contendo filtro de referencia de 600-650nm. Soros controles positivos e negativos, assim como todos os reativos utilizados para a execução desta metodologia foram fornecidos juntamente com o kit.

#### 4.4. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE A POTENCIAIS EPÍTOPOS

A reatividade dos peptídeos obtidos na síntese paralela de peptídeos em membranas frente à mistura de pool de soros anti-dengue foi avaliada através de ensaios imunológicos de quimioluminescência, cuja metodologia foi estabelecida em nosso laboratório, a partir de informações descritas por Frank e Overwin (1996).

Resumidamente, as membranas foram rinsadas por duas vezes com etanol e bloqueadas com tampão diluente pH 7,0 (0,13 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,05 M Tris, 0,05% de Tween 20, 3% de leite em pó desnatado) por 18 horas em temperatura de 2 a 8 °C. Em seguida, foram incubadas sob agitação por 4 horas em temperatura ambiente com soros de pacientes e após 3 lavagens com tampão TBS-tween 20 0,05% pH 7,0 (0,13 M NaCl, 0,003 M NaCl, 0,05 M Tris), as membranas foram incubadas em temperatura ambiente sob agitação com anticorpo IgG anti-humano conjugado à fosfatase alcalina (Abcam, Cambridge, MA, US) diluído 1:5000 em tampão diluente. Após 2 lavagens com tampão TBS-tween 20 0,05% pH 7,0 e 2 lavagens com tampão Citrato (0,14 M NaCl, 0,003 M KCl, 0,05 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O), as membranas foram incubadas com substrato quimioluminescente CDP star (Applied Biosystems, CA, US), expostas a filmes de raio-X (Kodak, São Paulo, SP, BR) e reveladas utilizando revelador e fixador GBX (Kodak, São Paulo, SP, BR).

A intensidade da cor obtida foi verificada através do software TIGR Spotfinder versão 3.1.1 para windows XP (Boston, MA, US), de modo que o “spot” com sinal mais intenso da membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros valores foram expressos em porcentagem relativa de acordo com o software. Os spots com valores densitométricos superiores ou iguais a 20% de intensidade foram considerados positivos, enquanto que os spots com valores abaixo de 20% foram considerados negativos (Hujer *et al.*, 2004).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3

As sequências completas de aminoácidos dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 obtidas a partir de sequências nucleotídicas brasileiras foram submetidas a análise computacional e, através do programa BioEdit foi possível verificar que o grau de conservação entre os aminoácidos dos 3 sorotipos de dengue variou de 72 a 78% - Figura 13.

```
Sequence Identity Matrix (BioEdit Sequence Alignment editor)

                DENV-1      DENV-3      DENV-2
Seq->
AAO20974 (D1)      ID          0,780      0,718
AAT79552 (D3)      0,780      ID          0,721
AAL96681 (D2)      0,718      0,721      ID
```

Figura 13: Matriz de identidade entre as sequências de proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, obtida através do programa Bioedit (versão 7.0.4.1).

### 5.2. PREDIÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS

As Figuras 14 a 18 apresentam a disposição ilustrativa de todas as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV, de acordo com os elementos da estrutura secundária, acessibilidade e hidrofobicidade. Todos os resíduos positivos no eixo de valores (y) de cada parâmetro analisado são considerados uma possível região de reconhecimento por anticorpos.

Tais parâmetros puderam ser quantificados através do mesmo programa, e após correlação entre os resultados obtidos através de cada parâmetro, foi possível prever um total de 133, 118 e 119 epitopos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Anexo 1).

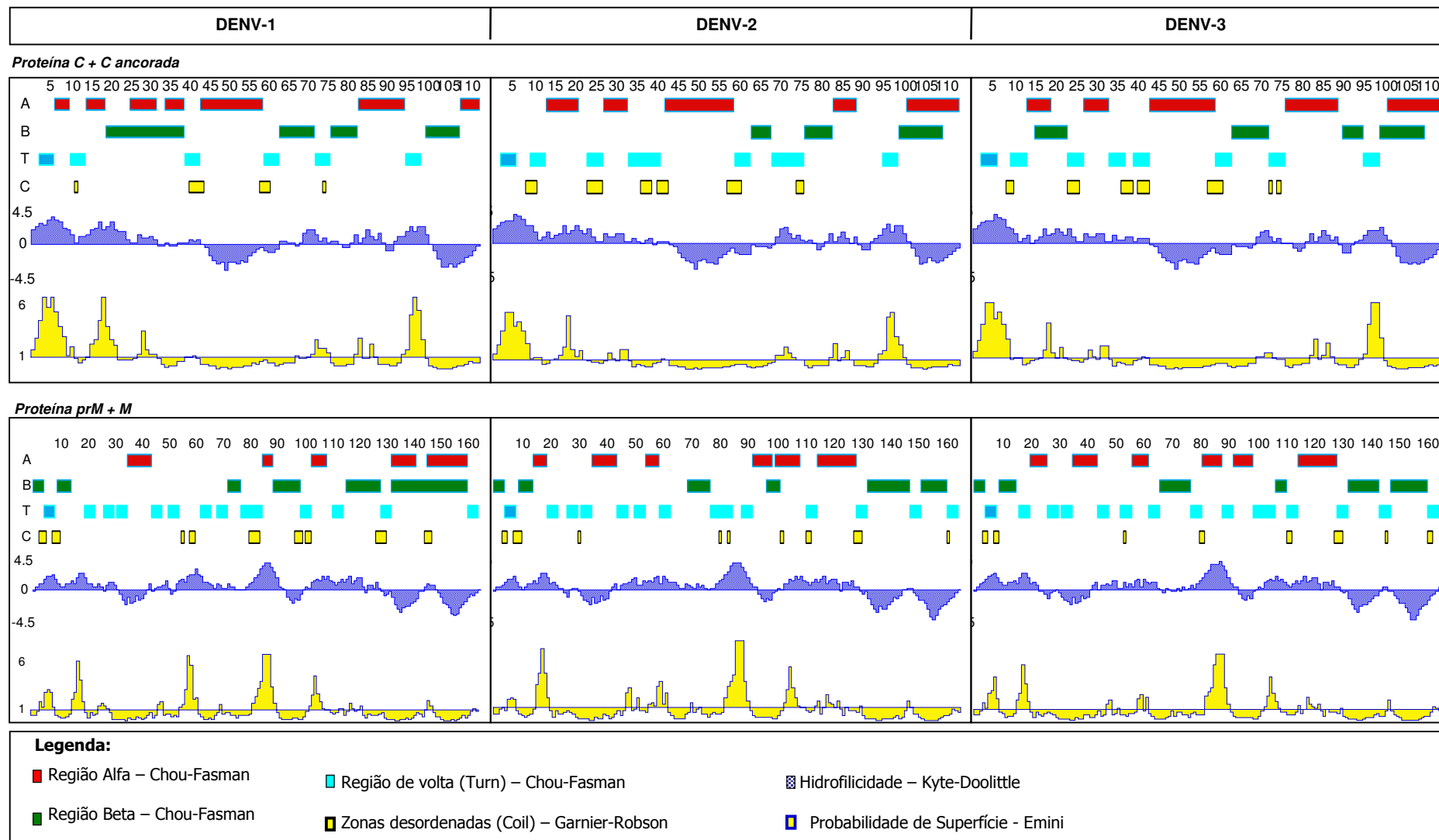


Figura 14: Representação gráfica das proteínas estruturais de capsídeo/capsídeo ancorada e pré-membrana/membrana dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado em elementos da estrutura secundária e em parâmetros de hidrofilicidade e acessibilidade de cada aminoácido, através do programa de computação DNASTAR

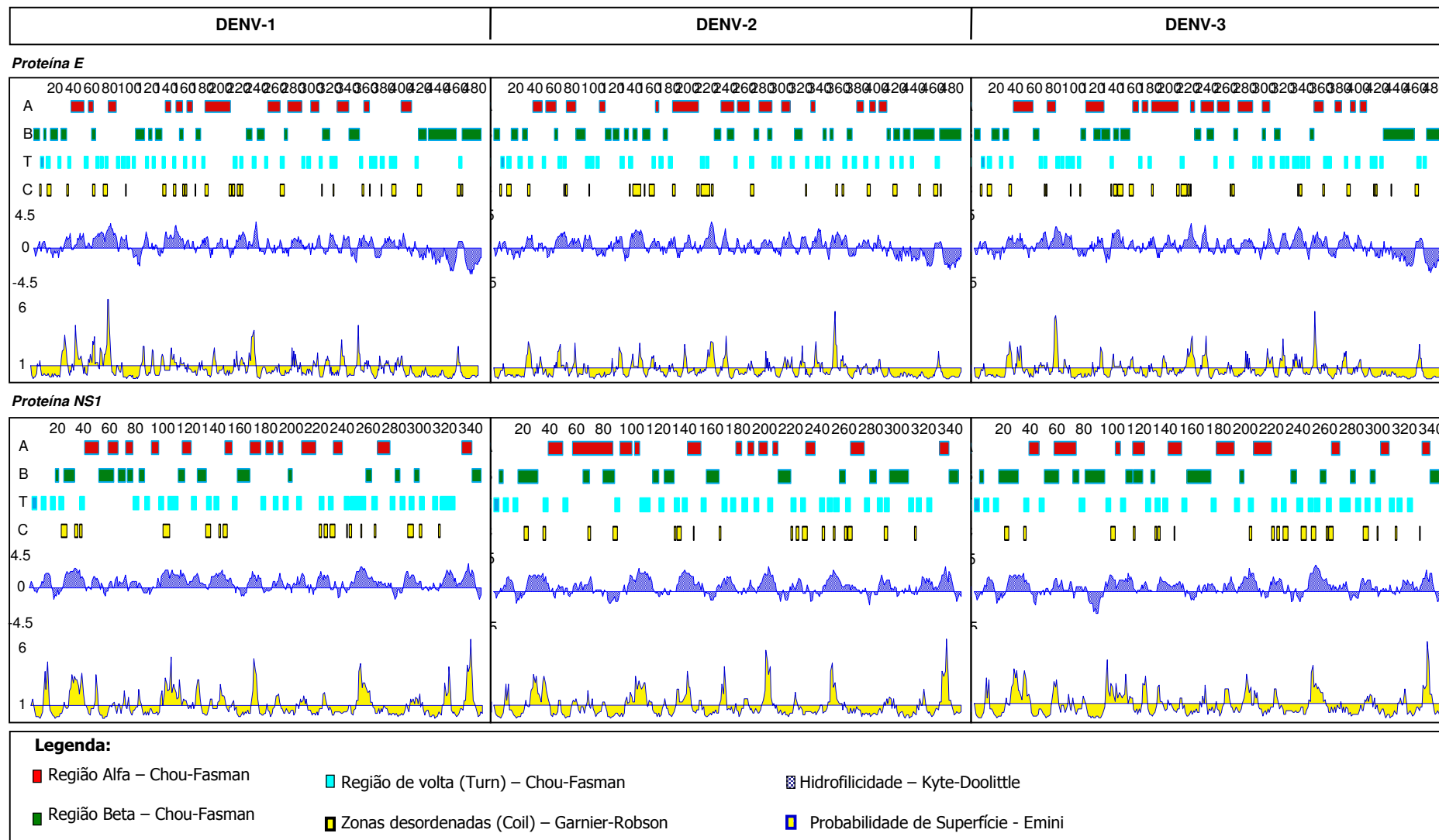


Figura 15: Representação gráfica da proteína estrutural de envelope e não estrutural 1 dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado em elementos da estrutura secundária e em parâmetros de hidrofilicidade e acessibilidade de cada aminoácido, através do programa de computação DNASTAR

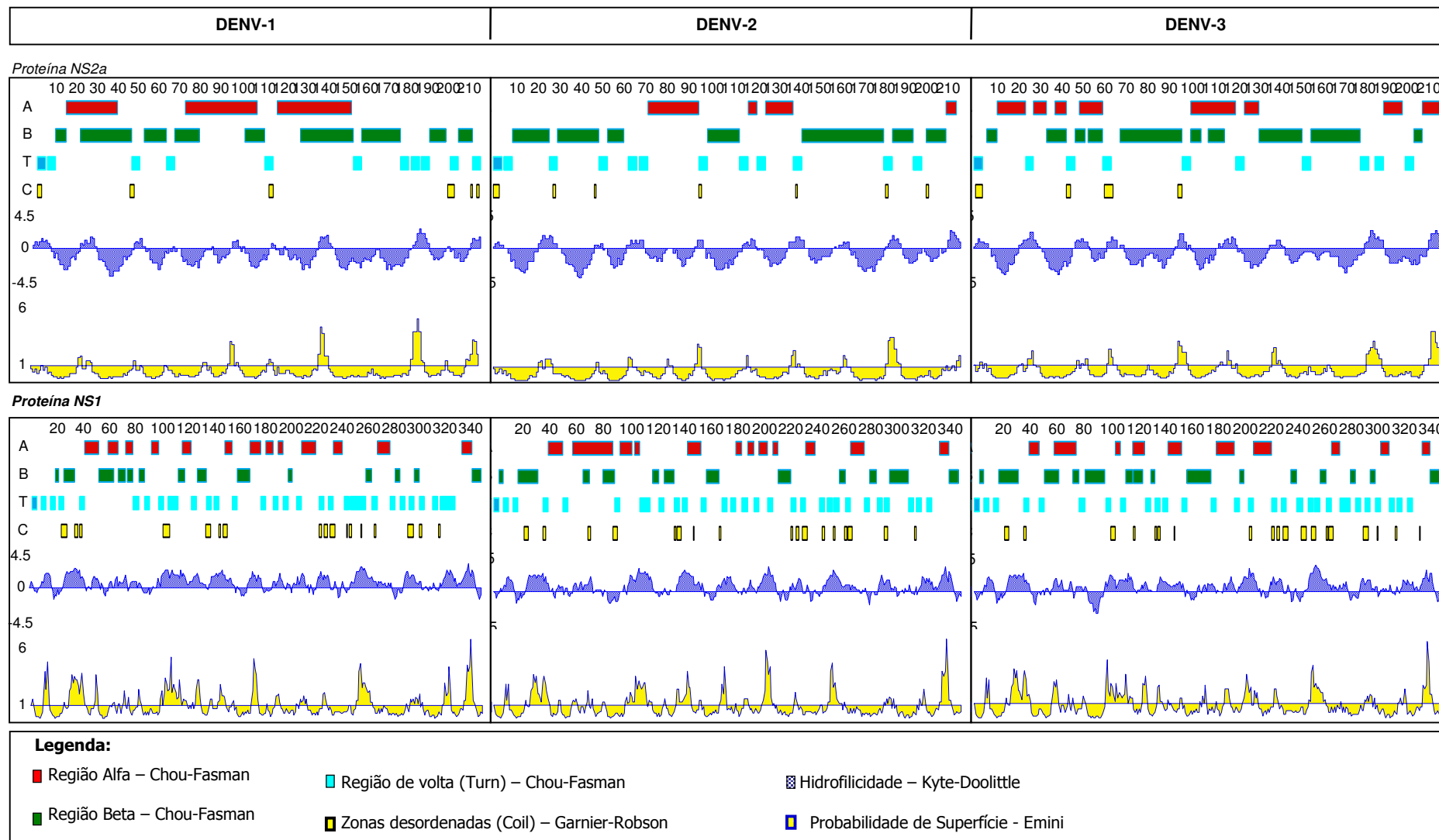


Figura 16: Representação gráfica da proteína não estrutural 2a e 2b dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado em elementos da estrutura secundária e em parâmetros de hidrofiliidade e acessibilidade de cada aminoácido, através do programa de computação DNASTAR

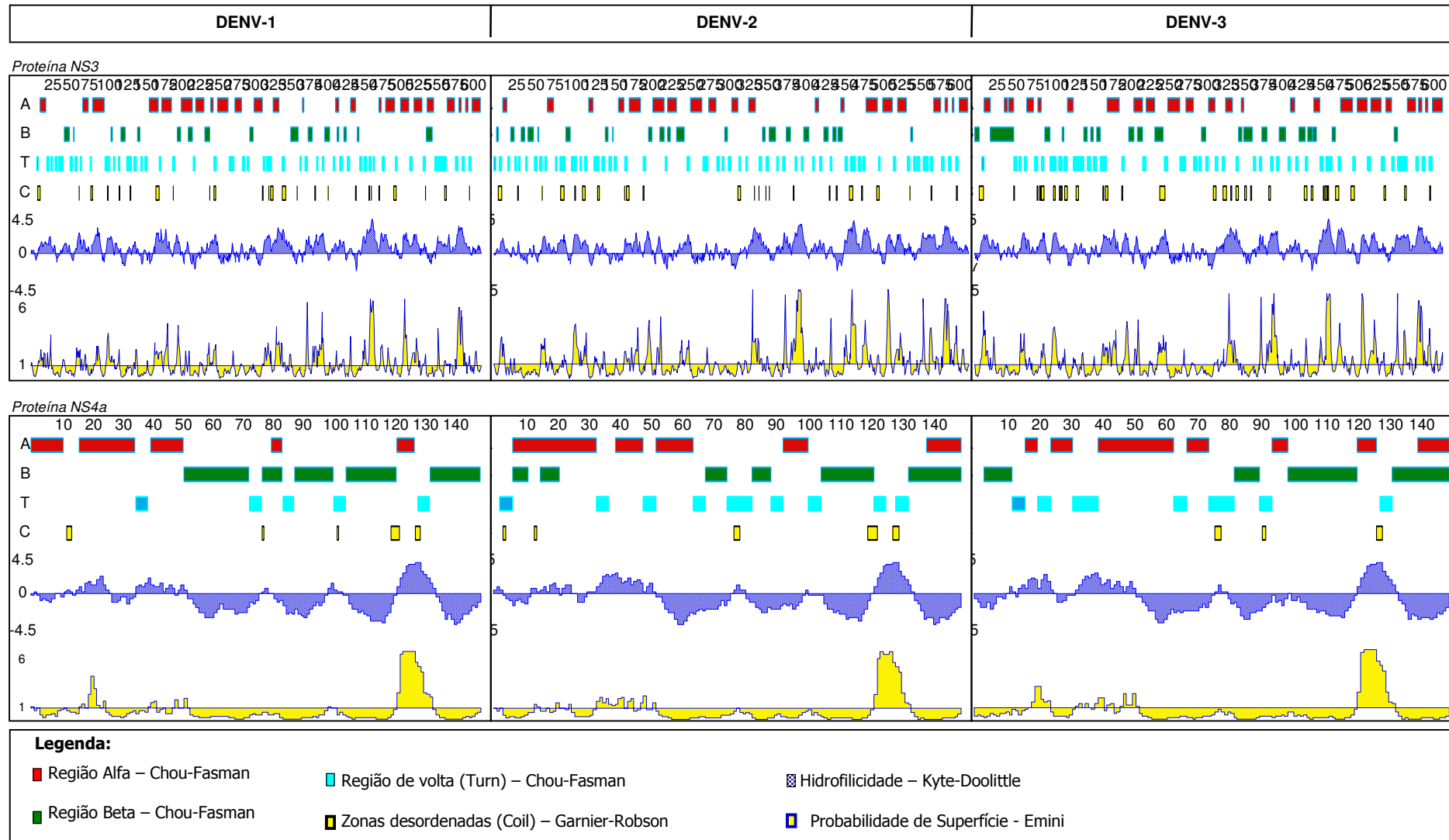


Figura 17: Representação gráfica da proteína não estrutural 3 e 4a dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado em elementos da estrutura secundária e em parâmetros de hidrofobicidade e acessibilidade de cada aminoácido, através do programa de computação DNASTAR

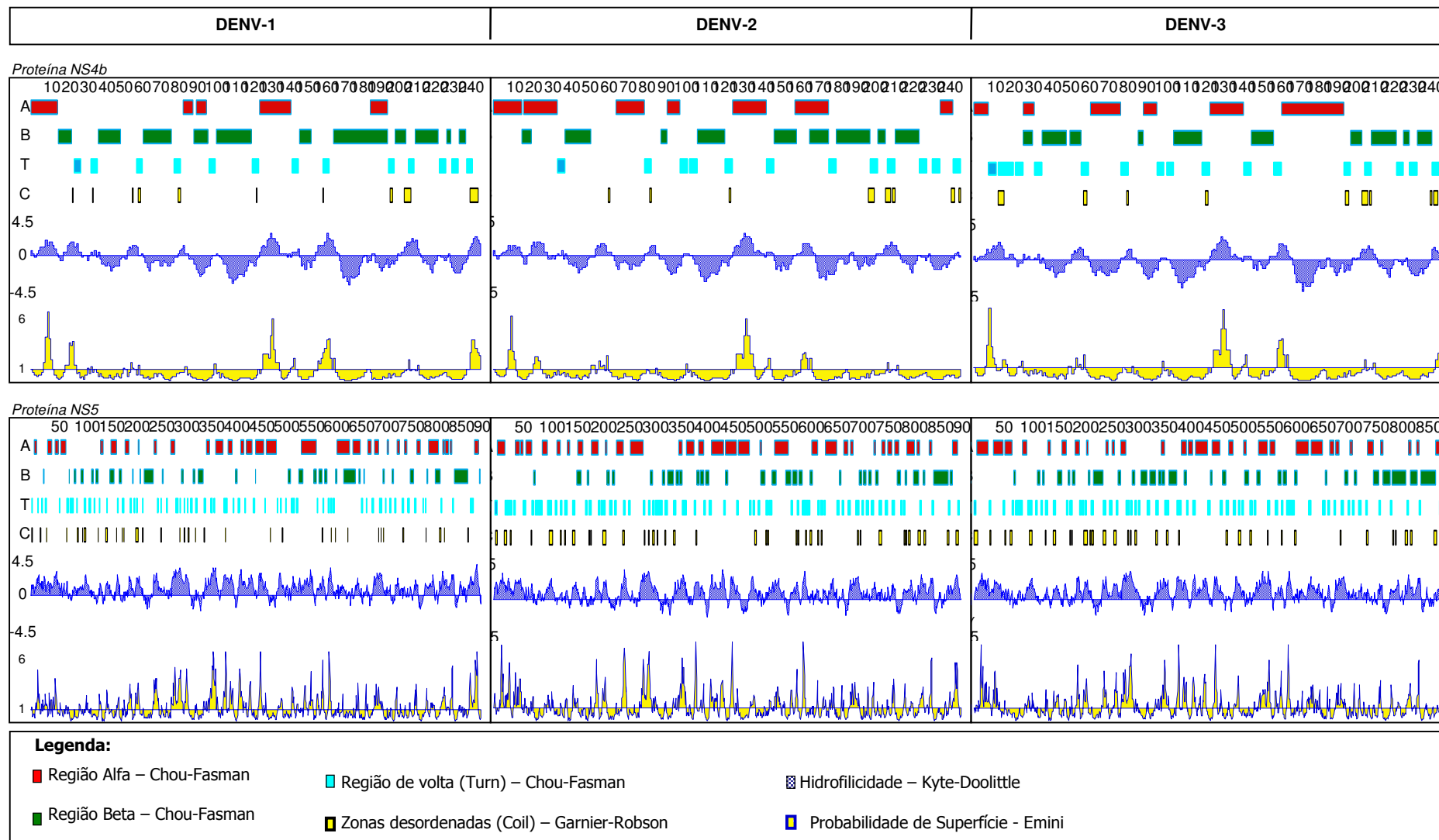


Figura 18: Representação gráfica da proteína não estrutural 4b e 5 dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado em elementos da estrutura secundária e em parâmetros de hidrofiliidade e acessibilidade de cada aminoácido, através do programa de computação DNASTAR

Para a determinação de regiões propensas à antigenicidade foi utilizado o parâmetro de Jameson & Wolf, através do programa de computação DNASTAR, que determinou um total de 152, 163 e 145 possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente. A figura 19 apresenta a disposição ilustrativa, enquanto que no anexo 2 foi determinada as regiões com propensão a antigenicidade através deste parâmetro.

Ao comparar os resultados obtidos utilizando o parâmetro de Jameson & Wolf com os parâmetros de estrutura secundária do programa computacional DNASTAR é possível verificar a existência de seqüências mais extensas no segundo caso e, portanto, um número menor de seqüências foi contabilizado. Este fato deve-se ao cálculo matemático utilizado na determinação do índice de antigenicidade, que inclui diferentes características topológicas para a predição de regiões de reconhecimento por anticorpos, resultando em sequências com maior especificidade.

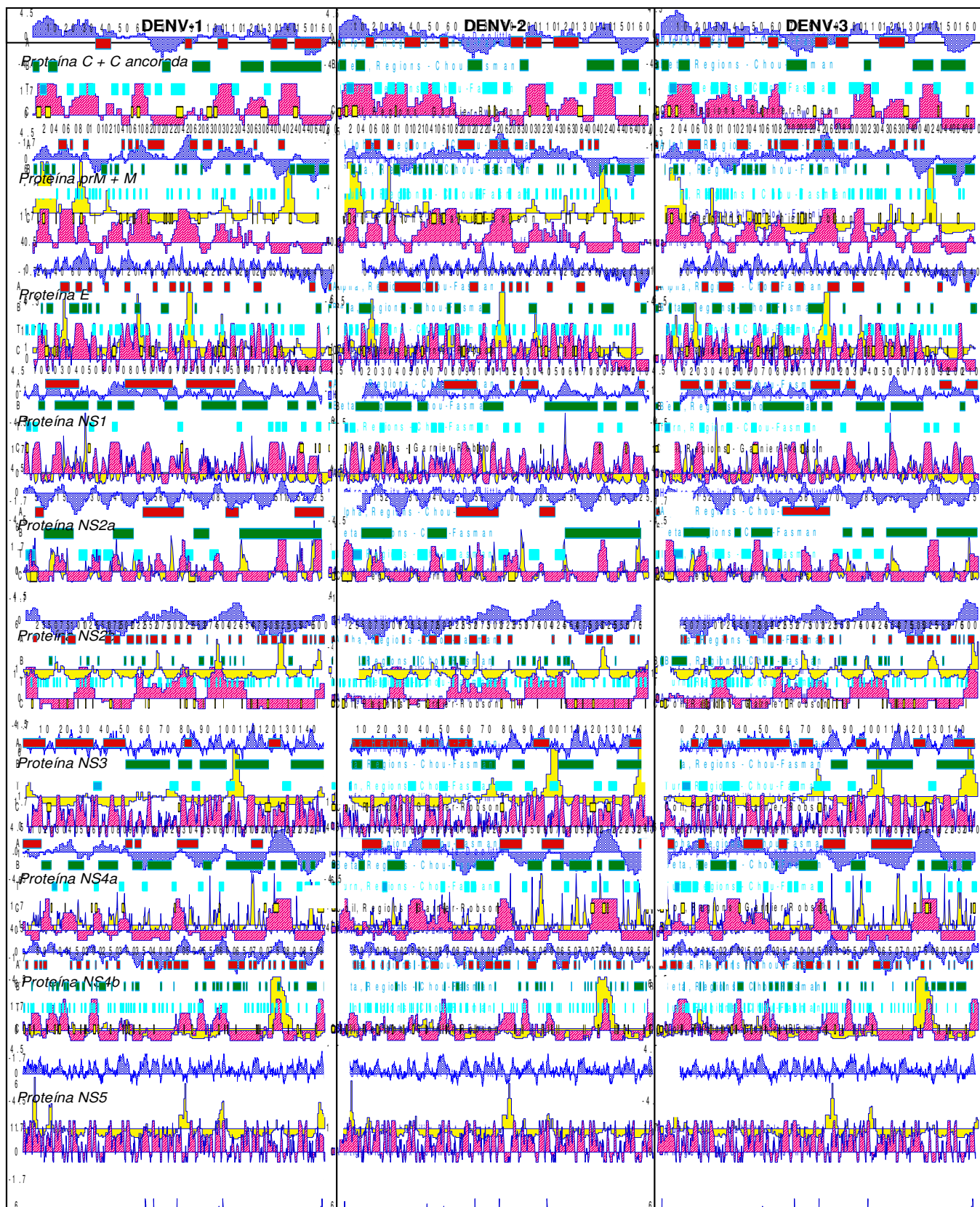


Figura 19: Representação gráfica das proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, contendo regiões com probabilidade de reconhecimento por anticorpos baseado no índice de antigenicidade determinada pelo parâmetro de antigenicidade de Jameson & Wolf



As escalas de Kolaskar & Tongaonkar e Bepipred foram utilizadas para a determinação de um resultado comutacional mais preciso, com relação à propensão a antigenicidade, sendo obtidas através do programa computacional IEDB. Pela escala de Kolaskar, foi identificado um total de 141, 132 e 136 prováveis epítomos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Anexo 3), enquanto que pela escala de bepiped um total de 108, 98 e 108 prováveis epítomos foram descritos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Anexo 4).

### **5.3. COMPARAÇÃO DAS PREDIÇÕES DE RECONHECIMENTO POR ANTICORPOS – ESCALA DE ANTIGENICIDADE**

Apesar de apresentarem sistemáticas diferentes para a predição de regiões antigênicas, os parâmetros de antigenicidade utilizados neste estudo puderam ser correlacionados, onde foi possível determinar um total de 120, 107 e 112 epítomos potenciais para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Quadro 2).

Foi considerado como epítomo de maior probabilidade, aquele que foi determinado em pelo menos dois parâmetros distintos.

Quadro 2: Determinação das possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da geração de um consenso entre os resultados obtidos pelo parâmetro de antigenicidade dos programas de computação DNASTAR e IEDB

| Proteínas | DENV-1          |                   |               | DENV-2          |                                      |               | DENV-3          |                        |               |
|-----------|-----------------|-------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência         | Posição final | Posição inicial | Seqüência                            | Posição final | Posição inicial | Seqüência              | Posição final |
| C         | 3               | NQRKKTGRP         | 11            | 1               | MNNQRKKARST                          | 11            | 3               | MNNQRKKTGKPS           | 12            |
|           | 24              | STGSQ             | 28            | 21              | NRVST                                | 25            | 23              | VSTGSQLAKR             | 32            |
|           | 35              | KGLLSGQ           | 41            | 61              | PTAG                                 | 64            | 61              | PTAG                   | 64            |
| prM-M     |                 |                   |               |                 |                                      |               | 79              | KVLKG                  | 83            |
|           | 119             | TRGGEP            | 124           | 157             | ELCEDT                               | 162           | 119             | SRDGEPRMI              | 127           |
|           | 131             | QERKSL            | 137           | 168             | PLLQRNEPEDICWCN                      | 183           | 169             | HITEVEPEDIDC           | 180           |
|           | 164             | TYKCPRITEAEPDDVD  | 179           | 193             | TCTTTGEHRRE                          | 204           | 192             | GTCNQAGERRRDKRSVA      | 208           |
|           | 192             | GTCSQTGEHRRDKRS   | 206           | 218             | ETRTETWMSSEGAW                       | 231           |                 |                        |               |
| 208       | ALAPHVGLGLETR   | 220               |               |                 |                                      |               |                 |                        |               |
| 234       | IQKVE           | 238               |               |                 |                                      |               |                 |                        |               |
| E         | 315             | AKNKPTL           | 321           | 287             | SNRDFVEGVSGG                         | 298           | 315             | AKNKPT                 | 320           |
|           | 346             | SNTTDSRCPTQGE     | 359           | 324             | ELIKTEAKQPAT                         | 335           | 362             | LPEEQDQNY              | 370           |
|           | 407             | GKIVQ             | 411           | 346             | TNTTRESRCPTQGEPSSLNEEQDKRFIC         | 372           | 375             | TYVDRGWGNGC            | 385           |
|           | 413             | ENLKYS            | 418           | 379             | RGWGN                                | 383           | 389             | GKGS                   | 392           |
|           | 424             | HTGDQHQVGNETTE    | 437           | 423             | PHSGEEHAVGNDTGKHGEEIKITPQSSITEAELTGY | 458           | 426             | GDQHQVGNETQGV          | 438           |
|           | 450             | TSEIQ             | 454           | 465             | CSPRTGL                              | 471           | 464             | SPRTGL                 | 469           |
|           | 499             | PWTSGASTSQETWNR   | 513           | 502             | PGADTQGSNWI                          | 512           | 498             | WTSGATTETPTWN          | 510           |
|           | 524             | HAKKQE            | 529           | 522             | NPHAKKQD                             | 529           | 522             | HAKKQE                 | 527           |
|           | 548             | TEIQTSGT          | 555           | 563             | LKCLR                                | 568           | 561             | LKCLR                  | 566           |
|           | 573             | TLKGTS            | 578           | 570             | DKLQL                                | 574           | 586             | LKKEVSETQ              | 594           |
|           | 591             | EVAETQH           | 597           | 587             | KIVKEIAET                            | 595           | 604             | YKGEDAPCK              | 612           |
|           | 604             | EGTDAPCK          | 614           | 604             | VQYEGDGSPCKI                         | 615           | 615             | FSTEDGQGKAH            | 625           |
|           | 620             | QDEKGVTV          | 627           | 638             | VTEKDSPVNIEAEPFPGDSY                 | 657           | 636             | VVTKKEEPVNIEAEPFPGESNI | 656           |
|           | 638             | VTDKEKPVNIETEPFGE | 655           |                 |                                      |               |                 |                        |               |

Quadro 2 (continuação): Determinação das possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da geração de um consenso entre os resultados obtidos pelo parâmetro de antigenicidade dos programas de computação DNASTAR e IEDB

| Proteínas | DENV-1          |                         |               | DENV-2          |                    |               | DENV-3          |                   |               |
|-----------|-----------------|-------------------------|---------------|-----------------|--------------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência               | Posição final | Posição inicial | Seqüência          | Posição final | Posição inicial | Seqüência         | Posição final |
| NS1       | 776             | DSGC                    | 779           | 776             | DSGC               | 779           | 806             | KFQADSPKRLA       | 816           |
|           | 787             | ELKCGSG                 | 793           | 787             | ELKCGSG            | 793           | 894             | AKIVTAETQN        | 903           |
|           | 808             | KFQADSPKRLS             | 818           | 806             | QYKFQPESPSKLAS     | 819           | 910             | GPNTPECPSASR      | 921           |
|           | 827             | EGVCG                   | 831           | 821             | IQKAHEEGIC         | 830           | 930             | DYGF              | 933           |
|           | 878             | MIRPQPMEHKYS            | 889           | 834             | SVTRL              | 838           | 943             | KLREYV            | 948           |
|           | 911             | DGPDTPECPDEQR           | 923           | 855             | SENEVK             | 860           | 952             | CDHR              | 955           |
|           | 944             | LKLRDSY                 | 949           | 876             | KRSLRPQPTELKYS     | 889           | 960             | AVKDERAVH         | 968           |
|           | 954             | CDHR                    | 957           | 901             | TESH               | 904           | 976             | ESQKNGSWKLEKASLIE | 992           |
|           | 1002            | KSHT                    | 1005          | 911             | DGPETAACPNTNRAWN   | 926           | 997             | TWPK              | 1000          |
|           | 1029            | HNYRPGY                 | 1035          | 930             | VEDYG              | 934           | 1006            | SNGVLE            | 1011          |
|           | 1047            | VDEHCGSRGPSLRT          | 1058          | 949             | KQDVFCDK           | 957           | 1015            | IIPKSLA           | 1021          |
|           | 1087            | RFRGEDGCW               | 1092          | 999             | HWPKS              | 1003          | 1024            | ISQHNHRPGY        | 1033          |
|           | 1111            | RPVKEKEE                | 1118          | 1022            | FAGPVSQHNYRPGY     | 1035          | 1045            | KLELDFNYC         | 1053          |
|           |                 |                         |               | 1062            | VTEDCGNRGPSLRTTTAS | 1079          | 1064            | CGTRGPSLRTTT      | 1075          |
|           |                 |                         | 1086          | WCCRST          | 1092               | 1077          | SGKL            | 1080              |               |
|           |                 |                         | 1094          | PPLRYRGEDGCW    | 1105               | 1084          | WCCRST          | 1090              |               |
|           |                 |                         | 1109          | EIRPLKEKEENL    | 1120               | 1095          | RYMG            | 1098              |               |
|           |                 |                         |               |                 |                    | 1110          | PISEKEEN        | 1117              |               |
| NS2a      | 1128            | GSGEVDSFS               | 1136          | 1130            | GQIDNFS            | 1136          | 1126            | GSGKVD            | 1131          |
|           | 1190            | NASDKMG                 | 1197          | 1312            | SQKTDW             | 1318          | 1188            | NASDR             | 1192          |
|           | 1243            | LPNSLEEL                | 1250          |                 |                    |               | 1221            | LTSRENLLL         | 1227          |
|           | 1312            | TSQKTT                  | 1317          |                 |                    |               | 1241            | LPEDIEQ           | 1247          |
|           | 1324            | GSFG                    | 1327          |                 |                    |               | 1307            | QSSMR             | 1312          |
|           | 1341            | IWGR                    | 1344          |                 |                    |               |                 |                   |               |
| NS2b      | 1346            | SWPL                    | 1349          | 1365            | SLLKN              | 1369          | 1346            | PLNEGV            | 1351          |
|           | 1365            | SLLKNDVP                | 1372          | 1403            | DVKWEDQAEISGSSP    | 1417          | 1363            | SLLRNDVPM         | 1371          |
|           | 1393            | SADLSLEKAAEVSWEEEAGHSGT | 1415          | 1424            | SEDGSMISIKNEEEEQ   | 1438          | 1391            | SADLTVEKA         | 1399          |
|           | 1424            | QDDGTMKIKDEERDD         | 1438          |                 |                    |               | 1403            | TWEEEAQGTGV       | 1413          |
|           | 1472            | KKQR                    | 1475          |                 |                    |               | 1422            | DDDGMTRIKDDETE    | 1435          |

Quadro 2 (continuação): Determinação das possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da geração de um consenso entre os resultados obtidos pelo parâmetro de antigenicidade dos programas de computação DNASTAR e IEDB

| Proteínas | DENV-1          |                                |               | DENV-2          |  |               | DENV-3          |   |               |
|-----------|-----------------|--------------------------------|---------------|-----------------|--|---------------|-----------------|---|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                                      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                                   | Posição final |
| NS3       | 1482            | TPSPPEVERAVLDG                 | 1496          | 1483            | PSPPPVEKAELEDGAYRIKQIRGI                       | 1505          | 1481            | PSPPETQKAELEEGVYRIKQ                        | 1500          |
|           | 1504            | GLLGRSQV                       | 1511          | 1515            | VYKEGT   | 1520          | 1513            | VQKEGV                                      | 1518          |
|           | 1546            | SVKKDLI                        | 1552          | 1533            | LMHRGKRIEPSWADVKKDLI                           | 1552          | 1532            | TYNGKRLEPNW                                 | 1542          |
|           | 1555            | GGGW                           | 1558          | 1555            | GGGWKLEGEWKEGEEVQ                              | 1571          | 1545            | VKKDLI                                      | 1550          |
|           | 1562            | GSWNTGEEVQ                     | 1571          | 1574            | ALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGT                       | 1597          | 1560            | AQWQKGEVQ                                   | 1569          |
|           | 1574            | AVEPGKNPKNVQTTTPGTFKT<br>PEGEV | 1598          | 1605            | FSPGTSGPSIVDRKGV                               | 1621          | 1572            | AVEPGKNPKNFQ                                | 1583          |
|           | 1604            | DFKPGTSGSPIVN                  | 1616          | 1629            | VVTRSG   | 1634          | 1585            | MPGTFQTTTGEI                                | 1596          |
|           | 1643            | AKASQEGPLPEIEDE                | 1657          | 1641            | AQTEKSIEDNPEIEDDFRKKRLT                        | 1664          | 1602            | DFKPGTSGS                                   | 1610          |
|           | 1670            | HPGSGKTRRY                     | 1679          | 1668            | LHPGAGKTKRY                                    | 1678          | 1612            | IINREGKV                                    | 1619          |
|           | 1722            | AVLSEHTGR                      | 1730          | 1685            | EAIKRGLR                                       | 1692          | 1641            | TNAEPDGPTPELEEMFKKRNL                       | 1663          |
|           | 1749            | VRVP                           | 1752          | 1702            | VAAEMEEALR                                     | 1711          | 1668            | HPGSGKTRKY                                  | 1677          |
|           | 1766            | DPASIAA                        | 1772          | 1720            | PAIRTEHTGREIV                                  | 1732          | 1684            | EAIKRRLR                                    | 1691          |
|           | 1793            | TPPGSVEAFPQSNA                 | 1803          | 1777            | AARGYISTRVEMGE                                 | 1783          | 1701            | VAAEMEEALK                                  | 1710          |
|           | 1808            | IQDEERDIPERSWNSGYD             | 1824          | 1792            | TPPGSRDPFPQSNAPIMDEEREIPERSW<br>NSGHEWVTFDKGKT | 1833          | 1719            | TATKSEHTGREIV                               | 1731          |
|           | 1828            | TDFPGK                         | 1834          | 1839            | SIKAGNDI                                       | 1846          | 1747            | VRVPN                                       | 1751          |
|           | 1840            | SIKSGND                        | 1846          | 1848            | ACLRKNGKKVIQLSRKTFDSEYVK<br>TRTNDWD            | 1878          | 1760            | AHFTDPAS                                    | 1767          |
|           | 1857            | RVIQLSR                        | 1863          | 1883            | TDISE  | 1887          | 1778            | VGMGE                                       | 1782          |
|           | 1865            | TFDTEYQTKNNDWD                 | 1879          | 1889            | GANFRAERVIDPRRCMK                              | 1905          | 1791            | TPPGTADAFPQSNAPIQDEERDIPER<br>SWNSGNEW      | 1824          |
|           | 1885            | DISE                           | 1888          | 1908            | ILTDGEERVI                                     | 1917          | 1838            | SIKAGNDIANCLRKNGKKVIQLSRKTFDTE<br>YQTKLNDWD | 1877          |
|           | 1896            | DRVIDPRRCLK                    | 1906          | 1928            | SAAQRRGRIGRNPRNENDQ                            | 1946          | 1882            | TDISEMGANFRAERVIDPRRCLK                     | 1904          |
|           | 1909            | ILKDGPERV                      | 1917          | 1952            | EPLENDEDCAHWKEAKML                             | 1969          | 1907            | ILTDGPERVI                                  | 1916          |
|           | 1930            | AAQRRGRIGRNQNKEGDQY            | 1948          | 1972            | NINTPEGI                                       | 1979          | 1928            | AASAAQRRGRVGRNPQKENDQ                       | 1945          |
|           | 1954            | PLNNDHHAH                      | 1963          | 1984            | FEPEREKVDIDGEYRLRGEARKTF                       | 2008          | 1951            | QPLNNDHHAH                                  | 1961          |
|           | 1975            | NTPEGI                         | 1980          | 2010            | DLMRRGDL                                       | 2017          | 1971            | NINTPEGI                                    | 1978          |
|           | 1985            | FEPEREKSAID                    | 1996          | 2029            | GINYADRRWCDFGIKNNQILENVE                       | 2053          | 1983            | FEPEREKSAIDGEYRLKGESRKTF                    | 2007          |
|           |                 |                                |               | 2056            | IWTKEGERKCLKPRWLD                              | 2072          |                 |   |               |

Quadro 2 (continuação): Determinação das possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da geração de um consenso entre os resultados obtidos pelo parâmetro de antigenicidade dos programas de computação DNASTAR e IEDB

| Proteínas   | DENV-1          |                 |               | DENV-2          |                |               | DENV-3          |                              |               |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|------------------------------|---------------|
|             | Posição inicial | Seqüência       | Posição final | Posição inicial | Seqüência      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                    | Posição final |
| NS3         | 2025            | KVASEGFQY       | 2033          | 2074            | RIYSDPLALKEFKE | 2087          | 2009            | ELMRRGDL                     | 2016          |
|             | 2043            | ERNNQV          | 2048          | 2089            | AAGRKS         | 2094          | 2024            | VASEGIKYDRKWCFDGERNNQILEENMD | 2052          |
|             | 2058            | WTKEGERKKL      | 2067          |                 |                |               | 2055            | IWTKEGEKKLRPRWLDARTYSDPLA    | 2080          |
|             | 2075            | RTYSDPLA        | 2082          |                 |                |               | 2082            | KEFKDFAAGRK                  | 2092          |
| NS4a e NS4b | 2095            | SVSG            | 2098          | 2104            | GRLP           | 2107          | 2127            | EHGGR                        | 2131          |
|             | 2169            | GKGLGKTS        | 2176          | 2167            | SGKGI          | 2171          | 2167            | GKGIGKTS                     | 2174          |
|             | 2214            | IPEPDRQRTPQDN   | 2226          | 2219            | QRTPQDN        | 2225          | 2218            | QRTPQDN                      | 2224          |
|             | 2303            | NTTA            | 2306          | 2266            | SESN           | 2269          | 2251            | TKRDLGMSKEPGV                | 2263          |
|             | 2324            | DKGW            | 2327          | 2276            | RPAS           | 2279          | 2300            | NSTA                         | 2303          |
|             | 2452            | GSPGKF          | 2457          | 2299            | IENSSV         | 2304          | 2321            | DKGW                         | 2324          |
|             | 2487            | SLGGGRR         | 2493          | 2322            | GKGW           | 2325          | 2386            | NPTV                         | 2389          |
|             |                 |                 |               | 2402            | PYDPKF         | 2407          | 2449            | GSPGKF                       | 2454          |
|             |                 |                 |               | 2449            | EGNPGRF        | 2455          | 2486            | GTGKR                        | 2490          |
|             |                 |                 |               | 2483            | MKNTTNRRTG     | 2493          |                 |                              |               |
| NS5         | 2494            | GTGA            | 2497          | 2509            | NTLGKNE        | 2515          | 2491            | GTGS                         | 2494          |
|             | 2512            | QLSKSEFNTYKRSGI | 2526          | 2520            | KKSG           | 2523          | 2546            | SRGSA                        | 2550          |
|             | 2562            | NLVKPEG         | 2568          | 2559            | RNMVTPEG       | 2566          | 2560            | MVIP                         | 2563          |
|             | 2574            | GCGRGGW         | 2580          | 2582            | CGGLK          | 2586          | 2572            | CGRGGW                       | 2577          |
|             | 2596            | YTKGGPGHEEP     | 2606          | 2595            | TKGGPGH        | 2601          | 2593            | YTKGGPGH                     | 2600          |
|             | 2620            | HSGKD           | 2624          | 2626            | TPPEK          | 2630          | 2626            | PPEK                         | 2629          |
|             | 2629            | PPEK            | 2632          | 2639            | GESSPNP        | 2645          | 2638            | GESSPSPT                     | 2645          |
|             | 2641            | GESSPNPTIEE     | 2651          | 2663            | LNNNT          | 2667          | 2697            | NPLSRNST                     | 2704          |
|             | 2664            | WLRGNQ          | 2669          | 2698            | RNPLSRNST      | 2706          | 2712            | NGTGN                        | 2716          |
|             | 2701            | PLSRNST         | 2707          | 2714            | NATG           | 2717          | 2736            | HRRPT                        | 2740          |
|             | 2739            | HRKPTYERD       | 2747          | 2750            | GSGT           | 2753          | 2755            | NAEPETPNM                    | 2763          |
|             | 2751            | GAGT            | 2754          | 2785            | YDQDHPYK       | 2792          | 2778            | NSTWHYDDENPYK                | 2790          |
|             | 2780            | HKSTWHYDDEDNPYK | 2793          | 2797            | HGSYE          | 2801          | 2795            | HGSY                         | 2798          |
|             |                 |                 |               | 2804            | QTGSA          | 2808          | 2835            | TTPFG                        | 2839          |

Quadro 2 (continuação): Determinação das possíveis regiões de reconhecimento por anticorpos das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, através da geração de um consenso entre os resultados obtidos pelo parâmetro de antigenicidade dos programas de computação DNASTAR e IEDB

| Proteínas | DENV-1          |               |               | DENV-2          |           |               | DENV-3          |              |               |
|-----------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|-----------|---------------|-----------------|--------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência     | Posição final | Posição inicial | Seqüência | Posição final | Posição inicial | Seqüência    | Posição final |
| NS5       | 2798            | HGSYEVKPSGSA  | 2809          | 2836            | DTTPF     | 2840          | 2852            | TPRSMPGT     | 2859          |
|           | 2822            | KPWD          | 2825          | 2877            | GKKKTPRM  | 2884          | 2875            | GRNKRPR      | 2881          |
|           | 2837            | DTTPFG        | 2842          | 2936            | GKCE      | 2939          | 2934            | GKCG         | 2937          |
|           | 2855            | TPRAKRGT      | 2862          | 2992            | ENSLSG    | 2997          | 2989            | RENSYSGVEGEG | 3001          |
|           | 2877            | LSRNKKP       | 2883          | 3064            | YQNK      | 3067          | 3014            | IPGG         | 3017          |
|           | 2896            | RSNA          | 2899          | 3074            | PTPRG     | 3078          | 3073            | TPTG         | 3076          |
|           | 2935            | KQGK          | 2938          | 3086            | RRDQRGSGQ | 3094          | 3085            | KDQRGSG      | 3091          |
|           | 2960            | AKGS          | 2963          | 3152            | SGDDC     | 3156          | 3185            | QPSKGWHD     | 3192          |
|           | 2991            | SRENSLSG      | 2998          | 3187            | PSRGWWDWT | 3195          | 3233            | GAGWS        | 3237          |
|           | 3017            | IPGG          | 3020          | 3234            | GAGWS     | 3238          | 3279            | PTSRTT       | 3284          |
|           | 3065            | YQNK          | 3068          | 3280            | PTSR      | 3283          | 3308            | IEDNPWM      | 3314          |
|           | 3075            | PAKNG         | 3079          | 3310            | QENPW     | 3314          | 3334            | DQWCG        | 3338          |
|           | 3087            | RRDQRGSGQ     | 3095          | 3335            | DQWCG     | 3339          |                 |              |               |
|           | 3116            | ESEGIFFPSELES | 3128          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3188            | PSKGWWDWQ     | 3196          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3235            | GAGW          | 3238          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3247            | GKSY          | 3250          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3281            | PTSRTT        | 3286          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3312            | ENPW          | 3315          |                 |           |               |                 |              |               |
|           | 3322            | VSSW          | 3325          |                 |           |               |                 |              |               |
| 3330      | YLGKR           | 3334          |               |                 |           |               |                 |              |               |
| 3336      | DQWC            | 3339          |               |                 |           |               |                 |              |               |
| 3367      | GNENY           | 3371          |               |                 |           |               |                 |              |               |
| 3382      | KNESDPE         | 3388          |               |                 |           |               |                 |              |               |

#### **5.4. IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS CONSECUTIVOS DAS PROTEÍNAS DOS DENV-1, DENV-2 E DENV-3, ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SÍNTESE PARALELA**

Inicialmente, uma biblioteca composta por um total de 1284 peptídeos foi construída cobrindo toda a extensão do DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Tal estratégia foi composta por peptídeos contendo 15 resíduos com sobreposição de 7 (dados não mostrados). Para o refinamento dos resultados, nova estratégia de síntese foi utilizada através da estratégia F-moc, onde cada peptídeo foi composto por 10 resíduos com sobreposição de 5, constituindo uma biblioteca de 2007 peptídeos. Tal estratégia foi utilizada como padrão nos testes subseqüentes.

Controles positivos (1210-GYPKDGNAFN-1219 - proteína precursora do *Clostridium tetani* - número de acesso Genbank P04958) e negativos (131-MDKEIKKGPR-140 - proteína do paramyxovirus aviário - número de acesso Genbank ACO48304) foram utilizados em todos os testes.

As Figuras 20 a 22 apresentam os resultados da triagem empregando mistura de soros de pacientes com o mesmo sorotipo de dengue para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente. No Quadro 3 estão descritas as regiões imunogênicas identificadas através da metodologia de síntese paralela de peptídeos em membranas, correspondendo a um total de 96, 103 e 106 epítomos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente.

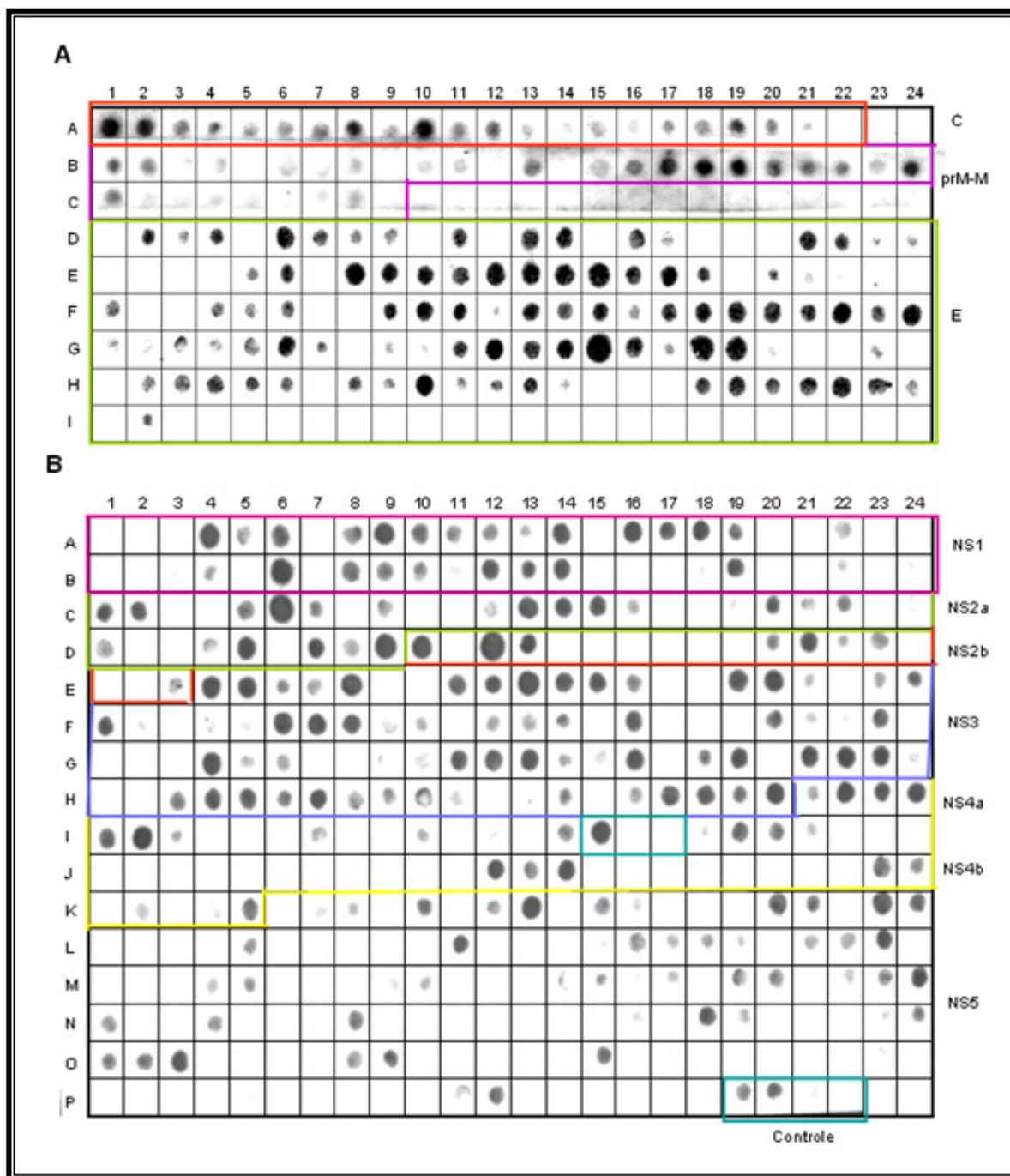


Figura 20: Revelação imunológica das membranas celulósicas contendo peptídeos das proteínas estruturais (A) e não estruturais (B) do DENV-1 sintetizados (10 mers) pela técnica de síntese paralela. Os pontos escuros correspondem aos resultados positivos e os espaços vazios correspondem às negativas. As linhas coloridas delimitam a extensão de cada proteína sintetizada.



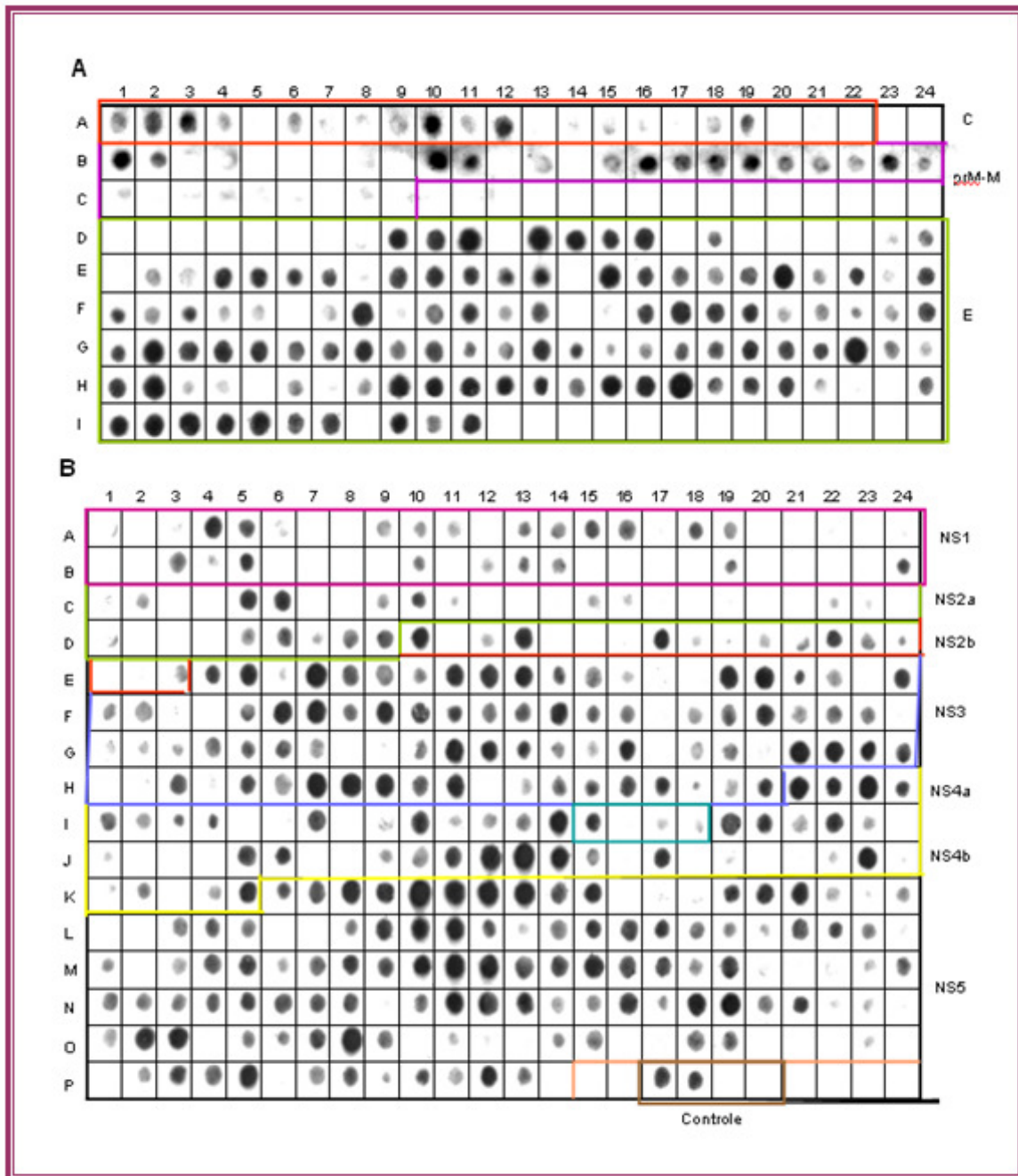


Figura 21: Revelação imunológica das membranas celulósicas contendo peptídeos das proteínas estruturais (A) e não estruturais (B) do DENV-2 sintetizados (10 mers) pela técnica de síntese paralela. Os pontos escuros correspondem aos resultados positivos e os espaços vazios correspondem às negativas. As linhas coloridas delimitam a extensão de cada proteína sintetizada.

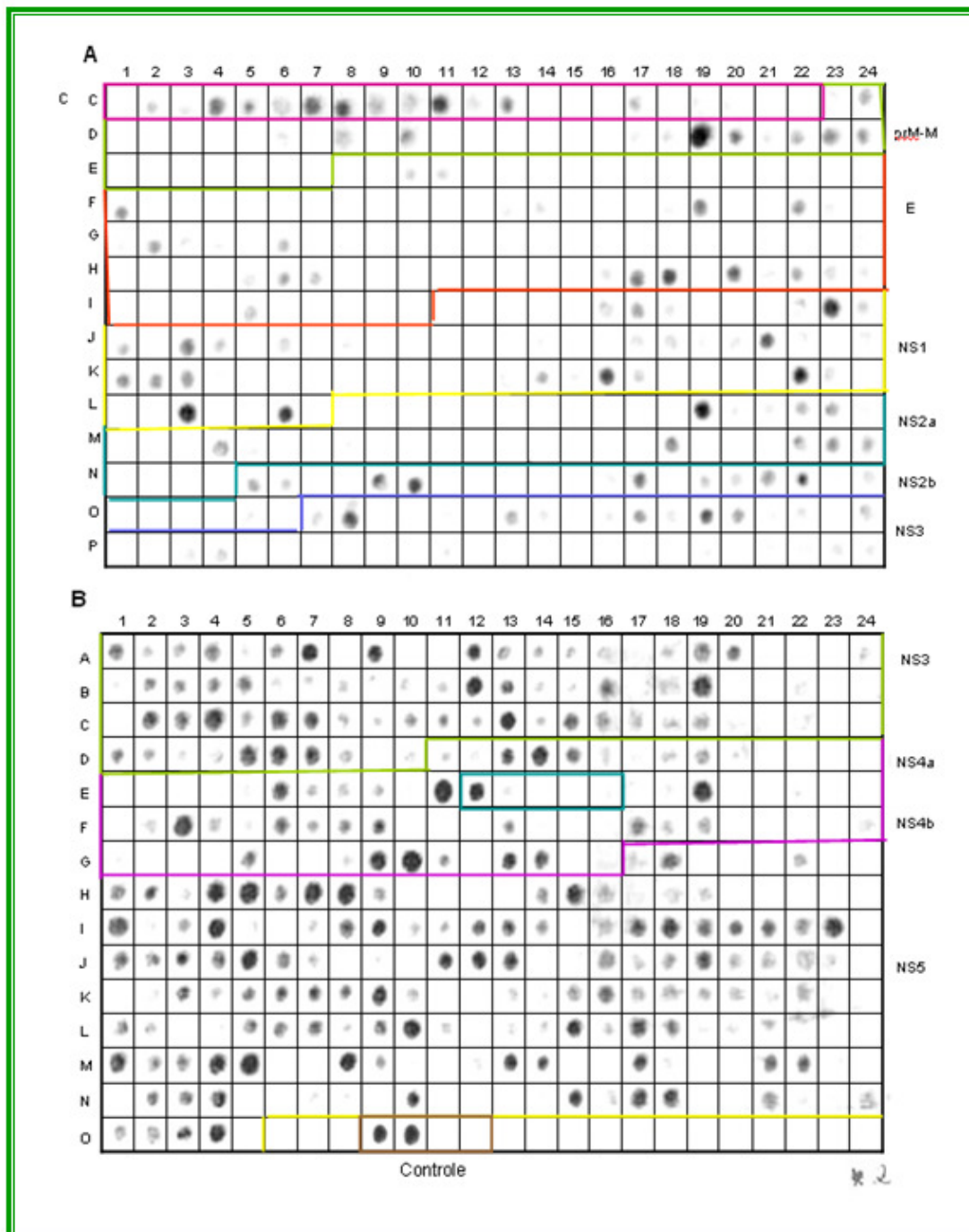


Figura 22: Revelação imunológica das membranas celulósicas contendo peptídeos das proteínas C, prM/M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3 (42 primeiros peptídeos) (A) NS3 (82 peptídeos finais), NS4a, NS4b e NS5 (B) do DENV-3 sintetizados (10 mers) pela técnica de síntese paralela. Os pontos escuros correspondem aos resultados positivos e os espaços vazios correspondem às negativas. As linhas coloridas delimitam a extensão de cada proteína sintetizada.

Quadro 3: Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |                               |               | DENV-2          |                              |               | DENV-3          |                                |               |
|-----------|-----------------|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                     | Posição final | Posição inicial | Seqüência                    | Posição final | Posição inicial | Seqüência                      | Posição final |
| C         | 7               | KKTGRPSFNMLKRARNRVSTGS        | 27            | 6               | KKARSTPFNMLKRERNRVSTVQ       | 27            | 7               | KTGKPSINMLKRVNRVSTG            | 26            |
|           | 35              | GLLSGQGPMK                    | 45            | 51              | ALVAFLRFLT                   | 58            | 38              | LNGQGPMK                       | 45            |
|           | 51              | IAFLRFLAIP                    | 60            | 61              | PTAGILKRWG                   | 70            | 51              | IAFLRFLAIP                     | 60            |
|           | 89              | SSMLNIMNRR                    | 98            | 96              | NRRRRTAGVI                   | 105           | 91              | MLSIINKRKK                     | 100           |
| prM / M   | 115             | FHLTTRGG                      | 122           | 115             | FHLTTRNGEPHMIV               | 128           | 115             | FHLTSRDG                       | 122           |
|           | 165             | KCPRITEA                      | 173           | 165             | KCPLLRQNE                    | 174           | 127             | IVGKNERG                       | 134           |
|           | 195             | SQTGEHRRDKRSVALAP<br>HVGLGLET | 219           | 196             | TTGEHRREKRSVALVP<br>HVGMGLET | 219           | 195             | NQAGERRRDKRSVAL<br>APHVGMGLDTR | 220           |
|           | 230             | AWKQIQKVETWALRH               | 244           | 231             | WKHVQRIET                    | 239           | 225             | MSAEGAWRQVEKVETWALRHP          | 245           |
| E         | 287             | GNRDFVEGLSGATWVDVLEH          | 307           | 287             | SNRDFVEG                     | 294           | 287             | GNRDFVEGLSGATW                 | 300           |
|           | 311             | VTTMAKNKPTLDIE                | 324           | 299             | SWVDIVLEH                    | 307           | 311             | VTTMAKNK                       | 318           |
|           | 329             | EVTNPAVLR                     | 338           | 311             | VTTMAKNKPTLDFE               | 324           | 347             | NITTD SRCPTQGEAV<br>LPEEQ      | 366           |
|           | 341             | IEAKISNTT                     | 349           | 353             | RCPTQGEPSLNEEQD              | 367           | 376             | VDRGWGNG                       | 384           |
|           | 353             | RCPTQGEATLVEEQD               | 367           | 371             | ICKHSMVDRGWGNGC              | 385           | 401             | CLEPIEGKVQYEN                  | 414           |
|           | 371             | VCRRTFVDRGWGNG                | 384           | 389             | GKGGIVTC                     | 396           | 419             | VIIIVHTGDQHQVGN<br>TQGV        | 438           |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |   |               | DENV-2          |   |               | DENV-3  |                          |               |
|-----------|-----------------|---|---------------|-----------------|---|---------------|---|--------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                                       | Posição final | Posição inicial | Seqüência   | Posição final | Posição inicial   | Seqüência                | Posição final |
| E         | 407             | GKIVQYEN  | 414           | 401             | CKKNMEGKVVLPENL<br>EYTIVITPHSGE   | 427           | 449   | TEAILPEYGTGLGLE          | 462           |
|           | 420             | IVTVHTGD  | 427           | 431             | VGNDTGKH  | 438           | 465   | PRTGLDFN                 | 472           |
|           | 455             | LTDYGALTL                                       | 463           | 455             | LTGYGVTM  | 463           | 483   | AWMVHRQW                 | 490           |
|           | 467             | PRTGLDFNEMVLLTM<br>KEKSWLVHK QWFLD<br>LPLPWTSGA | 504           | 467             | PRTGLDFNEMVLLQMEEKAWLVHRQW<br>FLDLPLPWLPGADTQGSNWIQKETLV<br>TFKNPHAKKQDVVVLGSEQEGAMH<br>TALTGATEIQMSSGNLL | 558           | 507   | PTWNRKELLVT<br>FKNAHAKKQ | 526           |
|           | 509             | ETWNRQDL  | 516           | 563             | LKCLRMDKQLQKGM  | 577           | 530   | EGAMHTAL                 | 548           |
|           | 521             | KTAHAKKQEVVVLG                                  | 534           | 587             | KIVKEIAETQHGTIVIRVQYE   | 607           | 569   | KLELKGMS                 | 576           |
|           | 539             | AMHTALTG  | 546           | 617             | FEIMDLEKRHALGRLITVNPVTEKDS<br>PVNIEAEPFPGDSYIIIGVEP<br>GQLKLNWFKKGSSIGQ<br>MFETTMRGAKRMAILGDTAW           | 700           | 587   | KKEVSETQ                 | 594           |
|           | 617             | FLTQDEKGVTVQNGRLITAN<br>PIVTDKEKPVNIE           | 648           | 737             | ILIGVIIT  | 744           | 599   | LIKVEYKG                 | 606           |
|           | 683             | EATARGARRMAILGDTAWDF                            | 702           | 755             | LSVSLVLVGVVTLYL GAMVQAD   | 775           | 623   | KAHNGRLI                 | 630           |
|           | 707             | GVFTSVGKLVHQVFG                                 | 721           |                 |   |               | 635   | VVTKKEEPVNIEAEPFPGES     | 654           |
| 743       | LTWLGLNS        | 750   |               |                 |   | 659           | GIGDKALKINWYRKGS<br>SIGKMFEATARG<br>ARRMAILGDTAWDFGS LNSLGKMV | 702                      |               |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |                                    |               | DENV-2          |               |               | DENV-3          |                                     |               |
|-----------|-----------------|------------------------------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|-------------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                          | Posição final | Posição inicial | Seqüência     | Posição final | Posição inicial | Seqüência                           | Posição final |
| E         | 761             | AVGMVTLY                           | 768           |                 |               |               | 707             | LNSLGKMV                            | 714           |
|           |                 |                                    |               |                 |               |               | 743             | WIGLNSKN                            | 750           |
| NS1       | 797             | TNEVHTWTEQYKFQADS<br>PKRLSAAIGRAWE | 826           | 797             | TDNVHTWT      | 805           | 803             | WTEQYKFQ                            | 808           |
|           | 833             | RSATRLLENIMWKQISNELN               | 851           | 809             | FQPESPSK      | 816           | 830             | IRSTTRMENLLWKQ<br>IANELNYILWENNIKLT | 860           |
|           | 869             | NGILAQQGKMMIRPQP<br>MEHSWGKAK      | 897           | 832             | IRSVTR        | 837           | 867             | LTPQPMELK                           | 875           |
|           | 904             | QNTTFIID                           | 911           | 923             | RAWNSLEV      | 930           | 906             | FIIDGPNT                            | 913           |
|           | 923             | RAWNIWEVEDYGF                      | 936           | 941             | NIWLKRE       | 948           | 921             | RAWNVWEVEDYGF<br>GVFTTNIWKLKREYVYQ  | 950           |
|           | 965             | DSKAVHADMGYWIESEK<br>NETWKLARA     | 990           | 971             | ADMGYWIESALND | 983           | 961             | VKDERAVHADMGYWIESQKN                | 980           |
|           | 1004            | HTLWSNGVLE                         | 1013          | 1037            | TQTAGPWH      | 1044          | 1032            | GYHTQTAGPWHLGK                      | 1045          |
|           | 1025            | PISQHNYPGYFT<br>QTAGPWHLGK         | 1047          | 1108            | MEIRPLKEKE    | 1117          | 1066            | TRGPSLRTTT                          | 1075          |
|           | 1070            | GPSLRTTT                           | 1077          |                 |               |               | 1093            | PLRYMGED                            | 1100          |
|           | 1110            | IRPVKEKE                           | 1117          |                 |               |               | 1106            | MEIRPISEKE                          | 1116          |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |                              |               | DENV-2          |   |               | DENV-3          |                                |               |
|-----------|-----------------|------------------------------|---------------|-----------------|---|---------------|-----------------|--------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                    | Posição final | Posição inicial | Seqüência   | Posição final | Posição inicial | Seqüência                      | Posição final |
| NS1       | 1118            | ENLVRSMV                     | 1125          |                 |   |               |                 |                                |               |
| NS2a      | 1140            | LCVSIMIEEVMRSRWGK            | 1157          | 1140            | LGMALFLEEMLRTRV<br>GTKHVILLVAVSFV<br>TLITGNMSFRDLGR | 1182          | 1138            | LCLAILFEEVMRG<br>KFGKKHMIAGVFF | 1163          |
|           | 1170            | LIMGQLTWNDLI                 | 1181          | 1196            | GMGVTYLALLAAFKVRPTFAAGLLLR                          | 1221          | 1168            | LLSGQITWRDMAH                  | 1180          |
|           | 1202            | LMATLKMRPMFA<br>VGLLFRRLTSRE | 1227          | 1255            | ALGMMVLK  | 1262          | 1194            | GMGVTYLALIATFKIQPFLA           | 1213          |
|           | 1255            | AMGIMMLKLL                   | 1264          | 1308            | LLTSSQKQ  | 1315          | 1218            | LRKLTSSRE                      | 1225          |
|           | 1287            | LDYAWKTTAM                   | 1297          | 1320            | PLALTIKGLNPTAI                                      | 1333          | 1312            | RKTDWLPM                       | 1319          |
|           | 1332            | TMFLITENEIWGRK               | 1345          | 1338            | LSRTSKKR  | 1345          | 1330            | PLFIFSLKDTLKRR                 | 1343          |
| NS2b      | 1346            | SWPLNE                       | 1351          | 1364            | SLLKNDI   | 1371          | 1343            | SWPLNEGVM                      | 1353          |
|           | 1364            | SLLKNDV                      | 1371          | 1426            | DGMSIKNEEEQTLTILIRTG                                | 1447          | 1361            | ASSLLRNDVPMAGPL                | 1375          |
|           | 1401            | AAEVSWE                      | 1407          | 1469            | WEVKKQR   | 1475          | 1399            | AADITWEEEAQ                    | 1410          |
|           | 1425            | DDGTMKIKDEERDDLTKAT          | 1447          |                 |   |               | 1418            | MITVDDDGTMRIKDETE              | 1435          |
|           | 1469            | WQKKKQR                      | 1475          |                 |   |               | 1467            | WQKQTR                         | 1473          |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |                           |               | DENV-2          |                                |               | DENV-3          |                               |               |
|-----------|-----------------|---------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------|---------------|-----------------|-------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                 | Posição final | Posição inicial | Seqüência                      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                     | Posição final |
| NS3       | 1476            | SGVLW                     | 1480          | 1476            | AGVLWDVPSPPV                   | 1488          | 1474            | SGVLWDVPSPPETQ                | 1487          |
|           | 1503            | RGLLGRSQ                  | 1510          | 1495            | DGAYRIKQRGILGYSQ               | 1510          | 1523            | WHVTRGAV                      | 1530          |
|           | 1529            | RGAVLMYQ                  | 1536          | 1519            | GTFHTMWHVTRGA<br>VLMHRGKRIEPSW | 1544          | 1537            | RLEPNWASVKKDL<br>ISYGGGWRLSA  | 1560          |
|           | 1549            | KDLISYGGGWRFQG            | 1562          | 1548            | KDLISYGGGWKLEG                 | 1562          | 1600            | ALDFKPGTSGSPIIN<br>REGKVVGLYG | 1624          |
|           | 1581            | PKNVQTP                   | 1588          | 1584            | VQTKPGLFKT                     | 1593          | 1655            | EMFKRNLTIM<br>DLHPGSGKTRK     | 1676          |
|           | 1614            | IVNREGKIVGLYG             | 1626          | 1599            | GAVSLDFS                       | 1606          | 1681            | IVREAIKRRLTLIL<br>APTRVVAEM   | 1705          |
|           | 1657            | EVFKRNLTIMD<br>LHPGSGKTRR | 1678          | 1611            | GSPIVDRK                       | 1618          | 1711            | GLPIRYQT                      | 1718          |
|           | 1693            | RTLILA                    | 1698          | 1652            | PEIEDDFRK                      | 1661          | 1754            | YNLIIMDEA                     | 1760          |
|           | 1711            | LKGMPYRYQTTA              | 1722          | 1672            | GAGTKRY                        | 1678          | 1773            | ISTRVGMGEAA                   | 1784          |
|           | 1854            | NGKRVIQLSRKT              | 1865          | 1688            | IVREAIKRGLRTLI                 | 1696          | 1808            | DEERDIPERSWN<br>SGNEWITDFAG   | 1830          |
|           | 1872            | KTKNNDWD                  | 1879          | 1702            | VVAEMEE                        | 1712          | 1856            | VIQLSRKTFD                    | 1865          |
|           | 1929            | SAAQRRGRIGRNQN            | 1942          | 1725            | TEHTGREIVD                     | 1734          | 1878            | WDFVTTDIS                     | 1885          |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epítopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |              |               | DENV-2          |                              |               | DENV-3          |                                      |               |
|-----------|-----------------|--------------|---------------|-----------------|------------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência    | Posição final | Posição inicial | Seqüência                    | Posição final | Posição inicial | Seqüência                            | Posição final |
| NS3       | 1971            | LDNINTPE     | 1978          | 1738            | HATFTMRLSPVR<br>VPNYNLIIMDEA | 1762          | 1887            | MGANFKADRVIDPR                       | 1900          |
|           | 1999            | YRLRGEAR     | 2006          | 1770            | IAARGYISTRVEMGEAA            | 1786          | 1926            | ASAAQRRGRVG<br>RNPQKENDQYIFTGQ       | 1951          |
|           | 2021            | WLSYKVAS     | 2028          | 1806            | APIMDEEREIPERS               | 1819          | 1971            | NINTPEGIIPALFE<br>PEREKS             | 1990          |
|           | 2061            | EGERKKLRPRWL | 2072          | 1861            | LSRKTFDSEYVKTRTNDWDF         | 1879          | 1995            | GEYRLKGESR                           | 2004          |
|           | 2088            | EFAAGRR      | 2094          | 1895            | ERVIDPRR                     | 1903          | 2009            | ELMRRGDLPVWLAHKVAS                   | 2026          |
|           |                 |              |               | 1943            | NENDQYIY                     | 1950          | 2040            | ERNNQILE                             | 2048          |
|           |                 |              |               | 1967            | AKMLLDNI                     | 1974          | 2061            | EKKKLRPRWLDART<br>YSDPLALKEFKDFAAGRK | 2092          |
|           |                 |              |               | 1979            | GIIPSMFE                     | 1986          |                 |                                      |               |
|           |                 |              |               | 1999            | YRLRGEAR                     | 2006          |                 |                                      |               |
|           |                 |              |               | 2011            | DLMRRGDLPVWLAY               | 2024          |                 |                                      |               |
|           |                 |              |               | 2043            | IKNNQILEEN                   | 2052          |                 |                                      |               |
|           |                 |              |               | 2058            | WTKEGERK                     | 2065          |                 |                                      |               |
|           |                 |              | 2085          | FKEFAAGRK       | 2094                         |               |                 |                                      |               |



Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |            |               | DENV-2          |                |               | DENV-3          |                                  |               |
|-----------|-----------------|------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência  | Posição final | Posição inicial | Seqüência      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                        | Posição final |
| NS4a      | 2132            | GKAYRHAME  | 2140          | 2095            | SLTLNLI        | 2101          | 2093            | SIALDLVTEIGRVPS<br>HLAHKTRNALDNL | 2120          |
|           | 2190            | WMASVEPH   | 2197          | 2107            | LPTFMTQK       | 2114          | 2124            | HTSEHGGRAYRHAV                   | 2137          |
|           | 2212            | LLIPEPDR   | 2219          | 2126            | HTAEAGGR       | 2132          | 2185            | MLWMAEIPLO                       | 2195          |
|           |                 |            |               | 2168            | SGKGIGKM       | 2175          | 2217            | KQRTPQDNQ                        | 2225          |
| NS4b      | 2252            | TTKKDLGIG  | 2260          | 2252            | KTKKDLGL       | 2259          | 2251            | TTKRDLGMSKE                      | 2261          |
|           | 2371            | QAKATREAQK | 2389          | 2272            | ILDIDLRP       | 2279          | 2270            | YLDVDLHPASA                      | 2280          |
|           | 2464            | GGRRGTGA   | 2478          | 2284            | TPMLRHSIEN     | 2303          | 2294            | MLRHTIEN                         | 2301          |
|           | 2490            | RTAAGIMKN  | 2497          | 2371            | QAKATREAQKRAAG | 2385          | 2363            | IIGPGLQAKATREA<br>QKRTAAGIMKN    | 2387          |
|           |                 |            |               | 2408            | KFEKQLGQ       | 2415          | 2442            | GPITTLWEGSPGKFW                  | 2456          |
|           |                 |            |               | 2444            | GPISTLWEGNPGRF | 2457          | 2468            | FRGSYLAGA                        | 2476          |
|           |                 |            |               | 2464            | VSMANIFR       | 2471          |                 |                                  |               |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epítopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1                         |  |               | DENV-2          |                                |               | DENV-3          |                  |               |
|-----------|--------------------------------|--|---------------|-----------------|--------------------------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|
|           | Posição inicial                | Seqüência  | Posição final | Posição inicial | Seqüência                      | Posição final | Posição inicial | Seqüência        | Posição final |
| NS5       | 2502                           | LGEKWKRQLNQLSK                                     | 2515          | 2497            | NIGETLGEKWKSRLNTLGK            | 2515          | 2489            | GKRG TG SQ       | 2496          |
|           | 2536                           | EGLKRGETTKHAVS<br>RGTAKLRWFVER                     | 2561          | 2521            | YKKSGIQEVDRTLA<br>KEGIKRGETDHH | 2546          | 2501            | GEKWKKKL         | 2508          |
|           | 2594                           | KGYTKGGP   | 2601          | 2551            | GSAKLRWF                       | 2568          | 2528            | DRTEAKEGLKRGEI   | 2541          |
|           | 2659                           | KMVEPWLRGN   | 2669          | 2596            | LTKGGPGHEEPIPM                 | 2608          | 2552            | KLQWFVERNMVIEPEG | 2566          |
|           | 2685                           | TLEQMQRKHGGM<br>LVRNPLSRNST                        | 2707          | 2619            | LQSGVDVF                       | 2626          | 2592            | RGYTKGGPGH       | 2601          |
|           | 2724                           | VNMTSRLNRF<br>TMAHRKPTY                            | 2744          | 2646            | NPTIEAGR                       | 2653          | 2621            | KDVFYLP          | 2628          |
|           | 2765                           | NLDIIGQRIENIKN<br>EHKSTWHYDE                       | 2788          | 2660            | LAENWLNN                       | 2667          | 2642            | SPTVEESR         | 2651          |
|           | 2839                           | PFQQRVFKE  | 2848          | 2688            | ETLQRKYGGALVRNPLSRNSTH         | 2709          | 2657            | KMVEPWLKNN       | 2666          |
|           | 2854                           | RTPRAKR  | 2860          | 2724            | SVNMISRM                       | 2731          | 2677            | MPTVIEHL         | 2684          |
|           | 2889                           | EFIRKVRNAAIGAVFDEN<br>QWNSAKEAVEDER<br>FWDLVHREREL | 2933          | 2766            | NLDIIGKRIEKIKQEHWTSW           | 2785          | 2697            | RNPLSRNSTHEMYWI  | 2711          |
|           | 2938                           | KCATCVYN   | 2945          | 2790            | DHPYKTWAYHGSYE                 | 2803          | 2728            | LLLNRFTM         | 2735          |
| 2949      | GKREKKGREKKG<br>EFGKAKGSRAIWYM | 2969   | 2813          | MVNGVVRL        | 2821                           | 2747          | VDLGAGTRHVNAEP  | 2759             |               |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epítopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |                              |               | DENV-2          |                                      |               | DENV-3          |                                       |               |
|-----------|-----------------|------------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|-----------------|---------------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência                    | Posição final | Posição inicial | Seqüência                            | Posição final | Posição inicial | Seqüência                             | Posição final |
| NS5       | 2987            | DHWFSREN                     | 2994          | 2855            | RTQEPKEG                             | 2862          | 2764            | MDVIGERIKRIKEEH<br>NSTWHYDDENP        | 2789          |
|           | 3002            | GLHKLGYILRDISKIPG            | 3018          | 2866            | LMRITAEWLWKELG<br>KKKTPRMCTREEFTRKVR | 2897          | 2818            | LTKPWDVV                              | 2825          |
|           | 3079            | GTVMVISRRDQR<br>GSGQVGTYGLNT | 3104          | 2918            | AVEDSRFW                             | 2925          | 2852            | RTPRSMGTR                             | 2861          |
|           | 3133            | ERVDWLEKHG<br>AERLKRMAISGD   | 3155          | 2963            | GSRAIWYM                             | 2970          | 2892            | KVRTNAAMGA                            | 2901          |
|           | 3158            | VVKPIDRFA                    | 3167          | 2982            | LGFLNEDH                             | 2989          | 2924            | LVDREREL                              | 2931          |
|           | 3189            | SKGWNDWQQ                    | 3197          | 3001            | EGEGLHRLGY                           | 3010          | 2979            | LGFLNEDHWFSRENS                       | 2993          |
|           | 3203            | HHFHQLIM                     | 3210          | 3027            | DTAGWDTRITLED                        | 3039          | 3023            | DTAGWDTRITEDDLH<br>NEEKITQQMDPEHRQLAN | 3055          |
|           | 3226            | LVGRARVS                     | 3233          | 3073            | VQRPTPRGTVMDIISR                     | 3088          | 3087            | QRGSGQVGT<br>YGLNTFTNME               | 3105          |
|           | 3248            | KSYAQMWQL<br>MYFHRRDLRLA     | 3267          | 3091            | QRGSGQVG                             | 3097          | 3122            | ADLENPHLPE                            | 3131          |
|           | 3288            | SIHAHHQWMT                   | 3297          | 3138            | QNWLARVGRE<br>RLSRMAISGDD            | 3158          | 3137            | WLETGVE                               | 3144          |
|           | 3319            | KTHVSSWE                     | 3326          | 3185            | IQWEPSRG                             | 3193          | 3157            | VVKPIDRFA                             | 3166          |
|           | 3373            | DYMTSMKRFKNESDP              | 3387          | 3225            | QDELIGRARISQGAGWS                    | 3241          | 3228            | RARISQGA                              | 3235          |

Quadro 3 (continuação): Relação dos epitopos B lineares de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 identificados, empregando mistura de soros de pacientes específicos a cada sorotipo. Os peptídeos foram sintetizados através da metodologia de síntese paralela contendo 10 a 15 aminoácidos com sobreposição de 5 resíduos. Os resultados foram resultantes de 3 experimentos realizados em datas independentes.

| Proteínas | DENV-1          |           |               | DENV-2          |                |               | DENV-3          |                               |               |
|-----------|-----------------|-----------|---------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|-------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência | Posição final | Posição inicial | Seqüência      | Posição final | Posição inicial | Seqüência                     | Posição final |
| NS5       |                 |           |               | 3250            | KSYAQMWTLMYFHR | 3263          | 3259            | HRRDLRLA                      | 3266          |
|           |                 |           |               | 3321            | KTPVESWE       | 3329          | 3289            | HAHHQWMT                      | 3297          |
|           |                 |           |               | 3375            | DYMPSMKR       | 3382          | 3312            | NPWMEDKTPVTTW<br>ENVPYLGKREDQ | 3336          |
|           |                 |           |               |                 |                |               | 3342            | IGLTSRATWA                    | 3351          |
|           |                 |           |               |                 |                |               | 3378            | KRFRKEEES                     | 3386          |

### 5.5. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO EXPERIMENTAL DA SÍNTESE PARALELA E MÉTODO COMPUTACIONAL DE PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS

A fim de verificar a eficiência da utilização de programas computacionais para a identificação de epítopos consecutivos responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral, os resultados obtidos através da síntese paralela de peptídeos em membrana foram comparados com os parâmetros determinados por programas computacionais [estrutura secundária, Bepipred, Jameson & Wolf, Kolaskar e pela correlação dos índices de antigenicidade (Jameson & Wolf, Kolaskar e Bepipred)] – Figura 23. Todas as sequências que apresentavam identidade igual ou superior a 70% foram considerados.

A média observada entre os resultados obtidos por todos os parâmetros utilizados (estrutura secundária, jameson & Wolf, kolaskar, bepiped e união de antigenicidade: jameson & wolf, bepiped e kolaskar) foi de 46,04%, 50,28% e 46,18% para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente.

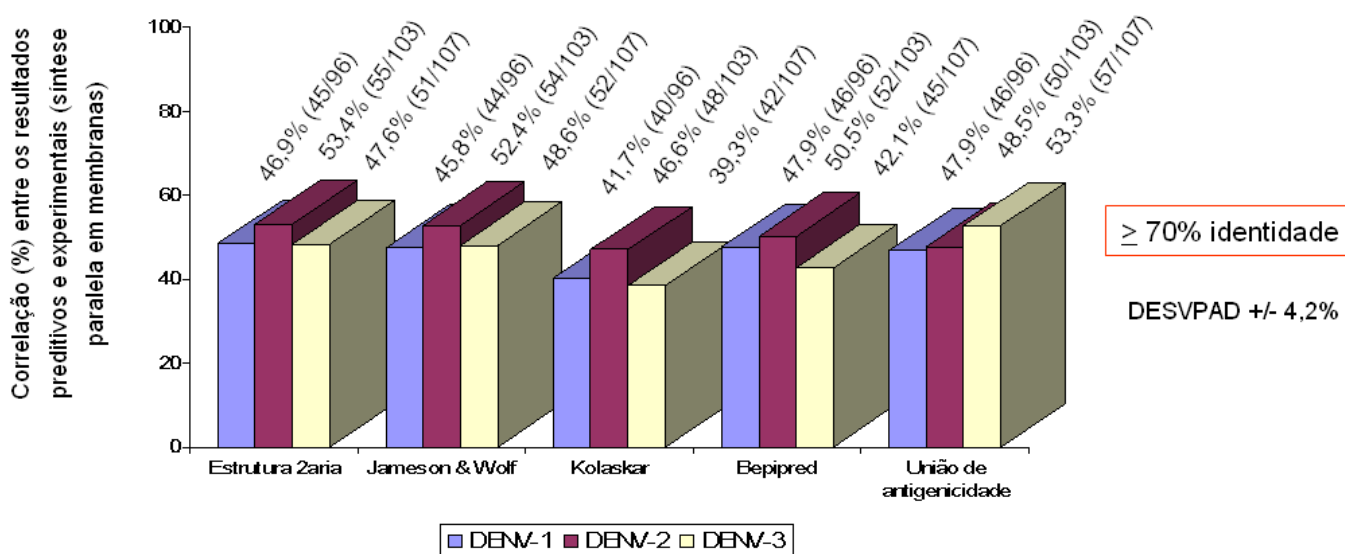


Figura 23: Correlação entre os métodos preditivos (computacionais) e experimentais (síntese paralela de peptídeos em membranas) de determinação de epítopos dos DENV

## **5.6. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPITOPOS ESPECÍFICOS E COMUNS AO GRUPO DENGUE E O GÊNERO *FLAVIVIRUS***

Para verificar a existência de epitopos específicos e/ou de grupo, a biblioteca correspondente a cada proteína do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 foi testada contra misturas de soros de pacientes com os outros sorotipos de dengue, de modo que a biblioteca de uma proteína do DENV-1 foi testada contra misturas de soros de pacientes com DENV-2 e DENV-3; os de DENV-2 foram testados contra misturas de soros de paciente com DENV-1 e DENV-3, e assim sucessivamente. Este procedimento, que foi denominado de teste de reação cruzada, possibilitou a identificação precisa de epitopos reativos para os DENV.

No Quadro 4 são apresentados os resultados da especificidade dos epitopos dos DENV-1, DENV-2 ou DENV-3 e comuns aos 3 sorotipos dos DENV de todas as proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, empregando mistura de soros de pacientes com outros sorotipos. Epitopos reativos para 2 sorotipos não foram contemplados.

Um total de 71, 56 e 68 epitopos dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente, reagiram aos 3 sorotipos do grupo dengue, enquanto que 3, 9 e 11 epitopos reagiram de forma específica aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente.

Quadro 4: Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPOS | # EPITOPOS DETERMINADOS* | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |
|-----------|-----------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|
|           |           |                          | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS |
| C         | 1         | 4                        | 7                       | KKTGRPSFNMLKRARNRVSTGS            | 27            | 0               |                        |
|           |           |                          | 35                      | GLLSGQGPMK                        | 45            |                 |                        |
|           |           |                          | 51                      | IAFLRFLAIP                        | 60            |                 |                        |
|           |           |                          | 89                      | SSMLNIMNRR                        | 98            |                 |                        |
|           | 2         | 4                        | 6                       | KKARSTPFNMLKRERNRVSTVQ            | 27            | 0               |                        |
|           |           |                          | 51                      | ALVAFLRFLT                        | 58            |                 |                        |
|           |           |                          | 61                      | PTAGILKRWG                        | 70            |                 |                        |
|           |           |                          | 96                      | NRRRRRTAGVI                       | 105           |                 |                        |
|           | 3         | 4                        | 7                       | KTGKPSINMLKVRNRVSTG               | 26            | 0               |                        |
|           |           |                          | 38                      | LNGQGPMK                          | 45            |                 |                        |
|           |           |                          | 51                      | IAFLRFLAIP                        | 60            |                 |                        |
|           |           |                          | 91                      | MLSIINKRKK                        | 100           |                 |                        |
| PrM/M     | 1         | 4                        | 115                     | FHLTTRGG                          | 122           | 0               |                        |
|           |           |                          | 165                     | KCPRITEA                          | 173           |                 |                        |
|           |           |                          | 195                     | SQTGEHRRDKRSVA                    | 209           |                 |                        |
|           |           |                          | 230                     | AWKQIQKVETWALRH                   | 244           |                 |                        |
|           | 2         | 4                        | 115                     | FHLTTRNGEPHMIV                    | 128           | 0               |                        |
|           |           |                          | 165                     | KCPLLQNE                          | 174           |                 |                        |
|           |           |                          | 196                     | TTGEHRRE                          | 203           |                 |                        |
|           |           |                          | 208                     | ALVPHVGM                          | 215           |                 |                        |
|           |           |                          | 231                     | WKHVQRIET                         | 239           |                 |                        |
|           | 3         | 4                        | 115                     | FHLTSRDG                          | 122           | 0               |                        |
|           |           |                          | 195                     | NQAGERRRDKRSVA                    | 209           |                 |                        |
|           |           |                          | 238                     | ETWALRHP                          | 245           |                 |                        |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epitopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epitopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPOS | # EPITOPOS DETERMINADOS* | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |
|-----------|-----------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           |           |                          | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECIFICAS | Posição final |
| E         | 1         | 18                       | 287                     | GNRDFVEGLSGATWVDVLEH              | 307           | 341             | IEAKISNTT              | 349           |
|           |           |                          | 311                     | VTTMAKNK                          | 318           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 329                     | EVTNPAVLR                         | 338           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 359                     | EATLVEEQD                         | 367           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 377                     | VDRGWGNG                          | 384           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 407                     | GKIVQYEN                          | 414           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 420                     | IVTVHTGD                          | 427           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 467                     | PRTGLDFN                          | 474           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 479                     | LTMKEKSWLVHK QW                   | 492           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 509                     | ETWNRQDL                          | 516           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 521                     | KTAHAKKQ                          | 528           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 617                     | FLTQDEKGVTQNGRLITANPIVTDKEKPVNIE  | 648           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 683                     | EATARGARRMAILG                    | 696           |                 |                        |               |
|           | 714       | KLVHQVFG                 | 721                     |                                   |               |                 |                        |               |
|           | 743       | LTWLGLNS                 | 750                     |                                   |               |                 |                        |               |
|           | 2         | 15                       | 300                     | WVDIVLEH                          | 307           | 371             | ICKHSM                 | 376           |
|           |           |                          | 311                     | VTTMAKNKPTLDFE                    | 324           | 389             | GKGGIVTC               | 396           |
|           |           |                          | 377                     | VDRGWGNGC                         | 385           | 455             | LTGYGTVM               | 463           |
|           |           |                          | 401                     | CKKNMEGKVVLPEN                    | 414           | 631             | LITVNPIVTEKDSPVN       | 646           |
|           |           |                          | 420                     | VITPHSGE                          | 427           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 431                     | VGNDTGKH                          | 438           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 467                     | PRTGLDFN                          | 474           |                 |                        |               |
|           |           |                          | 509                     | SNWIQKET                          | 516           |                 |                        |               |
| 521       |           |                          | KNPHAkkQ                | 528                               |               |                 |                        |               |
| 623       |           |                          | EKRHALGR                | 630                               |               |                 |                        |               |



Quadro 4 (continuação): Identificação de epitopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epitopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPOS | # EPITOPOS DETERMINADOS* | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |                            |                 |                        |               |     |
|-----------|-----------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------|------------------------|---------------|-----|
|           |           |                          | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final              | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS | Posição final |     |
| E         | 3         | 19                       | 287                     | GNRDFVEG                          | 294                        | 457             | GTLGLE                 | 462           |     |
|           |           |                          | 376                     | VDRGWGNG                          | 384                        | 645             | IEAEPPFGES             | 654           |     |
|           |           |                          | 401                     | CLEPIEGKVVQYEN                    | 414                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 465                     | PRTGLDFN                          | 472                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 507                     | PTWNRKEL                          | 514                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 599                     | LIKVEYKG                          | 606                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 623                     | KAHNGRLI                          | 630                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 635                     | VVTKKEEPVN                        | 644                        |                 |                        |               |     |
| NS1       | 1         | 10                       | 743                     | WIGLNSKN                          | 750                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 811                     | ADSPKRLSAA                        | 820                        | 892             | SWGKAK                 | 897           |     |
|           |           |                          | 833                     | RSATRL                            | 837                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 904                     | QNTTFIID                          | 911                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 923                     | RAWNIWEV                          | 930                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 971                     | ADMGYWIE                          | 978                        |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 1006                    | LWSNGVLE                          | 1013                       |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 1025                    | PISQHN                            | 1030                       |                 |                        |               |     |
|           | 2         | 8                        |                         | 1040                              | AGPWHLGK                   | 1047            |                        |               |     |
|           |           |                          |                         | 797                               | TDNVHTWT                   | 805             | 811                    | PESPSK        | 816 |
|           |           |                          |                         | 832                               | IRSVTR                     | 837             |                        |               |     |
|           |           |                          |                         | 923                               | RAWNSLEV                   | 930             |                        |               |     |
|           |           |                          |                         | 943                               | WLKLRE                     | 948             |                        |               |     |
|           | 3         | 10                       |                         | 976                               | WIESALND                   | 983             |                        |               |     |
|           |           |                          |                         | 803                               | WTEQYKFQ                   | 808             | 867                    | LTPQPMELK     | 874 |
|           |           |                          |                         | 830                               | IRSTTRMENLLWKQIANELNYILWEN | 856             | 906                    | FIIDGPNT      | 913 |
|           |           |                          |                         | 921                               | RAWNVWEV                   | 928             |                        |               |     |
|           |           |                          |                         | 973                               | YWIESQKN                   | 980             |                        |               |     |
| 1038      |           |                          |                         | AGPWHLGK                          | 1045                       |                 |                        |               |     |
|           |           |                          | 1066                    | TRGPSLRT                          | 1073                       |                 |                        |               |     |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPO | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |
|-----------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           |          |                         | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECIFICAS | Posição final |
| NS1       |          |                         | 1093                    | PLRYMGED                          | 1100          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1106                    | MEIRPISE                          | 1114          |                 |                        |               |
| NS2a      | 1        | 7                       | 1146                    | IEEVMRSRWGK                       | 1157          | 1255            | AMGIMMLKLL             | 1264          |
|           | 2        | 6                       | 1152                    | TRVGTKHV                          | 1159          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 1175                    | MSFRDLGR                          | 1182          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1338                    | LSRTSKKR                          | 1345          |                 |                        |               |
|           | 3        | 6                       | 1142                    | ILFEEVMRGK                        | 1151          | 1194            | GMGVTY                 | 1199          |
|           |          |                         | 1312                    | RKTDWLPM                          | 1319          | 1220            | KLTSRE                 | 1225          |
| 1330      |          |                         | PLFIFSLKDTLKRR          | 1343                              |               |                 |                        |               |
| NS2b      | 1        | 5                       | 1364                    | SLLKNDV                           | 1371          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 1401                    | AAEVSWE                           | 1407          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1469                    | WQKKKQR                           | 1475          |                 |                        |               |
|           | 2        | 3                       | 1364                    | SLLKNDI                           | 1371          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 1440                    | LTILIRTG                          | 1447          |                 |                        |               |
|           | 3        | 5                       | 1343                    | SWPLNEGVM                         | 1353          | 0               |                        |               |
| 1361      |          |                         | ASSLLRND                | 1368                              |               |                 |                        |               |
| 1399      |          |                         | AADITWEE                | 1407                              |               |                 |                        |               |
| NS3       | 1        | 17                      | 1503                    | RLLGRSQ                           | 1510          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 1529                    | RGAVLMYQ                          | 1536          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1553                    | SYGGGWRFGQ                        | 1562          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1614                    | IVNREGKIVGLYG                     | 1626          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1665                    | TIMDLHPGSGKTRR                    | 1678          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1872                    | KTKNNDWD                          | 1879          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1929                    | SAAQRR                            | 1934          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 1971                    | LDNINTPE                          | 1978          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2021                    | WLSYKVAS                          | 2028          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2061                    | EGERKKLRPRWL                      | 2072          |                 |                        |               |
| 2088      | EFAAGRR  | 2094                    |                         |                                   |               |                 |                        |               |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPO        | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |
|-----------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           |                 |                         | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS | Posição final |
| NS3       | 2               | 25                      | 1481                    | DVPSPPP                           | 1488          | 1702            | VVAAEMEEAL             | 1711          |
|           |                 |                         | 1495                    | DGAYRIKQRGILGYSQ                  | 1510          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1531                    | AVLMHRGK                          | 1538          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1672                    | GAGKTKRY                          | 1678          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1688                    | IVREAIKRLRTLI                     | 1696          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1945                    | NDQYIY                            | 1950          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 2085                    | FKEFAAGRK                         | 2094          |                 |                        |               |
|           | 3               | 19                      | 1479                    | VPSPPETQ                          | 1487          | 1600            | ALDFKP                 | 1605          |
|           |                 |                         | 1524                    | HVTRG                             | 1528          | 1701            | VAAEM                  | 1705          |
|           |                 |                         | 1537                    | RLEPNWASVKKDLISYGGGWRLSA          | 1560          | 1939            | QKENDQYIFTGQ           | 1951          |
|           |                 |                         | 1611                    | IINREGKVVGLYG                     | 1624          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1661                    | NLTIMDLHPGSGKTRK                  | 1676          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1681                    | IVREAIKRRL                        | 1691          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1694                    | LILAPTRV                          | 1700          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1711                    | GLPIRYQT                          | 1718          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1753                    | NLIIMDEA                          | 1760          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1773                    | ISTRVGMGEAA                       | 1784          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1808                    | DEERDIPE                          | 1815          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1856                    | VIQLSRKTFD                        | 1865          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1878                    | WDFVTTD                           | 1883          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1893                    | ADRVIDPR                          | 1900          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1926                    | ASAAQRRG                          | 1933          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1971                    | NINTPEGIIPALFEPEREKS              | 1990          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 1997                    | YRLKGESR                          | 2004          |                 |                        |               |
|           |                 |                         | 2009                    | ELMRGDLPVWLAHK                    | 2023          |                 |                        |               |
| 2040      | ERNNQILE        | 2048                    |                         |                                   |               |                 |                        |               |
| 2061      | EKKKLRPRWLDARTY | 2074                    |                         |                                   |               |                 |                        |               |
| 2085      | KDFAAGRK        | 2092                    |                         |                                   |               |                 |                        |               |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPO | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |
|-----------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           |          |                         | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS | Posição final |
| NS4a      | 1        | 3                       | 2190                    | WMASVEPH                          | 2197          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2212                    | LLIPEPDR                          | 2219          |                 |                        |               |
|           | 2        | 4                       | 0                       |                                   |               | 2095            | SLTNL                  | 2101          |
|           | 3        | 4                       | 2093                    | SIALDLVT                          | 2100          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2105                    | VPSHLAHT                          | 2113          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2185                    | MLWMAEIPLQ                        | 2195          |                 |                        |               |
| NS4b      | 1        | 4                       | 2252                    | TTKKDLGI                          | 2259          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2371                    | QAKATREAQK                        | 2389          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2464                    | GRRGTGA                           | 2478          |                 |                        |               |
|           | 2        | 7                       | 2252                    | KTKKDLGL                          | 2259          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2286                    | MLRHSIEN                          | 2303          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2450                    | WEGNPGRF                          | 2457          |                 |                        |               |
|           | 3        | 6                       | 2251                    | TTKRD LGM                         | 2257          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2270                    | YLDVDLHP                          | 2277          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2294                    | MLRHTIEN                          | 2301          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2369                    | QAKATREAQKRTAAGIMKN               | 2387          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2442                    | GPITTLWEGSPGKFW                   | 2456          |                 |                        |               |
| NS5       | 1        | 24                      | 2536                    | EGLKRGET                          | 2543          | 0               |                        |               |
|           |          |                         | 2548                    | VSRGTAKL                          | 2555          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2594                    | KGYTKGGP                          | 2601          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2659                    | KMVEPWLRGN                        | 2669          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2685                    | TLEQMQRKHGGMLVRNPLSRNST           | 2707          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2724                    | VNMTSRLNRF TMAH                   | 2739          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2765                    | NLDIIG                            | 2770          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2854                    | RTPRAKR                           | 2860          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2889                    | EFIRKV                            | 2894          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2892                    | VFVDENQWNSAK                      | 2903          |                 |                        |               |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPO | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |
|-----------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           |          |                         | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS | Posição final |
| NS5       | 1        |                         | 2908                    | DERFWDLVHREREL                    | 2921          |                 | 0                      |               |
|           |          |                         | 3082                    | MVISRRD                           | 3089          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3135                    | VLDWLEKHGAERLKRMAISGD             | 3155          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3189                    | SKGWNDWQQ                         | 3197          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3203                    | HHFHQLIM                          | 3210          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3158                    | VVKPIDDRFA                        | 3167          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3248                    | KSYAQMWQLMYFHR                    | 3261          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3288                    | SIHAHHQWMT                        | 3297          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3319                    | KTHVSSWE                          | 3326          |                 |                        |               |
|           | 3373     | DYMTSMKRFKNESDP         | 3387                    |                                   |               |                 |                        |               |
|           | 2        | 27                      | 2497                    | NIGETLGEKWKSRLNTLGK               | 2515          | 2619            | LQSGVDVF               | 2626          |
|           |          |                         | 2533                    | LAKEGIKRGETDHH                    | 2546          | 2813            | MVNGVVRL               | 2821          |
|           |          |                         | 2688                    | ETLQRKYG                          | 2695          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2700                    | GALVRNPLSRN                       | 2710          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2772                    | KRIEKIKQEHETSW                    | 2785          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2790                    | DHPYKTWAYHGSYE                    | 2803          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2872                    | EWLWKELGKKKTPR                    | 2885          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 2890                    | MCTREEFTRKVR                      | 2897          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3001                    | EGEGLHRLGY                        | 3010          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3073                    | VQRPTPRGTVMDIISR                  | 3088          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3091                    | QRGSGQVG                          | 3097          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3138                    | QNWLARVGRERLSRMAISGDD             | 3158          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3185                    | IQQWEPSRG                         | 3193          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3231                    | RARISQGAGWS                       | 3241          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3250                    | KSYAQMWT                          | 3257          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3321                    | KTPVESWE                          | 3329          |                 |                        |               |
|           |          |                         | 3375                    | DYMPMKR                           | 3382          |                 |                        |               |

Quadro 4 (continuação): Identificação de epítopos específicos aos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e epítopos comuns ao grupo dengue, através da utilização da mistura de soros de pacientes com infecção por DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, em teste de reação cruzada.

| PROTEÍNAS | SOROTIPO | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |                                   |               |                 |                        |               |  |
|-----------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|--|
|           |          |                         | Posição inicial         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AO GRUPO DENGUE | Posição final | Posição inicial | SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS | Posição final |  |
| NS5       | 3        | 29                      | 2552                    | KLQWFVERNMVIPEG                   | 2566          | 2530            | TEAKEGLKRGEI           | 2541          |  |
|           |          |                         | 2621                    | KDVFYLPP                          | 2628          | 3031            | ITEDDLHNEE             | 3040          |  |
|           |          |                         | 2657                    | KMVEPWLKNN                        | 2666          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 2697                    | RNPLSRNSTHEMYWI                   | 2711          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 2782                    | WHYDDENP                          | 2789          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 2854                    | PRSMGTR                           | 2861          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 3047                    | DPEHRQLAN                         | 3055          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 3228                    | RARISQGA                          | 3235          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 3289                    | HAHHQWMT                          | 3297          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 3318                    | KTPVTTWENVPYLG                    | 3331          |                 |                        |               |  |
|           |          |                         | 3344                    | LTSRATWA                          | 3351          |                 |                        |               |  |

Para verificar a existência de epítopos de reação cruzada extra-grupo dengue, os epítopos específicos e comuns aos 3 sorotipos dos DENV foram avaliados contra a mistura de soros de pacientes com outras patologias e vacinados para febre amarela. Não foi verificada a reação cruzada quando utilizados soros de outras patologias, o que demonstra a alta especificidade dos epítopos identificados. Entretanto, na avaliação de soros de vacinados para febre amarela foi possível verificar que 9 epítopos reagiram cruzadamente (Quadro 5).

A homologia de seqüências entre o vírus da febre do Nilo (acesso GenBank número AF404757\_1), vírus da encefalite japonesa (acesso GenBank número AAF34186.1), vírus da febre amarela (acesso GenBank número AAC72235.1) e as seqüências dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 demonstrou que tais regiões são comuns a outros membros do gênero *Flavivirus* (dados não mostrados), o que sugere a existência de epítopos gênero-específicos.

Quadro 5: Epítopos comuns ao grupo dengue que reagiram com mistura de soros de vacinados para febre amarela.

| PROTEÍNAS | # EPÍTOPOS DETERMINADOS | TESTE DE REAÇÃO CRUZADA |   |               |
|-----------|-------------------------|-------------------------|---|---------------|
|           |                         | POSIÇÃO INICIAL         | SEQÜÊNCIAS COMUNS AOS MEMBROS DO GÊNERO <i>FLAVIVIRUS</i> | POSIÇÃO FINAL |
| E         | 1                       | 378                     | DRGWGNG   | 384           |
| NS1       | 1                       | 1106                    | MEIRP   | 1110          |
| NS3       | 4                       | 1668                    | D/FLHPGS/AGKT   | 1676          |
|           |                         | 1693                    | LILAPTRV  | 1700          |
|           |                         | 1927                    | SAAQRRG   | 1933          |
|           |                         | 2015                    | DLPVWL  | 2021          |
| NS5       | 3                       | 2699                    | PLSRNSTHEMYW  | 2710          |
|           |                         | 3091                    | QRGSGQV   | 3096          |
|           |                         | 3151                    | RMAISGDD  | 3158          |

## 5.7. LOCALIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS

Para a maioria das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, foram identificadas uma ou mais proteínas de estrutura 3D previamente elucidada, que foi utilizada como proteína-molde para a construção dos modelos tridimensionais (Quadro 6 e Figura 24).

Todos os moldes selecionados apresentavam regiões com alta flexibilidade de troca conformacional, e, portanto, baixa resolução em RMN ou cristalografia de raios-X, não sendo possível obter um molde capaz de elucidar todos os resíduos correspondentes a cada uma das proteínas analisadas.

Para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 com molde disponível, foram construídos 30 modelos no programa Modeller (versão 9v4), dos quais apenas um foi selecionado, baseando-se na função objetiva e nos resultados de validação obtidos pelos programas Procheck e Prove.

As proteínas NS1, NS2a, NS4a e NS4b não tiveram seus modelos construídos, devido à indisponibilidade de proteínas-moldes elucidadas. A proteína NS2b não teve sua estrutura modelada em virtude da baixa homologia com a sequência-alvo, o que poderia resultar na construção de zonas desordenadas, o que tornaria o resultado com baixa confiabilidade.

Quadro 6: Número de acesso das proteínas depositadas no banco de dados de proteínas, usadas em nosso estudo para a modelagem por homologia das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1     | DENV-2     | DENV-3 |
|-----------|------------|------------|--------|
| C         | 1R6R       | 1R6R       | 1R6R   |
| PrM-M     | 3C6D       | 3C6D       | 3C6D   |
| E         | 1TGE, 1TG8 | 1UZG, 2HG0 | 1TG8   |
| NS3       | 2V8O, 2Z83 | 2V8O, 2Z83 | 2V8O   |
| NS5       | 2P3Q       | 2P3Q       | 2P3Q   |



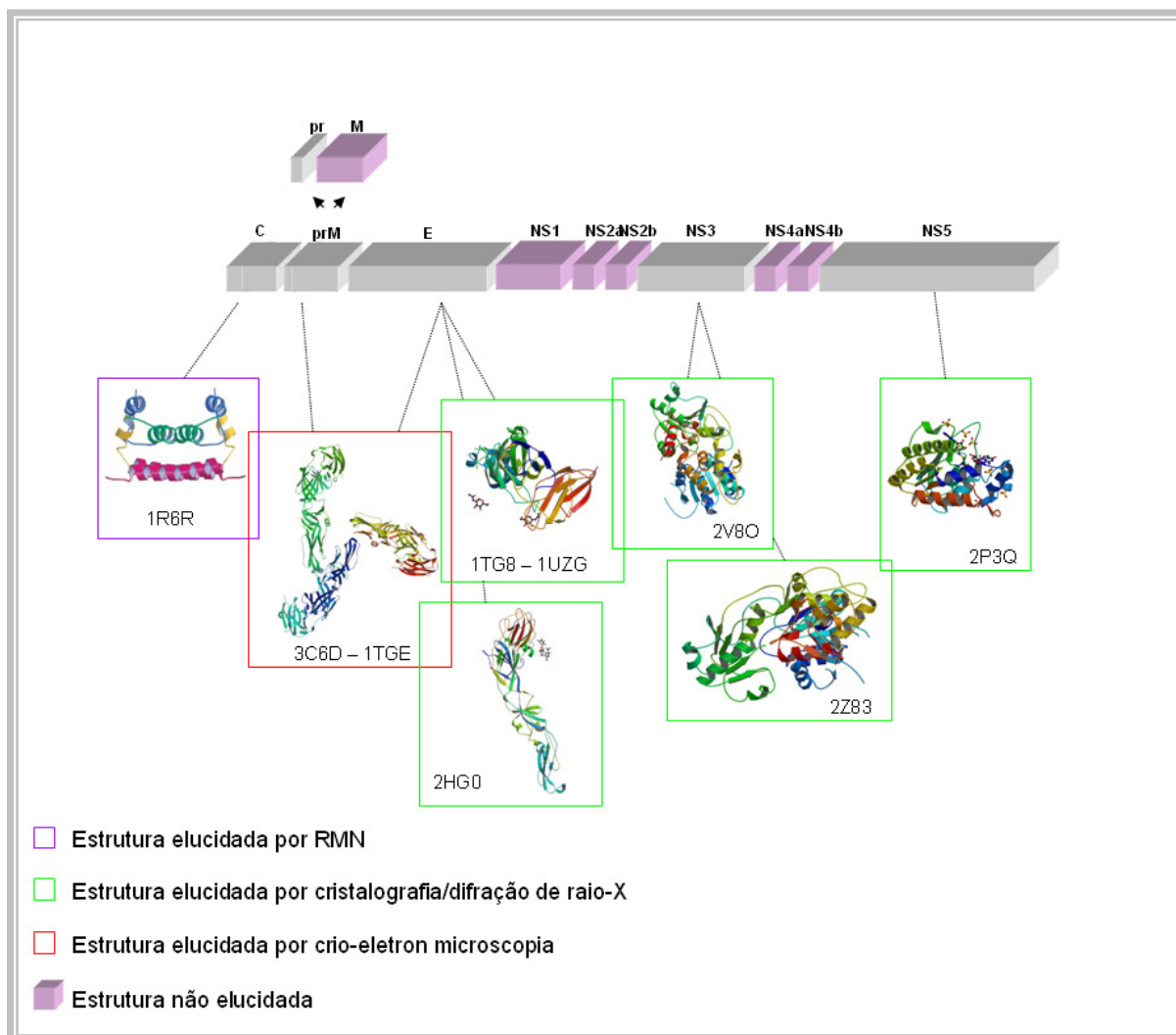


Figura 24: Estrutura das diferentes proteínas disponíveis no banco de dados de proteínas elucidadas por diferentes metodologias que foram utilizadas como molde para a construção dos modelos-3D das proteínas dos DENV (Egloff *et al.*, 2002; Benarroch *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Modis *et al.*, 2005; Nybakken *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Redondo *et al.*, 2008)

A qualidade estereoquímica geral de cada modelo mapeado foi avaliada pela distribuição dos resíduos gerados pelo gráfico de Ramachandran. No Quadro 7 é apresentada a avaliação dos modelos gerados para cada proteína dos DENV. Para um modelo ser considerado de boa qualidade, espera-se que mais de 90% dos resíduos estejam nas regiões mais favoráveis.

Quadro 7: Avaliação da qualidade estereoquímica geral dos modelos-3D obtidos através do programa Procheck (servidor SAVS - <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>)

| Proteínas | Sorotipos dos DENV | Programa Procheck                                |                                    |                         |
|-----------|--------------------|--|------------------------------------|-------------------------|
|           |                    | % regiões permitidas e/ou favoráveis da proteína | % regiões generosamente favoráveis | % regiões desfavoráveis |
| C         | 1                  | 94   | 2,9                                | 2,9                     |
|           | 2                  | 94   | 2,9                                | 2,9                     |
|           | 3                  | 94   | 2,9                                | 2,9                     |
| PrM-M     | 1                  | 94   | 4,3                                | 1,4                     |
|           | 2                  | 98,5   | 1,4                                | 0                       |
|           | 3                  | 98,5   | 1,4                                | 0                       |
| E         | 1                  | 98   | 1,2                                | 0,6                     |
|           | 2                  | 99,4   | 0,3                                | 0,3                     |
|           | 3                  | 97   | 2,7                                | 0,3                     |
| NS3       | 1                  | 99,5   | 0,3                                | 0,3                     |
|           | 2                  | 99,5   | 0,3                                | 0,3                     |
|           | 3                  | 98,9   | 0,4                                | 0,7                     |
| NS5       | 1                  | 99,5   | 0,5                                | 0                       |
|           | 2                  | 100  | 0                                  | 0                       |
|           | 3                  | 99,5   | 0,5                                | 0                       |

Para a proteína C, dois resíduos correspondentes às regiões desfavoráveis do DENV-1 (L<sub>37</sub> e Q<sub>41</sub>) e o resíduo Q<sub>41</sub> do DENV-3 apesar de serem constituintes de regiões imunogênicas comuns entre o grupo dengue, não influenciaram na construção do modelo. Os demais resíduos localizados na região desfavorável não estavam relacionados a epítopos identificados neste estudo e, portanto, não influenciaram na construção do modelo.

Pelo programa Prove, o volume atômico das proteínas modeladas foram determinadas através do Z-score, que é o desvio padrão do volume atômico em relação à média de cada tipo de átomo envolvido no mapeamento. Para todos os modelos construídos, foram obtidos valores de Z-score maiores que 1,2, o que é esperado para estrutura de baixa resolução, como as obtidas por modelagem por homologia (dados não mostrados).

## Proteína C

Para a proteína C, a proteína-molde selecionada (1R6R) correspondeu a um dímero simétrico da cepa PR159-S1 (1969) do DENV-2, circulante em Porto Rico, resolvido por ressonância magnética nuclear (RMN). A identidade obtida entre a proteína-molde e os alvos foram 69%, 98% e 66% para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Anexo 5).

A construção do modelo foi realizada através da sobreposição dos dois monômeros dos DENV naqueles que compõem o dímero da proteína 1R6R, utilizando o programa *DeepView/Swiss-PdbViewer* versão 3.7. Os 20 primeiros resíduos e os 14 últimos resíduos de aminoácido da proteína-molde, por serem conformacionalmente lábeis, apresentaram baixa resolução em RMN e, portanto, não foi possível obter um molde capaz de elucidar os 114 resíduos correspondentes à proteína C. Apesar dos modelos obtidos serem compostos por 80 resíduos, quatro regiões imunogênicas identificadas pela síntese paralela de peptídeos em membranas puderam ser destacadas (Figura 25).

A análise de cada sorotipo separadamente permitiu a verificação de que todas as regiões imunogênicas se apresentavam em regiões acessíveis ao solvente. Além disso, quando representados conforme sua estrutura secundária, tais epítomos estavam localizados na região de alfa hélice e/ou em alças (do inglês *loop*).

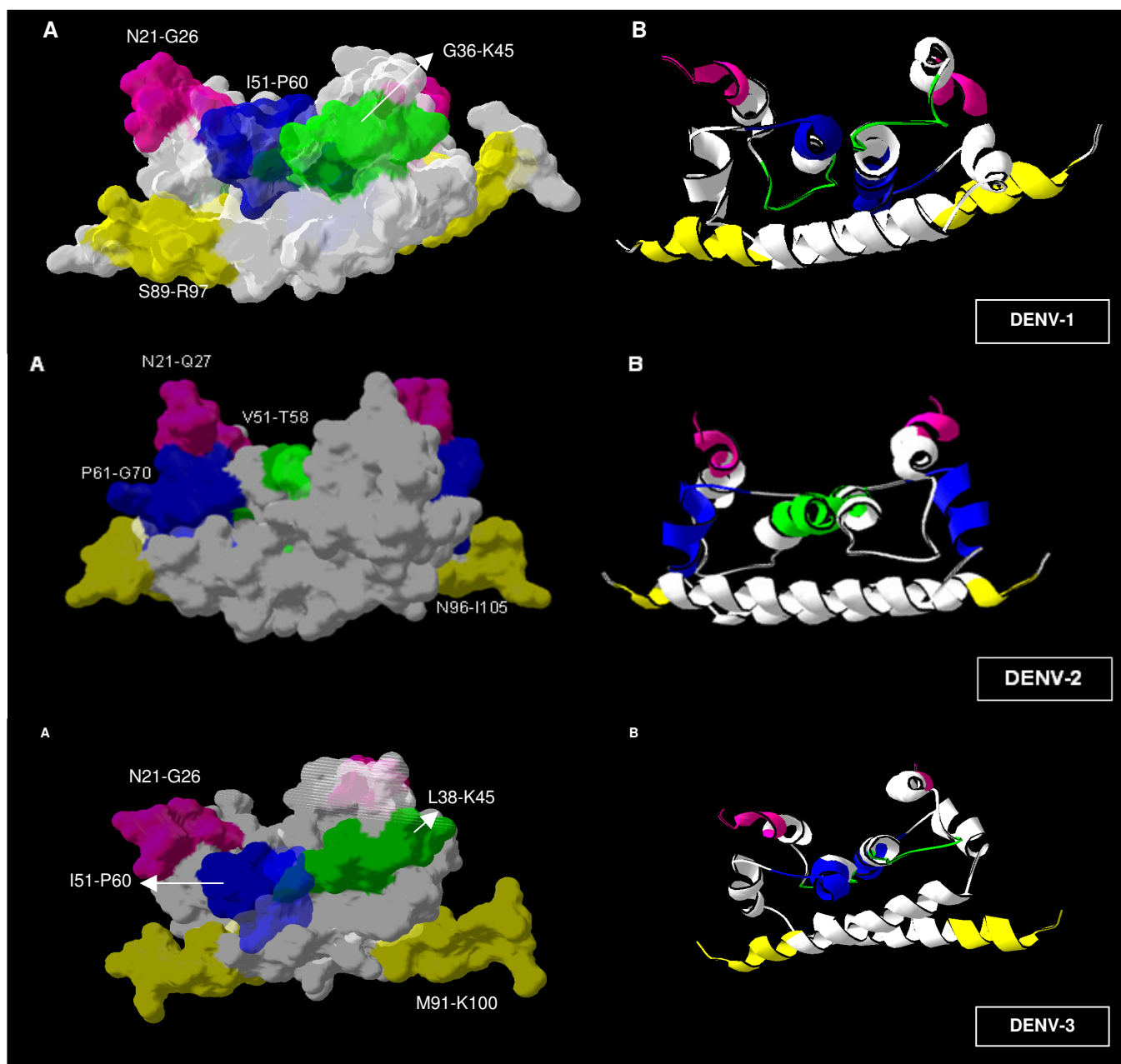


Figura 25: Estrutura-3D da proteína C dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, gerada por modelagem por homologia, destacando por cores os epítopos identificados pela síntese paralela de peptídeos (A) Superfície molecular; (B) Representação em fita (do inglês *ribbon*) da cadeia polipeptídica

### Proteína prM-M

A glicoproteína prM-M imatura utilizada neste estudo foi composta por 166 resíduos, cujo modelo selecionado foi obtido através da crio-eletromicroscopia (proteína 3C6D). A identidade com a proteína-molde selecionada foi de 79%, 97% e 81% para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente (Anexo 6).

A construção do modelo foi realizada nos 81 primeiros resíduos N-terminal, que corresponde ao fragmento “pr”, composto por 91 resíduos. Em virtude da baixa resolução, não foi possível obter um molde capaz de elucidar os resíduos correspondentes à proteína M.

A Figura 26 apresenta os modelos construídos para a proteína “pr”, ressaltando os epítomos identificados pela metodologia de síntese paralela de peptídeos em membrana. Para os DENV-1 e DENV-2 dois dos quatro epítomos identificados apresentaram estrutura determinada e para o DENV-3 apenas um epítomo dos quatro epítomos teve a sua estrutura ressaltada.

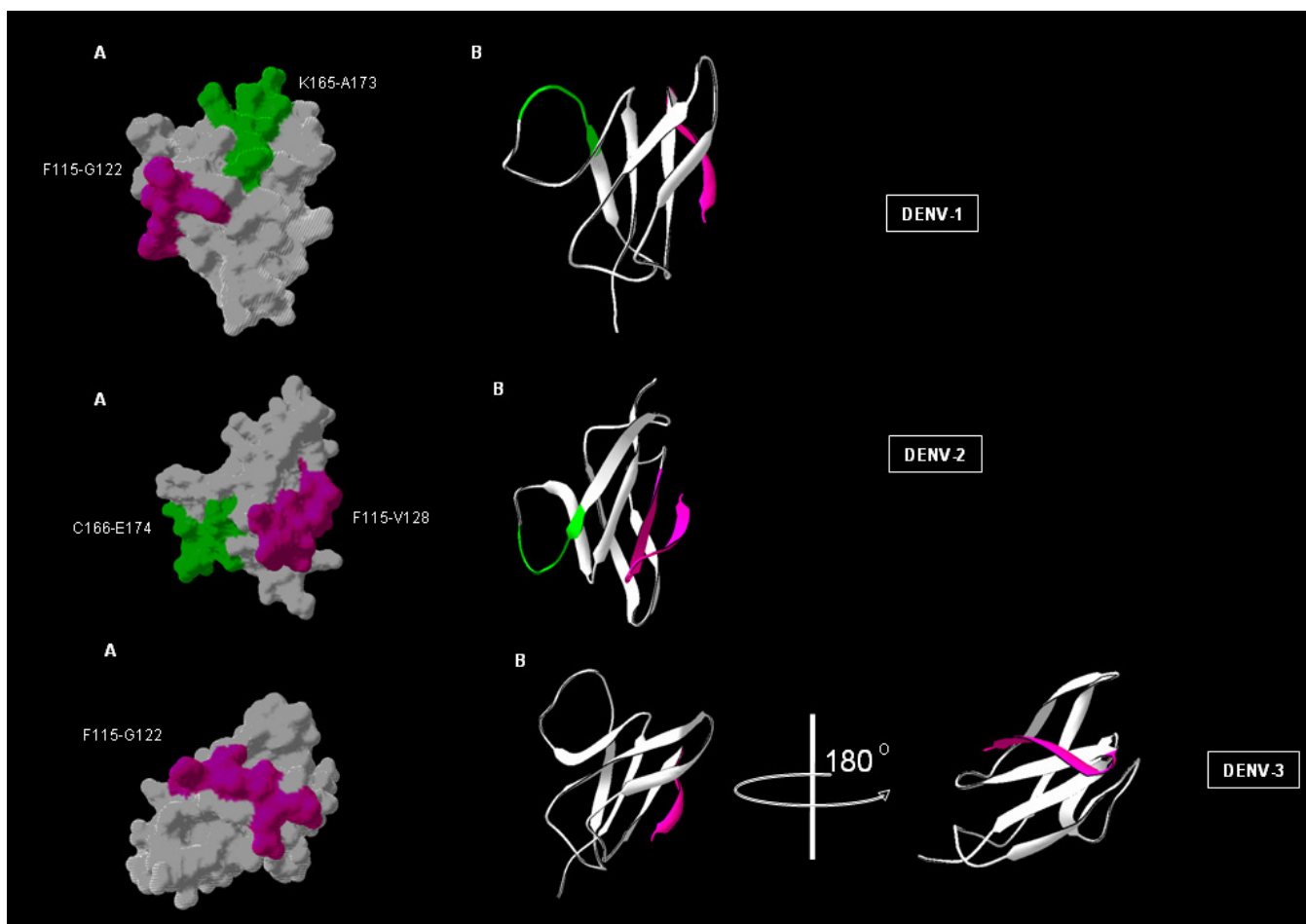


Figura 26: Estrutura-3D da proteína “pr” dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, gerada pelo programa Modeller e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítomos identificados pela síntese paralela de peptídeos. (A) Superfície molecular e (B) Representação em fita (do inglês *ribbon*) da cadeia polipeptídica

A análise de cada sorotipo separadamente sugeriu que todas as regiões imunogênicas se apresentavam em regiões acessíveis ao solvente. Além disso, quando representados conforme sua estrutura secundária, tais epítomos estavam localizados em alças e/ou em fitas beta-pregueadas – Figura 27.

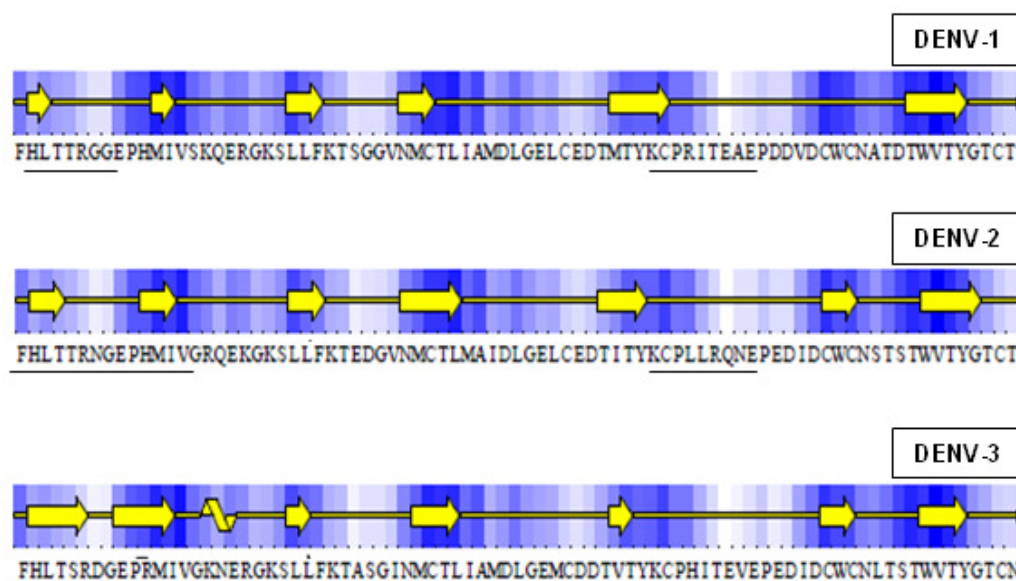


Figura 27: Estrutura primária da proteína prM-M (Modeller versão 9v4), ressaltando as estruturas secundárias. Sublinhados estão indicados os epítomos identificados experimentalmente.

## Proteína E

Para a modelagem da proteína E, os modelos para a construção da estrutura-3D disponíveis no PDB, apresentaram diferentes graus de identidade e e-value de acordo com os sorotipos dos DENV. Para os DENV-1, as estruturas selecionadas (1TGE e 1TG8) foram elucidadas por crio-eletromicroscopia e difração de raio-X, respectivamente, e apresentaram aproximadamente 67 e 68% de identidade com o sorotipo 1 dos DENV. Como as estruturas do 1TGE e 1TG8 são diferentes tridimensionalmente, a modelagem foi realizada utilizando ambas as estruturas como molde. Este procedimento também foi utilizado para a construção do modelo do DENV-2, que teve como modelo as proteínas 1UZG e 2HG0. Ambas as proteínas foram elucidadas por difração de raio-x e apresentaram 67 e 47% de identidade com este sorotipo. Já para o DENV-3, como o modelo selecionado (1TG8) apresentou 69% de identidade, a construção do modelo-3D foi realizada a partir de um único modelo.

O Anexo 7 apresenta o alinhamento múltiplo realizado entre os modelos selecionados para a construção da estrutura tridimensional e os sorotipos correspondentes.

Em virtude da ausência de alguns resíduos na estrutura elucidada, não foi possível a construção de um modelo que contemplasse todos os resíduos das proteínas dos DENV. Desta forma, os modelos obtidos foram compostos por 405 resíduos para os DENV-1, 403 resíduos para os DENV-2 e 395 resíduos para os DENV-3.

As Figuras 28, 29 e 30 apresentam a análise dos modelos obtidos através do programa de computação Swiss-pdb-viewer, destacando os epítopos dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente, identificados pelo teste de reação cruzada (Quadro 4). Dos 16 epítopos identificados para os DENV-1, 12 epítopos tiveram suas seqüências mapeadas tridimensionalmente no programa Swiss-PDB-viewer. Para os DENV-2, todos os 14 epítopos identificados neste estudo foram mapeados. Para os DENV-3, dos 11 epítopos identificados neste estudo, 10 epítopos tiveram suas seqüências mapeadas tridimensionalmente.

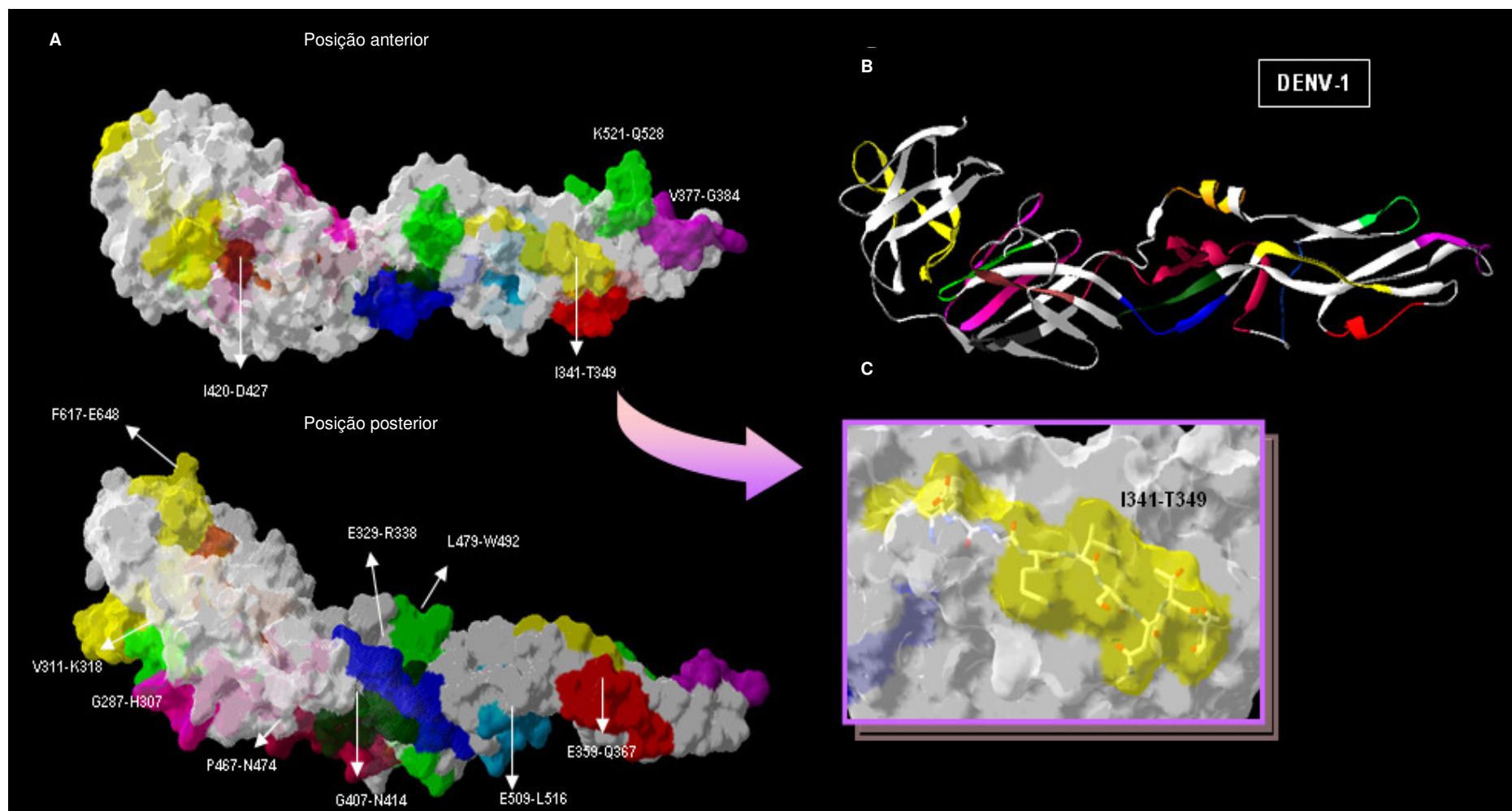


Figura 28: Estrutura-3D da proteína E dos DENV-1 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) Formato ribbon; (C) Superfície molecular do epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque



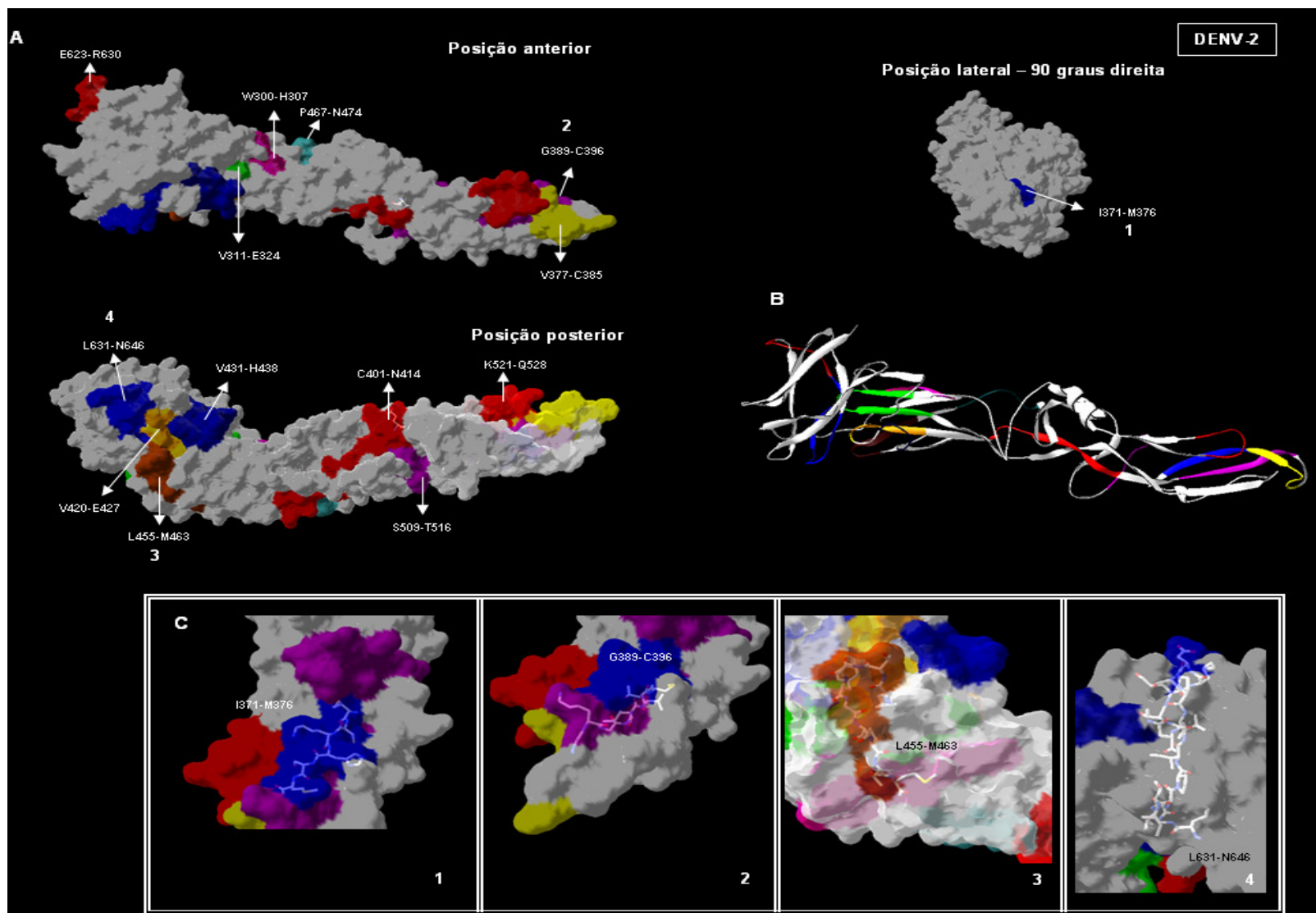


Figura 29: Estrutura-3D da proteína E dos DENV-2 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) Formato ribbon; (C) Superfície molecular do epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque

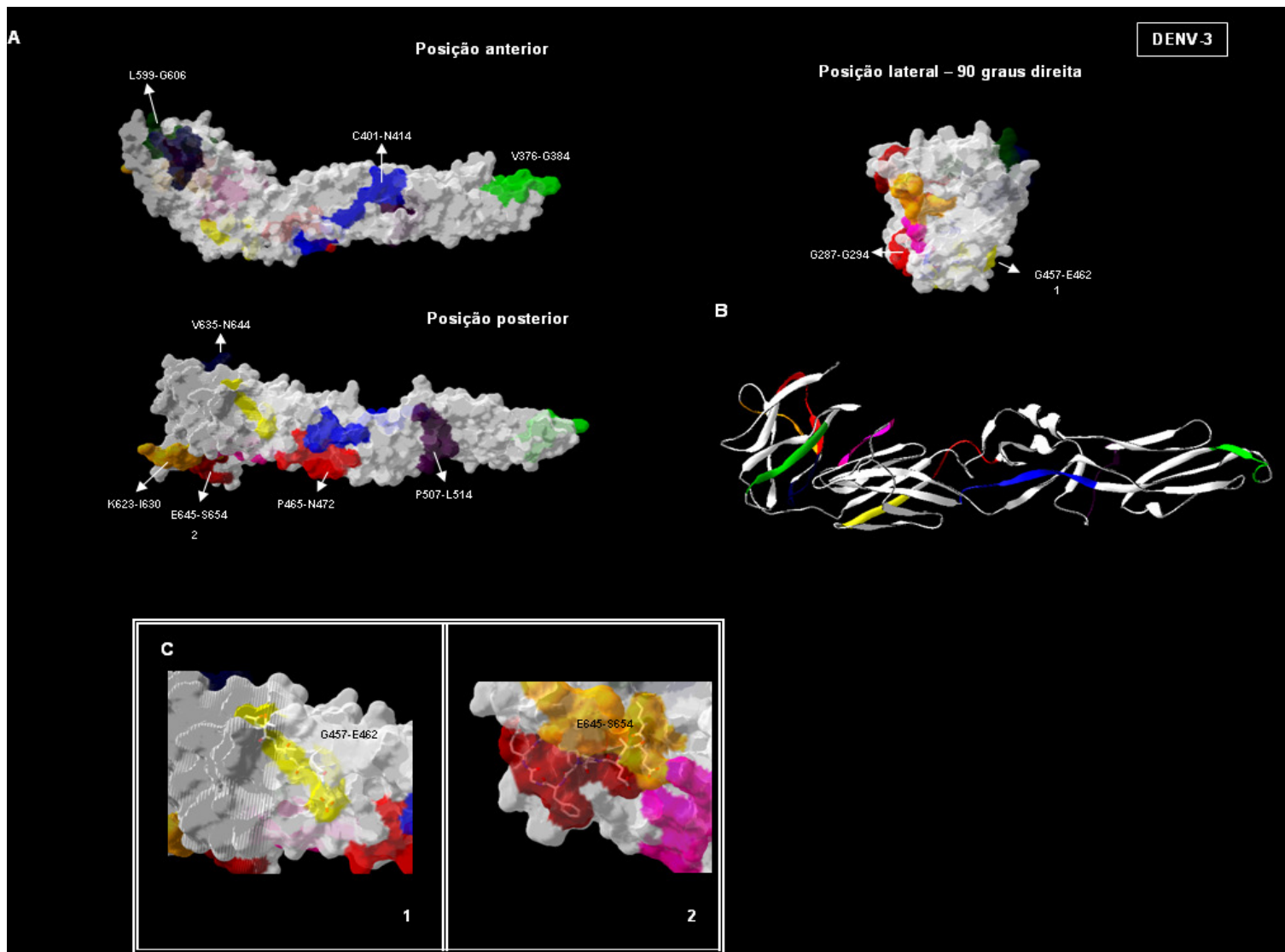


Figura 30: Estrutura-3D da proteína E dos DENV-3 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) Formato ribbon; (C) Superfície molecular do epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque

A análise de cada sorotipo separadamente permitiu a verificação de que todos os epítomos se apresentavam em regiões acessíveis ao solvente, exceto a região imunogênica I<sub>420</sub>-D<sub>427</sub> do DENV-1. Esta região foi destacada (rosa) e o mapeamento do potencial de superfície utilizando o mesmo programa, permitiu a verificação de que três (V<sub>421</sub>, T<sub>425</sub> e G<sub>426</sub>) dos oito resíduos que constituem a seqüência 420-IVTVHTGD-427 estavam localizados no interior da molécula, em regiões inacessíveis ao solvente. Isto significa que os resíduos restantes na estrutura tridimensional, foram capazes de desencadear reação com mistura de soros de pacientes com dengue. Os epítomos restantes identificados neste estudo para os DENV-1, assim como aqueles obtidos para os DENV-2 e DENV-3 estavam localizados em regiões acessíveis ao solvente (Figura 31).

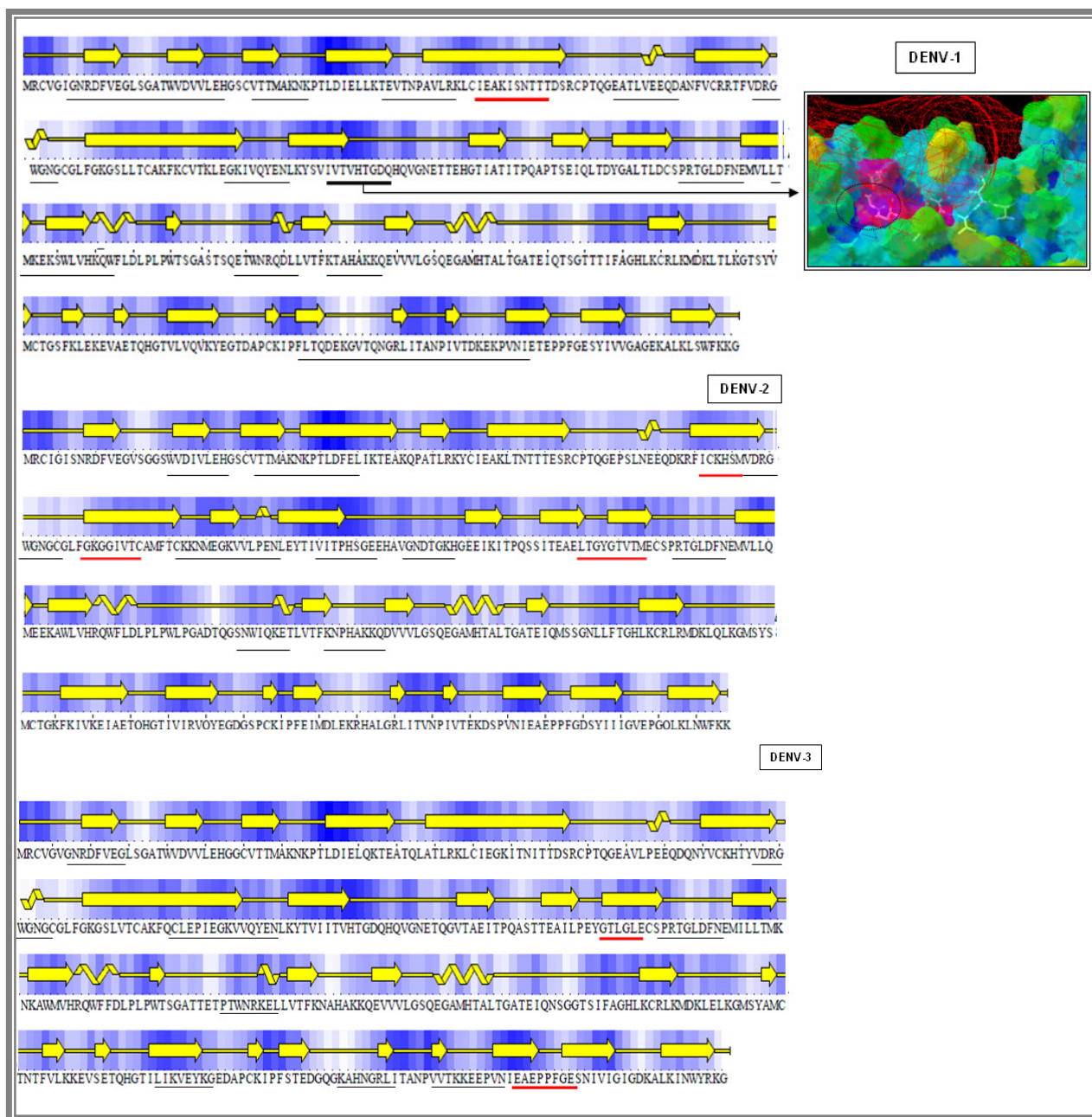


Figura 31: Estrutura primária da proteína E (Modeller versão 9v4), ressaltando as estruturas secundárias. Sublinhados estão indicados os epítopos identificados experimentalmente, cujo epítopo específico foi colorido de vermelho. Em destaque, a região imunogênica cujos resíduos de aminoácidos encontravam-se no interior da molécula.

### Proteína NS3

Para a proteína NS3, duas proteínas-molde (2V8O e 2Z83) foram selecionadas para os DENV-1 e DENV-2 e apenas uma proteína molde (2V8O) foi selecionada para os DENV-3. As estruturas 2V8O e 2Z83 foram elucidadas por cristalografia de raio-x para o vírus Murray Valley e eram compostas por 445 resíduos (Mancini *et al.*, 2007). A

identidade da proteína molde com os sorotipos dos DENV variaram entre 62 e 64% para os DENV-1 e DENV-2, respectivamente, e 65% para os DENV-3.

O anexo 8 apresenta um alinhamento múltiplo realizado entre as proteínas molde e as proteínas NS3 dos DENV, destacando os motivos de seqüência das atividades de helicase, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RTPase, característicos das proteínas NS3.

Como as estruturas 2V8O e 2Z83 foram diferentes tridimensionalmente, a modelagem para os DENV-1 e DENV-2 foi realizada utilizando um parâmetro avançado no programa modeller, que realiza a construção de um modelo tridimensional a partir de várias estruturas. Para os DENV-3, a construção do modelo tridimensional foi realizada utilizando o parâmetro básico do programa modeller, cuja construção foi realizada a partir de um único modelo (2V8O).

Com o intuito de visualizar a localização precisa dos domínios contendo os motivos de seqüência responsáveis pelas atividades da proteína NS3, as regiões destacadas na Figura 31 foram também destacadas na estrutura tridimensional da proteína NS3 do DENV-1 (Figura 32).

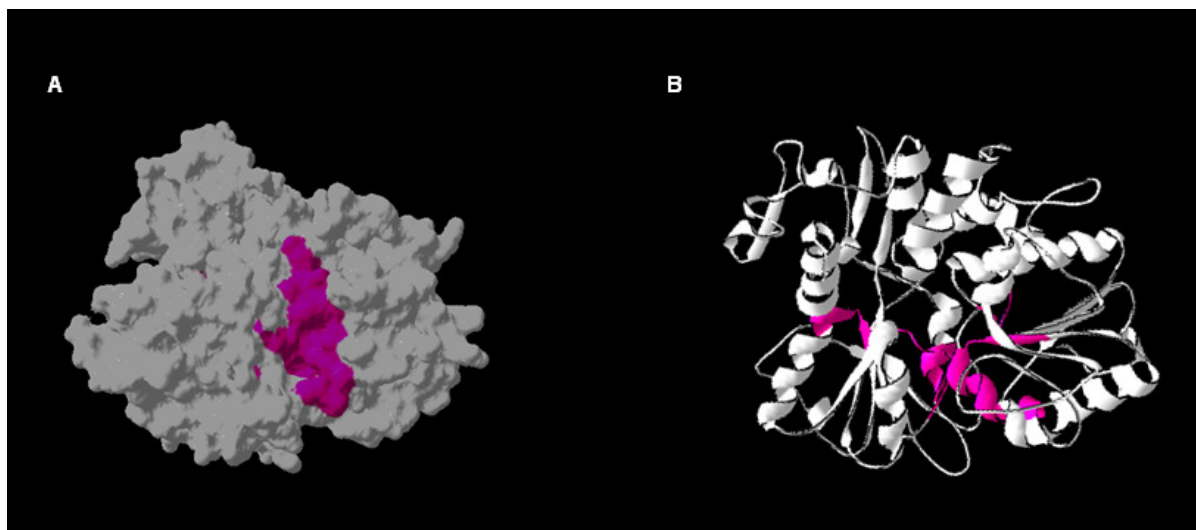


Figura 32: Localização-3D dos domínios carboxi-terminais proteína NS3 do DENV-1, gerada por modelagem por homologia. (A) Superfície molecular; (B) em fita (*ribbon*); Em destaque, os motivos de seqüências das atividades de helicase, RTPase e NTPase da proteína NS3

Os 175 resíduos amino-terminais da proteína molde, por serem conformacionalmente lábeis, não foram elucidados e, portanto, os modelos obtidos para as proteínas dos DENV-1 e DENV-2 apresentaram 443 resíduos. Da mesma forma para os DENV-3, a construção do modelo apresentou 428 resíduos. Desta forma, na análise dos epítopos identificados pela metodologia experimental (em destaque), através do programa computacional swiss-pdb-viewer, dos onze epítopos identificados pelo teste de reação cruzada para os DENV-1 (Quadro 4), a localização tridimensional dos quatro primeiros não pôde ser destacada (Figura 33). Da mesma forma, para os DENV-2, dos oito epítopos identificados, foram mapeados através do swiss-pdb-viewer cinco epítopos, incluindo o epítopo específico para este sorotipo (V<sub>1702</sub>-L<sub>1711</sub>) (Figura 34). Para os DENV-3, dos 24 epítopos identificados, 12 puderam ser mapeados no swiss-pdb-viewer, incluindo um epítopo específico para este sorotipo (Q<sub>1939</sub>-Q<sub>1951</sub>) (Figura 35). As regiões A<sub>1600</sub>-P<sub>1605</sub> e V<sub>1701</sub>-M<sub>1705</sub>, também foram identificadas como específicas para o DENV-3, entretanto, não puderam ser mapeados através da estrutura tridimensional.

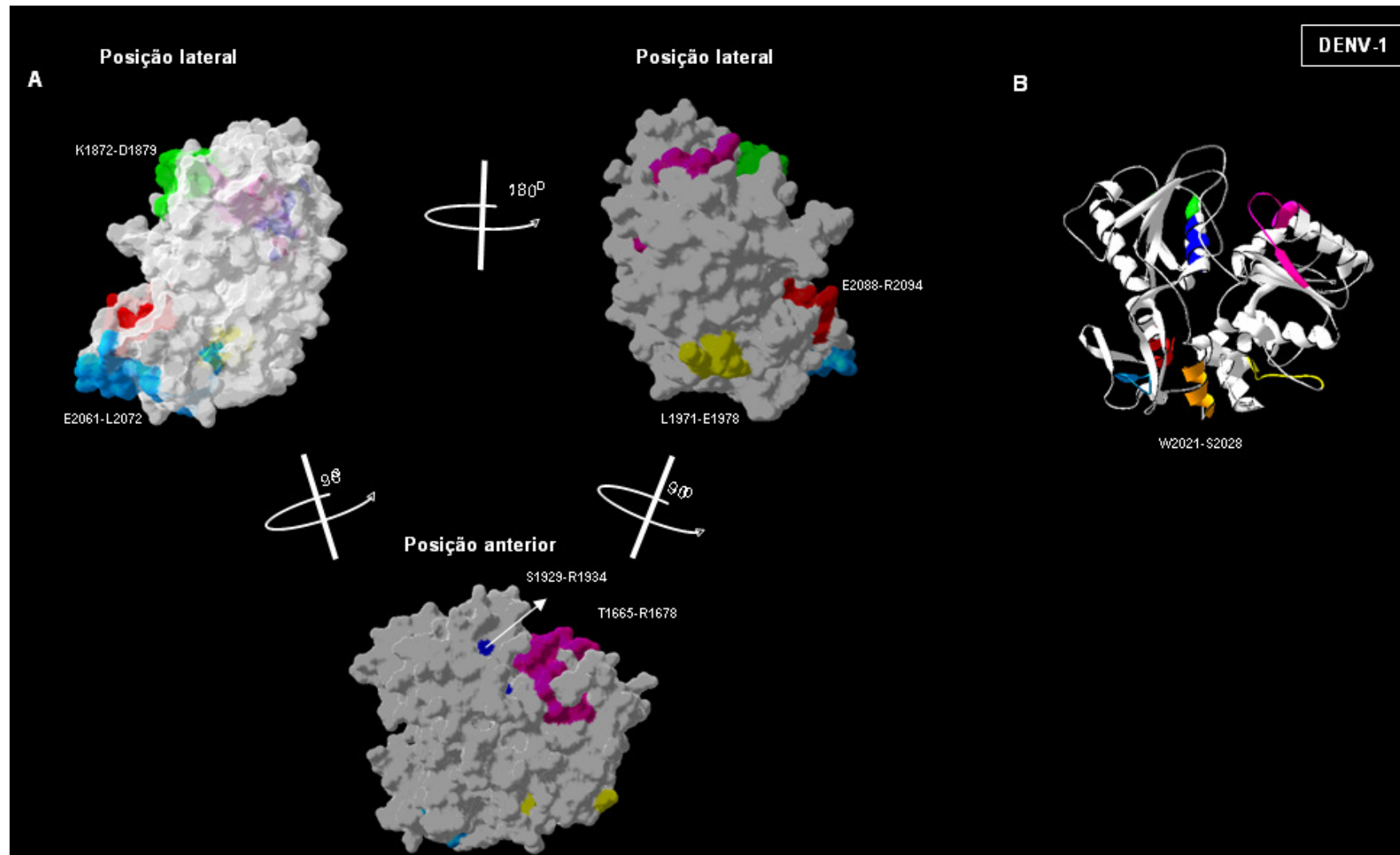


Figura 33: Estrutura-3D da proteína NS3 dos DENV-1 gerada por modelagem por homologia, destacando por cores os epitopos identificados pela síntese paralela de peptídeos em membranas. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon*

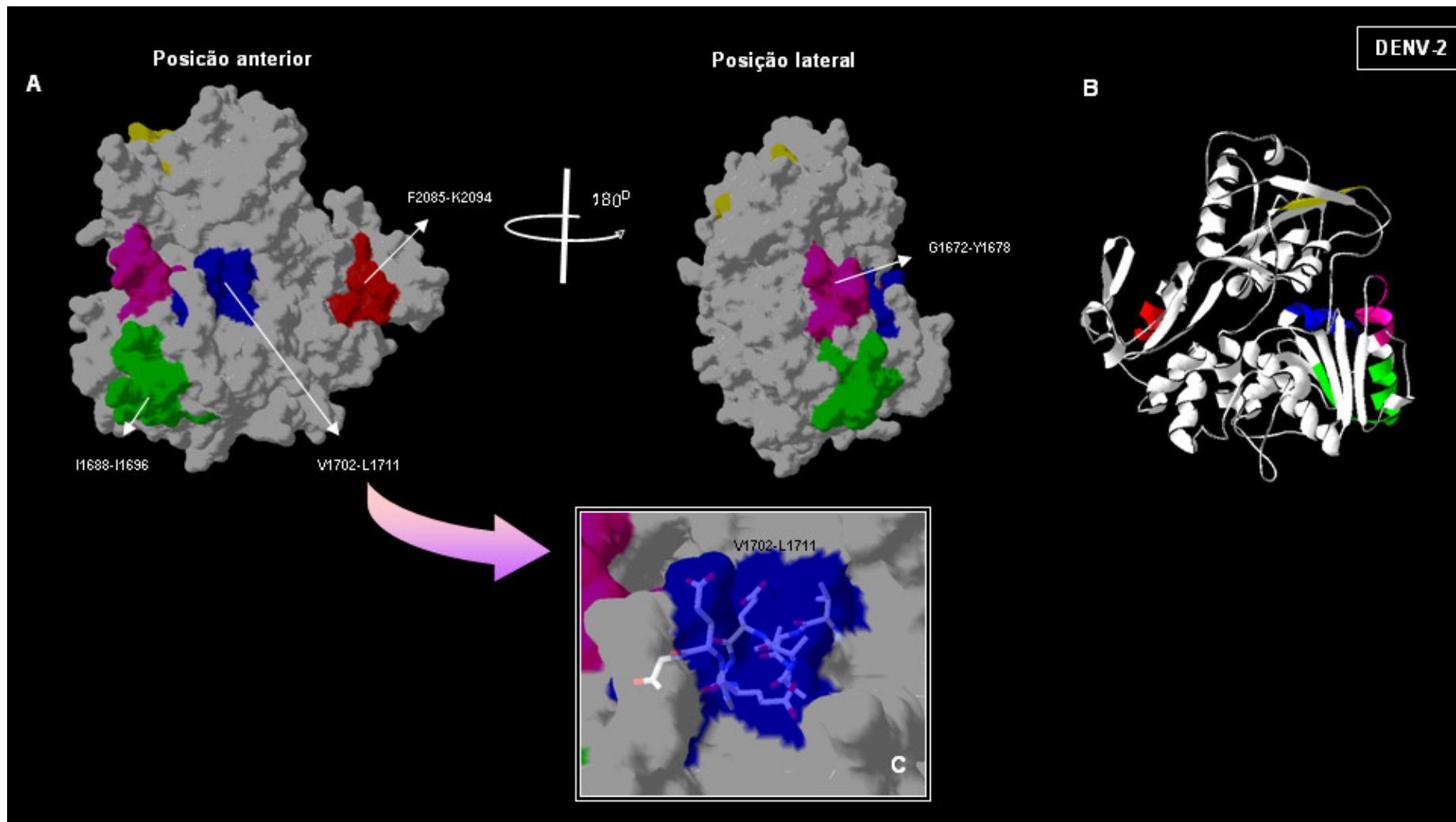


Figura 34: Estrutura-3D da proteína NS3 dos DENV-2 gerada por modelagem por homologia, destacando por cores os epítopos identificados pela síntese paralela de peptídeos em membranas. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon*; (C) epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque



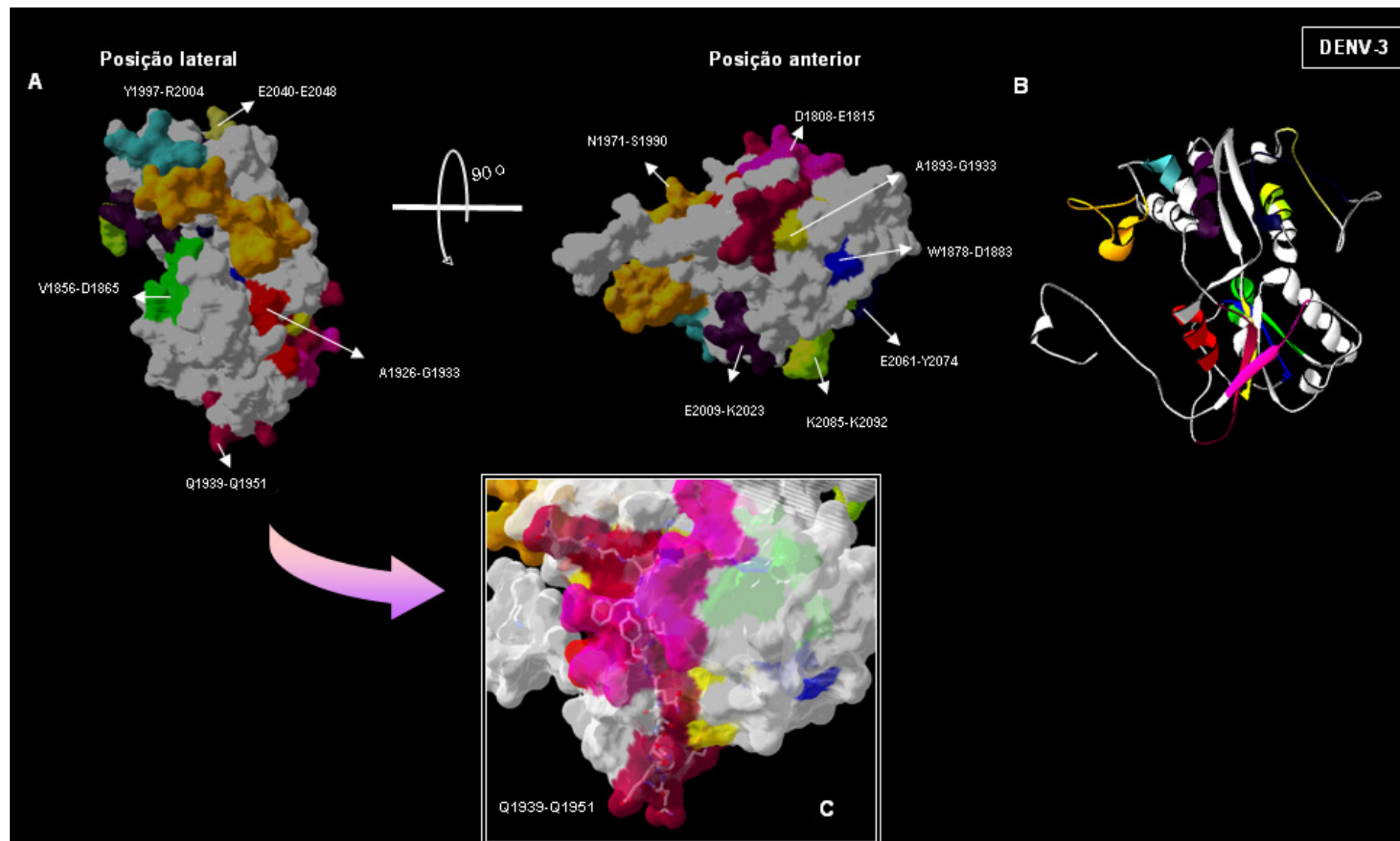


Figura 35: Estrutura-3D da proteína NS3 dos DENV-3 gerada por modelagem por homologia, destacando por cores os epítopos identificados pela síntese paralela de peptídeos em membranas. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon*; (C) epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque

## **Proteína NS5**

A última proteína modelada foi a NS5, cujo modelo disponível no PDB, apresentou identidade de 73% para os DENV-1, 91% para os DENV-2 e 70% para os DENV-3. A proteína molde selecionada (2P3Q), elucidada por difração de raio X, apresenta 295 resíduos e, portanto, dos 20 epitopos do DENV-1 identificados pelo teste de reação cruzada (Quadro 4), 6 puderam ser analisados através do programa swiss-pdb-viewer (Figura 36). Para os DENV-2, dos 19 epitopos identificados, 5 puderam ser avaliados (Figura 37) e para os DENV-3, dos 13 epitopos identificados neste estudo, 5 puderam ser avaliados com relação a sua estrutura-3D (Figura 38).

O anexo 9 apresenta o alinhamento múltiplo realizado entre os modelos selecionados para a construção da estrutura tridimensional e as proteínas NS5 dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

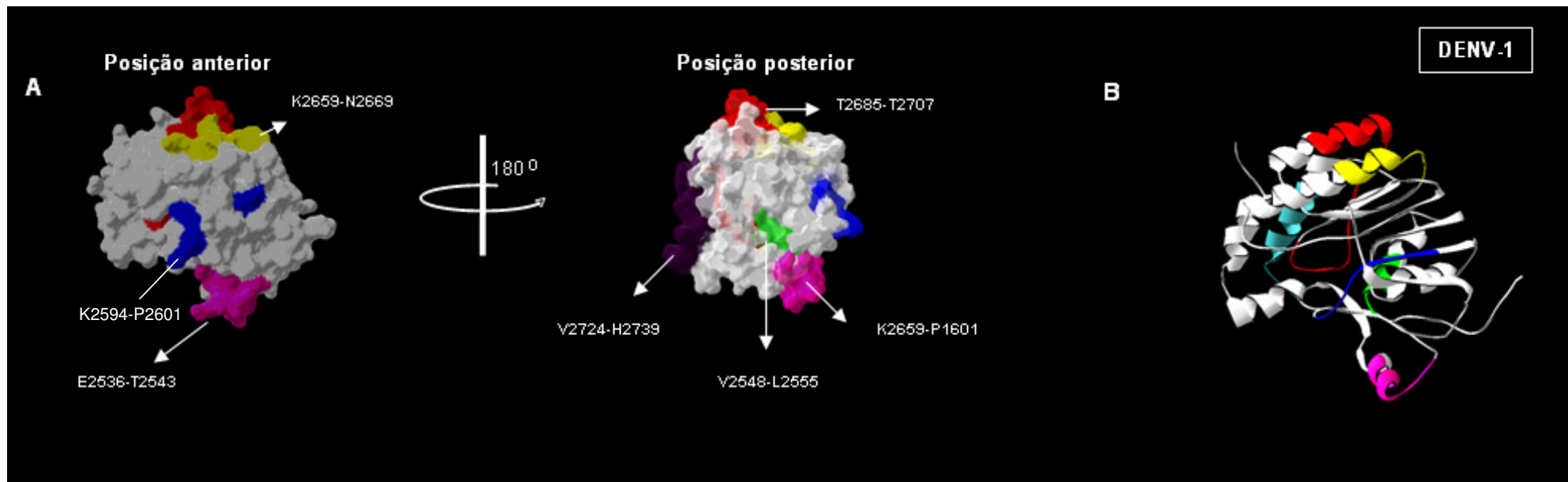


Figura 36: Estrutura-3D da proteína NS5 dos DENV-1 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon*

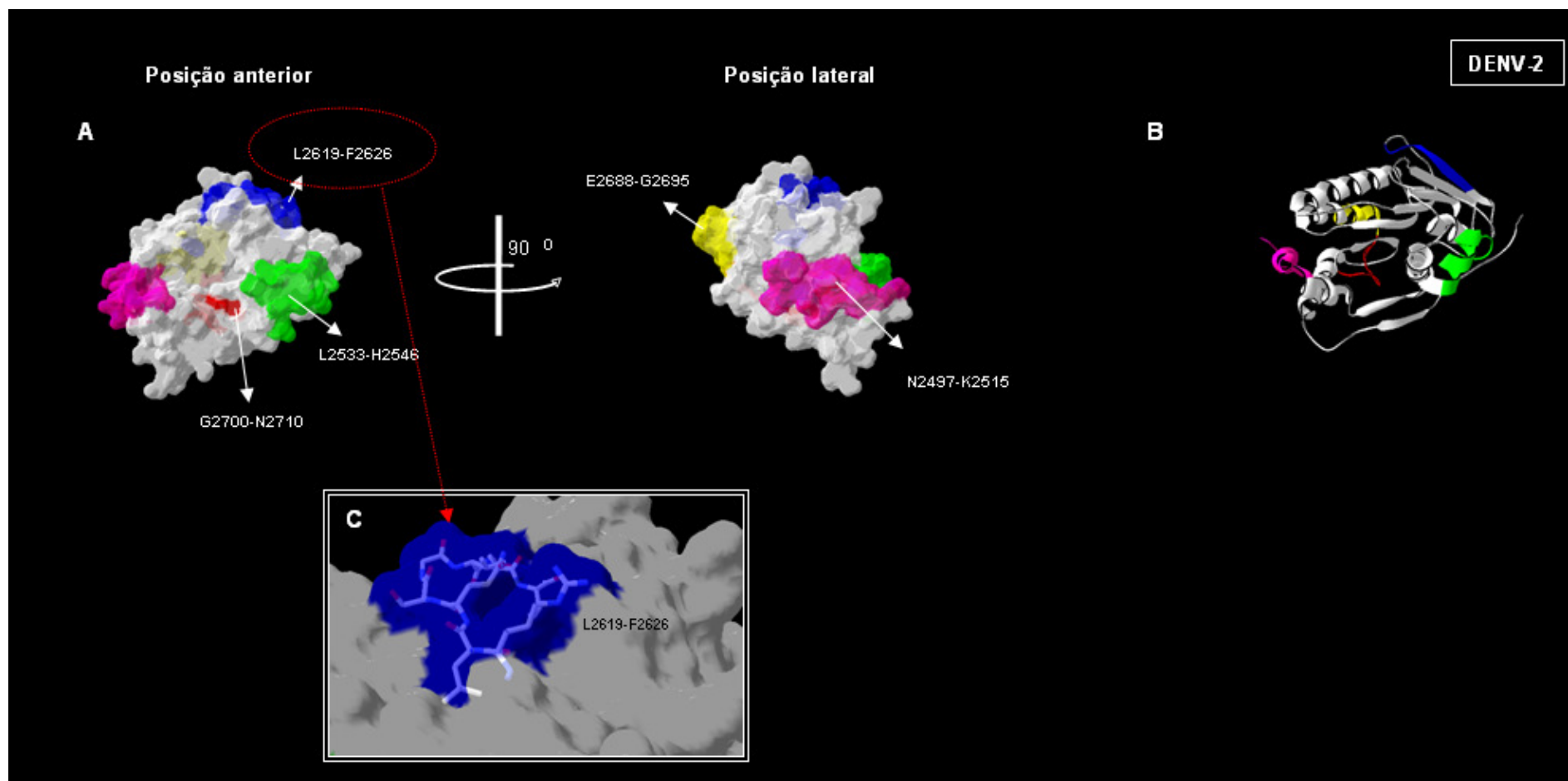


Figura 37: Estrutura-3D da proteína NS5 dos DENV-2 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epitopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon* (C) epitopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque

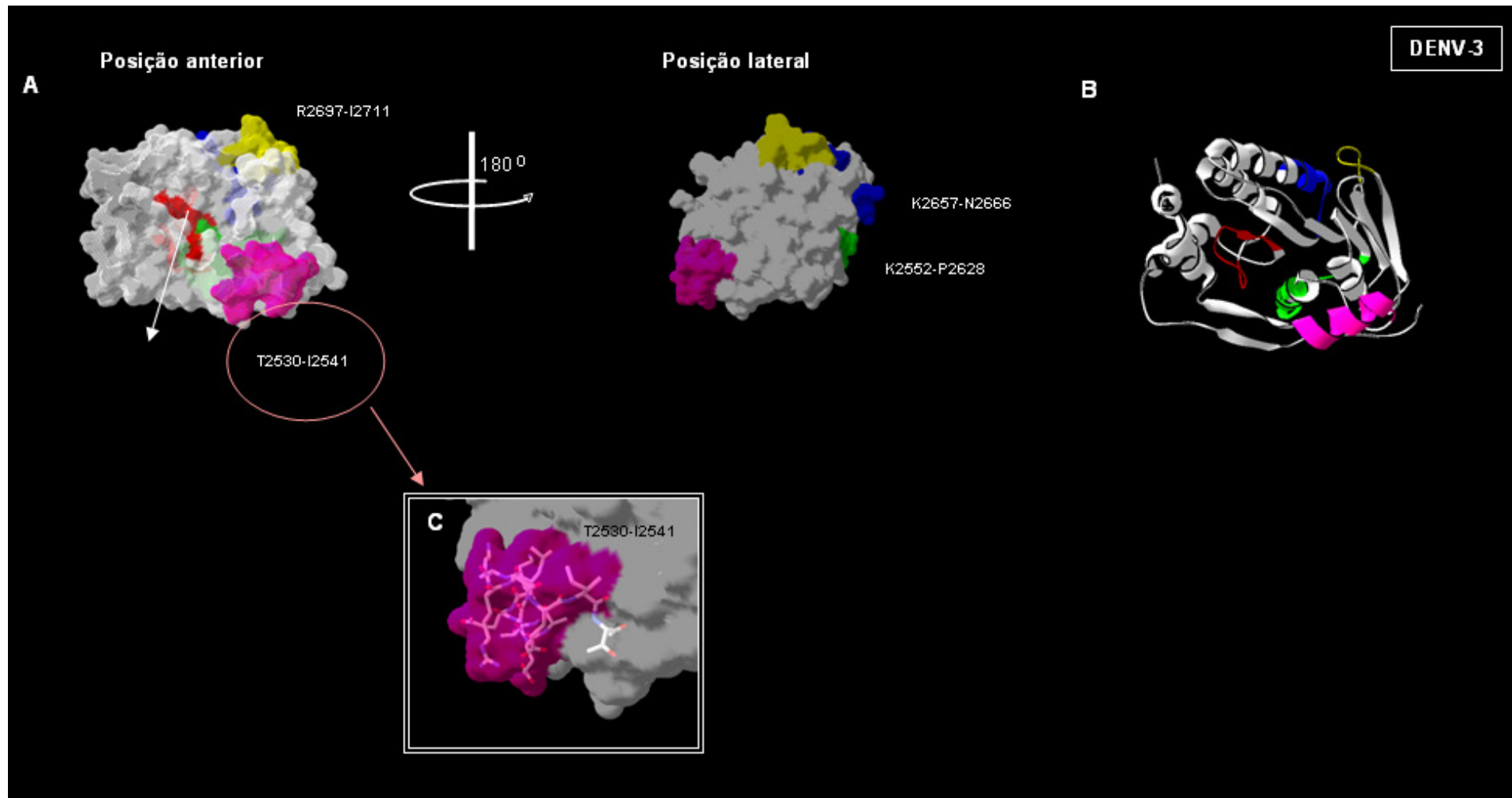


Figura 38: Estrutura-3D da proteína NS5 dos DENV-3 gerada pelo programa Modeller (versão 9v4) e analisada através do programa Swiss-pdb-viewer, destacando por cores os epítopos identificados experimentalmente. (A) Superfície molecular; (B) *ribbon* (C) epítopo específico, com sua cadeia principal e lateral em destaque

A análise de cada sorotipo separadamente permitiu a verificação de que todos os epítopos se apresentavam em regiões acessíveis ao solvente (Figura 39). O epítopo específico para os DENV-2 estava localizado em região de alça, quando visualizado em sua estrutura-3D.

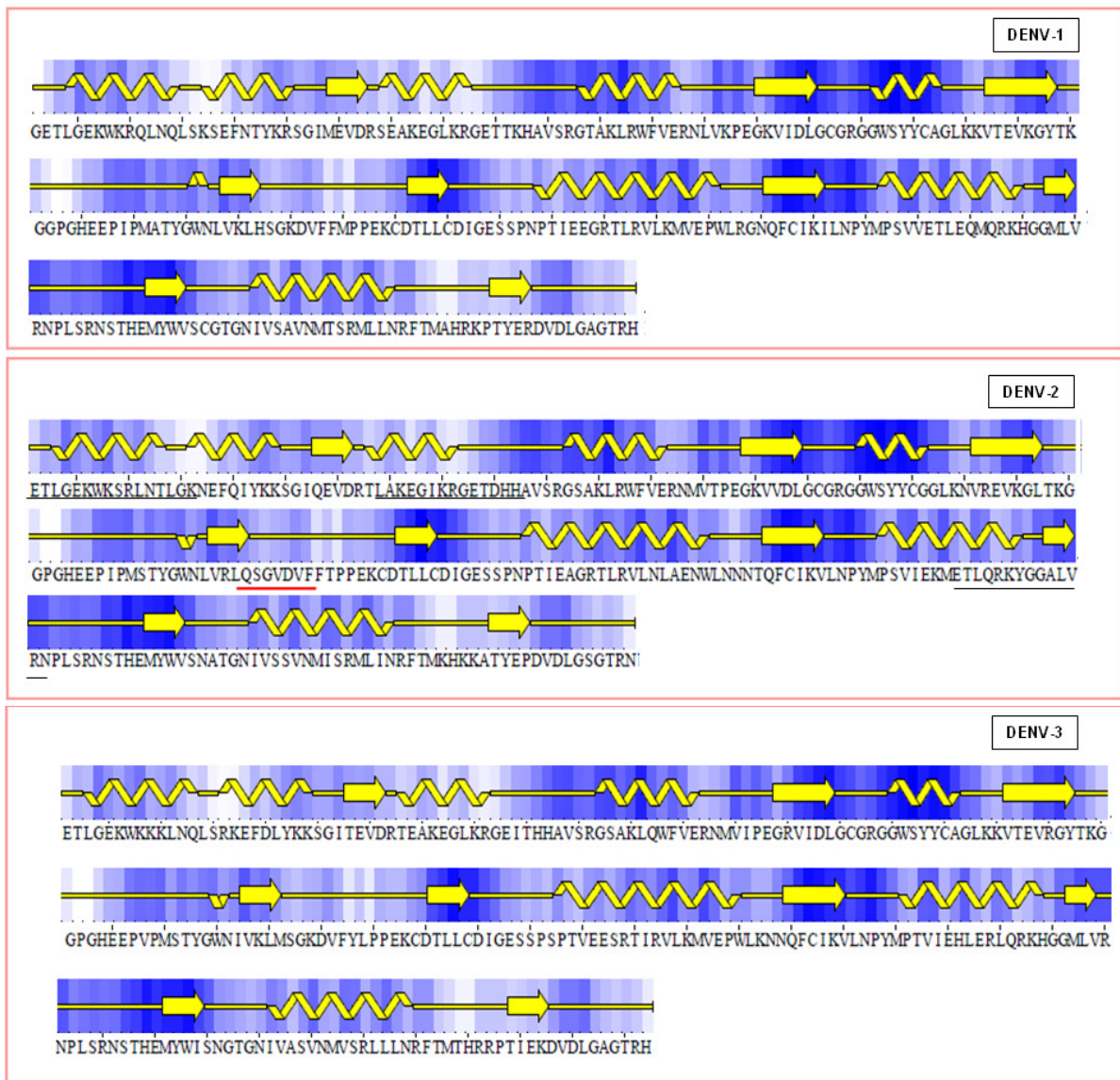


Figura 39: Estrutura primária da proteína NS5 (Modeller versão 9v4), ressaltando as estruturas secundárias. Sublinhado em preto, encontra-se o epítopo do DENV-2 identificado neste estudo e em vermelho, encontra-se o epítopo específico, também do DENV-2

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a situação do dengue no país tem desafiado a comunidade científica, no intuito de buscar soluções para o combate à expansão de surtos e epidemias, já que até o momento não está disponível uma vacina eficaz, nem foi descrita uma terapia antiviral efetiva para dengue (WHO, 2002; Crance *et al.*, 2003). Desta forma, pesquisas relacionadas à virologia, epidemiologia e metodologias de diagnóstico desta infecção têm aumentado com o passar dos anos. Em particular, a Bioquímica sofreu uma verdadeira revolução, principalmente devido aos avanços na área de Biologia Molecular, que vem disponibilizando uma incrível gama de informações sobre os sistemas biológicos. O surgimento da Era genômica permitiu, a partir de seqüências de DNA dos genes, deduzir a seqüência de aminoácidos das proteínas por elas codificadas e, desta forma, contribuiu para elucidar a estrutura do genoma viral e auxiliar no entendimento sobre a evolução molecular envolvendo estes vírus (Dutt *et al.*, 2000). Entretanto, com a necessidade de obter informações não apenas da estrutura, mas também saber como as proteínas operam para exercer suas funções surgiu a Era proteômica, e mais recentemente, as Eras peptidômica e imunômica, com metodologias que permitem a síntese e análise dos peptídeos (Schrader *et al.*, 2001; Soloviev *et al.*, 2005).

Dentre uma variedade de metodologias disponíveis para este fim, a síntese paralela de peptídeos em membranas vem se destacando, nas últimas décadas, por sua acessibilidade rápida e econômica de mapear sítios de interação em diversos sistemas, incluindo a modificação enzimática de peptídeos e reconhecimento proteína-proteína, na preferência de substratos por enzimas, como quinases, proteases e fosfatases, além de permitir a identificação de epitopos consecutivos, através da interação peptídeos-anticorpos, que é a sua aplicação mais freqüente (Reineke *et al.*, 1999; 2001; Hilpert *et al.*, 2007).

A identificação (ou mapeamento) de epitopos de uma proteína pode ser realizada através da interação com moléculas derivadas do sistema imune, através da triagem de toda a seqüência de aminoácidos que compõem a proteína em questão, em um processo chamado de mapeamento de epitopos. Esta interação ocorre através da formação de interações não-covalentes entre os sítios existentes na porção variável dos anticorpos (sítios ou paratopos) e regiões discretas de um agente externo (epitopo). Como descrito por Paige & Wu (1989), esta interação poderia ser vista como um sistema

“chave-fechadura”, onde um paratopo reconhece uma região específica do agente externo cuja estrutura seria diretamente complementar.

Durante uma infecção natural, a grande maioria dos anticorpos antígenos-específicos é direcionada contra epitopos conformação-dependente na estrutura nativa (também denominados de epitopos não-consecutivos). Neste caso, para a sua ligação seria necessária uma interação inter e intra-molecular que permitisse que aminoácidos distantes na estrutura primária se aproximassem para formar um determinante antigênico. Entretanto, sabe-se que além dos epitopos não-consecutivos, existem aqueles cujos aminoácidos encontram-se dispostos consecutivamente na proteína. De forma didática, tais epitopos foram denominados de consecutivos, embora seja notório que epitopos consecutivos reconhecidos podem representar partes constituintes de epitopos não consecutivos e vice-versa (Novotny *et al.*, 1989; Laver *et al.*, 1990; Cason, 1994).

Neste estudo, a síntese paralela de peptídeos em membranas se mostrou eficiente na identificação de epitopos responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral dos DENV, em relação aos programas computacionais tradicionalmente utilizados para a predição de epitopos. A concordância de 46,04%, 50,28% e 46,18% para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente, observada pela comparação dos programas computacionais utilizados para a predição de epitopos, corrobora com o grau de confiança geralmente estimado para a predição de epitopos através destes programas (Novotny *et al.*, 1986; Pontoppidan, *et al.*, 2006), mesmo com a utilização de mais de uma metodologia para a confiabilidade dos resultados. Em contrapartida, a utilização da síntese paralela de peptídeos em membranas permitiu a determinação inequívoca de regiões imunogênicas dos DENV através da síntese em microescala de um grande número de peptídeos simultaneamente.

Um estudo inicial utilizando a estratégia composta por peptídeos contendo 15 resíduos com sobreposição de 7 resíduos gerou regiões imunogênicas com tamanho acima do esperado, pois de acordo com a literatura, epitopos consecutivos variam em média de 5 a 20 resíduos (Meloan, 2001; Enshell-Seijffers *et al.*, 2003). Desta forma, nova estratégia de síntese foi utilizada para o refinamento dos resultados, cujos peptídeos foram compostos por 10 resíduos com sobreposição de 5 resíduos (Figuras 20, 21, 22 e Quadro 3). Os epitopos obtidos através da utilização desta estratégia em



sua maioria variaram entre 5 a 20 aminoácidos, com exceção de algumas regiões imunogênicas, que apresentaram número maior de resíduos.

A caracterização dos epitopos identificados neste estudo foi realizada através da discriminação entre epitopos específicos ao sorotipo (1, 2 ou 3) e epitopos específicos ao grupo dengue e/ou à família *Flaviviridae*, através de testes de reação cruzada utilizando mistura de soros com dengue e com outras patologias e, pela análise da estrutura tridimensional dos epitopos identificados.

De forma didática, a discussão dos resultados obtidos neste estudo foi realizada de acordo com cada proteína dos DENV.

### **Proteína C**

A primeira proteína a ser sintetizada foi a proteína C, que é uma importante proteína estrutural envolvida na maturação da partícula viral, na apoptose de células hospedeiras e no interior da partícula viral e que está envolvida na montagem do nucleocapsídeo (Lindenbach & Rice, 2001; Wang *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2007).

A identificação de epitopos através da síntese paralela de peptídeos em membranas, seguido da triagem empregando mistura de soros de pacientes com o mesmo sorotipo de dengue, permitiu a identificação de 4 regiões imunogênicas para cada um dos 3 sorotipos dos DENV circulantes no país (Quadro 3). De acordo com os resultados obtidos, todos os epitopos identificados reagiram cruzadamente com os sorotipos circulantes no país, quando utilizado mistura de soros de pacientes infectados com dengue. Além disso, não reagiram utilizando mistura de outros membros da família, nem quando submetidos à avaliação utilizando mistura de soros de pacientes com outras patologias, embora as regiões K<sub>7</sub>-S<sub>27</sub> e S<sub>89</sub>-R<sub>98</sub> do DENV-1 identificadas neste estudo (Quadros 3 e 4) corresponderam às seqüências imunogênicas previamente identificadas desta proteína para os vírus da encefalite japonesa (JEV) (Huang *et al.*, 1996).

Em outro estudo (AnandaRao *et al.*, 2005), baseado em análises computacionais da proteína C do DENV-2, das 3 regiões identificadas como imunogênicas utilizando soros de pacientes (N<sub>2</sub>-N<sub>10</sub>, R<sub>82</sub>-R<sub>85</sub> e M<sub>91</sub>-R<sub>99</sub>), duas corresponderam a regiões determinadas neste estudo (K<sub>6</sub>-Q<sub>27</sub> e N<sub>96</sub>-I<sub>105</sub>). A terceira região (R<sub>82</sub>-R<sub>85</sub>) descrita por AnandaRao e colaboradores (2005), localizava-se uma região de alfa-hélice na superfície da molécula, cuja cadeia lateral do resíduo F<sub>84</sub> encontrava-se localizada internamente (dados não mostrados). Visto que a identificação desta seqüência foi

baseada em parâmetros de hidrofiliçidade, em nosso estudo, esta seqüência foi contemplada apenas na predição de epitopos empregando o parâmetro de antigenicidade (Jameson & Wolf), que leva em consideração as propriedades físico-químicas dos aminoácidos, incluindo a escala Kyte e Doolittle, utilizada pelos autores.

Análises tridimensionais da proteína C permitiram verificar que todos os epitopos identificados neste estudo estavam localizados na região de alfa hélice ou alça, expostos na superfície do dímero do capsídeo viral, sendo uma característica importante para a localização tridimensional de um epitopo imunogênico.

Em virtude de não ser encontrada informação na literatura relacionada aos demais epitopos identificados neste estudo, esta constitui a primeira descrição completa de epitopos da proteína C dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 circulantes no país.

### **Proteína prM/M**

Na literatura, pouca informação a respeito da antigenicidade da proteína prM/M dos DENV tem sido descrita. Em nosso estudo, testes de reação cruzada com mistura de soros de pacientes infectados por cada sorotipo dos DENV permitiu a identificação de 4 regiões imunogênicas para os DENV-1, 4 para os DENV-2 e 4 para os DENV-3 (Quadro 4).

Segundo Vasquez e colaboradores (2002), duas regiões (L<sub>117</sub>-V<sub>145</sub>; L<sub>217</sub>-E<sub>238</sub>) foram responsáveis por induzir respostas de anticorpos neutralizantes utilizando soros policlonais anti-DENV-2. Nossos resultados corroboram com tal afirmação, com exceção da região I<sub>127</sub>-G<sub>134</sub> do DENV-3, que reagiu somente com o DENV-2 e DENV-3, mas não houve reação com o DENV-1. Desta forma, esta região não foi considerada como epitopo de reação cruzada para os 3 sorotipos dos DENV, visto que reações falso negativas poderiam ocorrer caso este epitopo fosse utilizado em testes de diagnóstico DENV específicos. Uma análise mais abrangente dos epitopos identificados por Vasquez e colaboradores nos permitiram verificar a existência da região F<sub>115</sub>-V<sub>128</sub> do DENV-2, identificada em nossos resultados como reagente para os 3 sorotipos. Desta forma, é provável que a região responsável por induzir respostas de anticorpos neutralizantes para o DENV-2 apresente tamanho de peptídeo menor que o descrito, sendo composto apenas pela região F<sub>115</sub>-V<sub>128</sub>.

Em virtude dos resultados obtidos neste estudo, todos os epitopos reagentes para os 3 sorotipos dos DENV identificados para a proteína prM/M poderiam ser úteis para o diagnóstico específico de dengue.

## Proteína E

A proteína E é uma proteína de aproximadamente 500 aminoácidos, no qual os 400 resíduos N-terminais formam o ectodomínio, que é dividido em domínio I, II e III (Modis *et al.*, 2003). Em termos dos DENV, o domínio III elicita anticorpos neutralizantes predominantemente DENV-específicos e que são efetivos em termos de bloqueio de adsorção viral em células suscetíveis (Gromowski & Barrett, 2007).

Comparado com outros *Flavivírus*, muito pouco tem sido reportado com relação à identificação de epítopos que desencadeiam a resposta imune humoral da proteína E dos DENV. A maioria dos epítopos identificados para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3 baseiam-se no emprego de anticorpos monoclonais e são descritos como não-consecutivos (Innis *et al.*, 1989; Aaskov *et al.*, 1989; Mason *et al.*, 1989; Megret *et al.*, 1992; Trirawatanapong *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994; Hiramatsu *et al.*, 1996; Roehrig *et al.*, 1990; Lok *et al.*, 2001; Serafin & Aaskov, 2001; Thullier *et al.*, 2001), embora, a existência de epítopos consecutivos, utilizando soros de pacientes, também tenha sido relatada na literatura.

Roehrig e colaboradores (1998) definiram 4 regiões antigênicas dos DENV-2 que poderiam elicitar reação com anticorpos de indivíduos infectados. Duas destas regiões (K<sub>316</sub>-T<sub>335</sub> e I<sub>632</sub>-E<sub>648</sub>) elicítaram baixos níveis de anticorpos neutralizantes *in vivo*, enquanto que como anti-peptídeos, as outras regiões (K<sub>338</sub>-Q<sub>400</sub> e G<sub>503</sub>-Q<sub>536</sub>) reagiriam melhor com o vírus, que quando expostas ao tratamento com pH ácido. Nossos resultados foram capazes de elicitar resposta utilizando soros de pacientes com dengue em todos os epítopos descritos por Roehrig e colaboradores (1998), inclusive discriminou em detalhes os epítopos imunogênicos. A região G<sub>503</sub>-Q<sub>536</sub>, descrita como reativa para os DENV, na verdade compreende duas pequenas regiões imunorreativas S<sub>509</sub>-T<sub>516</sub> e K<sub>521</sub>-Q<sub>528</sub>. Além disso, para a região K<sub>338</sub>-Q<sub>400</sub> descrita como reativa utilizando soros de pacientes com dengue, neste estudo, identificamos a existência de três regiões (I<sub>371</sub>-M<sub>376</sub>, V<sub>377</sub>-C<sub>385</sub>, G<sub>389</sub>-C<sub>396</sub>), sendo duas delas específicas para os DENV-2 (I<sub>371</sub>-M<sub>376</sub>, G<sub>389</sub>-C<sub>396</sub>).

A região V<sub>377</sub>-C<sub>385</sub>, apresenta uma seqüência hidrofóbica conservada entre os *Flavivírus*, presente no domínio II da glicoproteína E do DENV-2, sendo estes essenciais para a interação entre a membrana do vírus e da célula hospedeira (Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Esta região foi identificada neste estudo e reagiu cruzadamente com os sorotipos dos DENV, além de reagir com mistura de soros de voluntários vacinados para a febre amarela (Quadro 5), mas não reagiu com soros de

pacientes com outras metodologias, sugerindo que esta região seja específica aos *Flavivirus* e seria um bom candidato em testes de diagnósticos flavivirus-específicos.

Um estudo demonstrou a existência de um polipeptídeo recombinante na proteína E reativa em soros de pacientes com dengue, através do ELISA (Dos Santos *et al.*, 2004). Nossos resultados corroboraram com este estudo, demonstrando evidência definitiva da ocorrência de anticorpos anti-E em soros de pacientes com dengue. A região nucleotídica compreendida entre a posição 1093-1114 e 1564-1585 do DENV-2, correspondeu à seqüência de aminoácidos P<sub>333</sub>-L<sub>496</sub> em nosso estudo, sendo possível identificar um total de 7 regiões reativas (R<sub>353</sub>-D<sub>367</sub>, I<sub>371</sub>-C<sub>385</sub>, G<sub>389</sub>-C<sub>396</sub>, C<sub>401</sub>-E<sub>427</sub>, V<sub>431</sub>-H<sub>438</sub>, L<sub>455</sub>-M<sub>463</sub>, P<sub>467</sub>-L<sub>496</sub>), das quais 5 regiões foram comuns aos 3 sorotipos dos DENV (V<sub>377</sub>-C<sub>385</sub>, C<sub>401</sub>-N<sub>414</sub>, V<sub>420</sub>-E<sub>427</sub>, V<sub>431</sub>-H<sub>438</sub>, P<sub>467</sub>-N<sub>474</sub>) e 2 regiões foram específicas para os DENV-2 (G<sub>389</sub>-C<sub>396</sub> e L<sub>455</sub>-M<sub>463</sub>).

Os resultados obtidos neste estudo, além de corroborar com resultados previamente descritos na literatura, identificou novas regiões imunogênicas, constituindo a primeira descrição completa de epitopos consecutivos da proteína E dos DENV. Dos 18 epitopos identificados para os DENV-1, 15 epitopos reagiram cruzadamente para os 3 sorotipos e apenas 1 epitopo foi descrito como específico para este sorotipo (Quadro 4). Os 2 epitopos restantes pareceram não induzir resposta humoral significativa nos pacientes com dengue 2 e/ou 3, sugerindo que não seriam indicados para a utilização no diagnóstico e também pouco imunogênicos nas circunstâncias de uma infecção natural por dengue. Da mesma forma, dos 15 epitopos para os DENV-2, 10 reagiram cruzadamente com os 3 sorotipos e 4 foram específicos e, para os DENV-3, dos 19 epitopos identificados, 9 reagiram cruzadamente para os 3 sorotipos e 2 foram considerados como específicos a este sorotipo (Quadro 4).

Tais resultados são úteis para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico para dengue, assim como auxiliam no aprimoramento de testes de diagnósticos já existentes para estes vírus, tornando-os mais específicos na identificação de casos suspeitos de dengue.

## Proteína NS1

A glicoproteína não-estrutural NS1 é expressa em células de mamíferos associada à membrana, sendo sua forma secretada altamente conservada nos quatro sorotipos (Flamand *et al.*, 1999). Nas últimas décadas, esta proteína tem sido utilizada no desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos para a sua detecção específica em

soros de pacientes suspeitos de infecção por dengue, já que sua forma hexamérica foi encontrada em soros de pacientes com dengue até o nono dia de doença (Falconar, 1997; Flamand *et al.*,1999, Young *et al.*,2000, Alcon *et al.*, 2002, Xu *et al.*,2006; Dussart *et al.*,2006; Kumarasamy *et al.*, 2007; Sekaran *et al.*, 2007; Blacksell *et al.*, 2007; Lapphra *et al.*,2008; Chuansumrit *et al.*, 2008; Phuong *et al.*,2009; Chaiyaratana *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009). Além disso, tem sido sugerido que esta proteína apresente papel definitivo na patogênese do DHF, devido à reação cruzada de anticorpos geradas contra a proteína NS1, podendo conferir a proteção contra os DENV (Schlesinger *et al.*,1993; Falconar *et al.*,1997; Valdés *et al.*,2000). Desta forma, a identificação de epitopos da proteína NS1 capazes de desencadear a resposta imune humoral em soros de pacientes com dengue é de grande valia.

Apesar de poucos estudos serem encontrados na literatura envolvendo a resposta imunológica a epitopos desta proteína, estudos prévios sugerem que os determinantes antigênicos possam reagir cruzadamente com a proteína NS1 (Russel *et al.*,1970; Schlesinger *et al.*,1985). Neste estudo, testes de reação cruzada empregando mistura de soros de pacientes com dengue, permitiram verificar que dos 10 epitopos identificados para os DENV-1, 8 epitopos foram comuns aos 3 sorotipos dos DENV. Da mesma forma, dos 8 epitopos identificados para os DENV-2, 5 apresentaram reatividade cruzada e para os DENV-3, 6 dos 10 epitopos identificados também reagiram para os 3 sorotipos (Quadro 4). Testes de reação cruzada empregando soros de indivíduos vacinados para febre amarela demonstraram que apenas um epitopo (M<sub>1106</sub>-P<sub>1110</sub>) reagiu cruzadamente (Quadro 5). Tal fato não ocorreu quando empregado soros de pacientes com outras patologias, sugerindo que tais epitopos possam ser utilizados em testes de diagnóstico específicos para dengue e para os *Flavivirus*, respectivamente.

Wu e colaboradores (2003) descreveram através da metodologia de phage-display, a região imunogênica 887-HKYSWK-891 do DENV-2. Entretanto, a utilização de soros de pacientes com dengue não reagiu com a seqüência descrita neste estudo. Este fato pode ser explicado pela metodologia utilizada, pois estudos prévios sugerem que as seqüências consensos obtidas através da metodologia de phage-display podem não ser encontradas em seqüências de antígenos naturais (Felici *et al.*,1993; Folgiori *et al.*,1994; Wu *et al.*, 2001). Em outro estudo, Chan & Guan (1994) descrevem epitopos consecutivos identificados pela metodologia de PEPSCAN, que reagiram com soros de pacientes com dengue. Dos 3 epitopos localizados na região G<sub>875</sub>-N<sub>905</sub>, G<sub>1024</sub>-Y<sub>1031</sub> e Q<sub>1038</sub>-G<sub>1046</sub>, apenas a região compreendida entre G<sub>875</sub>-N<sub>905</sub> dos DENV-2, não

correspondeu à reação específica do DENV-2, mas reagiu cruzadamente para os DENV-1 e DENV-3 (Tabela 6).

Dos Santos e colaboradores (2004) demonstraram a existência de um polipeptídeo recombinante na proteína NS1-NS2a reativa em soros de pacientes com dengue, através do ELISA. Esta região compreendeu a seqüência de aminoácidos S<sub>979</sub>-K<sub>1158</sub> do DENV-2 e os resultados obtidos neste estudo corroboram com este estudo e sugerem a existência de inúmeras regiões que poderiam contribuir para a reatividade no ELISA. Tais regiões estariam localizadas nas posições A<sub>979</sub>-D<sub>983</sub>, T<sub>1037</sub>-H<sub>1044</sub> e M<sub>1108</sub>-E<sub>1117</sub> (Quadro 3), sendo a primeira reativa aos 3 sorotipos dos DENV (Quadro 4).

Ainda para esta proteína, foi possível a identificação de 1 epítipo específico ao DENV-1 (S<sub>892</sub>-K<sub>897</sub>), 1 epítipo específico ao DENV-2 (P<sub>811</sub>-K<sub>816</sub>) e 2 epítipos específicos ao DENV-3 (L<sub>867</sub>-K<sub>874</sub> e F<sub>906</sub>-T<sub>913</sub>), constituindo a primeira descrição completa de epítipos imunogênicos da proteína NS1 reativos ao grupo dengue e específicos a cada sorotipo viral. A localização tridimensional dos epítipos identificados para esta proteína neste estudo não foi possível, devido à ausência de estruturas tridimensionais, que pudessem atuar como base para a modelagem da proteína-alvo.

### **Proteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b**

Informações sobre as proteínas que desencadeiam resposta imune humoral das proteínas NS2a, NS2b e NS4b são ausentes na literatura. Em geral, os estudos descritos tentam associar funções a estas proteínas e até o momento, seu papel na replicação viral é ainda incerto. Sugere-se que a proteína NS2a, seja alvo viral à ligação de organelas citoplasmáticas, durante a replicação viral e a NS4b poderia modular a replicação viral via interação com a proteína NS3 (Umareddy *et al.*, 2006).

Nossos estudos demonstraram a existência de 7 epítipos comuns aos 3 sorotipos dos DENV para a proteína NS2a e 1 epítipo específico para os DENV-1 (Quadro 4). Da mesma forma, para as proteínas NS2b e NS4b foram verificados a existência de 8 e 11 epítipos comuns aos 3 sorotipos dos DENV, respectivamente (Quadro 4).

Observações sobre a proteína NS4a do vírus Kunjin, membro da Família *Flaviviridae*, sugerem seu envolvimento em alguns passos da replicação viral, possivelmente através de componentes ancoradores da replicase em membranas intracelulares (Mackezine *et al.*, 1998). Mais recentemente, Miller e colaboradores (2007) descreveram que a proteína NS4a encontrava-se estritamente associada com a membrana celular do hospedeiro, mesmo na ausência do fragmento 2K que é descrito

como seqüência sinal para a translocação da proteína no retículo endoplasmático. Em concordância com AnandaRao e colaboradores (2005) e Miller e colaboradores (2007), soros de pacientes com infecção por DENV-2 contém anticorpos NS4a-específicos.

Segundo AnandaRao e colaboradores (2005), uma comparação com seqüências de outros flavivirus como febre amarela e vírus da encefalite japonesa, demonstraram que a região A<sub>2123</sub>-H<sub>2126</sub> definida da proteína NS4a para os DENV-2, pertencia somente ao grupo dengue. Neste estudo, esta seqüência fez parte de uma seqüência maior, composta pelos resíduos 2123-A(V)LHT(N)A(S)EA(H/G)-2130, que foi reativa apenas para os DENV-2 e DENV-3, mas não reagiu para os DENV-1, utilizando mistura de soros de pacientes com dengue. Da mesma forma, a seqüência Y<sub>2135</sub>-E<sub>2140</sub>, definida como reativa para os DENV-2 através da produção de peptídeos recombinantes, reagiu de forma cruzada para os DENV-1 e DENV-2, mas não reagiu para os DENV-3 em nosso estudo, o que indica que tais regiões não seriam boas candidatas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico dengue - específico. Em contrapartida, nossos resultados demonstraram a existência de 5 regiões reativas para a proteína NS4a dos 3 sorotipos dos DENV utilizando misturas de soros de pacientes com dengue apresentando altos níveis de IgG, duas destas seqüências provenientes do sorotipo 1, enquanto as seqüências restantes foram provenientes do sorotipo 3. Além disso, foi identificada uma seqüência específica para o sorotipo 2 (S<sub>2095</sub>-L<sub>2101</sub>), que poderia ser útil no desenvolvimento de testes sorotipo específicos (Quadro 4).

### **Proteína NS3**

A proteína NS3 é uma proteína que pertence ao complexo replicase dos DENV, cujas funções, apesar de extensivamente estudadas, são ainda apenas sugeridas na literatura. A atividade de serinil-proteases tem sido sugerida na porção amino-terminal, localizada nos primeiros 180 resíduos da proteína (Chambers *et al.*, 1990; Falgout *et al.*, 1991; Wengler *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1992).

As serinil-proteases são uma das proteases mais estudadas, onde estudos de biologia molecular e bioquímicos tem extensivamente documentado a existência de uma região catalítica, também chamada de tríade catalítica, composta pelos resíduos D<sub>1550</sub>-H<sub>1522</sub>-S<sub>1610</sub> (Murthy *et al.*, 1999).

A porção carboxi-terminal da proteína NS3 tem sido predita e implicada em três atividades enzimáticas: helicase, nucleotídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RTPase (Gorbalenya *et al.*, 1989; Suzich *et al.*, 1993; Warrenner *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999; Borowski

*et al.*,2001; Bartelma & Padmanabhan, 2002). O domínio mínimo da helicase e NTPase foi reportado ter início entre os resíduos 1635 e 1655, estendendo-se a toda região carboxi-terminal (Li *et al.*,1999).

Neste estudo, o modelo selecionado para a construção de estruturas tridimensionais foi constituído por uma proteína com atividade de helicase e, portanto, os 175 resíduos amino-terminal da proteína molde, não foram elucidados. Desta forma, a tríade catalítica não pode ser visualizada, porém, os resíduos responsáveis pelas atividades de helicase, NTPase e RTPase puderam ser visualizados (Figura 32). Todas as regiões, apesar de distantes em sua estrutura primária comportaram-se como um “cluster”, sendo constituídas por regiões tridimensionalmente próximas, que é uma característica descrita para esta região (Benarroch *et al.*,2004; Mancini *et al.*,2007; Rosales-Léon *et al.*,2007).

Praticamente todos os estudos envolvendo a proteína NS3 baseiam-se na busca por atividades biológicas e sua interação com antivirais. Desta forma, a identificação de seqüências imunogênicas responsáveis pelo desencadeamento de resposta humoral, poderia contribuir para a compreensão das atividades enzimáticas desta proteína, podendo ser uma ferramenta importante na busca por um tratamento específico para esta doença.

Neste estudo, através da síntese paralela de peptídeos em membranas, um total de 64 epitopos foram descritos, dos quais 18 foram identificados para os DENV-1, 26 para os DENV-2 e 20 para os DENV-3 (Quadro 3). Estudos de reação cruzada com soros de pacientes com outros sorotipos dos DENV permitiram a identificação de 11 epitopos comuns aos 3 sorotipos para os DENV-1, 7 epitopos comuns aos 3 sorotipos para os DENV-2 e 21 epitopos comuns aos 3 sorotipos para os DENV-3 (Quadro 4). Além disso, foi verificada a existência de 1 epitopo específico para os DENV-2 (V<sub>1702</sub>-L<sub>1711</sub>), e 3 epitopos específicos para os DENV-3 (A<sub>1600</sub>-P<sub>1605</sub>, V<sub>1701</sub>-M<sub>1705</sub> e Q<sub>1939</sub>-Q<sub>1951</sub>) – Quadro 4.

O papel da reação cruzada envolvendo células T e B em infecções causadas pelos DENV ainda é motivo de especulações. Entretanto, estudos revelam que os peptídeos capazes de desencadear resposta imune humoral poderiam atuar como componentes de uma vacina viral, já que os linfócitos T CD4 necessitam da ativação e proliferação de células humorais para o desencadeamento da resposta imune. Alternativamente, se a resposta de anticorpos estivesse ligada a ativação de células T CD4 e se tais peptídeos pudessem funcionar como epitopos de células T CD4 ativas,



tais peptídeos poderiam ser utilizados para desencadear a resposta imune (Roehrig *et al.*,1994; Janeway *et al.*,2001).

Kurane e colaboradores (1998) identificaram um epítopo reconhecido por clones de linfócito T CD4 e CD8 que reagiu cruzadamente com os sorotipos DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Esta região foi compreendida entre T<sub>1700</sub>-A<sub>1710</sub>. Curiosamente em nosso estudo, esta região foi considerada específica para os DENV-2 e DENV-3 e da mesma forma como descrito por Kurane *et al.* (1998), não apresentou reação com soros de pacientes infectados por DENV-1. Tais epítopos seriam bons candidatos a vacinas, se reagissem com os 4 sorotipos dos DENV, mas podem auxiliar na compreensão da resposta imunológica envolvendo tais proteínas.

### **Proteína NS5**

A proteína NS5 é considerada a proteína mais conservada dos flavivírus e por apresentar similaridade do motivo GDD, encontrado em seqüências RNA-dependentes de RNA-polimerase (RdRp) de outros vírus RNA fita positiva com esta função, tem sido implicada como sendo a polimerase viral (Bruenn, 1991). Nos DENV, este domínio catalítico está localizado na região 2762-3395 e contem seis motivos de seqüências na região C-terminal, identificados neste estudo como K2962-I2967, A3025-G3030, Q3091-T3107, I3154-D3157, L3175-K3180 e C3203-R3223.

Todos os estudos descritos na literatura envolvendo a proteína NS5 baseiam-se na determinação de atividades biológicas desta proteína e seu papel na replicação viral. Desta forma, este estudo constitui a primeira descrição envolvendo a identificação de epítopos responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune humoral da proteína NS5.

Através da síntese paralela de peptídeos em membranas, um total de 80 epítopos foi descrito, sendo 24 para os DENV-1, 27 para os DENV-2 e 29 para os DENV-3 (Quadro 3). Estudos de reação cruzada envolvendo mistura de soros de pacientes com outros sorotipos dos DENV identificaram 20 epítopos dos DENV-1 comuns aos 3 sorotipos dos DENV, 17 epítopos dos DENV-2 e 11 epítopos dos DENV-3 que reagiram cruzadamente com mistura de soros infectados por outros sorotipos de dengue. Através desta metodologia também foi possível a identificação de 2 epítopos específicos para os DENV-2 (L<sub>2619</sub>-F<sub>2626</sub> e M<sub>2813</sub>-L<sub>2821</sub>) e 2 para os DENV-3 (T<sub>2530</sub>-I<sub>2541</sub> e I<sub>3031</sub>-E<sub>3040</sub>) – Quadro 4.

Análises da estrutura tridimensional da proteína NS5 dos 3 sorotipos dos DENV permitiram verificar que os epitopos analisados estavam localizados na superfície da molécula, em região acessível ao solvente (Figuras 34, 35 e 36).

Testes empregando mistura de soros de indivíduos vacinados para febre amarela identificaram 3 epitopos de reação cruzada (P<sub>2699</sub>-W<sub>2710</sub>, Q<sub>3091</sub>-V<sub>3096</sub> e R<sub>3151</sub>-D<sub>3158</sub>), o que sugere sua utilização em testes de diagnóstico gênero-específicos (Quadro 5).

## 7. CONCLUSÕES

- Este estudo constituiu a primeira descrição completa de epitopos de todas as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.
- A síntese paralela de peptídeos em membrana demonstrou ser uma metodologia altamente eficaz no mapeamento de epitopos, onde foi possível identificar um total de 96 epitopos para os DENV-1, 103 para os DENV-2 e 107 epitopos para os DENV-3.
- A comparação dos resultados obtidos pela síntese paralela de peptídeos em membranas com a utilização de programas computacionais para a identificação de regiões com propensão à imunogenicidade demonstrou a preeminência da síntese paralela, visto que permitiu de maneira inequívoca a determinação de um grande número de regiões imunogênicas dos DENV simultaneamente.
- A utilização de misturas de soros de pacientes com DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em testes de reação cruzada inter-sorotipos identificou um total de 71 epitopos comuns aos 3 sorotipos para os DENV-1, 56 para os DENV-2 e 70 para os DENV-3. Tais epitopos podem ser utilizados no desenvolvimento de diagnósticos grupos-específicos, além de auxiliar no planejamento racional de futuras vacinas para dengue.
- Da mesma forma, foi possível a identificação de 3 regiões imunogênicas específicas para os DENV-1, 9 para os DENV-2 e 11 para os DENV-3, sugerindo a sua utilização no desenvolvimento de metodologias de diagnóstico sorotipos-específicos, além de contribuir para a compreensão da resposta imunológica de cada sorotipo dos DENV.
- A utilização de uma mistura de soros de vacinados para febre amarela, seguido da homologia de seqüência com outros membros do gênero *Flavivirus*, permitiram a identificação de 9 regiões comuns, que podem ser utilizadas no desenvolvimento de metodologias de diagnósticos gênero-específicos. Além disso, a utilização de mistura de soros de pacientes com outras patologias, devido à ausência de reação cruzada com qualquer epitopo identificado neste estudo comprova a especificidade dos resultados.

- Os resultados obtidos neste estudo abrem novas perspectivas com relação à patogenia da doença, que é um dos grandes problemas relacionados ao dengue.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections **J. Clin. Microbiol.**, 2002; 40 (2): 376–381
- Almond J, Clemens J, Engers H, Halstead S, Khiem HB, Pablos-Mendez A, Pervikov Y, Tram TT. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, VietNam. **Vaccine**. 2002. 20:3043-6.
- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in Flavivirus envelope protein E. **J. Virol**. 2001; 75: 4268-4275.
- Alvarenga LM, Diniz CR, Granier C, Chávez-Olortegui C. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes **Toxicon** 2002; 40, 89-95.
- AnandaRao R, Swaminathan S, Khanna N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. **Virus Res**. 2005 Sep;112(1-2):60-8.
- Anderson CR, Downs WG, Hill AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. **Science** 1956; 124: 224-25.
- Angibaud G, Luauté J, Laille M, Gaultier C. Brain involvement in dengue fever. **J. Clin. Neuroscience** 2001; 8 (1): 63-65.
- Araujo JMG, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Zanotto PMA, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infect. Genet. Evol.** 2009; 9: 716–25.
- Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. **J. Infect. Dis.** 1907; 4: 440–75.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acid Res.** 1997; 25: 3389–3402.

Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J. Infect. Dis.** 2006; 193: 1078–1088.

Barth OM. **Atlas of Dengue Viruses Morphology and Morphogenesis**. Rio de Janeiro: Imprinta Gráfica Ltda., 2000. v. 1. 209 p.

Barreto ML; Teixeira MG. Dengue fever: a call for local, national, and international action. **Lancet** 2008; 372 (9634):205.

Bartelma G, Padmanabhan R. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. **Virology**. 2002; 299(1):122-32.

Benarroch D, Selisko D, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5V-triphosphatase, and RNA 5V-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology**. 2004; 328: 208–218

Blacksell SD. **Diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of IgM antibodies to dengue virus during the acute phase of infection: a systematic review and meta-analysis**. In: WHO. Dengue diagnostics: proceedings of an international workshop-2004. Geneva, Switzerland. 2005, 32-38.

Blacksell SD, Bell D, Kelley J, Mammen Jr MP, Gibbons RV, Jarman RG, Vaughn DW, Jenjaroen K, Nisalak A, Thongpaseuth S, Vongsouvath M, Davong V, Phouminh P, Phetsouvanh R, Day NP, Newton PN. Prospective study to determine accuracy of rapid serological assays for diagnosis of acute dengue virus infection in Laos. **Clin. Vacc. Immunol.** 2007; 14:1458-64.

Blaney Jr JE, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. **Viral Immunol** 2006;19:10-32.

Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, Jansen C L, Wertheim-Van Dillen P M E, Van Der Noordaam J. Rapid and single method for purification of nucleic acid. **J. Clin. Microbiol.** 1990; 28: 495-503.

Borowski P, Lang M, Niebuhr A, Haag A, Schmitz H, Schulze zur Wiesch J, Choe J, Siwecka MA, Kulikowski T. Inhibition of the helicase activity of HCV NTPase/helicase by 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide-5'-triphosphate (ribavirin-TP). **Acta Biochim. Pol.** 2001;48(3):739-44.

Braga-Neto UM, Marques Jr ETA. From functional genomics to functional immunomics: New challenges, old problems, big rewards. **PLoS Comput. Biol.** 2006; 2(7): 651-62.

- Bricks LF. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria** (São Paulo) 2004;26(4):268-81
- Brooks, AJ, Johanson M, John AV, Xu Y, Jans DA. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin  $\beta$ 1 and importin  $\alpha$ / $\beta$ -recognized nuclear localization signals. **J. Biol. Chem.** 2002; 277 (39): 36399-407.
- Bruenn JA. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. **Nucl. Acid Res.** 2001; 19, 217–226.
- Callahan, JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, Porter KR, Murpgy GR, Suharyono W, King CC, Hayes CG, Temenak JJ. Development and evaluation of serotype and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **J. Clin. Microbiol.** 2001; 39:4119–4124
- Cardosa MJ, Wang SM, Sum MSH, Tio PH. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. **BMC Microbiol.** 2002; 2: 1-6.
- Cason J. Strategies for mapping and imitating viral B-cell epitopes. **J. Virol. Methods** 1994; 49(2):209-19.
- Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2009. 64:91-2.
- Chan SY, Kautner I, Lam SK. Detection and serotyping of dengue viruses by PCR: a simple, rapid method for the isolation of viral RNA from infected mosquito larvae. **South. Asian J. Trop. Med. Pub. Health.** 1994;25(2):258-61.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice C. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.** 1990; 44: 649-88.
- Chávez-Olórtegui C, Zanetti VC, Ferreira AP, Minozzo JC, Mangili OC, Gubert IC. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders **Toxicon** 1998; 36, 563-569.
- Chen TY, Lee CT. Guillain-Barré syndrome following dengue fever. **Ann. Emerg. Med.** 2007;50(1):94-5.
- Chou PY, Fasman GD, Prediction of protein conformation, **Biochem.** 1974; 13(2):222-45
- Chungue E, Marché G, Plichart R, Boutin JP, Roux J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of

- dengue antibodies: Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**; 1989; 83: 708-11.
- Churdboonchart V, Bhamarapravati N, Peampramprecha S, Sirinavin S. Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**; 1991; 44: 481-93.
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination - inhibition with arthropode - borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1958; 7: 561-73.
- Crill WD, Chang GJJ. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes. **J. Virol.** 2004: 13975–86.
- Coelho GE. Dengue: desafios atuais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 2008; Brasília, 17(3):231-233.
- Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, Despre's P, Sakuntabhai A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microb. Infect.** 2009; 11: 143-56.
- Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Aaskov J, Dung NM, Devine PL. Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and venture technologies dengue IgM and IgG dot blot. **J. Clin. Virol.** 2000; 16: 135-44.
- Cuzzubbo AJ, Endy TP, Nisalak A, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Ogata SA, Clements DE, Devine PL. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 2001. 8(6):1150-5.
- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet** 2006; 368: 170–73
- Deubel D. Recent advances and prospective researches on molecular epidemiology of dengue viruses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1992; 87 (5): 133-36.
- De Simone TS, Nogueira RM, Araújo ES, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G, Miagostovich MP. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2004; 98(9):553-62.
- Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. **J. Virol.** 2000; 74, 7814–23.

dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2004;71(2):144-52.

Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantitation of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.** 2002; 40: 2323–30.

Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MRT, Rodrigues SG, Storck-Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clin. Vacc. Immunol.** 2006; 13 (11): 1185-89.

Dutt MJ, Lee KH. Proteomic analysis. **Cur. Op. Biotechnol.** 2000, 11:176–179

Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, et al Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2003;69:48-60.

Egloff MP, Decroly E, Malet H, Selisko B, Benarroch D, Ferron F, Carnard B. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. **J. Mol. Biol.** 2007; 372:723-36.

Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of Hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **J. Virol.** 1985: 836-39.

Enshell-Seiffers D, Denisov D, Groisman B, Smelyanski L, Meyuhar R, Gross G, Denisova G, Gershoni JM. The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1. **J Mol Biol.** 2003; 334(1):87-101.

Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 2006; 13 (4): 372–73.

Falconar AK, Young PR. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. **J. Virol. Meth.** 1990; 30: 323-32.

Felici A, Amicosante G, Oratore A, Strom R, Ledent P, Joris B, Fanuel L, Frère JM. An overview of the kinetic parameters of class B beta-lactamases. **Biochem. J.** 1993; 291 (1):151-5.

Figueiredo LT, Carlucci RH, Duarte G. Prospective study with infants whose mothers had dengue during pregnancy. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 1991; 36: 417-21.

Figueiredo LTM. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Rev. Res.** 1996; 1: 9-16.

Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. Simpósio: **Virologia Médica I**, Ribeirão Preto; 1999; 32: 15-20.

Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. **Microb. Infect.** 2000; 2: 1643-49.

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J Virol.** 1999; 73(7):6104-10.

Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfré G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **EMBO J.** 1994;13(9):2236-43.

Forwood JK, Brooks A, Briggs LJ, Xiao CY, Jans DA, Vasudevan SG. The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NSL and inhibitory CK2 site. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1999; 257: 731-37.

Foster JE, Bennett SN, Carrington CVF, Vaughan H, Mcmillan WO. Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981–2000. **Viol.** 2004; 324: 48–59.

Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron** 1992; 48, 9217.

Frank, R., Overwin, H. **SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes.** In: Morris, G.E. (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Epitope Mapping Protocols*, 1996; vol. 66. Humana Press, Totowa, p.149.

Franco O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. **Rev. Brasil. Malar. Doen. Trop.** 1961; 13: 43-8.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 2002. 5 ed. Brasília: FUNASA. (a)

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). **Programa Nacional de Controle da dengue (PNCD).** 2002. FUNASA. 32 pg. (b)

Gausepohl H, Behn C. **Automated synthesis of solid phase bound peptides.** In: Koch J, Mahler M (eds) *Peptide arrays on membranes-synthesis and applications.* 2002; Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 55–69



- Garcia G, Vaughn DW, Angel RMD. Recognition of synthetic oligopeptides from nonstructural proteins NS1 and NS3 of dengue-4 virus by sera from dengue virus-infected children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1997; 56 (4): 466-70.
- Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AKI, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **J. Gen. Virol.** 2001; 82, 1867–76.
- Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. **BMJ** 2002; 324: 1563-66.
- Girard MP. Vaccins du futur. *Annales Pharmaceutiques Françaises*; 2009;
- Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res Immunol.** 1998;149:685–688.
- Graham H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. **J. Trop. Med.** (London) 1903; 6: 209.
- Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien E, Deubel V, Vorndam V, Osterhaus DME. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection. **Microbes Infect.** 1999; 1 (13): 1085-90.
- Gorbalenya AE, Koonin EV. Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. **Nucl. Acid. Res.** 1989;17(21):8413-40.
- Gromowski GD, Barrett AD. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. **Virol.** 2007;366(2):349-60.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1984; 33: 158-65.
- Gubler DJ. Dengue/Dengue hemorrhagic fever in the Americas: prospects for the year 2000. In: Halstead SB, Gomez-Dantes H. **Dengue: a worldwide problem, a common strategy.** Proceedings of the international conference on dengue and *Aedes aegypti* community-based control. Merida, México. 1992: 19-27.
- Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. In : World Health Organization, regional office for South-east Asia, New Delhi. **Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever.** Regional Publication, 1993; SEARO n° 22: 9-22.

Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect. Ag. Dis.** 1994; 2 (6):383-93.

Gubler DJ. **Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem.** In: Gubler DJ and Kuno G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Chapter 1. New York: CAB international. 1997: 1-22.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.** 1998; 11 (3): 480-96.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.** 2002; 33: 330-42.

Guzman MG and Kouri G Advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 1996; 3: 621-7

Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. **Lancet Infect. Dis.** 2002; 2: 33-42.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J. Clin. Virol.** 2003; 27: 1-13.

Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VLR, Kruger H, Pinheiro, F and Peters CJ. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemistry. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991; 45:408-417.

Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever: A public health problem and a field for research. **Bull. WHO.** 1980; 58 (1): 1–21.

Halstead SB. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science** 1988; 239 (4839): 476-81.

Halstead, SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev. Infect. Dis.**, 1989; 11(Suppl 4): S 830-9.

Halstead SB, Dean J. The future of dengue vaccines. **Lancet** 2002; 360:1243-45.

Halstead SB, Heiinz FX, Barrett ADT, Roehrig JT. Conference report on dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 june 2003 Vienna, Austria **Vaccine** 2005; 23: 849-56

Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. **Science** 1960; 31: 1102-3.

- Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, Dung NM, Van Ngoc T, Hien TT, Farrar J, Wills B, Simmons CP. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2009. 3: 360.
- Harris E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. **Viol.** 1999;253(1):86-95.
- Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Curr. Opinion Microbiol.** 2001; 4: 450-55.
- Henchal EA, Henchal LS, Thaisoonboonsuk BK. Topological mapping of unique epitopes on the dengue 2 virus NS1 protein using monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.** 1987; 68: 845-51.
- Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nat Protoc.** 2007;2(6):1333-49.
- Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infect. Genet. Evol.** 2003; 3: 19–28.
- Hombach, J, Cardoso JM, Sabchareon A, Vaughn DW, Barrett AD. Scientific consultation on immunological correlates of protection induced by dengue vaccines. Report from a meeting held at the World Health Organization 17–18 November 2005. Vaccine. Forthcoming 2007.
- Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA. Antibody mapping of the linear epitopes of CMY-2 and SHV-1 beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004, 48, (10), 3980-8.
- Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. **Viol.** 1999; 257, 156-67.
- Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, Yao CW, Shaio MF. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **J. Med. Virol.** 2001; 65: 553-60.
- ICTVdB Management. **Dengue virus.** In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), New York, USA: Columbia University. 2006.
- Innis BL., Eckels KH. Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the united states army medical research and materiel command. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2003; 69: 1-4.

- Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microb. Infect.** 2001;3(13):1167-71.
- Jianmin Z, Linn ML, Bilich R, Gentry MK, Aaskov JG. Analysis of functional epitopes on the dengue 2 E protein using monoclonal IgM antibodies. **Arch. Virol.** 1995; 140, 899-913.
- Kanesa-Thanan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. **Vaccine** 2001;19:3179-88
- Karplus PA, Schulz GE. Prediction of chain flexibility in proteins, **Naturwissenschaften** 1985;72: 212-213
- King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**; 1999; 30: 718-28.
- Koraka P, Suharti C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. **J. Clin. Microbiol.**; 2001; 39 (12): 4332-8.
- Korber B, LaBute M, Yusim K. Immunoinformatics comes of age. **PLOS Comp. Bio.** 2006; 2:6 484-492
- Kouri G, Guzmán MG, Bravo J. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 821-823.
- Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. **J. Virol.** 2001; 75 (10): 4633–40.
- Kong YY, Thaty CH, Tin TC. Rapid detection serotyping and quantification of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **J. Virol. Methods** 2006; 138: 123-30.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell** 2002, 108:717-25.
- Kuno G, Gomez I, Gubler D J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1987; 36 (1): 153-9.
- Kuno G, Cropp CB, Wong-Lee J, Gubler DJ. Evaluation of an IgM immunoblot Kit for dengue diagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1998; 59: 757-62.

- Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, Chua KB. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection **J. Virol. Methods** 2007; 140: 75–79.
- Kurane I, Janus J, Ennis FA. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. **Arch. Virol.** 1992;124(1-2):21-30.
- Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections **Arch. Virol.** 1990; 110: 91–101.
- Kurane I, Zeng L, Brinton MA, Ennis FA. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD41 cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. **Virol.** 1998; 240, 169–174.
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, **J. Mol. Biol.** 1982, 157, 105-132
- Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, Wu HC, Chang GJ, Wang WK. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **J. Virol.** 2008; 82 (13): 6631–43
- Lam SK, Devi S, Pang T. Detection of specific IgM in dengue infections. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.** 1987; 18: 532-8.
- Lam SK, Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diag. Virol.** 1998; 10:75-81.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 1992; 30: 545-51.
- Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2008. 60:387-391.
- Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. Procheck - A Program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallog.** 1993; 26: 283-291

- Laune D, Molina F, Ferrieres G, Villard S, Bes C, Rieunier F, Chardes T, Granier C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **J. Immunol. Methods** 2002; 267, 53-70.
- Laver WG, Air GM, Webster RG, Smith-Gill SJ. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. **Cell.** 1990;61(4):553-6
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, Ramos C, Rico-Hesse R Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J. Virol.** 1999; 73: 4738-47.
- Li L, Barrett ADT, Beasley DWC. Differential expression of domain III neutralizing epitopes on the envelope proteins of west nile virus strains. **Virol.** 2005; 335: 99-105.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.** 2002; 186: 1165-8.
- Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, Liu HS. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. **J. Med. Virol.** 2000; 60: 425–31.
- Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **J.Clin.Virol.** 2007; 38: 265–68.
- Lindenbach BD, Rice CM. **Flaviviridae: The viruses and their replication.** In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M. Virology. Fourth edition. Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins. 2001: 991-1041.
- Liu H, Chiou SS, Chen WJ. Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface. **J. Med. Virol.** 2004; 72, 618–624.
- Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature** 1992; 356: 83-85
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **PNAS** 2004; 101 (10): 3414–19.
- Machado RL, Pova MM, Calvosa VS, Ferreira MU, Rossit AR, dos Santos EJ, Conway DJ. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region. **J. Infect. Dis.** 2004;190(9):1547-55.

- Machado De Avila RA, Alvarenga LA, Tavares CA, Molina F, Granier C, Chavez-Olortegui C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon** 2004; 44, 233-41.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Viol.** 1998 Jun 5;245(2):203-15.
- Mancini EJ, Assenberg R, Verma A, Walter TS, Tuma R, Grimes JM, Owens RJ, Stuart DI. Structure of the murray valley encephalitis virus RNA helicase at 1.9 Angstrom resolution. **Protein Sci.** 2007 Oct;16(10):2294-300.
- Markoff L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. **Adv. Virus Res.** 2003;59:177-228.
- Mariano F. A dengue: considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul em 1916. **Arch. Bras. Med.** 1917; 7 (5): 272-7.
- Mathew A, Kurane I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Ennis FA, Rothman AL. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. **J. Immunol.** 1999, 162: 5609-15.
- McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H, Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection**; 2000; 2:1041-50.
- McBride WJ. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2009;64(1):31-6.
- McCloud TG, Cardiff RD, Brandt WE, Chiewsilp D, Russel PK. Separation of dengue strains on the basis of a nonstructural antigen. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 1971; 20(7): 964-68.
- Mendes TM, Maria WS, Granier C, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E. Epitope mapping of the antigenic protein TsNTxP from *Tityus serrulatus* scorpion venom using mouse, rabbit and sheep antibodies **Toxicon** 2004; 44, 617-24.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RMR, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Marchevsky RS, Mesquita RP, Schatzmayr HG. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinic. Neuropath.** 1997a; 16 (4): 204-8.
- Miagostovich MP, Santos FB, Araújo ESM, Dias J, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1997b; 92 (5): 595-600.

- Miagostovich MP, Vorndam V, Araújo ESM, Santos FB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J. Clin. Virol.** 1999; 14: 183-89.
- Miagostovich MP, De Simone TS, Araújo ESM, Miranda LHA, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Evaluation of IgM anti-dengue immune response in sequential infection. **Vírus Rev. Res.** 2001; 6 (2): 13-19
- Miagostovich MP, Santos FB, De Simone TS, Costa EV, Filippis AMB, Schatzmayr HG. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2002; 35: 1-4.
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker L, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations alterations in a 2K-regulated manner. **J. Biol. Chem.** 2007. 282(12): 8873-82.
- Miller, J.L., Dewet, B.J., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Gordon, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.** 2008; 4-17.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2003;100(12):6986-91
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC: Structure of the dengue virus envelope protein after fusion. **Nature** 2004; 427:313-19.
- Monath TP. **Pathology of the Flaviviruses.** In: Schlesinger S & Schlesinger M, eds. The Togaviridae and Flaviviridae, New York: Plenum Press. 1986: 375-424.
- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1994. 91:2395-2400.
- Monath TP, Heinz F. **Flaviviruses** In: Fields BN & Knipe DM, eds. Virology, 3th ed, Philadelphia: Lippincott - Raven, 1996: 961-1034.
- Moreno-Altamirano MMB, Sánchez-García FJ, Muñoz ML. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. **J. Gen. Virol.** 2002; 83, 1123-30.
- Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 1991; 29: 2107-10.



- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** 2005; 3: 13–22.
- Murthy HMK, Clum S, Padmanabhan R. Dengue virus NS3 serine protease. **J. Biol. Chem.** 1999; 274 (9): 5573-80.
- Navarro-Sanchez E, Despre's P, Cedillo-Barro'n L. Innate Immune Responses to Dengue Virus. **Arch. Med. Res.** 2005; 36: 425–35
- Nayeem A, Sitkoff D, Krystek S A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Sci.** 2006; 15 (4): 808-824.
- Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. **Mol. Pathol.** 2000;53(3):111-7.
- Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue hemorrhagic fever on liver function. **Res. Virol.;** 1997; 148:273-77.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MFDB, Farias Filho JC. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** 1988; 83 (2):219-25.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** 1990; 85 (2):253.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Cavalcanti SMB, Marzochi KBF, Scatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brasil. **Res. Virol.** 1992; 143: 423-27.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Moraes GC, Cardoso FMA, Ferreira J, Cerqueira V, Pereira M. Dengue type 2 outbreak in the south of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1995; 37: 507-10.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Cunha RV, Zagne SMO, Gomes FP, Nicol AF, Coelho JCO, Schatzmayr HG. Dengue fatal cases in primary infections in Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1999a; 93:418.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Santos FB, Filippis AMB, Souza RW, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira Filho G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1999b; 94(3): 297-304.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Publica** 2000, 16(1):205-211.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2001; 96 (7):925-926.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue virus in Brazil. **Dengue Bull.**; 2002a; 26:1-10.

Nogueira RMR, Filippis AMB, Coelho JMO, Sequeira PC, Schatzmayr HG, Paiva FG, Ramos AMO, Miagostovich MP. Dengue virus infection of the central nervous systems (CNS): a case report from Brazil. **South. Asian J. Trop. Med. Public. Health**; 2002b; 33 (1): 68-71.

Novotný V, Mayer A. . A case of male pseudopregnancy. **Cesk Psychiatr.** 1989; 85 (6):398-401.

Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, et al Sustained transmission of dengue virus type 1 in the pacific due to repeated introductions of different Asian strains **Virol.** 2004;329(2):505–12

Osanaí CH, Travassos Da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota Prévia. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1983; 25 (4): 53-4.

Paige CJ, Wu GE. The B cell repertoire. **FASEB J.** 1989; 3: 1818-24.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue in the Americas: 1980-87. **Epidemiol. Bull.** 1989; 10 (1):1-8.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue hemorrhagic fever (DHF) in the Americas, by country: number of reported cases of dengue and figures for 2002. **Dengue website.** 2002. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2002.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2002.htm) Acesso em: 25/08/2009.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue hemorrhagic fever (DHF) in the Americas, by country: number of reported cases of dengue and figures for 2004. **Dengue website.** 2004. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2004.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2004.htm) Acesso em: 20/08/2009.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue hemorrhagic fever (DHF) in the Americas, by country: number of reported cases of dengue and figures for 2006. **Dengue website.** 2006. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2006.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2006.htm) Acesso em: 20/08/2009.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Americas, by country: number of reported cases of dengue and figures for 2008. **Dengue website.** 2008. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2008.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2008.htm) Acesso em: 25/08/2009.

Pan American Health Organization (PAHO). Regional Update on Dengue in the Americas. Epidemiological Status, 2009.

- Pang T Vaccines for the prevention of neglected diseases-dengue fever. **Curr. Opin. Biotechnol.** 2003; 14: 332-6
- Parker J, Guo D, Hodges R. New hydrophilicity scale derived from High-Performance Liquid Chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochem.** 1986; 25:5425-32
- Pedro A. O Dengue em Nictheroy. **Brazil - Mexico**, 1923; 37: 173-77.
- Peng WP, Hou Q, Xia ZH, Chen D, Li N, Sun Y, Qiu HJ. Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library. **Virus Res.** 2008;135(2):267-72.
- Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue vírus. **Curr. Op. Microbiol.** 2008; 11:369–377.
- Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hungle Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in vietnamese patients with fever. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2009. 63:372-8.
- Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Américas. **World Health Stat.** 1997; 50 (3-4): 161-69.
- Pontius J, Richelle J, Wodak SJ. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. **J. Mol. Biol.** 1996; 264 (1): 121-136.
- Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3-untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. **Nucl. Acid Res.** 1997; 25: 1194–1202
- Putnak JR, Thasan NK, Innis BL. A putative receptor for dengue viruses. **Nature Med.** 1997; 3: 828 -29.
- Reineke U, Kramer A, Schneider-Mergener J. Antigen sequence and library based mapping of linear and discontinuous protein-protein interaction sites by spot synthesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 1999; 243: 23-36.
- Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. **Curr. Op.Biotechnol.** 2001, 12:59–64.

- Reineke U, Ivascu C, Schlieff M, Landgraf C, Gericke S, Zahn G, Herzel H, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences. **J. Immunol. Methods.** 2002;267(1):37-51.
- Reis T J. A febre dengue em Curitiba. **Gaz. Med. Bahia**, 1896; 4 (7): 263-6.
- Rezende JM. **Notas históricas e filosóficas sobre a palavra dengue.** Linguagem Médica, 3a. edição, Goiânia: AB Editora e Distribuidora de Livros Ltda; 2004.
- Rice CM, Strauss EG, Strauss JH. **Structure of the flavivirus genome.** In: Schlesinger S and Schlesinger M. *Togaviruses and flaviviruses*; N. York: Plenum Publishing Corp; 1986.
- Rigau-Pèrez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**; 1998; 352: 971-77.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**; 1997; 30(2):244-51.
- Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; 2001; 43(1):55-7.
- Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA, Chu MC Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation **Virology**; 1990; 177(2):668-75.
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**; 1998; 246: 317–28.
- Rosales-León L, Ortega-Lule G, Ruiz-Ordaz B. Analysis of the domain interactions between the protease and helicase of NS3 in dengue and hepatitis C virus. **J. Mol. Graph. Model.** 2007;25(5):585-94.
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* marks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1954; 3: 878-82.
- Rosen L. The emperor's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; 1977; 26 (3): 337-343.
- Rothman AL & Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**; 1999; 257:1-6.
- Rothman AL. **Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis.** In: *Dengue Virus*. 2010; vol 338; Springer Berlin Heidelberg: 83-98.

- Russell PK, McCown JM. Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization tests and identification of a serotype of dengue 3. **Am J. Trop. Med. Hyg**, 1972; 21(1): 97-99.
- Sabin AB. Research on dengue during World War II. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1952; 1: 30-50.
- Sabin AB, Schelinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**; 1945; 101: 640-42.
- Sang CT, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Evaluation of a commercial capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**; 1998; 5: 7-10.
- Sang RC. **Dengue in África**. In: World Health Organization on behalf of the special programme for research and training in tropical diseases, 2007. Disponível em [http://www.tropika.net/review/061001-Dengue in Africa/article.pdf](http://www.tropika.net/review/061001-Dengue%20in%20Africa/article.pdf). Acesso em 18/12/2009.
- Santos Filho OA, Alencastro RB. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova** 2003; 26: 253-59.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 1986 Abr/Jun; 81 (2): 245-6
- Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2000. 95 Suppl 1:179-181.
- Schrader M, Schulz-Knappe P. Peptidomics technologies for human body fluids. **Trends Biotechnol.**; 2001; 19 (1): 55-60.
- Shurtleff AC, Beasley DW, Chen JJ, Ni H, Suderman MT, Wang H, Xu R, Wang E, Weaver SC, Watts DM, Russell KL, Barrett AD. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. **Virology**; 2001;281(1):75-87.
- Sekaran SD, Ew CL, Kantesh BM, Appana R, Subramaniam G. Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. **J. Infect. Develop. Countries**. 2007. 1: 182-188.
- Se-Thoe SY, Ng MM, Ling AE. Retrospective study of western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. **J Med Virol**. 1999; 57: 322-30.

- Selligman SJ, Bucher DJ. The importance of being outer: consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E. **Trends in microbial.**, 2003; 11 (3): 22-24.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. **J Med. Virol.** 2000; 62(2):224-32.
- Shu PY, Huang JH Current advances in dengue diagnosis **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**; 2004; 11: 642–650
- Schuman S. Structure, mechanism and evolution of the mRNA capping apparatus. **Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.**; 2001; 66: 1-40.
- Siler JF, Hall M, Hitchens AP. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philipp. J. Sci.**, 1926; 29 (1-2): 1- 302.
- Silva JS, Mariano ZD, Scopel I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia** 2008; 3(6):163-175.
- Silva AN, Nascimento EJ, Cordeiro MT, Gil LH, Abath FG, Montenegro SM, Marques ET. Identification of continuous human B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3 (DENV-3). **PLoS One.** 2009;4(10):e7425.
- Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. **Chem. Rev.** 1997; 97(2):391-410.
- Soares CN, Faria LC, Peralta JM, Freitas MRG, Pucciono-Sohler M Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid analysis **J. Neurol. Sci.**; 2006; 249:19-24
- Soloviev M, Finch P. Peptidomics, current status. **J. Chromatog. B**, 2005; 815 (1-2): 11-24.
- Soloviev M. Peptidomics: Divide et Impera. **Meth. Molec. Biol.**; 2007, 615: 3-9.
- Soloviev, M. **Peptidomics approach to proteomics**. In: Soloviev M. Peptidomics: Methods and Protocols. 2010. 398 pg.
- Southern JA, Precious B, & Randall RE. Two nontemplated nucleotide additions are required to generate the P mRNA of parainfluenza type 2 since the RNA genome encodes protein V. **Virology**. 1991; 177, 388-390.
- Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bull WHO**; 2005; 83 (4): 308-14.

Stephenson J. **Dengue**. In: Halstead, SB. Dengue; Imperial College Press, London, 2008. 485 pp.

Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrener P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. **J. Virol.** 1993;67(10):6152-8.

Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2 **J. Med. Virol.**; 2007; 79, 300–07.

**SVS/MS** (Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde). Informe epidemiológico da dengue. Janeiro a Novembro de 2008. ano 2008; Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_janeiro\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf). Acessado em: 03/12/2008.

Ta M, Vrati S. Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus. **J Virol.** 2000;74(11):5108-15.

Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. **J. Clin. Microbiol.**, 1998 ; 36 (5): 1189-92.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiology and Preventive Measures of Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS** 1999; 8(4):5-33.

Thein S, Aung M N, Shwe T N, Aye M, Zaw A, Aye K M, Aaskov J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1997; 56 (5): 566-72.

Thisyakorn U, Thisyakorn C, Limpitikul W, Nisalak A. Dengue infection with central nervous system manifestations. **South Asian J.Trop.Med.Public Health** 1999; 30 (3): 504-6.

Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang YP, Watowich SJ. Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. **Antiviral Res.** 2009;82(3):110-4.

Trirawatanapong T, Chandran B, Putnak R, Padmanabhan R. Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. **Gene.** 1992;116(2):139-50.

Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J. Gen. Virol.** 2006;87(9):2605-14.

Valdes K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodriguez R, Guzman MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 2000; 7: 856-7.

- Van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. **Immunobiol.** 2009; 214: 613–29
- Vasconcelos PFC, Rosa APAT, Pinheiro FP, Rodrigues SG, Rosa EST, Cruz ACR, Ros JFST. Aedes aegypti, Dengue and Re-urbanization of Yellow Fever in Brazil and other South American Countries - Past and Present Situation and Future Perspectives. **Dengue Bull.** 1999; 23.
- Vasilakis N, Fokam EB, Hanson CT, Weinberg E, Sall AA, Whitehead SS, Hanley KA, Weaver SC, Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. **Virology.** 2008; 377: 296–307
- Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanaroj S, Solomon T, Dung NM, Cuzzubbo A, Devine PL. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection **J. Clin. Microbiol.** 1998; 36:234–238
- Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulchai B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.** 2000; 181: 2-9.
- Vaughn D. **Immunological responses to dengue virus** In: WHO Dengue diagnostics: proceedings of an international workshop-2004. Geneva, Switzerland; 2005: 16-18.
- Vásquez S, Guzmán MG, Guillen G, Chinea G, Pérez AB, Pupo M, Rodríguez R, Reyes O, Garay HE, Delgado I, Garcia G, Alvarez M. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine;** 2002; 20: 1823-30.
- Vásquez S, Pérez AB, Ruiz D, Rodríguez R, Pupo M, Calzada N, González L, González D, Castro O, Serrano T, Guzmán MG. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. **J. Clin. Virol.** 2004; 33 (2): 132-7.
- Videa E, Coloma MJ, Dos Santos FB, Balmaseda A, Harris E. Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides for diagnosis of dengue. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2005;12(7):882-4.
- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler DJ, Kuno G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** CAB International: Wallingford, USA. 1997.
- Waldman EA. O controle das doenças infecciosas emergentes e a segurança sanitária. Ver. **Direito sanitário,** 2000; 1 (1): 89-106.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.** 2000; 74: 3227–3234.



- Wang WK, Sung TL, Lee CN, Lin TY, King CC. Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2b of dengue 3 virus in vivo. **Virology**; 2002; 303:181-91.
- Warrener P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. **J. Virology**. 1993;67(2):989-96.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vazquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet** 1999; 354: 1431-34.
- Wearing HJ, Rohani P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2006; 103(31):11802-7.
- Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect. Gen. Evol.** 2009; 9: 523–40.
- Wei HY, Jiang LF, Fang DY, Guo HY. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides **J. Gen. Virology**. 2003; 84, 3095–98.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. 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. **J. Virology**. 1997. 71:6650–6661.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.** 2007. 5: 518-528.
- Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med. Clin. N. Am.** 2008; 92: 1377–90.
- Williams KL, Hochstrasser DF. **Introduction to Proteome**. In: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser (eds) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany 1997. pp1-11.
- Wilkins MR, Gooley AA. **Protein identification in proteomic projects**. In: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Chapter 3: 35-64.

World Health Organization (WHO). – Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). **International Nomenclature of Diseases**. In: Infectious diseases. Vol. II. Part 3: Viral Diseases. Geneva; World Health Organization; 1983. 101 p.

World Health Organization (WHO). **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd edition. Geneva; 1997.

World Health Organization (WHO). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Fact Sheet N° 117, revised April 2002. ano 2002. Disponível em [www.who.int/csr/disease/en/who](http://www.who.int/csr/disease/en/who). Acesso em: 12/12/2009.

World Health Organization (WHO). **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2009. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 160 pg.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat. Med.** 2000; 6: 816–20.

Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, King CC, Shaio MF. Identification of B-Cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001, 39 (3): 977-82.

Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY, Che XY. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol.** 2006;44(8):2872-8.

Young P, Paige A, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 38:1053–1057.

Zagne S M O, Alves V G F, Nogueira R M R, Miagostovich M P, Lampe E, Tavares W. Dengue haemorrhagic fever in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1994; 88: 677-9.

Zainah S, Wahab AH, Mariam M, Fauziah MK, Khairul AH, Roslina I, Sairulakhma A, Kadimon SS, Jais MS, Chua KB. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **J. Virol. Methods**. 2009;155(2):157-60.

Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG: Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J.** 2003, 22:2604-2613.

Zhu W, Qin C, Chen S, Jiang T, Yu M, Yu X, Qin E. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. **Virus Res.** 2007; 126 (1-2): 226-232.

Zulueta A, Martín J, Hermida L, Alavrez M, Valdés I, Prado I, China G, Rosário D, Guillén G, Guzmán MG. Amino acid changes in the recombinant dengue 3 envelope protein domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. **Virus Res.** 2006; 121: 65-73.

# **ANEXO 1**

Anexo 1: Regiões propensas ao reconhecimento por anticorpos para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, baseado em parâmetros de estrutura secundária, acessibilidade e solubilidade.

| Proteínas | DENV-1          |                   |               | DENV-2          |                  |               | DENV-3          |                 |               |
|-----------|-----------------|-------------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência         | Posição final | Posição inicial | Seqüência        | Posição final | Posição inicial | Seqüência       | Posição final |
| C         | 3               | NQRKKTGRPSF       | 13            | 40              | GRGP             | 43            | 3               | NQRKKTGKPS      | 12            |
|           | 24              | STGS              | 27            | 59              | IPPTA            | 63            | 24              | STGS            | 27            |
|           | 34              | SKGLLSGQGP        | 43            | 73              | KKSK             | 76            | 34              | SKGLLNGQGP      | 43            |
|           | 58              | AIPPTA            | 63            | 97              | RRRRT            | 101           | 57              | LAIPPTA         | 63            |
|           | 69              | WSSFKNKG          | 76            |                 |                  |               | 73              | KKSG            | 76            |
| prM-M     | 119             | TRGGEP            | 124           | 119             | TRNGEP           | 124           | 119             | SRDGE           | 123           |
|           | 141             | TSGGVNM           | 147           | 172             | QNEPEDIDWCNSTST  | 187           | 141             | TASGIN          | 146           |
|           | 174             | EPDD              | 177           | 192             | GTCTTTGE         | 199           | 167             | CPHI            | 170           |
|           | 191             | YGTCSTGEHRRDKRS   | 206           | 244             | HPGF             | 247           | 191             | YGTCNQ          | 196           |
|           | 225             | MSSEGA            | 230           |                 |                  |               | 244             | HPGF            | 247           |
|           | 243             | RHPGF             | 247           |                 |                  |               | 258             | IGTSL           | 262           |
| E         | 287             | GNRDF             | 291           | 287             | SNRDF            | 291           | 287             | GNRDF           | 291           |
|           | 294             | GLSGA             | 298           | 295             | VSGGS            | 299           | 295             | LSGA            | 298           |
|           | 307             | HGSC              | 310           | 307             | HGSC             | 310           | 307             | HGGC            | 310           |
|           | 315             | AKNKPTL           | 321           | 316             | KNKPT            | 320           | 317             | NKPTL           | 321           |
|           | 346             | SNTTDSRCPTQGE     | 359           | 347             | NTTRESRCPTQGEPSL | 362           | 349             | TTDSRCPTQ       | 357           |
|           | 378             | DRGWNGCG          | 386           | 378             | RGWNGCG          | 386           | 378             | DRGWNGCG        | 386           |
|           | 389             | GKGS              | 392           | 389             | GKGG             | 392           | 389             | GKGS            | 392           |
|           | 415             | LKYS              | 418           | 422             | TPHSG            | 426           | 424             | HTGDQHVGNETQG   | 437           |
|           | 424             | HTGDQHVGNETTE     | 437           | 434             | DTGK             | 437           | 454             | PEYGT           | 458           |
|           | 446             | PQAPTS            | 451           | 445             | TPQSS            | 449           | 464             | SPRTGL          | 469           |
|           | 456             | TDYG              | 459           | 456             | TGYG             | 459           | 494             | LPLPWTSGATTETPT | 508           |
|           | 465             | CSPRTGLD          | 472           | 466             | SPRTGL           | 471           | 550             | NSGGT           | 554           |
|           | 496             | LPLPWSGASTSQETWNR | 513           | 496             | LPLPWLPGADTQGSNW | 511           | 616             | STEDGQKHAHNGR   | 628           |
|           | 552             | TSGT              | 555           | 553             | SSGN             | 556           | 649             | PPFGESNI        | 656           |
|           | 607             | EGTDAPCK          | 614           | 576             | GMSY             | 579           | 671             | RKGSSI          | 676           |
|           | 621             | DEKGVQNG          | 629           | 595             | TQHG             | 598           | 699             | DFGSVGG         | 705           |
|           | 643             | KPVNIETPPFG       | 654           | 607             | EGDGSPCK         | 614           | 746             | LNSKNTSMSFSC    | 757           |
|           | 673             | KKGSSIG           | 679           | 640             | EKDSP            | 644           |                 |                 |               |
| 701       | DFGSIGG         | 707               | 651           | PPFGDSYI        | 658              |               |                 |                 |               |
| 748       | LNSRSTS         | 754               | 663           | EPGQ            | 666              |               |                 |                 |               |

Anexo 1 (continuação): Regiões propensas ao reconhecimento por anticorpos para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, baseado em parâmetros de estrutura secundária, acessibilidade e solubilidade.

| Proteínas | DENV-1          |                 |               | DENV-2          |                   |               | DENV-3          |                   |               |
|-----------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência       | Posição final | Posição inicial | Seqüência         | Posição final | Posição inicial | Seqüência         | Posição final |
| E         |                 |                 |               | 673             | KKGSSIGQ          | 680           |                 |                   |               |
|           |                 |                 |               | 701             | DFGSLGG           | 707           |                 |                   |               |
|           |                 |                 |               | 748             | MNSRSTS           | 754           |                 |                   |               |
| NS1       | 776             | DSGC            | 779           | 789             | KCGSG             | 793           | 787             | KCGSG             | 791           |
|           | 783             | WKGRELKCGSG     | 793           | 797             | TDNVH             | 801           | 811             | SPKR              | 814           |
|           | 808             | KFQADSPKR       | 816           | 808             | KFQPESPSK         | 816           | 873             | GKRTLTP           | 879           |
|           | 866             | GNANG           | 870           | 875             | GKRSLRPQPTLKYKYS  | 889           | 902             | QNSSF             | 906           |
|           | 886             | HKYSWKSWGKA     | 896           | 911             | DGPET             | 915           | 909             | DGPNTPECPSA       | 919           |
|           | 911             | DGPDTPECPDE     | 921           | 918             | CPNTNRAWNS        | 927           | 930             | DYGF              | 933           |
|           | 931             | EDYGF           | 935           | 998             | CHWPKSHTLWSNGV    | 1011          | 978             | QKNGSW            | 983           |
|           | 946             | LRDSYT          | 951           | 1019            | PKNFAGPVSQHNYRPGY | 1035          | 996             | CTWPKSHTLWSNGV    | 1009          |
|           | 954             | CDHR            | 957           | 1041            | GPWH              | 1044          | 1017            | PKSLAGPISQHNHRPGY | 1033          |
|           | 998             | CIWPKSHTLWSNGV  | 1011          | 1064            | EDCGNRGPSL        | 1073          | 1039            | GPWHL             | 1043          |
|           | 1021            | MYGGPISQHNYRPGY | 1035          | 1078            | ASGK              | 1081          | 1061            | TENCGTRGPSL       | 1071          |
|           | 1040            | AGPWHL          | 1045          | 1086            | WCCRCTL           | 1093          | 1076            | VSGK              | 1079          |
|           | 1065            | HCGSRGPSL       | 1073          | 1099            | RGEDGCW           | 1105          | 1084            | WCCRCTLPLR        | 1095          |
| 1088      | CRSCT           | 1092            |               |                 |                   |               |                 |                   |               |
| 1096      | LRFRGEDGCW      | 1105            |               |                 |                   |               |                 |                   |               |
| NS2a      | 1126            | SAGSGEVDSFS     | 1136          | 1173            | GNMSF             | 1177          | 1126            | GSGK              | 1129          |
|           | 1154            | WSGK            | 1157          | 1239            | SQST              | 1242          | 1169            | LSGQ              | 1172          |
|           | 1191            | ASDKMGMGT       | 1199          | 1312            | SQKTDW            | 1318          | 1186            | GNASD             | 1191          |
|           | 1223            | LTSRE           | 1227          | 1327            | GLNPTA            | 1332          | 1221            | LTSREN            | 1226          |
|           | 1243            | LPNS            | 1246          | 1340            | RTSKKRS           | 1346          | 1310            | SMRKTDW           | 1316          |
|           | 1268            | QPHQ            | 1271          |                 |                   |               |                 |                   |               |
|           | 1310            | STTSQK          | 1315          |                 |                   |               |                 |                   |               |
|           | 1324            | GSFG            | 1327          |                 |                   |               |                 |                   |               |
| 1342      | WGRK            | 1345            |               |                 |                   |               |                 |                   |               |
| NS2b      | 1346            | SWPLNEGI        | 1353          | 1367            | LKND              | 1370          | 1344            | RRSWPLNEGV        | 1351          |
|           | 1367            | LKND            | 1370          | 1412            | ISGSSP            | 1417          | 1365            | LRND              | 1368          |
|           | 1390            | SGSSA           | 1394          | 1424            | SEDG              | 1427          | 1389            | GTSA              | 1392          |
|           | 1412            | HSGTSHN         | 1418          |                 |                   |               | 1468            | QKQTQR            | 1473          |
|           | 1471            | KKKQR           | 1475          |                 |                   |               |                 |                   |               |

Anexo 1 (continuação): Regiões propensas ao reconhecimento por anticorpos para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, baseado em parâmetros de estrutura secundária, acessibilidade e solubilidade.

| Proteínas | DENV-1            |                 |               | DENV-2          |                   |               | DENV-3          |                  |               |
|-----------|-------------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|
|           | Posição inicial   | Seqüência       | Posição final | Posição inicial | Seqüência         | Posição final | Posição inicial | Seqüência        | Posição final |
| NS3       | 1481              | DTPSPP          | 1486          | 1482            | VPSPPP            | 1487          | 1480            | VPSPPET          | 1486          |
|           | 1503              | RGLLGRSQ        | 1510          | 1535            | HRGKRIEPSW        | 1544          | 1526            | TRGA             | 1529          |
|           | 1554              | YGGGWRFQGSWNTGE | 1568          | 1555            | GGGWK             | 1559          | 1534            | NGK              | 1536          |
|           | 1576              | EPGKNPK         | 1582          | 1576            | EPGKNPRA          | 1583          | 1553            | GGGW             | 1556          |
|           | 1589              | GTFKTPEG        | 1596          | 1594            | NTGT              | 1597          | 1560            | AQWQKGEE         | 1567          |
|           | 1606              | KPGTSGSPIVNRGK  | 1620          | 1606            | SPGTSGSP          | 1613          | 1575            | PGKNPKN          | 1581          |
|           | 1646              | SQEGPLP         | 1652          | 1616            | DRKG              | 1619          | 1585            | MPGT             | 1588          |
|           | 1670              | HPGSGK          | 1675          | 1646            | SIEDNPEI          | 1653          | 1592            | TTGE             | 1595          |
|           | 1725              | SEHTGR          | 1730          | 1669            | HPGA              | 1672          | 1604            | KPGTSGSP         | 1611          |
|           | 1747              | SPVRVPNY        | 1754          | 1726            | HTGR              | 1729          | 1642            | NAEPDGP          | 1648          |
|           | 1793              | TPPGSV          | 1798          | 1792            | TPPGSRDPFPQSNAPI  | 1807          | 1668            | HPGSGK           | 1673          |
|           | 1801              | FPQSNA          | 1806          | 1818            | SWNSGHE           | 1824          | 1719            | TATKSEHTGR       | 1728          |
|           | 1815              | IPERSWNSGYD     | 1825          | 1829            | FKGK              | 1832          | 1790            | ATPPGT           | 1795          |
|           | 1830              | FPGK            | 1833          | 1841            | KAGNDI            | 1846          | 1801            | QSNAPI           | 1806          |
|           | 1840              | SIKSGND         | 1846          | 1851            | RKNG              | 1854          | 1816            | RSWNSGNE         | 1823          |
|           | 1852              | RKNG            | 1855          | 1863            | KTFDSEY           | 1869          | 1850            | RKNG             | 1853          |
|           | 1863              | RKTFDTEYQTKNNDW | 1878          | 1874            | TNDW              | 1877          | 1861            | RKTF             | 1864          |
|           | 1901              | PRRC            | 1904          | 1899            | DPRRC             | 1903          | 1871            | TKLNDW           | 1876          |
|           | 1912              | DGPER           | 1916          | 1937            | GRNPRNENDQY       | 1947          | 1898            | DPRRC            | 1902          |
|           | 1938              | GRNQKKEGDQ      | 1947          | 1973            | INTPEG            | 1978          | 1910            | DGPER            | 1914          |
|           | 1953              | QPLNDE          | 1959          | 2013            | RRGDL             | 2017          | 1931            | RRGRVGRNPQKENDQY | 1946          |
|           | 1973              | NINTPEG         | 1979          | 2029            | GINYADRRWCDFGIKNN | 2045          | 1951            | QPLNDE           | 1957          |
|           | 2014              | RRGDL           | 2018          | 2076            | YSDP              | 2079          | 1972            | INTPEG           | 1977          |
| 2031      | FQYSDRRWCDFGERNNQ | 2047            |               |                 |                   | 2012          | RRGDL           | 2016             |               |
| 2066      | KLRPRW            | 2071            |               |                 |                   | 2033          | DRKWCFDGERNNQ   | 2045             |               |
| 2076      | TYSDP             | 2080            |               |                 |                   | 2074          | TYSDP           | 2078             |               |
| NS4a      | 2092              | GRRSVSGD        | 2099          | 2104            | GRLP              | 2107          | 2127            | EHGGR            | 2131          |
|           | 2168              | SGKGLGKTS       | 2176          | 2166            | MSGKGI            | 2171          | 2167            | GKGIGKTS         | 2174          |
|           | 2214              | IPEPDRQR        | 2221          | 2194            | QPHW              | 2197          | 2183            | SSGM             | 2186          |
|           | 2222              | TPQDN           | 2226          | 2219            | QRT               | 2221          | 2220            | AIVLE            | 2224          |
|           |                   |                 | 2222          | PQDN            | 2225              |               |                 |                  |               |

Anexo 1 (continuação): Regiões propensas ao reconhecimento por anticorpos para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, baseado em parâmetros de estrutura secundária, acessibilidade e solubilidade.

| Proteínas | DENV-1          |                 |               | DENV-2          |           |               | DENV-3          |                    |               |
|-----------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------|---------------|-----------------|--------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência       | Posição final | Posição inicial | Seqüência | Posição final | Posição inicial | Seqüência          | Posição final |
| NS4b      | 2303            | NTTA            | 2306          | 2266            | SESN      | 2269          | 2251            | TKRDLGMSKEPGVVSPTS | 2268          |
|           | 2324            | DKGW            | 2327          | 2276            | RPAS      | 2279          | 2300            | NSTA               | 2303          |
|           | 2443            | TGPLT           | 2447          | 2299            | IENSSV    | 2304          | 2321            | DKGW               | 2324          |
|           | 2452            | GSPGKF          | 2457          | 2322            | GKGW      | 2325          | 2364            | GPGL               | 2367          |
|           | 2487            | SLGGGRR         | 2493          | 2365            | GPGL      | 2368          | 2386            | NPTV               | 2389          |
|           |                 |                 |               | 2402            | PYDPKF    | 2407          | 2439            | ATGP               | 2442          |
|           |                 |                 |               | 2440            | ATGP      | 2443          | 2449            | GSPGKF             | 2454          |
|           |                 |                 |               | 2453            | GRF       | 2455          | 2486            | GTGKR              | 2490          |
|           |                 |                 |               | 2483            | MKNTTNTRR | 2491          |                 |                    |               |
| NS5       | 2494            | GTGA            | 2497          | 2509            | NTLGKN    | 2515          | 2491            | GTGS               | 2494          |
|           | 2512            | QLSKSEFNTYKRSGI | 2526          | 2520            | KKSG      | 2523          | 2520            | KSG                | 2522          |
|           | 2562            | NLVKPEG         | 2568          | 2559            | RNMVTPEG  | 2566          | 2546            | SRGSA              | 2550          |
|           | 2572            | DLGCGRGGWSYICAG | 2586          | 2582            | CGGLK     | 2586          | 2560            | MVIP               | 2563          |
|           | 2596            | YTKGGPGHEEP     | 2606          | 2595            | TKGGPGH   | 2601          | 2572            | CGRGGWSYYC         | 2581          |
|           | 2620            | HSGKD           | 2624          | 2626            | TPPEK     | 2630          | 2593            | YTKGGPGH           | 2600          |
|           | 2629            | PPEK            | 2632          | 2639            | GESSPNP   | 2645          | 2626            | PPEK               | 2629          |
|           | 2641            | GESSPNPTIEE     | 2651          | 2663            | LNNNTQ    | 2668          | 2638            | GESSPSPT           | 2645          |
|           | 2664            | WLRGNQ          | 2669          | 2675            | NPYM      | 2678          | 2673            | NPYM               | 2676          |
|           | 2701            | PLSRNST         | 2707          | 2698            | RNPLSRNST | 2706          | 2695            | VRNPLSRNST         | 2704          |
|           | 2715            | SCGTG           | 2719          | 2714            | NATG      | 2717          | 2711            | SNGTGN             | 2716          |
|           | 2739            | HRKPTYERD       | 2747          | 2750            | GSGT      | 2753          | 2736            | HRRPT              | 2740          |
|           | 2751            | GAGT            | 2754          | 2785            | YDQDHPYK  | 2792          | 2755            | NAEPETPNM          | 2763          |
|           | 2780            | HKSTWHYDEDNPYK  | 2793          | 2797            | HGSYE     | 2801          | 2778            | NSTWHYDDENPYK      | 2790          |
|           | 2798            | HGSYEVKPSGSA    | 2809          | 2804            | QTGSA     | 2808          | 2795            | HGSY               | 2798          |
|           | 2822            | KPWD            | 2825          | 2821            | KPW       | 2823          | 2835            | TTPFG              | 2839          |
|           | 2837            | DTPFG           | 2842          | 2836            | DTPF      | 2840          | 2852            | TPRSMPGT           | 2859          |
|           | 2855            | RTRAKRGT        | 2862          | 2877            | GKKKTPRM  | 2884          | 2875            | GRNKRPR            | 2881          |
|           | 2877            | LSRNKKP         | 2883          | 2936            | GKCE      | 2939          | 2934            | GKCG               | 2937          |
|           | 2896            | VRSN            | 2899          | 2992            | ENSLSG    | 2997          | 2968            | LGARY              | 2972          |
| 2935      | KQGK            | 2938            | 3064          | YQNK            | 3067      | 2989          | RENSYSGVEGGL    | 3001               |               |



Anexo 1 (continuação): Regiões propensas ao reconhecimento por anticorpos para cada proteína dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, baseado em parâmetros de estrutura secundária, acessibilidade e solubilidade.

| Proteínas | DENV-1          |               |               | DENV-2          |                |               | DENV-3          |           |               |
|-----------|-----------------|---------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|-----------|---------------|
|           | Posição inicial | Seqüência     | Posição final | Posição inicial | Seqüência      | Posição final | Posição inicial | Seqüência | Posição final |
| NS5       | 2960            | AKGS          | 2963          | 3074            | PTPRG          | 3078          | 3014            | IPGG      | 3017          |
|           | 2991            | SRENSLSG      | 2998          | 3086            | RRDQRGSGQVGTYG | 3099          | 3073            | TPTG      | 3076          |
|           | 3017            | IPGG          | 3020          | 3152            | SGDDC          | 3156          | 3085            | KDQRGSG   | 3091          |
|           | 3065            | YQNK          | 3068          | 3187            | PSRGWWDWT      | 3195          | 3185            | QPSKGWHD  | 3192          |
|           | 3075            | PAKNG         | 3079          | 3234            | GAGWS          | 3238          | 3233            | GAGWS     | 3237          |
|           | 3087            | RRDQRGSGQVGT  | 3098          | 3280            | PTSR           | 3283          | 3279            | PTSRTTW   | 3285          |
|           | 3116            | ESEGIFFPSELES | 3128          | 3309            | IQENPW         | 3314          | 3289            | AHHQ      | 3292          |
|           | 3188            | PSKGWWDWQ     | 3196          | 3335            | DQWCG          | 3339          | 3308            | IEDNPWM   | 3314          |
|           | 3235            | GAGW          | 3238          |                 |                |               | 3327            | PYLG      | 3330          |
|           | 3247            | GKSY          | 3250          |                 |                |               | 3334            | DQWCG     | 3338          |
|           | 3281            | PTSRTTW       | 3287          |                 |                |               |                 |           |               |
|           | 3312            | ENPW          | 3315          |                 |                |               |                 |           |               |
|           | 3322            | VSSW          | 3325          |                 |                |               |                 |           |               |
|           | 3330            | YLGKR         | 3334          |                 |                |               |                 |           |               |
|           | 3336            | DQWC          | 3339          |                 |                |               |                 |           |               |
|           | 3367            | GNENY         | 3371          |                 |                |               |                 |           |               |
| 3382      | KNESDPE         | 3388          |               |                 |                |               |                 |           |               |

# **ANEXO 2**

Anexo 2: Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |   |               | DENV-2          |   |               | DENV-3            |                                   |               |
|-----------|-----------------|---|---------------|-----------------|---|---------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia                                       | Posição final | Posição inicial | Sequencia                                 | Posição final | Posição inicial   | Sequencia                         | Posição final |
| C         | 1               | MNNQRKKTGRPSFNMLKRARNRVS<br>TGSQAKRFSKGLLSGQGPM | 44            | 1               | MNNQRKKARSTP                              | 12            | 1                 | MNNQRKKTGKPSINM                   | 15            |
|           | 69              | WSSFKNKA  | 77            | 15              | MLKREARNRVST                              | 25            | 17                | KRVARNRVSTGSQAKRFSKGL<br>LNGQGPM  | 44            |
|           | 82              | RGFKKEIS  | 89            | 29              | LTKRFS                                    | 34            | 70                | GTFKKSGA                          | 77            |
|           | 95              | MNRRKRSV  | 102           | 39              | QGRGPL                                    | 44            | 79                | KVLKGFKEIS                        | 89            |
|           |                 |   |               | 70              | GTIKKSKAIN                                | 79            | 95                | INKRKKTS                          | 102           |
|           |                 |   | 82            | RGFRKEIGR       | 90  |               |                   |                                   |               |
|           |                 |   | 95            | LNRRRRTA        | 102                                       |               |                   |                                   |               |
| prM-M     | 118             | TTRGGEP   | 124           | 117             | LTRNGEP                                   | 124           | 117               | LTSRDGEPRMIVGKNERGKSL             | 137           |
|           | 129             | SKQERGKSL                                       | 137           | 129             | GRQEKGKSL                                 | 137           | 141               | TASG                              | 144           |
|           | 141             | TSGGVNM   | 147           | 140             | KTEDGVN                                   | 146           | 154               | DLGEMCDDTVTYK                     | 166           |
|           | 154             | DLGELCEDTMTYKCPRITEAEPDDVD                      | 179           | 157             | ELCEDTITY                                 | 165           | 169               | HITEVEPEDIC                       | 180           |
|           | 192             | GTCSQTGEHRRDKRSV                                | 207           | 168             | PLLQNEPEDIDWCNSTS                         | 186           | 192               | GTCNQAGERRRDKRSVA                 | 208           |
|           | 217             | LETRTET   | 223           | 192             | GTCTTTGEHRRREKRSV                         | 207           | 215               | MGLDTRTQT                         | 223           |
|           | 225             | MSSEGAWKQIQKVE                                  | 238           | 215             | MGLETRTETWMSSEGAW                         | 231           | 226               | SAEGAWRQVEKVE                     | 238           |
|           | 262             | ITQK  | 265           |                 |   |               | 259               | GTSL                              | 262           |
| E         | 287             | GNRDFVEGLSGA                                    | 298           | 287             | SNRDFVEGVSGGS                             | 299           | 287               | GNRDFVEGLSG                       | 297           |
|           | 315             | AKNKPTL   | 321           | 314             | MAKNKPTL                                  | 321           | 315               | AKNKPTLDIELQKTEA                  | 330           |
|           | 324             | ELLKTEVTN                                       | 332           | 324             | ELIKTEAKQPATLRKYCI                        | 341           | 343               | GKITNITTD SRCPTQGEAVL<br>PEEQDQNY | 370           |
|           | 343             | AKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDA                       | 368           | 343             | AKLTNTTETS                                | 372           | 375               | TYVDRGWGNGC                       | 385           |
|           | 375             | TFVDRGWGNGC                                     | 385           | 375             | SMVDRGWGNG                                | 384           | 389               | GKGS                              | 392           |
|           | 389             | GKGS  | 392           | 389             | GKGG                                      | 392           | 403               | EPIEGVVQ                          | 411           |
|           | 403             | TKLEGKIVQ                                       | 411           | 400             | TCKKNMEG                                  | 407           | 424               | HTGDQHVGNETQGV                    | 438           |
|           | 413             | ENLKYS  | 418           | 422             | TPHSGEEHVGNDTGKHGEEIKITP<br>QSSITEAELTGYG | 459           | 442               | ITPQAST                           | 448           |
|           |                 |   |               |                 |   |               | 463               | CSPRTGLDF                         | 471           |
|           |                 |   |               |                 |   | 498           | WTSGATTETPTWNRKEL | 514                               |               |

Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |                                    |               | DENV-2          |                     |               | DENV-3          |                        |               |
|-----------|-----------------|------------------------------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia                          | Posição final | Posição inicial | Sequencia           | Posição final | Posição inicial | Sequencia              | Posição final |
| E         | 424             | HTGDQHQVGNETTE                     | 437           | 465             | CSPRTGLDF           | 473           | 521             | AHAKKQE                | 527           |
|           | 447             | QAPTS                              | 451           | 481             | MEEKA               | 485           | 533             | LGSQEGA                | 537           |
|           | 465             | CSPRTGLD                           | 472           | 502             | PGADTQGSNWIQKET     | 516           | 546             | TEIQNSGGTS             | 555           |
|           | 481             | MKEKS                              | 485           | 522             | NPHAKKQD            | 529           | 561             | LKRLKMDKLELKGMS        | 576           |
|           | 499             | PWTSGAST                           | 516           | 535             | SQEGA               | 539           | 586             | LKKEVSETQH             | 595           |
|           | 523             | AHAKKQE                            | 529           | 551             | QMSSGN              | 556           | 602             | VEYKGEDAPCK            | 612           |
|           | 535             | SQEG                               | 538           | 563             | LKRLRMDKLQL         | 574           | 615             | FSTEDGQGKAHNGRLIT      | 631           |
|           | 548             | TEIQTSGT                           | 555           | 582             | CTGK                | 585           | 636             | VVTKKEEPVNIEAPPPFGESNI | 656           |
|           | 567             | LKMDKLTLLKGT                       | 578           | 587             | KIVKEIAETQHG        | 598           | 660             | IGDKAL                 | 665           |
|           | 584             | GSFLEKEVAETQH                      | 597           | 604             | VQYEGDGSPPCKI       | 615           | 668             | NWYRKGSSI              | 676           |
|           | 604             | VKYEGTDAPCK                        | 614           | 620             | MDLEKRHAL           | 628           | 678             | KMFEATARGARRMAI        | 692           |
|           | 618             | LTQDEKGVVTQNGR                     | 630           | 638             | VTEKDSPVNIEAPPPGDSY | 657           | 746             | LNSKNTS                | 752           |
|           | 638             | VTDKEKPVNIETEPFGES                 | 656           | 663             | EPGQL               | 667           |                 |                        |               |
|           | 661             | GAGEKAL                            | 667           | 670             | NWFKKGSSIGQ         | 680           |                 |                        |               |
|           | 671             | WFKKGSSIGK                         | 680           | 684             | TTMRGAKRMAI         | 694           |                 |                        |               |
| 685       | TARGARRMAI      | 694                                | 748           | MNSRSTS         | 754                 |               |                 |                        |               |
| 748       | LNSRSTS         | 754                                |               |                 |                     |               |                 |                        |               |
| NS1       | 775             | ADSGC                              | 779           | 775             | ADSGC               | 779           | 781             | WKGKELKCGSGIFVTNE      | 797           |
|           | 783             | WKGRELKCGSG                        | 793           | 783             | WKNKELKCGSG         | 793           | 805             | YKFQADSPKRLA           | 816           |
|           | 807             | YKFQADSPKRLS                       | 818           | 806             | QYKFQPEPSPKSLAS     | 819           | 832             | STTRME                 | 837           |
|           | 824             | AWEEGVCG                           | 831           | 821             | IQKAHEEGIC          | 830           | 870             | LEQ GKRTLTPQMELKYS     | 887           |
|           | 834             | SATRL                              | 838           | 834             | SVTRLE              | 839           | 894             | AKIVTAETQNSSF          | 906           |
|           | 845             | QISNE                              | 849           | 855             | SENEVK              | 860           | 910             | GPNTPECPASASR          | 921           |
|           | 857             | NDIK                               | 860           | 864             | MTGDIKG             | 870           | 927             | EVEDYGF                | 933           |
|           | 874             | QGKKMIRPQPMEHKYSWKS<br>GKAKIIGADIQ | 904           | 873             | QAGKRSLRPQPTLKY     | 889           | 943             | KLREYV                 | 948           |
|           |                 |                                    |               | 897             | KMLSTESHN           | 905           | 952             | CDHRL                  | 956           |

Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |                |               | DENV-2          |                        |               | DENV-3          |                       |               |
|-----------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|-----------------|-----------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia      | Posição final | Posição inicial | Sequencia              | Posição final | Posição inicial | Sequencia             | Posição final |
| NS1       | 911             | DGPDTPECPDEQR  | 923           | 911             | DGPETAECPNTNRAWN       | 926           | 960             | AVKDERAVH             | 968           |
|           | 929             | EVEDYGF        | 935           | 929             | EVEDYG                 | 934           | 976             | ESQKNGSWKLEKASLIE     | 992           |
|           | 944             | KLRDSYT        | 952           | 945             | KLREKQDVFCDSKL         | 958           | 997             | TWPKSHTLWSNGVLE       | 1011          |
|           | 954             | CDHR           | 957           | 962             | AIKDNRAVH              | 970           | 1014            | MIIPKSLA              | 1021          |
|           | 963             | IKDSK          | 970           | 980             | ALNDTWKIEK             | 989           | 1024            | ISQHNHRPGY            | 1033          |
|           | 978             | SEKDETWK       | 986           | 999             | HWPKS                  | 1003          | 1045            | KLELDFNYCEGT          | 1056          |
|           | 1002            | KSHTLWSNGVLE   | 1013          | 1007            | SNGVLE                 | 1013          | 1062            | ENCGTRGPSLRRTTTSVSGKL | 1080          |
|           | 1021            | MYGG           | 1024          | 1020            | KNFAGPVSQHNYRPGY       | 1035          | 1084            | WCCRST                | 1090          |
|           | 1029            | HNYRPGY        | 1035          | 1047            | KLEMDDFCE              | 1056          | 1095            | RYMGEDGCW             | 1103          |
|           | 1041            | KLELDFDLCEGT   | 1044          | 1062            | VTEDCGNRGPSLRRTTASGKLI | 1083          | 1107            | EIRPISEKEENMV         | 1119          |
|           | 1047            | VDEHCGSRGPSLRT | 1058          | 1086            | WCCRST                 | 1092          |                 |                       |               |
|           | 1087            | RFRGEDGCW      | 1092          | 1094            | PPLRYRGEDGCW           | 1105          |                 |                       |               |
|           | 1109            | EIRPVKEKEEDL   | 1120          | 1109            | EIRPLKEEENL            | 1120          |                 |                       |               |
| NS2a      | 1126            | SAGSGEVDSFS    | 1136          | 1130            | GQIDNFS                | 1136          | 1125            | AGSGKVDN              | 1132          |
|           | 1149            | VMRSRWSG       | 1156          | 1148            | EMLRTRVGT              | 1156          | 1146            | EVMRGKFGKKHM          | 1157          |
|           | 1190            | NASDKMGM       | 1197          | 1174            | NMSFRDLG               | 1181          | 1186            | GSNASDRMG             | 1194          |
|           | 1222            | RLTSRE         | 1227          | 1191            | MTDDIG                 | 1196          | 1221            | LTSRELLLL             | 1227          |
|           | 1243            | LPNSLEELGDGL   | 1254          | 1222            | KLTSKELM               | 1229          | 1241            | LPEDIEQMA             | 1249          |
|           | 1267            | FQPHQ          | 1271          | 1239            | SQSTIPETI              | 1247          | 1307            | QSSSMRKTDW            | 1316          |
|           | 1310            | STTSQKTT       | 1317          | 1266            | NMEKY                  | 1270          | 1338            | DTLKRRSWPLNEGV        | 1351          |
|           | 1324            | GSFG           | 1327          | 1310            | TSSQKTDW               | 1318          |                 |                       |               |
|           | 1338            | ENEIWGRK       | 1345          | 1338            | LSRTSKKRSWPL           | 1349          |                 |                       |               |

Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |                             |               | DENV-2          |  |               | DENV-3          |                      |               |
|-----------|-----------------|-----------------------------|---------------|-----------------|--|---------------|-----------------|----------------------|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia                   | Posição final | Posição inicial | Sequencia                                    | Posição final | Posição inicial | Sequencia            | Posição final |
| NS2b      | 1346            | SWPLNEGI                    | 1353          | 1365            | SLLKNDIPM                                    | 1373          | 1363            | SLLRNDVPM            | 1371          |
|           | 1365            | SLLKNDVP                    | 1372          | 1391            | GRSADLELERAADVKWEDQAEISGSSP                  | 1417          | 1389            | GTSADLTVEKAA         | 1400          |
|           | 1390            | SGSSADLSLEKAAEVSWEIEAGHSGTS | 1416          | 1423            | ISEDGMSIKNEEEET                              | 1439          | 1403            | TWEEEAETGV           | 1413          |
|           | 1423            | VQDDGTMKIKDEERDDT           | 1439          | 1471            | VKKQRA                                       | 1476          | 1421            | VDDDGTMRIKDEETEN     | 1436          |
|           | 1470            | QKKKQRS                     | 1476          |                 |  |               | 1468            | QKQTQR               | 1473          |
| NS3       | 1482            | TPSPPEVERAVLDGI             | 1497          | 1483            | PSPPPVEKAELEDGAYRIKQRGI                      | 1505          | 1481            | PSPPETQKAELEEGVYRIKQ | 1500          |
|           | 1504            | GLLGRSQV                    | 1511          | 1515            | VYKEGT                                       | 1520          | 1513            | VQKEGV               | 1518          |
|           | 1535            | YQGRLEPSW                   | 1544          | 1533            | LMHRGKRIEPSWADVKKDLI                         | 1552          | 1532            | TYNGKRLEPNW          | 1542          |
|           | 1546            | SVKKDLI                     | 1552          | 1555            | GGGWKLEGEWKEGEEVQ                            | 1571          | 1545            | VKKDLI               | 1550          |
|           | 1555            | GGGW                        | 1558          | 1574            | ALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGT                     | 1597          | 1560            | AQWQKGEEVQ           | 1569          |
|           | 1562            | GSWNTGEEVQ                  | 1571          | 1605            | FSPGTSGSPIVDRKGKV                            | 1621          | 1572            | AVEPGKNPKNFQ         | 1583          |
|           | 1574            | AVEPGKNPKNVQTTPGTFKTPGEV    | 1598          | 1629            | VVTRSG                                       | 1634          | 1585            | MPGTFQTTTGEI         | 1596          |
|           | 1604            | DFKPGTSGSPIVREKI            | 1621          | 1641            | AQTEKSIEDNPEIEDDFRKKRLT                      | 1664          | 1602            | DFKPGTSGS            | 1610          |
|           | 1643            | AKASQEGPLPEIEDEVFKRNL       | 1665          | 1668            | LHPGAGKTKRY                                  | 1678          | 1612            | IINREGKV             | 1619          |
|           | 1670            | HPGSGKTRRY                  | 1679          | 1685            | EAIKRLR                                      | 1692          | 1641            | TNAEPDGPTPELEEMFKRNL | 1663          |
|           | 1687            | AIRRLR                      | 1693          | 1702            | VAAEMEEALR                                   | 1711          | 1668            | HPGSGKTRKY           | 1677          |
|           | 1722            | AVLSEHTGREIV                | 1733          | 1720            | PAIRTEHTGREIV                                | 1732          | 1684            | EAIKRLR              | 1691          |
|           | 1749            | VRVPN                       | 1753          | 1777            | AARGYISTRVEMGE                               | 1783          | 1701            | VAAEMEEALK           | 1710          |
|           | 1766            | DPASIAA                     | 1772          | 1792            | TPPGSRDPFPQSNAPIMDEEREIPERS<br>WNSGHEWVTFKGT | 1833          | 1719            | TATKSEHTGREIV        | 1731          |
|           | 1780            | VGMGE                       | 1784          | 1839            | SIKAGNDI                                     | 1846          | 1747            | VRVPN                | 1751          |
|           | 1793            | TPPGSVEAFPQSN               | 1803          | 1848            | ACLRKNGKKVIQLSRKTFDSEYVKTRT<br>NDWD          | 1878          | 1760            | AHFTDPAS             | 1767          |
|           | 1808            | IQDEERDIPERSWNSGYD          | 1824          | 1883            | TDISE  | 1887          | 1778            | VGMGE                | 1782          |
|           |                 |                             |               | 1889            | GANFRAERVIDPRRCMK                            | 1905          |                 |                      |               |
|           |                 |                             |               | 1908            | ILTDGEERVI                                   | 1917          |                 |                      |               |

Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |  |               | DENV-2          |                            |               | DENV-3          |  |               |
|-----------|-----------------|--|---------------|-----------------|----------------------------|---------------|-----------------|--|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia                                  | Posição final | Posição inicial | Sequencia                  | Posição final | Posição inicial | Sequencia                                    | Posição final |
| NS3       | 1828            | TDFPGK                                     | 1834          | 1928            | SAAQRRGRIGRNPRNENDQ        | 1946          | 1791            | TPPGTADAFQSNAPIQDEERDIPERSW<br>NSGNEW        | 1824          |
|           | 1840            | SIKSGNDIANCLRKNGKRVQLSRKTF<br>DTEYQKTKNNDW | 1879          | 1952            | ELENDEDCAHWKEAKML          | 1969          | 1838            | SIKAGNDIANCLRKNGKKVIQLSRKTFDTEY<br>QKTKLNDWD | 1877          |
|           | 1885            | DISE                                       | 1888          | 1972            | NINTPEGI                   | 1979          | 1882            | TDISEMGANFRAERVIDPRRCLK                      | 1904          |
|           | 1893            | FRADRIDPRRCLK                              | 1906          | 1984            | FEPEREKVDIAIDGEYRLRGEARKTF | 2008          | 1907            | ILTDGPERVI                                   | 1916          |
|           | 1909            | ILKDGPERV                                  | 1917          | 2010            | DLMRRGDL                   | 2017          | 1928            | AASAAQRRGRVGRNPQKENDQ                        | 1945          |
|           | 1930            | AAQRRGRIGRNQKQEGDQY                        | 1948          | 2029            | GINYADRRWCFDGIKNNQILEENVE  | 2053          | 1951            | QPLNDEDHAH                                   | 1961          |
|           | 1952            | GQPLNDEDHAH                                | 1963          | 2056            | IWTKEGERKCLKPRWLD          | 2072          | 1971            | NINTPEGI                                     | 1978          |
|           | 1973            | NINTPEGI                                   | 1980          | 2074            | RIYSPLALKEFKE              | 2087          | 1983            | FEPEREKSAIDGEYRLKGESRKTF                     | 2007          |
|           | 1985            | FEPEREKSAIDGEYRLRGEARKTF                   | 2009          | 2089            | AAGRKS                     | 2094          | 2009            | ELMRRGDL                                     | 2016          |
|           | 2011            | ELMRRGDL                                   | 2018          |                 |                            |               | 2024            | VASEGIKYDRKWCFDGERNNQILEENMD                 | 2052          |
|           | 2025            | KVASEGFQYSRRWCFDGERNNQVLE<br>ENMD          | 2054          |                 |                            |               | 2055            | IWTKEGEKCLKRPRWLDARTYSPLA                    | 2080          |
|           | 2058            | WTKEGERKCLKRPRWLDARTYSPLA                  | 2082          |                 |                            |               | 2082            | KEFKDFAAGRK                                  | 2092          |
|           | 2084            | REFKEFAAGR                                 | 2094          |                 |                            |               |                 |  |               |
| NS4a e 4b | 2095            | SVSG                                       | 2098          | 2102            | EMGRLP                     | 2107          | 2100            | TEIGRVPS                                     | 2107          |
|           | 2105            | GKLP                                       | 2108          | 2112            | QKARDALD                   | 2119          | 2111            | HKTRNAL                                      | 2117          |
|           | 2127            | NSEQGKAYRHAMEELPDIE                        | 2147          | 2128            | EAGGR                      | 2132          | 2124            | HTSEHGGRAYRHAVEELPETME                       | 2145          |
|           | 2169            | GKGLGKTSI                                  | 2177          | 2140            | ELPETL                     | 2145          | 2167            | GKGIGKTS                                     | 2174          |
|           | 2214            | IPEPDRQRTPDQDNL                            | 2228          | 2167            | SGKGIGK                    | 2173          | 2213            | PEPEKQRTPDQDNL                               | 2226          |
|           | 2251            | ETTKDLG                                    | 2258          | 2214            | PEPEKQRTPDQDNL             | 2227          | 2249            | ETTKRDLGMSKEPGV                              | 2263          |
|           | 2265            | EDHQ                                       | 2268          | 2250            | EKTKKDLG                   | 2257          | 2296            | HTIENSTAN                                    | 2304          |
|           | 2276            | DLHP                                       | 2279          | 2262            | TTQESSESNIL                | 2271          | 2320            | LDKGWPISKMDL                                 | 2331          |
|           | 2299            | HTIEDTTAN                                  | 2307          | 2273            | IDLRPAS                    | 2279          | 2370            | KATREAQRKA                                   | 2380          |
|           | 2323            | LDKGWPISKMDL                               | 2334          | 2297            | HSIENSSV                   | 2304          |                 |  |               |
|           | 2369            | GLQAKATREAQRKA                             | 2383          | 2322            | GKGWP                      | 2325          |                 |  |               |

Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |  |               | DENV-2          |                                    |               | DENV-3              |  |               |
|-----------|-----------------|--|---------------|-----------------|------------------------------------|---------------|---------------------|--|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia  | Posição final | Posição inicial | Sequencia                          | Posição final | Posição inicial     | Sequencia  | Posição final |
| NS4a e 4b | 2387            | MKNPTVDG   | 2394          | 2329            | KMDI                               | 2332          | 2384                | MKNPTVDG   | 2391          |
|           | 2407            | AKFEKQL  | 2413          | 2371            | KATREAQKRAA                        | 2381          | 2401                | IYDSKFEKQL   | 2410          |
|           | 2451            | EGSPGKF  | 2457          | 2385            | MKNPTVDG                           | 2392          | 2447                | WEGSPGKF   | 2454          |
|           | 2486            | KSLGGGRR   | 2493          | 2399            | EPIPYDPKFEKQL                      | 2411          | 2485                | VGTKR  | 2490          |
|           |                 |  |               | 2448            | WEGNPGRF                           | 2455          |                     |  |               |
|           |                 |  |               | 2483            | MKNTTNRRT                          | 2493          |                     |  |               |
| NS5       | 2494            | GTGAQGETLGEKWKRQLNQLSK<br>SEFNTYKRSRIMEVDRSEAKEGLKRGE<br>TTKHAVSRGTA | 2553          | 2499            | TLGEKWKSRNLTLGKNEF                 | 2516          | 2491                | GTGSQGETLGEKWKKKLNQL<br>SRKEFDLYKKSGITEVDR<br>TEAKEGLKRGEI | 2540          |
|           | 2562            | NLVKPEGKVID  | 2572          | 2518            | IYKSGIQEVDRTLAKGIGRGETDH           | 2543          | 2544                | AVSRGSAK   | 2551          |
|           | 2574            | GCGRGGW  | 2580          | 2545            | AVSRGSAK                           | 2552          | 2558                | RNMVIPEGVI   | 2569          |
|           | 2586            | GLKKVTEVKGYTKGGPGHEEPI   | 2607          | 2559            | RNMVTPEGKND                        | 2570          | 2571                | GCRGGW   | 2577          |
|           | 2618            | KLHSGKDV   | 2625          | 2572            | GCGRGGW                            | 2578          | 2583                | GLKKVTEVRGYTKGGPGHEEPPV                                    | 2605          |
|           | 2628            | MPPEKCDTL  | 2636          | 2582            | CGGLKNVREVKGLTKGGPGHEEPI           | 2605          | 2616                | LMSGKDV  | 2622          |
|           | 2640            | IGESSNPTIEEGRTL  | 2656          | 2617            | LQSG                               | 2620          | 2625                | LPPEKCDT   | 2632          |
|           | 2664            | WLRGNQF  | 2670          | 2626            | TPPEKCDT                           | 2633          | 2637                | IGESSSPTVEESRTIR   | 2653          |
|           | 2684            | ETLEQMQRKHGGMVLRNPLSRNSTHE   | 2709          | 2638            | IGESSNPTIEAGRTL                    | 2654          | 2682                | HLERLQRKHGGMVLRNPLSRNSTHE                                  | 2695          |
|           | 2738            | AHRKPTERDVLGAGT  | 2754          | 2663            | LNNNT                              | 2667          | 2697                | NPLSRNSTHE   | 2706          |
|           | 2757            | VAVEPEVAN  | 2765          | 2681            | VIEKMETLQRKYG                      | 2693          | 2712                | NGTGN  | 2716          |
|           | 2769            | IGQRIEDIKDEHKSTWHYDEDNPKYK   | 2793          | 2697            | VRNPLSRNSTHE                       | 2708          | 2734                | MTHRRPTIEKDVDLGGAGTRHVNAEP<br>ETPNM                        | 2763          |
|           | 2798            | HGSYEVKPSGSASSM  | 2812          | 2714            | NATG                               | 2717          | 2765                | VIGERIKRIKEEHNSTWHYDDENPKYK                                | 2790          |
|           | 2822            | KPWD   | 2825          | 2734            | FTMKHKKATYEPDVLGSGTRNIGIE<br>SEIPN | 2764          | 2795                | HGSYEVKATGSA   | 2806          |
|           | 2837            | DTPFG  | 2842          | 2767            | IIGKRIKIKQEHETSWHYDQDHPYK          | 2792          | 2819                | KPWD   | 2822          |
|           | 2845            | RVFKEKVDTRTPRAKRGT   | 2862          | 2797            | HGSYETKQTGSASSM                    | 2811          | 2834                | DTPFG  | 2839          |
|           | 2876            | FLSRNKKPRICTREEFIRKVRNSA   | 2899          | 2821            | KPWD                               | 2824          | 2842                | RVFKEKVDTRTPRSMPTGTRVM                                     | 2863          |
|           |                 |  |               | 2836            | DTPFG                              | 2841          | 2872                | RTLGRNKRPRLCTREEFTKKVRTNA                                  | 2896          |
|           |                 |  |               |                 |                                    | 2902          | FTEENQWDSAKAAVEDEDF | 2920   |               |



Anexo 2 (continuação): Índice de antigenicidade (escala de Jameson & Wolf) das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteínas | DENV-1          |   |               | DENV-2          |                          |               | DENV-3          |  |               |
|-----------|-----------------|---|---------------|-----------------|--------------------------|---------------|-----------------|--|---------------|
|           | Posição inicial | Sequencia                                   | Posição final | Posição inicial | Sequencia                | Posição final | Posição inicial | Sequencia  | Posição final |
| NS5       | 2905            | FVDEDQWNSAKEAVEDEF                          | 2923          | 2844            | RVFKEKVDTRTQEPKEGTTKLMRI | 2867          | 2924            | VDRERELHKLKCGS                                   | 2938          |
|           | 2927            | VHRERELHKQKCA                               | 2940          | 2875            | ELGKKKTPRMCTREEFTRKVRNSA | 2898          | 2944            | MGKREKLGFEFGKAKGSR                               | 2961          |
|           | 2947            | MGKREKLGFEFGKAKGSR                          | 2964          | 2904            | FTDENKWSAREAVEDSRF       | 2922          | 2981            | LNEDHWFSRENSYSGVEGEG                             | 3002          |
|           | 2984            | MNEDHWFSREDSLSGVEGEG                        | 3005          | 2926            | VDRERLHLEGKCE            | 2939          | 3010            | DISKIPGGAMYADDTAGWDTRITED<br>DLHNEEKITQQMDPEHRQL | 3054          |
|           | 3013            | DISKIPGGNMYADDTAGWDTRITED<br>DLQNEAKITDIMEP | 2053          | 2946            | MGKREKLGFEFGKAKGSR       | 2963          | 3062            | YQNKVVVQRPTPTGT                                  | 3077          |
|           | 3065            | YQNKVVVRQRPKADG                             | 3080          | 2983            | LNEDHWFSRENSLSGVEGEG     | 3004          | 3082            | ISRKDQRGSG                                       | 3091          |
|           | 3084            | ISRRDQRGSGQ                                 | 3095          | 3012            | DVSKKEGG                 | 3018          | 3110            | RQMEGEGVLSKADLENPHLPEKKI<br>TQWLE                | 3138          |
|           | 3113            | RQMESEGIFFPSELEPNL                          | 3140          | 3022            | YADDTAGW                 | 3029          | 3140            | KGVERLKRMAISGDDCVVKPIDRFA                        | 3165          |
|           | 3142            | HGAERLKRMAISGDDCVVKPIDRFA                   | 3167          | 3033            | ITLEDLKNEMV              | 3044          | 3173            | DMGKVRKDIPQ                                      | 3183          |
|           | 3175            | DMGKVRKDIPQWEPKSGWWDWQ                      | 3196          | 3048            | MKGEHKLA                 | 3056          | 3185            | QPSKGWHDW  | 3193          |
|           | 3209            | IMKDGREIVPCRNPQDELVGRAR<br>VSQGAGWSLRETAC   | 3245          | 3064            | YQNKVVVRQRPTRPGTV        | 3080          | 3207            | IMKDGRKLVVPCRNPQDELIGRARI<br>SQGAGWSLRETAC       | 3243          |
|           | 3247            | GKSY  | 3250          | 3084            | ISRRDQRGSGQ              | 3094          | 3258            | HRRDLRL  | 3264          |
|           | 3260            | HRRDLRL                                     | 3266          | 3112            | RQMEGEGIF                | 3120          | 3279            | PTSRTT   | 3284          |
|           | 3281            | PTSRTT                                      | 3286          | 3128            | VTEEIA                   | 3133          | 3295            | TTEDM  | 3299          |
|           | 3309            | WIEENPWMEKTHVSSWEE                          | 3327          | 3142            | GRERLSR                  | 3148          | 3307            | WIEDNPWMEKTPVTT                                  | 3322          |
|           | 3329            | PYLKREDQWCG                                 | 3340          | 3150            | AISGDDCVVKPLDDRFA        | 3166          | 3328            | YLGKREDQWCG                                      | 3338          |
|           | 3361            | QVRRLLIGNENYLD                              | 3373          | 3174            | NDMGKVRKDIQWEPKSGWWDWT   | 3195          | 3364            | IGNEEFL  | 3370          |
|           | 3376            | TSMKRFRKESDPEGA                             | 3390          | 3208            | VMKDGR                   | 3213          | 3374            | PSMKRFRKEEESG                                    | 3387          |
|           |                 |   |               | 3219            | CRNQDELIGRARIQAGWSLKETAC | 3244          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3246            | GKSY                     | 3249          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3259            | HRRDLRL                  | 3265          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3276            | SHVVPTSRTT               | 3285          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3296            | TTEDM                    | 3300          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3310            | QENPWMEKTPVESWE          | 3325          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3328            | PYLKREDQWCG              | 3339          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3365            | IGNEEYTD                 | 3372          |                 |  |               |
|           |                 |   |               | 3374            | MPSMKRFRREEEEA           | 3387          |                 |  |               |

# **ANEXO 3**

Anexo 3: Regiões imunogênicas com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Kolaskar & Tonagonkar para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1          |                      |               | DENV-2         |                          |               | DENV-3         |                           |               |
|----------|-----------------|----------------------|---------------|----------------|--------------------------|---------------|----------------|---------------------------|---------------|
|          | Posição Início  | Sequencia            | Posição Final | Posição Início | Sequencia                | Posição Final | Posição Início | Sequencia                 | Posição Final |
| C        | 25              | TGSQLAKR             | 32            | 23             | VSTVQQLTKR               | 32            | 25             | TGSQLAKR                  | 32            |
|          | 35              | KGLLSG               | 40            | 43             | PLKLFMALVAFLRFLTIPPTAGIL | 66            | 44             | MKLVMAFIAFLRFLAIPPTAGVLAR | 68            |
|          | 44              | MKLVMAFIAFLRFLAIPPT  | 69            | 77             | AINVLRG                  | 83            | 77             | AIKVLKG                   | 83            |
|          | 77              | AGILARW              | 83            | 102            | AGVIIMLIPTAMA            | 114           | 101            | TSLCLMMILPAALA            | 114           |
|          | 102             | VTMLMLLPTALA         | 114           |                |                          |               |                |                           |               |
| prM-M    | 115             | FHLT                 | 118           | 135            | KSLLFK                   | 140           | 115            | FHLT                      | 118           |
|          | 125             | HMIVSK               | 130           | 146            | NMCTLMAI                 | 153           | 135            | KSLLFKTA                  | 142           |
|          | 135             | KSLLFK               | 140           | 155            | LGELCEDT                 | 162           | 147            | MCTLIAM                   | 153           |
|          | 145             | VNMCTLIAM            | 153           | 164            | TYKCPLLRQ                | 172           | 160            | DDTVTYKCPHITEV            | 173           |
|          | 164             | TYKCPRI              | 170           | 177            | DIDWCN                   | 183           | 175            | PEDIDWCNLTSTWVTYGTG       | 194           |
|          | 177             | DVDCWCN              | 183           | 187            | TWVTYGTG                 | 194           | 205            | RSVALAPHVGM               | 215           |
|          | 190             | TYGTCS               | 195           | 206            | SVALPHVGM                | 215           | 242            | LRHPGFTILALFLAHYIGTS      | 261           |
|          | 205             | RSVALAPHVGLG         | 216           | 231            | WKHVQRI                  | 237           | 263            | TQKVVIFILLMLVTP           | 277           |
|          | 234             | IQKVETW              | 240           | 239            | TWILRHGFAIMAILAYT        | 257           |                |                           |               |
|          | 242             | LRHPGFTVIALFLAHAIGTS | 261           | 264            | QRALIFILLTAVAPS          | 278           |                |                           |               |
| 264      | QKGIIFILLMLVTPS | 278                  |               |                |                          |               |                |                           |               |
| E        | 280             | AMRCVGI              | 286           | 300            | WVDIVLEHGSCVTT           | 313           | 281            | MRCVGVG                   | 287           |
|          | 298             | ATWVDVVLEHGSCVTT     | 313           | 322            | DFELIKT                  | 328           | 298            | ATWVDVVLEHGGCVTT          | 313           |
|          | 321             | LDIELLKTE            | 329           | 333            | PATLRKYCIEA              | 343           | 331            | TQLATLRKLCIEG             | 343           |
|          | 332             | NPAVLRKLCIEA         | 343           | 369            | RFICKHS                  | 375           | 357            | QGEAVLPE                  | 364           |
|          | 360             | ATLVEE               | 365           | 393            | IVTCAMFT                 | 400           | 368            | QNYVCKHTYV                | 377           |
|          | 368             | ANFVCRRT             | 375           | 407            | GKVVLPE                  | 414           | 390            | KGSLVTCAKFQCLEP           | 404           |
|          | 390             | KGSLLTCAKFKCVTKL     | 405           | 417            | YTIVITP                  | 423           | 406            | EGKVVQYENLKYSVIVHTG       | 426           |
|          | 407             | GKIVQYENLKYSVIVHTG   | 426           | 444            | ITPQSSI                  | 450           | 450            | EAILPEY                   | 456           |
|          | 443             | TITPQA               | 448           | 474            | NEMVLLQ                  | 480           | 458            | TLGLECS                   | 464           |
|          | 450             | TSEIQLTDYGALTLDCSPR  | 468           | 485            | AWLVHRQWFLDLPLPWLP       | 502           | 491            | FFDLPLPWT                 | 499           |
|          | 474             | NEMVLLT              | 480           | 515            | ETLVTFK                  | 521           | 513            | ELLVTFK                   | 519           |
|          | 485             | SWLVHKQWFLDLPLPWT    | 501           | 527            | KQDVVVLS                 | 535           | 525            | KQEVVVLS                  | 533           |
|          | 515             | DLLVTFKTA            | 523           | 555            | GNULLFTGHLKCLR           | 568           | 557            | FAGHLKCRK                 | 566           |
|          | 527             | KQEVVVLS             | 535           | 570            | DKLQLKGM                 | 577           | 582            | NTFVLKKE                  | 589           |
|          | 559             | FAGHLKCRK            | 568           | 585            | KFKIVKEI                 | 592           | 596            | GTILIKVE                  | 603           |
|          | 573             | TLKGTSYVMCTGS        | 585           | 598            | GTIVIRVQYE               | 607           | 608            | DAPCKIPF                  | 615           |
|          | 597             | HGTVLVQVKY           | 606           | 611            | SPCKIPFEI                | 619           | 631            | TANPVVTK                  | 638           |

Anexo 3 (continuação): Regiões imunogênicas com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Kolaskar & Tonagonkar para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                          |               | DENV-2         |                              |               | DENV-3                |                            |               |
|----------|----------------|--------------------------|---------------|----------------|------------------------------|---------------|-----------------------|----------------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência                | Posição Final | Posição Início | Seqüência                    | Posição Final | Posição Início        | Seqüência                  | Posição Final |
| E        | 610            | DAPCKIPFLT               | 619           | 628            | LGRLITVNPVTEKD               | 642           | 654                   | SNIVIGI                    | 660           |
|          | 633            | TANPIVTD                 | 640           | 654            | GDSYIIIGVEPGQL               | 667           | 703                   | VGGVLNS                    | 709           |
|          | 654            | GESYIVVGAG               | 663           | 705            | LGGVFTSIGKALHQVFGAIYG        | 731           | 711                   | GKMHVHQIFGSAYTALFSGVSWVMKI | 744           |
|          | 666            | ALKLSW                   | 671           | 736            | AVFSGV                       | 744           | 754                   | GIGVLLTWI                  | 772           |
|          | 705            | IGGVFTSVGKLVHQVFGT       | 731           | 753            | KILIGVIIT                    | 775           |                       | SFSCIAIGIITLYLGAVVQ        |               |
|          | 739            | AYGVLFSGV                | 746           |                | TLSVSLVVLVGVVTLVYLGAMVQA     |               |                       |                            |               |
|          | 756            | IGILLTWL                 | 775           |                |                              |               |                       |                            |               |
|          | 756            | SMTCIAVGMVTLYLGVMVQA     | 775           |                |                              |               |                       |                            |               |
| NS1      | 776            | DSGCVIN                  | 782           | 776            | DSGCVVSW                     | 783           | 773                   | ADMGCVIN                   | 780           |
|          | 787            | ELKCGSGIFVTNE            | 799           | 787            | ELKCGSGIF                    | 795           | 785                   | ELKCGSGIFVTNE              | 797           |
|          | 814            | PKRLSAAI                 | 821           | 814            | PSKLASAIQK                   | 823           | 812                   | PKRLATAIA                  | 820           |
|          | 827            | EGVCGIR                  | 833           | 827            | EGICGIRSVTRL                 | 838           | 825                   | NGVCGIR                    | 831           |
|          | 851            | NHILLEN                  | 857           | 847            | TPELNHI                      | 853           | 858                   | KLTVVVGDIIGVLEQ            | 872           |
|          | 860            | KFTVVVGN                 | 867           | 879            | LRPQPTELKYS                  | 889           | 894                   | AKIVTA                     | 899           |
|          | 943            | WLKLRDS                  | 949           | 906            | QTFLLID                      | 911           | 914                   | PECPSA                     | 919           |
|          | 951            | TQMCDHR                  | 957           | 930            | VEDYGFVFTT                   | 940           | 930                   | DYGFVFTT                   | 938           |
|          | 963            | IKDSKAVHAD               | 972           | 949            | KQDVFCDSK                    | 957           | 941                   | WLKLVREVTQLCDHR            | 955           |
|          | 988            | ARASFIEVKTCIWPKSHT       | 1005          | 992            | FIEVKSCHWPKSHT               | 1005          | 957                   | MSAAVKDERAVHAD             | 970           |
|          | 1045           | LGKLELDFDLCEGTTVVVDEH    | 1065          | 1023           | AGPVSQHN                     | 1030          | 987                   | KASLIEVKCTCTWP             | 999           |
|          | 1084           | HEWCCRSTLPPLR            | 1097          | 1032           | RPGYYTQ                      | 1038          | 1006                  | SNGVLESD                   | 1013          |
|          | 1122           | RSMVSA                   | 1127          | 1057           | GTTVVVTEDE                   | 1065          | 1015                  | IIPKSLAGPI                 | 1024          |
|          |                |                          | 1084          | TEWCCRSTLPPLR  | 1097                         | 1043          | LGKLELDFNYC           | 1053                       |               |
|          |                |                          | 1121          | VNSLVTA        | 1127                         | 1055          | GTTVVITE              | 1062                       |               |
|          |                |                          |               |                |                              | 1077          | SGKLIHEWCCRSTLPPLR    | 1095                       |               |
|          |                |                          |               |                |                              | 1119          | VKSLVSA               | 1125                       |               |
| NS2a     | 1132           | VDSFSLGILCVSIMIE         | 1147          | 1134           | NFSLGVLGMALFLE               | 1147          | 1135                  | MGVLCCLAILFEE              | 1146          |
|          | 1162           | GTLAVFLLIMG              | 1173          | 1156           | TKHVILLVAVSFVTLI             | 1171          | 1158                  | IAGVFFTFVLLLSGQ            | 1172          |
|          | 1180           | LIRLCIMVG                | 1188          | 1182           | RVMVMVGVT                    | 1190          | 1180                  | HTLIMI                     | 1185          |
|          | 1201           | YLALMAT                  | 1207          | 1198           | GVTYLALLAAAFKVRPT            | 1213          | 1197                  | VTYLALIAATFKIQPFALGFFLRKL  | 1221          |
|          | 1213           | MFAVGLLFRR               | 1222          | 1215           | AAGLLLRKL                    | 1223          | 1226                  | NLLLVGGLA                  | 1234          |
|          | 1225           | SREVLLLTIGLSLVASVELPNSL  | 1247          | 1233           | IGIALLSQST                   | 1242          | 1236                  | ATTLQLPED                  | 1244          |
|          | 1260           | MLKLLTEFQPHQLWTTLLSLTFIK | 1291          | 1244           | PETILELTDALALGMMVLKIV        | 1264          | 1251                  | GIALGLMALKLITQF            | 1265          |
|          |                | TTLSLDYA                 |               |                | YQLAVTIMAISCVPNAVILLNAWKVSCT |               |                       | LWTALISLTCS                |               |
|          | 1296           | AMVLSIVSLFPLCLSTT        | 1312          | 1270           | ILAAVSVSPLLLTSS              | 1312          | 1270                  | LWTALISLTCS                | 1280          |
|          | 1318           | WLPVLLGSFGCKPLTMF        | 1334          | 1318           | WIPLALTIK                    | 1326          | 1285                  | TLTVAWR                    | 1291          |
|          |                |                          | 1330          | PTAIFLTTL      | 1338                         | 1293          | ATLILAGVSLLPVCQSS     | 1309                       |               |
|          |                |                          |               |                |                              | 1318          | PMAVAAMGVPLPLFIFSLKDT | 1339                       |               |

Anexo 3 (continuação): Regiões imunogênicas com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Kolaskar & Tonagonkar para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                         |               | DENV-2         |                                      |               | DENV-3         |                                    |               |
|----------|----------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência               | Posição Final | Posição Início | Seqüência                            | Posição Final | Posição Início | Seqüência                          | Posição Final |
| NS2b     | 1355           | AIGIVSILLSSLLKNDVPLAGP  | 1391          | 1350           | NEAVMAVGMVSILASSLLKN                 | 1369          | 1348           | NEGVMVAGLVLSILASSLLRND             | 1368          |
|          | 1393           | LIAGGMLIACYVISG         | 1404          | 1374           | TGPLVAGGLLTVCYVLTG                   | 1391          | 1371           | MAGPLVAGGLLIACYVITG                | 1389          |
|          | 1417           | SADLSLEKAAEV            | 1424          | 1415           | SSPILSIT                             | 1422          | 1393           | DLTVEKA                            | 1399          |
|          | 1440           | HNILVEVQ                | 1468          | 1440           | LTILIRTGLLVISGVFVPSIPI<br>TAAAWYLWEV | 1471          | 1411           | TGVSHNLMIT                         | 1420          |
|          |                |                         |               |                |                                      |               | 1437           | ILTVLLKTALLIVSGVFP<br>YSIPATLLVWHT | 1466          |
| NS3      | 1475           | RSGVLWDT                | 1482          | 1476           | AGVLWDVPSPPPVEKA                     | 1491          | 1473           | RSGVLWDVPS                         | 1483          |
|          | 1485           | PPEVERAVLDDG            | 1496          | 1505           | ILGYSQIGAGVY                         | 1516          | 1492           | EEGVYRIKQQ                         | 1501          |
|          | 1498           | YRILQRGLLGRSQVGVG       | 1525          | 1528           | TRGAVLMH                             | 1535          | 1506           | KTQVGVGVQKEGVFHTMW                 | 1523          |
|          |                | VFQDGVFHTMW             |               |                |                                      |               |                |                                    |               |
|          | 1528           | TRGAVLMY                | 1535          | 1548           | KKDLISY                              | 1554          | 1526           | TRGAVLTY                           | 1533          |
|          | 1542           | PSWASVKKDLISY           | 1554          | 1569           | EVQVLALE                             | 1576          | 1545           | VKKDLISY                           | 1552          |
|          | 1569           | EVQVIAVE                | 1576          | 1582           | RAVQTKPGL                            | 1590          | 1567           | EVQVIAVE                           | 1574          |
|          | 1598           | VGAIALDF                | 1605          | 1598           | IGAVSLDFS                            | 1606          | 1597           | GAIALDF                            | 1603          |
|          | 1621           | IVGLYNGVVTTSGTYSIAIAQAK | 1644          | 1612           | SPIVDRKGGKVVGLYNGVGV<br>TRSGAYVSAIA  | 1641          | 1617           | GKVVGLYNGVVTK                      | 1630          |
|          | 1678           | RYLPAIVREA              | 1687          | 1665           | IMDLHPG                              | 1671          | 1676           | KYLPAIVREA                         | 1685          |
|          | 1693           | RTLILAPTRVVASE          | 1706          | 1677           | RYLPAIVREA                           | 1686          | 1691           | RTLILAPTRVVAA                      | 1703          |
|          | 1717           | RYQTAVKSE               | 1726          | 1692           | RTLILAPTRVVAA                        | 1704          | 1709           | LKGLPIRYQ                          | 1717          |
|          | 1732           | IVDLMCHAT               | 1740          | 1710           | LRGLPIRYQTP                          | 1720          | 1730           | IVDLMCHAT                          | 1738          |
|          | 1743           | MRLSPVRVP               | 1752          | 1731           | IVDLMCHAT                            | 1739          | 1741           | MRLSPVRVPNYNLI                     | 1755          |
|          | 1765           | TDPASIAARGY             | 1775          | 1742           | MRLSPVRVPNYNLI                       | 1756          | 1763           | TDPASIAARGY                        | 1773          |
|          | 1786           | AAIFMT                  | 1791          | 1764           | TDPASIAARGY                          | 1774          | 1784           | AAIFMT                             | 1789          |
|          | 1795           | PGSVEAF                 | 1801          | 1832           | KTVWFVPSI                            | 1840          | 1830           | GKTVWFVPSI                         | 1839          |
|          | 1803           | QSNVIQ                  | 1809          | 1846           | IAACLK                               | 1852          | 1855           | KVIQLSR                            | 1861          |
|          | 1832           | GKTVWFVPSI              | 1841          | 1856           | KVIQLSR                              | 1862          | 1876           | WDFVTTD                            | 1883          |
|          | 1857           | RVIQLSR                 | 1863          | 1878           | DFVTTD                               | 1884          | 1894           | DRVIDPRRCLKPVILT                   | 1909          |
|          | 1879           | DYVTTD                  | 1885          | 1895           | ERVIDPR                              | 1901          | 1913           | ERVILAGPMPVTAASA                   | 1928          |
|          | 1896           | DRVIDPRRCLKPVILK        | 1911          | 1903           | CMKPVILT                             | 1910          | 1977           | GIIPALFE                           | 1984          |
|          | 1915           | ERVILAGPMPVTVASA        | 1930          | 1915           | RVILAGPMPVTHSSA                      | 1929          | 2005           | KTFVEL                             | 2010          |
|          | 1946           | DQYVYMG                 | 1952          | 2006           | KTFVDL                               | 2011          | 2015           | DLPVWLAHKVASEG                     | 2028          |
|          | 1979           | GIIPALFE                | 1986          | 2016           | DLPVWLAHRVAE                         | 2028          | 2076           | SDPLALK                            | 2082          |
|          | 2007           | KTFVEL                  | 2012          | 2076           | YSDPLALK                             | 2083          |                |                                    |               |
|          | 2017           | DLPVWLSYKVASEGF         | 2031          |                |                                      |               |                |                                    |               |
|          | 2078           | SDPLALR                 | 2084          |                |                                      |               |                |                                    |               |

Anexo 3 (continuação): Regiões imunogênicas com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Kolaskar & Tonagonkar para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |   |               | DENV-2         |   |               | DENV-3         |   |               |
|----------|----------------|---|---------------|----------------|---|---------------|----------------|---|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência                                       | Posição Final | Posição Início | Seqüência                                     | Posição Final | Posição Início | Seqüência                                     | Posição Final |
| NS4a     | 2097           | SGDLILEIGKLPQHLLTR                              | 2114          | 2119           | DNLAVLHTA                                     | 2127          | 2093           | SIALDLVTEIGRVPSHLAH                           | 2111          |
|          | 2120           | DNLVMLH   | 2126          | 2135           | NHALSELPETLETLTLLTLLA<br>TVTGGIFFLM           | 2166          | 2118           | DNLVMLHTS                                     | 2126          |
|          | 2148           | TLMLLALIAVLTGGVTLFFLSGK                         | 2170          | 2176           | LGMCCIITASILLWYAQIQPHWIA<br>ASIILEFFLIVLLIPE  | 2215          | 2133           | YRHAVEEL                                      | 2140          |
|          | 2174           | KTSIGLLCVTASSALLWMASVEPHW<br>IAASIILEFFLMVLLIPE | 2216          |                |   |               | 2146           | TLLLLGLMILLTGG                                | 2159          |
| NS4b     | 2226           | NQLAYVVIGLLFMILTVA                              | 2243          | 2227           | LTYVVIAILTVVAAT                               | 2241          | 2224           | NQLAYVVIGILTAAIIA                             | 2241          |
|          | 2258           | GIGHVAE   | 2265          | 2270           | ILDIDLRPA                                     | 2278          | 2261           | PGVVSPTS YLDVDLHPASAWT<br>LYAVATTVITPM        | 2293          |
|          | 2270           | ATMLDVDLHPASAWT<br>LYAVATTVITP                  | 2295          | 2280           | AWTLYAVATTFVTPMLRHS                           | 2298          | 2304           | NVSLAAIANQAVVLMG                              | 2319          |
|          | 2307           | NISLTAIANQAAILMG                                | 2322          | 2303           | SVNVSLTAIANQATVLMG                            | 2320          | 2330           | DLGVPLLALGCYSQVNPLTLTAAVLL<br>LITHYAIIGPGLQAK | 2370          |
|          | 2333           | DLGVPLLALGCYSQVNPLTLTAAVLM<br>LVAHYAIIIGPGLQAK  | 2373          | 2331           | DIGVPLLAIGCYSQVNPIITLA<br>ALLLVAHYAIIIGPGLQAK | 2371          | 2397           | LDPVIYDS                                      | 2404          |
|          | 2392           | VDGIVAIDLDPVYDA                                 | 2407          | 2390           | VDGITVIDLEPIPYDP                              | 2405          | 2409           | QLGQVMMLVLCVQQLLMR                            | 2427          |
|          | 2412           | QLGQIMLLILCTSQILLM                              | 2429          | 2410           | QLGQVMMLILCVTQVLM                             | 2426          | 2430           | WALCEALTLATG                                  | 2441          |
|          | 2433           | WALCESITLATG                                    | 2444          | 2431           | WALCEALTLATG                                  | 2442          | 2458           | TIAVSMA                                       | 2464          |
|          | 2461           | TIAVSMA   | 2467          | 2459           | TIAVSMA                                       | 2465          | 2469           | GSYLAGAGLAFSIMKS                              | 2484          |
|          | 2472           | GSYLAGAGLAFSLMKS                                | 2487          | 2470           | GSYLAGAGLLFSI                                 | 2482          |                |   |               |
| NS5      | 2545           | KHAVSRG   | 2551          | 2524           | IQEVDR  | 2530          | 2515           | FDLYKK  | 2520          |
|          | 2560           | ERNLVKPEGKVIDLGCG                               | 2576          | 2543           | HHAVSRGS                                      | 2550          | 2541           | THHAVSRGSAKLQWF                               | 2555          |
|          | 2581           | SYCAGLKKVTEVKG                                  | 2596          | 2565           | EGKVVDLGC                                     | 2574          | 2563           | PEGRVIDLGC                                    | 2573          |
|          | 2614           | WNLVKLH   | 2620          | 2579           | SYCGGL  | 2585          | 2578           | SYCAGLKKVTEV                                  | 2590          |
|          | 2622           | GKDVFFM   | 2628          | 2588           | VREVKGL                                       | 2594          | 2601           | EPPVMS  | 2607          |
|          | 2630           | PEKCDTLLCDIG                                    | 2641          | 2612           | WNLVRLQSGVDVFFTPP<br>EKCDTLLCDIG              | 2639          | 2611           | WNIVKLM                                       | 2617          |
|          | 2654           | TLRVLKMVEPW                                     | 2664          | 2652           | TLRVLNL                                       | 2658          | 2621           | DVFPPEKCDTLLCDIG                              | 2638          |
|          | 2668           | NQFCIKILNPYMPVSVETL                             | 2686          | 2668           | QFCIKVLPYMPVSVIE                              | 2683          | 2651           | TIRVLKMVEPW                                   | 2661          |
|          | 2710           | MYWVSCGTG                                       | 2718          | 2693           | GGALVRNP                                      | 2700          | 2665           | NQFCIKVLPYMPVSVIEHLERL                        | 2686          |
|          | 2754           | TRHVAVEPEVANLDIIGQ                              | 2771          | 2718           | NIVSSVNM                                      | 2725          | 2716           | NIVASVNMVSRLLLN                               | 2730          |
|          | 2797           | YHGSYEVKPS                                      | 2806          | 2744           | EPDVDLG                                       | 2750          | 2794           | YHGSYEVKAT                                    | 2803          |

Anexo 3 (continuação): Regiões imunogênicas com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Kolaskar & Tonagonkar para as proteínas estruturais e não estruturais dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                       |               | DENV-2         |                        |               | DENV-3         |                       |               |
|----------|----------------|-----------------------|---------------|----------------|------------------------|---------------|----------------|-----------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência             | Posição Final | Posição Início | Seqüência              | Posição Final | Posição Início | Seqüência             | Posição Final |
| NS5      | 2813           | VNGVVRLLTKPWDVIPMVTQI | 2833          | 2812           | VNGVVRLLTKPWDVPMVTQV   | 2832          | 2810           | INGVVKLLTKPWDVPMVT    | 2828          |
|          | 2843           | QQRVFKE               | 2849          | 2842           | QQRVFKE                | 2848          | 2840           | QQRVFKE               | 2846          |
|          | 2900           | AIGAVFVD              | 2907          | 2934           | LEGKCETCVYN            | 2944          | 2880           | PRLCTR                | 2885          |
|          | 2924           | WDLVHRE               | 2930          | 2972           | ARFLEFEALGF            | 2982          | 2930           | LHKLKCGSVCVYN         | 2942          |
|          | 2936           | QGKCATCVYN            | 2945          | 3003           | LHRLGYILRDV            | 3013          | 2970           | ARYLEFEALGF           | 2980          |
|          | 2971           | LGAAFLEFEAL           | 2981          | 3055           | LAEAIFKLT              | 3063          | 3001           | LHKLGYILRDISKI        | 3014          |
|          | 3004           | LHKLGYILRDISKI        | 3017          | 3065           | QNKVVRVQRP             | 3074          | 3053           | LANAIFKLT             | 3061          |
|          | 3052           | EHALLATSIFKLT         | 3064          | 3120           | FKSIQHLTVTEEIAVQNWLARV | 3141          | 3063           | QNKVVKVQRP            | 3072          |
|          | 3066           | QNKVVRVQRP            | 3075          | 3153           | GDDCVVKPL              | 3161          | 3116           | GVLSKA                | 3121          |
|          | 3120           | IFFPSEL               | 3126          | 3166           | ASALTA                 | 3171          | 3152           | GDDCVVKPI             | 3160          |
|          | 3132           | AERVLDWL              | 3139          | 3196           | QVPFCSHHFHELV          | 3208          | 3166           | NALLAL                | 3171          |
|          | 3154           | GDDCVVKPI             | 3162          | 3210           | KDGRVLVPCR             | 3220          | 3193           | WQQVPFCSHHFHELV       | 3206          |
|          | 3167           | ATALIAL               | 3173          | 3241           | ETACLGKS               | 3248          | 3212           | RKLVVPCRQDE           | 3223          |
|          | 3196           | QQVPFCSHHFHQLI        | 3209          | 3262           | DLRLAANAICSAVPSHWVPTS  | 3282          | 3240           | ETACLGKA              | 3247          |
|          | 3215           | EIVVPCR               | 3221          | 3300           | MLAVWNR                | 3306          | 3261           | DLRLASNAICSAVPVHWVPTS | 3281          |
|          | 3223           | QDELVGRARVSQG         | 3235          | 3326           | EVPLYG                 | 3331          | 3286           | SIHAHH                | 3291          |
|          | 3242           | ETACLGKS              | 3249          | 3338           | CGSLIGLT               | 3345          | 3325           | NVPYLG                | 3330          |
|          | 3263           | DLRLAANAICSAVPVNWV    | 3280          | 3357           | AINQVRSL               | 3364          | 3337           | CGSLIGLT              | 3344          |
|          | 3288           | SIHAHH                | 3293          |                |                        |               | 3351           | QNILTAIQVRSL          | 3363          |
|          | 3301           | MLSVWNR               | 3307          |                |                        |               |                |                       |               |
| 3320     | THVSSWEEVPYLG  | 3332                  |               |                |                        |               |                |                       |               |
| 3339     | CGSLIGLT       | 3346                  |               |                |                        |               |                |                       |               |
| 3354     | NIQVAINQVRRL   | 3365                  |               |                |                        |               |                |                       |               |

# **ANEXO 4**



Anexo 4: Regiões com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Bepipred das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                                     |               | DENV-2         |  |               | DENV-3         |                                 |               |
|----------|----------------|-------------------------------------|---------------|----------------|--|---------------|----------------|---------------------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência                           | Posição Final | Posição Início | Seqüência                                | Posição Final | Posição Início | Seqüência                       | Posição Final |
| C        | 1              | MNNQRKKTGRP                         | 11            | 1              | MNNQRKKARST                              | 11            | 1              | MNNQRKKTGKPS                    | 12            |
|          | 21             | NRVSTGSQ                            | 28            | 61             | PTAG                                     | 64            | 23             | VSTGSQ                          | 28            |
|          | 38             | LSGQ                                | 41            |                |  |               | 38             | LNGQ                            | 41            |
| prM-M    | 119            | TRGGEPEH                            | 125           | 120            | RNGEPH                                   | 125           | 119            | SRDGEPRMI                       | 127           |
|          | 131            | QER                                 | 133           | 131            | QEKQ                                     | 134           | 131            | NER                             | 133           |
|          | 169            | RITEAEPDDVD                         | 179           | 172            | QNEPEDI                                  | 178           | 170            | ITEVEPEDI                       | 178           |
|          | 186            | DTWV                                | 189           | 186            | STWV                                     | 189           | 193            | TCNQAGERRRDK                    | 204           |
|          | 193            | TCSQTGEHRRDK                        | 204           | 193            | TCTTTGEHRRDK                             | 204           | 218            | DTR                             | 220           |
|          | 218            | ETR                                 | 220           | 218            | ETR                                      | 220           | 222            | QWMS                            | 226           |
|          | 222            | ETWMSSEGAWK                         | 232           | 222            | ETWMSSEGAW                               | 231           | 229            | GAWR                            | 232           |
| E        | 315            | AKNKPT                              | 320           | 292            | VEGVSGG                                  | 298           | 314            | MAKNKPT                         | 320           |
|          | 330            | VTN                                 | 332           | 315            | AKNKPT                                   | 320           | 328            | TEAT                            | 331           |
|          | 346            | SNTTDSRCPTQGEATLVEE                 | 365           | 328            | TEAKQPAT                                 | 335           | 347            | NITDSDRCPTQGEAVL<br>PEEQDQN     | 369           |
|          | 380            | GWGN                                | 383           | 346            | TNTTDSRCPTQGEPSLNEEQD                    | 367           | 378            | DRGWGN                          | 383           |
|          | 425            | TGDQHQVGNETTEHGTIA<br>TITPQAPTSEIQL | 455           | 379            | RGWGN                                    | 383           | 426            | GDQHQVGNETQGV<br>AEITPQASTTEAIL | 453           |
|          | 466            | SPRTGL                              | 471           | 423            | PHSGEEHAVGNDTGKHGE<br>EIKITPQSSITEAELTGY | 458           | 464            | SPRTGL                          | 469           |
|          | 499            | PWTSGASTSQETWN                      | 512           | 463            | MECSPRTGL                                | 471           | 497            | PWTSGATTETPTWN                  | 510           |
|          | 524            | HAK                                 | 526           | 501            | LPGADTQGSNWI                             | 512           | 522            | HAK                             | 524           |
|          | 537            | EGA                                 | 539           | 522            | NPHAKK                                   | 527           | 535            | EGA                             | 537           |
|          | 547            | ATEIQTSGTT                          | 556           | 537            | EGA                                      | 539           | 545            | ATEIQNSGGTS                     | 555           |
|          | 591            | EVAETQ                              | 596           | 549            | EIQM                                     | 552           | 590            | VSETQ                           | 594           |
|          | 606            | YEGTDAPC                            | 613           | 593            | AET                                      | 595           | 604            | YKGEDAPCKIPFSTEDGQGAH           | 625           |
|          | 620            | QDEKGVQ                             | 627           | 606            | YEGDGSPCK                                | 614           | 635            | VVTKKEEPVNIEAEPFGE              | 653           |
|          | 637            | IVTDKEKPVNIETEPFGE                  | 655           | 637            | IVTEKDSPVNIEAEPFGE                       | 654           | 684            | ARG                             | 686           |
|          | 686            | ARG                                 | 688           | 664            | PGQ                                      | 666           | 698            | WDFG                            | 701           |
|          | 700            | WDF                                 | 702           | 750            | SRST                                     | 753           | 748            | SKNT                            | 751           |

Anexo 4 (continuação): Regiões com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Bepipred das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                             |               | DENV-2         |                      |               | DENV-3         |                              |               |
|----------|----------------|-----------------------------|---------------|----------------|----------------------|---------------|----------------|------------------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência                   | Posição Final | Posição Início | Seqüência            | Posição Final | Posição Início | Seqüência                    | Posição Final |
| NS1      | 808            | KFQADSPKRL                  | 817           | 806            | QYKFQPESPSKL         | 817           | 806            | KFQADSPKR                    | 814           |
|          | 878            | MIRPQPMHKYS                 | 889           | 822            | QKAHE                | 826           | 874            | KRTLTPQPM                    | 883           |
|          | 910            | IDGPDTPCEPDEQR              | 923           | 876            | KRSLRPQPTLKY         | 888           | 898            | TAETQN                       | 903           |
|          | 978            | ESEKNET                     | 984           | 901            | TESH                 | 904           | 908            | IDGPNTPECPASR                | 921           |
|          | 1023           | GGPISQHNYPGYFTQT<br>AGPW    | 1043          | 911            | DGPETAECPTNRAW       | 925           | 961            | VKDERAV                      | 967           |
|          | 1065           | HCGSRGPSLRTTT               | 1077          | 1022           | FAGPVSQHNYPGYTQTAGPW | 1043          | 976            | ESQKNGSWK                    | 984           |
|          | 1098           | FRGE                        | 1101          | 1065           | DCGNRGPRLRTTTAS      | 1079          | 997            | TWPK                         | 1000          |
|          | 1111           | RPVKEKEE                    | 1118          | 1097           | RYRGEDGC             | 1104          | 1021           | AGPISQHNHRPGYHT<br>QTAGPW    | 1041          |
|          |                |                             | 1113          | LKEKEEN        | 1119                 | 1064          | CGTRGPSLRTTT   | 1075                         |               |
|          |                |                             |               |                |                      | 1110          | PISEKEEN       | 1117                         |               |
| NS2a     | 1126           | SAGSGEVD                    | 1133          | 1129           | HGQI                 | 1132          | 1126           | GSGKVD                       | 1131          |
|          | 1190           | NASDKMG                     | 1197          | 1312           | SQKTD                | 1317          | 1188           | NASDR                        | 1192          |
|          | 1244           | PNSLEEL                     | 1250          | 1340           | RTSKKRSWP            | 1348          | 1244           | DIEQ                         | 1247          |
|          | 1312           | TSQKT                       | 1316          |                |                      |               | 1309           | SSMR                         | 1312          |
|          | 1341           | IWGR                        | 1344          |                |                      |               |                |                              |               |
| NS2b     | 1346           | SWPL                        | 1349          | 1371           | IPMT                 | 1374          | 1369           | VPMA                         | 1372          |
|          | 1393           | SADL                        | 1396          | 1403           | DVKWEDQAEISGSS       | 1416          | 1391           | SADLT                        | 1395          |
|          | 1403           | EVSWEAAEHS                  | 1415          | 1424           | SEDGMSIKNEEEQ        | 1438          | 1401           | DITWEEAAEQTGV                | 1413          |
|          | 1424           | QDDGTMKIKDEERDD             | 1438          |                |                      |               | 1422           | DDDGTMRIKDEDETE              | 1435          |
|          | 1472           | KKQR                        | 1475          |                |                      |               | 1468           | QKQTR                        | 1473          |
| NS3      | 1478           | VLWDTPSPPEVERA              | 1491          | 1481           | DVPSPPPVEKAELED      | 1495          | 1478           | WDVSPPETQKAELE               | 1492          |
|          | 1539           | RLEPSWAS                    | 1546          | 1513           | AGVYK                | 1517          | 1509           | VGVGQ                        | 1514          |
|          | 1557           | GWRFQGSWNTGEE               | 1569          | 1539           | RIEPSWADV            | 1547          | 1536           | KRLEPNWAS                    | 1544          |
|          | 1575           | VEPGKNPKNVQTTTGT<br>KTPEGEV | 1598          | 1557           | GWKLEGEWKEGEE        | 1569          | 1561           | QWQKGEE                      | 1567          |
|          | 1606           | KPGTSGSPIVN                 | 1616          | 1576           | EPGKNPRAVQTKPLFKT    | 1593          | 1573           | VEPGKNPKNFQTMP<br>GTFQTTTGEI | 1596          |
|          | 1629           | VVTSTGT                     | 1635          | 1595           | TGTI                 | 1598          | 1604           | KPGTSGSPIIN                  | 1614          |

Anexo 4 (continuação): Regiões com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Bepipred das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                           |               | DENV-2         |  |               | DENV-3         |   |               |
|----------|----------------|---------------------------|---------------|----------------|--|---------------|----------------|---|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência                 | Posição Final | Posição Início | Seqüência                              | Posição Final | Posição Início | Seqüência                               | Posição Final |
| NS3      | 1642           | QAKASQEGPLPEIEDE          | 1657          | 1605           | FSPGTSVSGPIVDR                         | 1617          | 1627           | VVTKNGGYVSGIAQT<br>NAEPDGPTPELEE        | 1654          |
|          | 1670           | HPGSGKTR                  | 1677          | 1629           | VVTR                                   | 1632          | 1668           | HPGSGKTRK                               | 1676          |
|          | 1721           | TAVKSEHTGR                | 1730          | 1641           | AQTEKSIEDNPEIED                        | 1655          | 1717           | QTTATKSEHTGR                            | 1728          |
|          | 1763           | HFTDPASIA                 | 1771          | 1670           | PGAGKTKR                               | 1677          | 1761           | HFTDPASIA                               | 1769          |
|          | 1792           | ATPPGSVEAFPQ              | 1803          | 1718           | QTPAIRTEHTGR                           | 1729          | 1790           | ATPPGTADAFPQSNAPIQ<br>DEERDIPERSWNSGNEW | 1824          |
|          | 1805           | NAVIQDEERDIPERSWNSG       | 1823          | 1762           | HFTDPASIA                              | 1770          | 1840           | KAGND                                   | 1844          |
|          | 1825           | DWITDFPG                  | 1832          | 1791           | ATPPGSRDPPQSNAPIMDE<br>EREIPERSWNSGHEW | 1825          | 1863           | TFDTEYQKTKL                             | 1873          |
|          | 1841           | IKSGND                    | 1846          | 1865           | FDSEYVKTRTN                            | 1875          | 1909           | TDGPER                                  | 1914          |
|          | 1865           | TFDTEYQTKNNDWD            | 1879          | 1922           | MPVTHSSAAQRRGRGRNP<br>RNENDQ           | 1946          | 1921           | MPVTAASAAQRRGRVGRN<br>PQKENDQYI         | 1947          |
|          | 1911           | KDGPER                    | 1916          | 1953           | PLENDEDCAH                             | 1962          | 1951           | QPLNDEDHAW                              | 1962          |
|          | 1924           | PVTVASAAQRRGRGRNQNKEGDQYV | 1949          | 1974           | NTPEGI                                 | 1979          | 1973           | NTPEGI                                  | 1978          |
|          | 1954           | PLNDEDHAW                 | 1964          | 1984           | FEPEREKVDAID                           | 1995          | 1984           | EPEREKSAID                              | 1994          |
|          | 1975           | NTPEGI                    | 1980          | 2058           | TKEGERKKL                              | 2066          | 1997           | YRLKGESR                                | 2004          |
|          | 1986           | EPEREKSAID                | 1996          |                |  |               | 2028           | GIKY                                    | 2031          |
|          | 2029           | EGFQY                     | 2033          |                |  |               | 2041           | ERNNQI                                  | 2046          |
|          | 2043           | ERNNQV                    | 2048          |                |  |               | 2056           | WTKEGEKKKL                              | 2065          |
| 2058     | WTKEGERKKL     | 2067                      |               |                |  | 2073          | RTYSD          | 2077                                    |               |
| 2075     | RTYSD          | 2079                      |               |                |  |               |                |   |               |
| NS4a     | 2128           | SEQGGKAY                  | 2135          | 2128           | EAGGRA                                 | 2133          | 2127           | EHGGRA                                  | 2132          |
|          | 2140           | EELPD                     | 2144          | 2215           | EPEKQRT                                | 2221          | 2138           | EELPE                                   | 2142          |
|          | 2171           | GLGK                      | 2174          |                |  |               | 2169           | GIGK                                    | 2172          |
|          | 2216           | EPDRQR                    | 2221          |                |  |               | 2214           | EPEKQR                                  | 2219          |

Anexo 4 (continuação): Regiões com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Bepipred das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1                        |                        |               | DENV-2            |                                     |               | DENV-3         |                        |               |
|----------|-------------------------------|------------------------|---------------|-------------------|-------------------------------------|---------------|----------------|------------------------|---------------|
|          | Posição Início                | Seqüência              | Posição Final | Posição Início    | Seqüência                           | Posição Final | Posição Início | Seqüência              | Posição Final |
| NS4b     | 2222                          | TPQDNQ                 | 2227          | 2222              | PQDNQ                               | 2226          | 2220           | TPQDNQ                 | 2225          |
|          | 2264                          | AENHQ                  | 2268          | 2253              | KKDL                                | 2256          | 2253           | RDLGMSKEPGVVSPTS       | 2269          |
|          | 2302                          | ENTT                   | 2305          | 2261              | ITTQESSES                           | 2268          | 2299           | ENSTA                  | 2303          |
|          | 2326                          | GWPI                   | 2329          | 2324              | GWPL                                | 2327          | 2323           | GWPI                   | 2326          |
|          | 2370                          | LQAKATREAQKRT          | 2382          | 2368              | LQAKATREAQKRA                       | 2380          | 2367           | LQAKATREAQKRT          | 2379          |
|          | 2385                          | GIMKNPTVD              | 2393          | 2385              | MKNPTVD                             | 2391          | 2382           | GIMKNPTVD              | 2390          |
|          | 2448                          | TLWEGSPGKF             | 2457          | 2400              | PIPYDPKFEK                          | 2409          | 2444           | TTLWEGSPGKF            | 2454          |
|          | 2489                          | GGGRR                  | 2493          | 2445              | STLWEGNPGRF                         | 2455          | 2486           | GTGK                   | 2489          |
|          |                               |                        | 2486          | TTNTRRGT          | 2493                                |               |                |                        |               |
| NS5      | 2494                          | GTGAQGETLGEK           | 2505          | 2494              | GNIGETLGEK                          | 2503          | 2490           | RGTGSQGETLGEK          | 2502          |
|          | 2518                          | FNTY                   | 2521          | 2523              | GIQE                                | 2526          | 2522           | GITEVDRTEAKEGLKR       | 2537          |
|          | 2530                          | DRSEAKEGLKRGETTKHAVSR  | 2550          | 2535              | GIKRGETDHHAVSR                      | 2548          | 2573           | GRGG                   | 2576          |
|          | 2576                          | GRGG                   | 2579          | 2561              | MVTPEGKV                            | 2568          | 2590           | VRGYTKGGPGHEEPPMST     | 2608          |
|          | 2592                          | EVKGYTKGGPGHEEPPM      | 2609          | 2574              | GRGGW                               | 2578          | 2627           | PEK                    | 2629          |
|          | 2641                          | GESSPNTIEEG            | 2652          | 2593              | GLTKGGPGHEEPPMS                     | 2608          | 2638           | GESSPSPTVEES           | 2649          |
|          | 2702                          | LSRNST                 | 2707          | 2626              | TPPEKC                              | 2631          | 2699           | LSRNST                 | 2704          |
|          | 2740                          | RKPTYERDVDLGAG         | 2753          | 2639              | GESSPNTIEA                          | 2649          | 2738           | RPTIEKDVDLGAGTRHVN     | 2765          |
|          |                               |                        |               |                   |                                     |               |                | AEPETPNMDV             |               |
|          | 2756                          | HVAVEPEV               | 2763          | 2701              | LSRNST                              | 2706          | 2775           | EEHNSTWHYDDENP         | 2794          |
|          |                               |                        |               |                   |                                     |               |                | YKTWAY                 |               |
|          | 2776                          | IKNEHKSTWHYDEDNPYKTWAY | 2797          | 2740              | KATYEPDVLGSGTRNIG                   | 2757          | 2797           | SYEVKATGSASS           | 2808          |
|          | 2800                          | SYEVKPSGSASS           | 2811          | 2760              | SEI                                 | 2762          | 2832           | MTDTPFG                | 2839          |
|          | 2835                          | MTDTPFG                | 2842          | 2776              | KQEHETSWHYDQDHPYKTWAYHGSYETKQTGSASS | 2810          | 2848           | VDTRTPRSMPGT           | 2859          |
|          | 2851                          | VDTRTPRAKRG            | 2861          | 2834              | MTDTPFG                             | 2841          | 2905           | ENQWDSAKAAVEDE         | 2918          |
|          | 2882                          | KPRI                   | 2885          | 2850              | VDTRTQEPKEGTK                       | 2862          | 2948           | EKKLGEFGKAKG           | 2959          |
|          | 2909                          | NQWNSAKEAVE            | 2919          | 2877              | GKKKTPRMC                           | 2885          | 2990           | ENSYSGVEGE             | 2999          |
|          | 2951                          | EKKLGEFGKAKG           | 2962          | 2907              | ENKWKSAREAVE                        | 2918          | 3013           | KIPGGAMYADDTAGWDTRITED | 3052          |
|          |                               |                        |               |                   |                                     |               |                | DLHNEEKITQQMDPEHRQ     |               |
|          | 2994                          | NSLSGVEGE              | 3002          | 2950              | EKKLGEFGKAKG                        | 2961          | 3069           | VQRPTPTGT              | 3077          |
| 3016     | KIPGGAMYADDTAGWDTRITEDDLQNEAK | 3044                   | 2993          | NSLSGVEGE         | 3001                                | 3085          | KDQRGSGQVGTY   | 3096                   |               |
|          |                               |                        | 3014          | SKKEGGAMYADDTAGWD | 3030                                |               |                |                        |               |

Anexo 4 (continuação): Regiões com propensão à antigenicidade determinada através da escala de Bepipred das proteínas dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

| Proteína | DENV-1         |                    |               | DENV-2         |                 |               | DENV-3         |                    |               |
|----------|----------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|--------------------|---------------|
|          | Posição Início | Seqüência          | Posição Final | Posição Início | Seqüência       | Posição Final | Posição Início | Seqüência          | Posição Final |
| NS5      | 3074           | RPAKNGT            | 3080          | 3072           | QRPTPRGT        | 3079          | 3115           | EGVL               | 3118          |
|          | 3087           | RRDQRGSGQVGTY      | 3099          | 3087           | RDQRGSGQVGTY    | 3098          | 3122           | DLENPHLPEK         | 3131          |
|          | 3125           | ELESPNL            | 3131          | 3182           | IQWEPSTRGWNDW   | 3194          | 3176           | KVRKDIPQWQPSKGWHDW | 3193          |
|          | 3178           | KVRKDIPQWEPKSGWNDW | 3195          | 3231           | ISQG            | 3234          | 3219           | RPQDEL             | 3224          |
|          | 3223           | QDEL               | 3226          | 3276           | SHWVPTSRTT      | 3285          | 3230           | ISQG               | 3233          |
|          | 3231           | RVSQGAGWS          | 3239          | 3313           | PWMEDKTPVESWEEV | 3327          | 3278           | VPTSRTT            | 3284          |
|          | 3278           | NWVPTSRTT          | 3286          | 3329           | YLGKREDQW       | 3337          | 3311           | NPWMEDKTPVTTWEN    | 3325          |
|          | 3313           | NPWMEDKTHVSSWEEV   | 3328          | 3368           | EEYTDYMP        | 3375          | 3328           | YLGKREDQW          | 3336          |
|          | 3330           | YLGKREDQW          | 3338          | 3381           | RREEEEA         | 3387          | 3379           | FRKEEESGAI         | 3389          |
|          | 3381           | FKNESDPEGAL        | 3391          |                |                 |               |                |                    |               |

# **ANEXO 5**

Anexo 5: Alinhamento múltiplo entre cada sorotipo dos DENV e a proteína 1R6R, selecionada como molde para a modelagem por homologia da proteína C



# **ANEXO 6**





# **ANEXO 7**





Anexo 7 (continuação): Alinhamento múltiplo, realizado através do parâmetro clustalW, entre cada sorotipo dos DENV e as diferentes proteínas selecionadas como modelo para a modelagem por homologia da proteína E dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. (A) alinhamento entre as proteínas 1TGE, 1TG8 e DENV-1; (B) alinhamento entre 1UZG, 2HG0 e DENV-2 e (C) alinhamento entre 1TG8 e DENV-3.

(C)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
dengue3 MRCVGVGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGGC VTTMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKITNITT DSRCPQTQGEA VLPEEQDQNY VCKHTYVDRG
1TG8_A|PDB MRCIGISNRD FVEGVSGGSW VDIVLEHGGC VTTMAKNKPT LDFELIKTEA KQPATLRKYC IEAKLTNTTT DSRCPQTQGEF TLNEEQDKRF VCKHSMVDRG
Clustal Co ***:*:.*** ***:**:* **:*:*:* * **:*:*:* **:*:*:* * **:*:*:* **:*:*:* * **:*:*:* **:*:*:* * **:*:*:* **:*:*:*

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
dengue3 WNGCGGLFGK GSVLTCAPFQ CLEPIEGKVV QYENLKYTVI ITVHTGDQHQ VGNET--QGV TAEITPQAST TEAILPEYGT LGLECSPRTG LDFNEMILLT
1TG8_A|PDB WNGCGGLFGK GGIVTCAMFT CKKNMEGKIV QPENLEYTVV ITPHSGEEHA VGNDTGKHGK EVKITPQSSI TEAELTGYGT VTMECSPRTG LDFNEMVLLQ
Clustal Co ***** *:.***** * : :***:* * **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:*

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
dengue3 MKNKAWMVHR QWFFDLPLPW TSGATTETPT WNRKELLVTF KNAHAKKQEV VVLGSQEGAM HTALTGATEI QNSGGTSIFA GHLKCRKMD KLELKGMSYA
1TG8_A|PDB MKDKAWLVHR QWFFDLPLPW LPGADTQGSN WIQKETLVTF KNPHAKKQDV VVLGSQEGAM HTALTGATEI QMSSGNLLFT GHLKCRLRMD KLQLKGMSYS
Clustal Co **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:*

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
dengue3 MCTNTFVLKK EVSETQHGFI LIKVEYKGED APCKIPFSTE DGQGAHNGR LITANPVVTK KEEPVNIEAE PPFGESNIVI GIGDKALKIN WYRKGSSIGK
1TG8_A|PDB MCTGKFKVVK EIAETQHGFI VIRVQYEGDG SPCKIPFEIM DLEKRHVLRG LITVNPVIE KDSPVNIEAE PPFGDSYIII GVEPGQLKLD WFKKG-----
Clustal Co ***.* : * **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:* **:*:*:*

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480     490
dengue3 MFEATARGAR RMAILGDTAW DFGSVGGVLN SLGKMHQIF GSAYTALFSG VSWVMKIGIG VLLTWIGLNS KNTSMSFSCI AIGIITLYLG AVV
1TG8_A|PDB -----
Clustal Co -----

```

# **ANEXO 8**









# **ANEXO 9**



# **ANEXO 10**