ANÁLISE COMPUTACIONAL DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA DENGUE COMO CANDIDATA PARA UMA VACINA BASEADA EM RNA MENSAGEIRO

Maria Clara Duran[1], Bruno Henrique Godoi[2]

[1]Faculdade Anhanguera de Taubaté, Av. Charles Schnneider, 585 - Parque Sr. do Bonfim,12040-000, Taubaté - SP, Brasil, mariaclaradr30@gmail.com
[2]Universidade de Taubaté /Departamento de Saúde e Biotecnologia, Av. Tiradentes, 500 - Bom Conselho, 12030-180, Taubaté – SP, Brasil, bruno.hgodoi@unitau.br

Resumo
A dengue é uma arbovirose causada por quatro sorotipos do vírus DENV e representa um problema de saúde pública, pois não há antiviral específico e as vacinas de vírus vivo atenuado apresentam eficácia heterogênea entre sorotipos e risco de amplificação dependente de anticorpos (ADE) em indivíduos soronegativos. Este projeto, ainda em desenvolvimento, tem como objetivo desenhar e validar *in silico* um candidato vacinal de mRNA quimérico, multiepítopo e pan-sorotípico contra o DENV, sem risco de ADE, por meio da predição e triagem de epítopos de células B e T conservados, seguidas de montagem da quimera, modelagem estrutural, docking molecular e simulação imunológica. Até o momento, foram selecionados epítopos pan-dengue com cobertura fenotípica populacional de 99,93%, e a variante V2 (adjuvante PADRE) destacou-se com a melhor qualidade estrutural (65,5% dos resíduos em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran), sendo selecionada para as etapas finais de docking e simulação imunológica, que permitirão concluir a validação do candidato vacinal.

Palavras-chave: Dengue. Vacina de mRNA. Imunoinformática. Epítopos. Vacinologia reversa.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas — Biologia Molecular / Imunologia.

Introdução

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus DENV, transmitida pela picada da fêmea do mosquito Aedes aegypti. Trata-se de um relevante problema de saúde pública: cerca de metade da população mundial vive em áreas de risco, com estimativa de 100 a 400 milhões de infecções por ano, e 2024 registrou o maior número de casos e óbitos já notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS, 2025). Além dos casos leves, a doença pode evoluir para formas graves, como a febre hemorrágica e a síndrome de choque da dengue, com risco de morte do paciente infectado.

O vírus da dengue apresenta variabilidade genética, resultado de mutações frequentes durante a replicação do RNA, e é classificado em quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) que compartilham características estruturais semelhantes, mas diferem na genética e nas proteínas de superfície. Essas diferenças fazem com que a infecção por um sorotipo confira imunidade duradoura apenas contra ele, permanecendo a suscetibilidade aos demais. Em infecção secundária por sorotipo diferente, anticorpos preexistentes podem não neutralizar o vírus e, em vez disso, facilitar sua entrada nas células — fenômeno conhecido como amplificação dependente de anticorpos (ADE), associado a quadros mais graves da doença (Katzelnick et al., 2017).

Atualmente não há antiviral específico disponível para o tratamento da dengue, fazendo com que a imunização continue sendo a principal estratégia de controle da doença. As duas vacinas atualmente aprovadas, Dengvaxia (CYD-TDV) e Qdenga (TAK-003), são formulações de vírus vivo atenuado que, apesar de eficazes, apresentam eficácia heterogênea entre os quatro sorotipos e limitações clínicas relevantes: a Dengvaxia é indicada apenas para soropositivos prévios, por elevar o risco de dengue grave em soronegativos, enquanto a Qdenga não demonstrou proteção garantida contra os sorotipos DENV-3 e DENV-4 em soronegativos (Esposito; Principi, 2026).

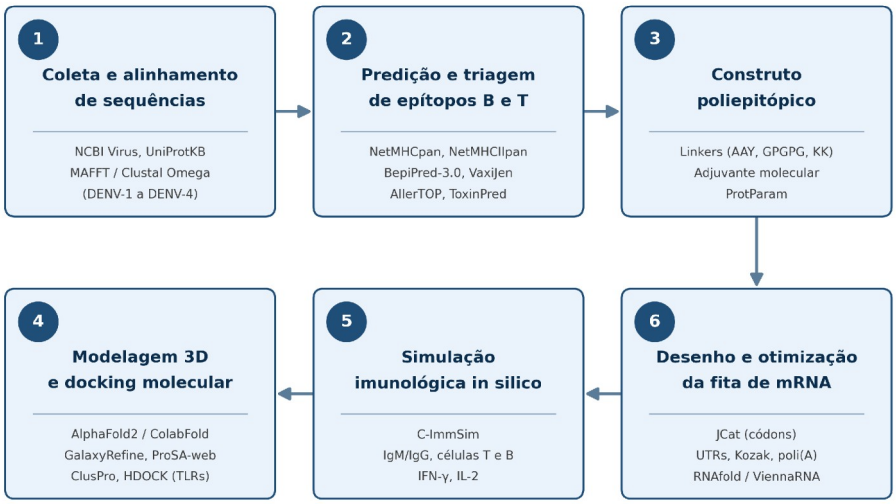
Nesse cenário, as vacinas de RNA mensageiro (mRNA) surgem como alternativa moderna e promissora, por permitirem desenhar antígenos de forma rápida e precisa, sem os riscos do uso de vírus vivo atenuado (Pardi et al., 2018; Liu, 2025). Diante disso, este estudo busca projetar e validar *in silico* um candidato vacinal de mRNA quimérico, multiepítopo e pan-sorotípico contra o DENV (DENV-1 a DENV-4), capaz de gerar resposta imune balanceada e sem risco de ADE, a partir do mapeamento

de regiões conservadas em alvos antigênicos estratégicos — como o domínio EDIII da proteína do envelope e as proteínas não estruturais NS1, NS3 e NS5 — e da seleção de epítopos de células B e T (MHC-I/II) seguros e imunogênicos.

Metodologia

Este projeto é uma abordagem *in silico* baseada nos princípios da Vacinologia Reversa 2.0 e da Imunoinformática, estruturada em seis etapas sequenciais: (1) coleta e alinhamento de sequências virais; (2) predição e seleção de epítopos de Células B e T; (3) engenharia do construto poliepitópico; (4) modelagem estrutural tridimensional e docking molecular; (5) simulação imunológica *in silico*; e (6) desenho e otimização da fita de mRNA. Todas as etapas serão realizadas com o uso de servidores públicos, bancos de dados abertos e ferramentas de acesso gratuito via web, compatíveis com a infraestrutura disponível. As seis etapas estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma das seis etapas do pipeline metodológico de bioinformática.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na primeira etapa, serão recuperadas as sequências de referência e de cepas circulantes dos quatro sorotipos do DENV (DENV-1 a DENV-4) a partir do NCBI Virus e do UniProtKB, com foco nas sequências completas das proteínas E, NS1, NS3 e NS5. Em seguida, será realizado um alinhamento múltiplo das sequências usando o programa MAFFT (Katoh; Standley, 2013) permitindo identificar regiões altamente conservadas entre os quatro sorotipos, chamadas regiões pan-dengue, que servirão de base para a seleção dos alvos antigênicos.

Na segunda etapa, os epítopos de linfócitos T citotóxicos (MHC de classe I) serão preditos com o NetMHCpan-4.1, no IEDB Analysis Resource (Reynisson et al., 2020; Vita et al., 2019), considerando os alelos HLA-A e HLA-B mais comuns na população brasileira/latino-americana (HLA-A*02:01, HLA-A*24:02 e HLA-B*07:02) e afinidade inferior a 1,0% ou IC50 inferior a 50 nM. Os epítopos de linfócitos T auxiliares (MHC de classe II) serão preditos com o NetMHCIIpan-4.0 (Reynisson et al., 2020), priorizando os alelos HLA-DRB1 mais frequentes, e os epítopos de linfócitos B serão mapeados com o BepiPred-3.0 (Clifford et al., 2022).

Os epítopos selecionados serão submetidos a filtros de qualidade imunológica: antigenicidade pelo VaxiJen v3.0 (corte de 0,4; Doytchinova; Flower, 2007), alergenicidade pelo AllerTOP v2.1 (Dimitrov et al., 2014), toxicidade pelo ToxinPred2 (Gupta et al., 2013) e conservação entre sorotipos pela ferramenta Epitope Conservancy Analysis do IEDB, mantendo-se apenas os epítopos antigênicos, não alergênicos, não tóxicos e conservados entre sorotipos.

Na terceira etapa, os epítopos selecionados serão organizados em uma quimera poliepitópica, com um adjuvante molecular (β-defensina humana) na porção N-terminal, unida aos demais componentes

por linkers específicos: EAAAK (adjuvante-epítopo, separação estrutural entre domínios), AAY (entre epítopos de MHC-I, clivagem proteassomal), GPGPG (entre epítopos de MHC-II, processamento imunológico) e KK (entre epítopos de células B). As propriedades físico-químicas de cada variante (peso molecular, ponto isoelétrico teórico, índice de instabilidade, índice alifático e hidropaticidade/GRAVY) serão avaliadas com o ProtParam do servidor ExPASy (Gasteiger et al., 2005), buscando-se peso molecular inferior a 50 kDa e índice de instabilidade inferior a 40, indicativos de proteína estável e compatível com expressão heteróloga.

A estrutura 3D da vacina será prevista pelo AlphaFold2/ColabFold (Jumper et al., 2021), refinada com o GalaxyRefine (Heo et al., 2013) e validada pelo gráfico de Ramachandran no PROCHECK (≥ 85-90% dos resíduos em regiões favoráveis) e pelo escore Z global do ProSA-web (Wiederstein; Sippl, 2007). Os epítopos conformacionais de células B serão mapeados com o DiscoTope-3.0 (Høie et al., 2024), seguido do docking molecular entre a proteína quimérica e receptores Toll-like humanos (TLR3, TLR4 e TLR7/8) nos servidores ClusPro 2.0 (Kozakov et al., 2017) e HDOCK (Yan et al., 2020), com análise dos resíduos de contato, pontes de hidrogênio e energia livre de ligação estimada.

Na quinta etapa, a resposta imune induzida pelo candidato vacinal será simulada *in silico* no servidor C-ImmSim (Rapin et al., 2010), integrando ferramentas de predição de ligação a MHC para reproduzir eventos imunológicos centrais. Serão configuradas três doses virtuais, com intervalo de quatro semanas, monitorando a produção de anticorpos (IgM e IgG1/IgG2), células T de memória, ativação de células B e citocinas relevantes (IFN-γ, IL-2).

Por fim, a sequência da quimera selecionada será retrotraduzida e otimizada para expressão em corpo humano com o JCat (Grote et al., 2005), visando um Índice de Adaptação de Códons (CAI) superior a 0,85 e um teor de guanina-citosina (GC) entre 50% e 60%. A arquitetura da fita de mRNA incluirá: Cap-1 na extremidade 5'; região 5' UTR de alta eficiência (β-globina humana); sequência de Kozak (GCCACCATG); peptídeo sinal N-terminal (derivado do tPA); a sequência codificante otimizada (CDS); códon de parada duplo; região 3' UTR estabilizadora; e cauda poli(A) de 100 a 120 nucleotídeos. A estrutura secundária será avaliada com o RNAfold, do pacote ViennaRNA (Lorenz et al., 2011), verificando-se a energia livre mínima (ΔG) e a acessibilidade do sítio AUG e da 5' UTR.

Resultados Parciais

A sequência primária da glicoproteína de envelope (proteína E) de DENV-2 (cepa Jamaica/1409/1983; UniProtKB P07564, segmento correspondente à proteína E, 495 resíduos) foi recuperada e alinhada com as sequências homólogas de DENV-1, DENV-3 e DENV-4. O alinhamento múltiplo revelou identidade estrita de 52,53% entre os quatro sorotipos (260 de 495 resíduos idênticos), evidenciando regiões conservados nos domínios I, II e III da proteína E, que serviram de base para a seleção de epítopos com potencial de proteção cruzada (*pan-dengue*)

A predição de epítopos de linfócitos T CD8+ (MHC de classe I) no IEDB Analysis Resource, com o NetMHCpan-4.1, contra os alelos de HLA-A e HLA-B mais frequentes na população brasileira, gerou 59 ligantes fortes (percentil de afinidade < 1,0%). Após a filtragem de sobreposições, selecionamos 9 epítopos (Tabela 1), com cobertura fenotípica populacional estimada em 99,93% (99,80% para o locus HLA-A e 63,40% para o locus HLA-B, com base em frequências alélicas do REDOME), cobrindo 22 dos 23 alelos avaliados. A avaliação de imunogenicidade intrínseca pelo preditor do IEDB indicou 8 dos 9 peptídeos com escore positivo, destacando-se TVNPIVTEK (+0,246) e ITEAELTGY (+0,211); apenas TEAKQPATL apresentou escore negativo (-0,272), sendo mantido no painel por ser o único ligante de alta afinidade identificado para o alelo HLA-B*40:01.

Tabela 1 – Painel de epítopos CD8+ (MHC-I) selecionados para a quimera vacinal.

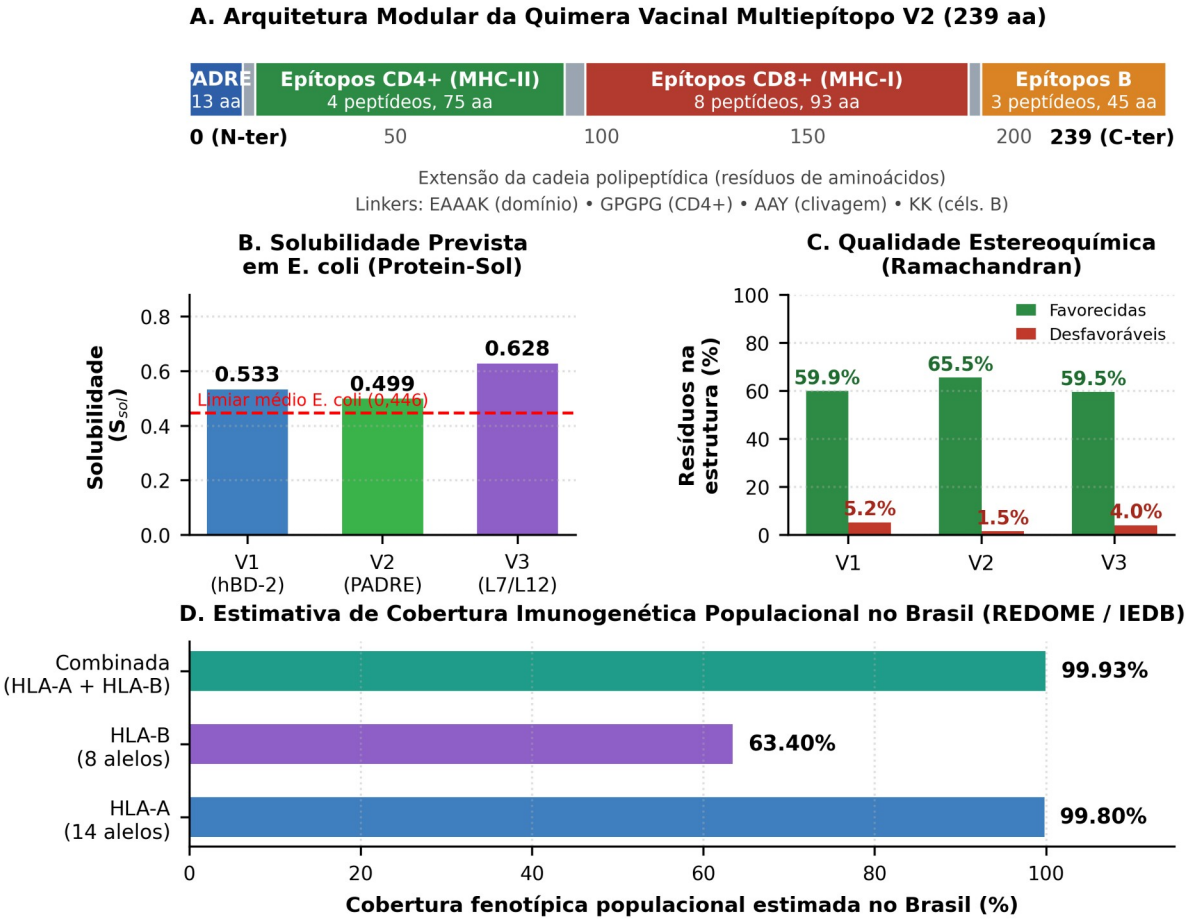
Epítopo	Posição	Nº alelos	Melhor rank (%)	Imunogenicidade (score IEDB)
TEAKQPATL	48–56	3	0,01	-0,272 (baixa)
ITEAELTGY	170–178	2	0,01	+0,211 (imunogênico)
KAWLVHRQW	204–212	4	0,01	+0,107 (imunogênico)
FLDLPLPWL	213–221	2	0,04	+0,095 (imunogênico)
IQKETLVTF	232–240	5	0,01	+0,116 (imunogênico)
TVNPIVTEK	353–361	6	0,01	+0,246 (imunogênico)
AEPPFGDSY	369–377	2	0,04	+0,053 (imunogênico)
MAILGDTAW	412–420	4	0,02	+0,142 (imunogênico)
SVSLVLVGV	475–483	2	0,03	+0,020 (imunogênico)

Fonte: elaborado pela autora, com base em predições do IEDB Analysis Resource / NetMHCpan-4.1 (2026).

Na predição de epítopos T CD4+ (MHC de classe II) com o NetMHCIIpan, serão avaliadas 3.367 combinações de peptídeos de 15 resíduos contra sete alelos HLA-DRB1 prevalentes no Brasil, resultando em 61 predições fortes (percentil ≤ 2,0%). Destaca-se a ocorrência de clusters imunogênicos duplos, nos quais epítopos de classe II se sobrepõem a epítopos CD8+ já selecionados, por exemplo, o core IKTEAKQPA sobrepõe-se ao epítopo TEAKQPATL, e o core YIIIGVEPG sobrepõe-se a AEPPFGDSY, o que tende a favorecer a ativação conjunta de linfócitos T auxiliares e citotóxicos na mesma parte da vacina.

As três variantes quiméricas desenhadas, V1 (adjuvante β-defensina humana hBD-2), V2 (peptídeo PADRE) e V3 (proteína ribossomal L7/L12 de M. tuberculosis), todas tiveram a estrutura 3D prevista pelo AlphaFold2/ColabFold e a qualidade validada pelo PROCHECK no SAVES v6.0 (Figura 2). A variante V2 (239 aminoácidos) apresentou o melhor desempenho conformacional, com 65,5% dos resíduos em regiões mais favorecidas do gráfico de Ramachandran e apenas 1,5% em regiões desfavoráveis, dentro do limite aceito na literatura (< 2,0%), contra 5,2% (V1) e 4,0% (V3). As três variantes também superaram o limiar de solubilidade bacteriana (Ssol > 0,446) no servidor Protein,Sol, com destaque para V3 (0,628) e V1 (0,533). Com base nesses resultados, a Quimera V2 foi selecionada como candidata principal para a etapa seguinte de docking molecular com receptores Toll-like.

Figura 2 – Engenharia estrutural, caracterização biofísica e cobertura populacional da quimera vacinal multiepítopo contra o DENV. (A) Arquitetura modular da Quimera V2 (adjuvante PADRE, 239 aa). (B) Solubilidade prevista para superexpressão em Escherichia coli (Protein-Sol; limiar de 0,446). (C) Comparativo estereoquímico no gráfico de Ramachandran (PROCHECK/SAVES v6.0) entre as variantes V1, V2 e V3. (D) Cobertura fenotípica estimada da população brasileira para os alelos de HLA de classe I selecionados.



Fonte: elaborado pela autora (2026), com base em predições do AlphaFold2/ColabFold, Protein-Sol e PROCHECK/SAVES v6.0.

Discussão

A identidade de 52,53% encontrada na proteína E entre os quatro sorotipos foi suficiente para regiões pan-dengue nos domínios I, II e III. Isso reforça que apostar em epítopos conservados é um caminho viável para gerar proteção cruzada, desviando de alvos sorotipo-específicos que costumam aumentar o risco de amplificação dependente de anticorpos (Katzelnick et al., 2017). A cobertura de 99,93% obtida para o painel T CD8+ mostra um alcance imunogenético excelente para população brasileira. Além disso, a sobreposição observada entre epítopos CD4+ e CD8+ indica que o desenho pode acionar tanto a resposta humoral quanto a citotóxica. Esse comportamento combina perfeitamente com a proposta das vacinas de mRNA: entregar uma imunidade rápida e completa, sem as complicações e riscos associados ao uso de vírus vivo atenuado (Pardi et al., 2018; Liu, 2025). Escolhemos a Quimera V2 por conta da sua boa qualidade estereoquímica — com 65,5% dos resíduos em regiões favorecidas no gráfico de Ramachandran e só 1,5% em zonas desfavoráveis — e pelo seu perfil de solubilidade. Esses parâmetros funcionam como ótimos indicativos de estabilidade estrutural, ajudando a filtrar as melhores opções antes de avançar para testes experimentais mais caros. Vale lembrar que os dados apresentados cobrem a fase inicial do fluxo de trabalho: a escolha dos epítopos, a montagem da quimera e a triagem da estrutura. Para confirmar de fato a imunogenicidade e garantir a ausência de risco de ADE, ainda precisamos concluir o docking molecular com os receptores Toll-like e as simulações imunológicas dinâmicas, que já estão em andamento.

Conclusão

Os resultados parciais obtidos até o momento indicam a viabilidade do desenho de um candidato vacinal de mRNA pan-sorotípico contra o DENV, sem risco de ADE, com a Quimera V2 destacando-se como a candidata estrutural mais promissora para as etapas seguintes. Por se tratar de um trabalho em desenvolvimento, as próximas etapas incluirão a finalização do *docking* molecular com os receptores Toll-like, a simulação imunológica dinâmica no C-ImmSim e o desenho completo da fita de mRNA, consolidando a molécula como candidata a síntese e validação experimental da vacina.

Referências

CLIFFORD, J. N.; HØIE, M. H.; DELEURAN, S.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-3.0: improved B-cell epitope prediction using protein language models. **Protein Science**, v. 31, n. 12, e4497, 2022.

DIMITROV, I.; BANGOV, I. P.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. AllerTOP v.2 — a server for in silico prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, 2014.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, 2007.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Dengue vaccines in a changing epidemiological landscape: current evidence, unresolved challenges, and public health considerations. **Vaccines**, v. 14, n. 9, 2026.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.). **The proteomics protocols handbook. Totowa: Humana Press,** 2005. p. 571-607.

GROTE, A.; HILLER, K.; SCHEER, M.; MÜNCH, R.; NÖRTEMANN, B.; HEMPEL, D. C.; JAHN, D. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W526-W531, 2005.

GUPTA, S.; KAPOOR, P.; CHAUDHARY, K.; GAUTAM, A.; KUMAR, R.; RAGHAVA, G. P. S. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e73957, 2013.

HEO, L.; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. W384-W388, 2013.

HØIE, M. H.; GADE, F. S.; JOHANSEN, J. M.; WÜRTZEN, C.; WINTHER, O.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. DiscoTope-3.0: improved B-cell epitope prediction using inverse folding latent representations. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, p. 583-589, 2021.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KATZELNICK, L. C.; GRESH, L.; HALLORAN, M. E.; MERCADO, J. C.; KUAN, G.; GORDON, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929-932, 2017.

KOZAKOV, D.; HALL, D. R.; XIA, B.; PORTER, K. A.; PADHORNY, D.; YUEH, C.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The ClusPro web server for protein-protein docking. Nature Protocols, v. 12, n. 2, p. 255-278, 2017.

LIU, X. Opportunities and challenges of mRNA technologies in development of dengue virus vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 16, 2025.

LORENZ, R.; BERNHART, S. H.; HÖNER ZU SIEDERDISSEN, C.; TAFER, H.; FLAMM, C.; STADLER, P. F.; HOFACKER, I. L. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 6, artigo 26, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue and severe dengue. Genebra: OMS, 2025. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue. Acesso em: 4 set. 2026.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; PORTER, F. W.; WEISSMAN, D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. Nature Reviews Drug Discovery, v. 17, p. 261-279, 2018.

RAPIN, N.; LUND, O.; BERNASCHI, M.; CASTIGLIONE, F. Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, e9862, 2010.

REYNISSON, B.; ALVAREZ, B.; PAUL, S.; PETERS, B.; NIELSEN, M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W449-W454, 2020.

VITA, R.; MAHAJAN, S.; OVERTON, J. A.; DHANDA, S. K.; MARTINI, S.; CANTRELL, J. R.; WHEELER, D. K.; SETTE, A.; PETERS, B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D339-D343, 2019.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Research, v. 35, p. W407-W410, 2007.

YAN, Y.; TAO, H.; HE, J.; HUANG, S.-Y. The HDOCK server for integrated protein-protein docking. **Nature Protocols**, v. 15, n. 5, p. 1829-1852, 2020.