

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

Joelma Rodrigues de Souza

**Mapeamento de epítomos reativos para
as células T das proteínas não
estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3**

RECIFE

2011

Joelma Rodrigues de Souza

Mapeamento de epítomos reativos para as células T das proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientadores: Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*).

Recife

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S729m Souza, Joelma Rodrigues de.
Mapeamento de epítomos relativos as células T das proteínas estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3 / Joelma Rodrigues de Souza. — Recife: J. R. de Souza, 2011.
263 f.: il.

Tese (Doutorado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Sílvia Maria Lucena Montenegro, Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior, Frederico Guilherme Coutinho Abath.

.1. Dengue. 2. Epítomos. 3. Linfócitos T. I. Montenegro, S. M. L. II. Marquez Junior, E. T. A. III. Abath, F. G. C. IV. Título.

CDU 616.98

Joelma Rodrigues de Souza

Mapeamento de epítomos reativos para as células T das proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2011.

Banca Examinadora

Dra. Silvia Maria de Lucena Montenegro
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Departamento de Virologia e Terapia Experimental do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Marli Tenório Cordeiro
Laboratório Central de Pernambuco – LACEN/PE

Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dedico este trabalho a minha mamãe Conceição e ao meu amado papis Joel
(*in memoriam*), a quem homenageio com os versos abaixo:

Você meu amigo de fé meu irmão camarada,
amigo de tantos caminhos, de tantas jornadas
Cabeça de homem mas o coração de menino,
aquele que está do meu lado em qualquer caminhada

Me lembro de todas as lutas meu bom companheiro,
você tantas vezes provou que é um grande guerreiro
O seu coração é uma casa de portas abertas,
amigo você é o mais certo das horas incertas

As vezes em certos momentos difíceis da vida,
em que precisamos de alguém para ajudar na saída
A sua palavra de força de fé e de carinho,
me dá a certeza de que eu nunca estive sozinho

Você meu amigo de fé meu irmão camarada,
sorriso e abraço festivo da minha chegada
Você que me diz as verdades com frases abertas,
amigo você é o mais certo das horas incertas

Não preciso nem dizer, tudo isso que eu lhe digo,
mas é muito bom saber, que você é meu amigo
Não preciso nem dizer, tudo isso que eu lhe digo,
mas é muito bom saber que eu tenho um grande amigo

(*Roberto Carlos e Erasmo Carlos*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer entender que tudo é no tempo certo e oportuno, e que sem Ele, nada é possível !

A minha orientadora Dra. Silvia, pelo seu exemplo de fé, profissionalismo, amizade, sabedoria e humanidade, simplesmente muito obrigada !

Ao meu orientador Dr. Ernesto, pelos seus valiosos ensinamentos, oportunidade e credibilidade;

Ao meu orientador Dr. Fred (*in memoriam*), seu exemplo de profissionalismo, orientação e inteligência me inspiram até hoje!

A Dra. Laura Gil, pela confiança, amizade e por colocar o LAViTE à disposição em todos os momentos, *conditio se ne qua non* para a conclusão deste trabalho;

A Dra. Marli Tenório, pelo exemplo de seriedade e pela colaboração no diagnóstico laboratorial dos pacientes;

Ao Dr. Carlos Brito, pela colaboração no diagnóstico clínico dos pacientes;

Ao Dr. Eduardo Nascimento, pelos seus ensinamentos e solicitude;

Ao Dr. Ulisses Braga Neto, pela atenção e por todo suporte estatístico;

A Dra. Clarice Morais, pela amizade, apoio, atenção e incentivo;

A equipe LAViTE, em especial a Ana Maria, pelo diagnóstico molecular das amostras; a Cecília Magalhães e a Doris, pela contato e resgate das amostras dos pacientes; a Verônica, por sua alegria, amizade e competência no processamento das amostras; a Amanda, Jefferson e Clintiano, pela colaboração na tipagem dos alelos HLA; a Andrea Rangel e Sabrina pelas palavras de carinho, incentivo e aconselhamento imprescindíveis para reflexão e inspiração deste trabalho;

A equipe do Departamento de Imunologia, em especial a Dra. Yara, Dra. Virginia, Fabiana, Roberto, Andrea, Roni, Wlademir, Daniele e Simone por toda atenção, incentivo e amizade;

Aos colaboradores e gerenciadorees do Hospital Santa Joana, Hospital HOPE/Esperança e IMIP pela indicação e seleção dos pacientes;

A Dra. Eduarda Cesse, Coordenadora do Programa de Pós-graduação (Doutorado) do CPqAM/FIOCRUZ pela compreensão e atenção dispensadas;

A Secretaria Acadêmica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em especial a Nilda e Joselice, por todas as atenções e informações;

Aos pacientes deste estudo, sem os quais, este sonho não teria sido possível;

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida;

A *Johns Hopkins University* pelo financiamento desta pesquisa;

Aos colegas da Faculdade Maurício de Nassau, em especial aos professores MSc. Eduardo Maciel e MSc. Renata Ramos, pelo exemplo de profissionalismo, incentivo, disposição, amizade e companhia.

Aos amigos do Laboratório de Sirinhaém, em especial a Betânia pela amizade, cooperação e compreensão nas ausências do trabalho;

A minha amiga, irmã e doutora Adriana Vieira, seu exemplo de fé, determinação, perseverança e amor ao próximo e a família enriqueceram meus valores e me incentivaram a qualidade deste trabalho;

Ao meu amigo Sidney, pela atenção, admiração, incentivo, força, valores, sabedoria e carinho;

As minhas amigas Bianka e Mônica, pelos ensinamentos e incentivo;

Aos meus amigos, ex-alunos e fiéis colaboradores: Deborah (minha monitora homenageada), Ana Paula, Rossana, Amanda, Gustavo, Cybelle e Tierry, pela amizade, alegria e ajuda valiosa!

A minha família, em especial as minhas primas Neta e Fátima e ao meu bebezinho Joice, sem vocês esse trabalho não seria possível;

A minha irmã Dindinha (*in memoriam*) sua garra, determinação, força de vida, amizade, carinho e amor fraternal me espelham e me acompanham em todos os momentos. Sua contribuição na minha vida é incomensurável!

“Benções são derramadas a cada instante,
Há sempre um novo milagre para acontecer...”

(Eros Biondini)

SOUZA, Joelma Rodrigues de. **Mapeamento de Epítomos reativos para as células T das proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3.** 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

A dengue é uma das principais arboviroses humana, causada por um dos quatro sorotipos virais (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos pode resultar desde uma forma clínica inaparente a manifestações clínicas graves. O genoma viral consiste de RNA, que após tradução e processamento, origina dez proteínas: três estruturais e sete não estruturais (NS), envolvidas na replicação viral. Estudos buscam correlacionar fatores genéticos do hospedeiro com a predisposição à resistência, suscetibilidade ou gravidade da infecção pelo dengue. A resposta imune de 72 pacientes com dengue foi analisada *ex-vivo*, utilizando *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) de pacientes provenientes de uma coorte de dengue previamente iniciada no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE/CPqAM). Essa análise foi realizada através de *Enzyme Linked Immunospot* (ELISPOT), utilizando-se peptídeos sintéticos abrangendo as proteínas NS1 e NS3 do DENV-3, para estimular células T CD4⁺ e CD8⁺. As respostas imunes foram analisadas quanto à associação com atributos clínicos e imunogenéticos, tais quais: forma clínica, tipo de infecção e *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dos pacientes e seus supertipos. A identificação *ex-vivo* de epítomos para células T obtidas experimentalmente também foi comparada com as previsões teóricas utilizando-se algoritmos computacionais avançados. Os resultados evidenciaram que seis peptídeos, sendo três da NS1 e três da NS3, foram propostos como epítomos de células T. Em acréscimo, o peptídeo NS1_297_311 apresentou perfil de positividade alélica entre a população e o gene HLA-DRB1. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas ou preventivas, como uma vacina baseada em epítomos múltiplos contra a dengue.

Palavras-chave: Dengue, Epítomos, Linfócitos T.

SOUZA, Joelma Rodrigues de. **T Cell Epitope Mapping for NS1 and NS3 non structural proteins for dengue 3**. 2011. Thesis (Health Public PhD) – Aggeu Magalhães Center of Researches, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2011.

ABSTRACT

Dengue is the most important mosquito-borne viral disease caused by one of four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). Infection by any of the four serotypes may result from a clinical form with no symptoms to severe clinical manifestations. The viral genome consists of RNA, which after translation and processing, will result in ten proteins: three structural and seven nonstructural (NS), which are involved in viral replication. Studies seek to correlate with genetic factors host predisposing to resistance, susceptibility or severity of dengue infection. The immune response of dengue patients (n = 72) was analyzed *ex vivo*, using *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) of patients from a cohort of dengue previously started at the Department of Virology and Experimental Therapy (LaViTE/ CPqAM). This analysis was performed by *Enzyme Linked Immunospot* (ELISPOT), using synthetic peptides spanning the proteins NS1 and NS3 of DENV-3, to stimulate CD4+ and CD8+ T cells. Immune responses were analyzed for association with clinical and immunogenetic attributes, such as: clinical form, type of infection and the *Human Leukocyte Antigen* (HLA) of the patient and their supertypes. The identification of *ex-vivo* T-cell epitopes obtained experimentally was also compared with theoretical predictions using advanced computational algorithms. Our results showed that six peptides, three of NS1 and three of NS3 proteins, were proposed as T cell epitopes. In addition, the peptide NS1_297_311 showed profile allele positivity among the population and HLA-DRB1 gene. These findings may contribute to the development of preventive or therapeutic interventions, such as a multi-epitope-based vaccine against dengue.

Keywords: Dengue; Epitope; T Lymphocyte.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da partícula dengue e conformações da proteína E.....	30
Figura 2	Diagrama esquemático da poliproteína do vírus dengue.....	32
Figura 3	Representação esquemática da nova nomenclatura para os alelos HLA.....	37
Figura 4	Representação esquemática das estruturas das moléculas HLA...	38
Figura 5	Interação entre os <i>pockets</i> de uma molécula HLA e os resíduos peptídicos	39
Figura 6	Representação esquemática de uma matriz 10x10 de 100 peptídeos agrupados em <i>pools</i>	59
Figura 7	Etapas da técnica ELISPOT.....	74
Figura 8	Frequência dos peptídeos da proteína NS1 e NS3 selecionados através de matriz para teste individual.....	83
Figura 9	Frequência dos peptídeos da proteína NS1 considerando-se os ensaios individuais.....	88
Figura 10	Frequência dos peptídeos da proteína NS3 considerando-se os ensaios individuais.....	89
Figura 11	Correlação entre afinidade de ligação peptídica ao alelo HLA-DRB1 e o perfil de positividade do alelo na população de estudo para o peptídeo NS1_297_311 e NS3_181_195.....	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Funcionalidade físico-química das cadeias laterais dos Peptídeos	40
Quadro 2 Descrição das especificidades dos supertipos HLA de classe I (A e B).....	41
Quadro 3 Matriz dos <i>pools</i> de peptídeos da proteína NS1.....	70
Quadro 4 Matriz dos <i>pools</i> de peptídeos da proteína NS3.....	71
Quadro 5 Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT em <i>pools</i>	72
Quadro 6 Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT por peptídeo individual.....	73
Quadro 7 Ensaio de ligação moléculas HLA-DRB1 e o seu respectivo peptídeo ligante padrão.....	77
Quadro 8 Sequências peptídicas propostas como epítomos de células T ...	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características da população de estudo (n=20) utilizada para triagem do mapeamento de epítomos através de matrizes de peptídeos em <i>pools</i>	82
Tabela 2 Características da população de estudo (n=52) utilizada para o mapeamento de epítomos os peptídeos candidatos.....	84
Tabela 3 Tipagem dos <i>loci</i> HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 dos pacientes (n=43) utilizados na triagem individual dos peptídeos candidatos a epítomos de células T.....	90
Tabela 4 Classificação dos alelos HLA-A e HLA-B em supertipos.....	93
Tabela 5 Associação entre a resposta peptídica e a presença do alelo HLA.....	96.
Tabela 6 Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA na severidade da doença.....	99
Tabela 7 Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA no <i>status</i> da infecção.....	102
Tabela 8 Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS1 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura.....	106
Tabela 9 Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura	111
Tabela 10 Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV.	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Infectividade Viral facilitada por anticorpos (<i>Antibody-dependent enhancement</i>)
AEC	3 amino-9-etil-carbazole
ANN	Rede Neural Artificial (<i>Artificial Neural Networks</i>)
C	Proteína do Capsídeo
CD	Grupamento de Diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CG	Complexo de Golgi
CML	Condição Máxima Estimada
CN	Controle Normal
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico (<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>)
DALY	Anos de vida perdidos em decorrência da doença (<i>Disability-adjusted life years</i>)
DC	Dengue Clássica
DCC	Dengue Clássica Complicada
DENV	Vírus Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
dsRNA	Ácido Ribonucleíco de fita dupla
E	proteína do Envelope
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme Immunospot</i>
EPM	Erro Padrão da Média

Fc γ	Fração cristalizável da Imunoglobulina G
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
G6PD	Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
GM-CSF	Fator Estimulador de colônia Granulócito-Monócito
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leucocyte Antigens</i>)
HPA	Antígeno de plaqueta humana
HSP	proteína de choque térmico
Ht	hematócrito
ICAM-3	molécula 3 de adesão intercelular
IEDB	<i>ImmuneEpitope Database</i>
IFD	imunofluorescência direta
IFN- γ	Interferon gama
IFN- α/β	Interferon alfa/beta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Inibição da hemaglutinação
IL	Interleucina
IMGT/HLA	International Immunogenetics/Human Leucocyte Antigen
Iono	Ionomicina
Kb	kilobase
kDa	kilodáton
LPS	lipopolissacarídeo
LT	linfócito T
LTA	linfotóxina alfa
MBL-2	Lectina ligadora de manose 2
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1

MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mNS1	forma membranar da proteína não estrutural 1
MTase	metiltransferase
NK	células natural killer
NO	óxido nítrico
NS	proteína não estrutural
NTPase	nucleotídeo trifosfatase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>odds ratio</i>
PAHO	Organização Pan Americana da Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR-SSO	Reação em cadeia da polimerase oligoespecífica
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase sequência específica
PMA	Acetato de forbol mirastato
prM/M	proteína pré-Membrana/Membrana
PRR	Receptores Padrão de Reconhecimento
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
RPMI	<i>Rosevelt Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SCD	Síndrome do Choque da dengue
SE	semana epidemiológica
SFB	Soro fetal bovino
SFC	célula formadora de <i>spot</i>

SFM	Serum Free Media
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
sNS1	forma solúvel da proteína não estrutural 1
TAP	Proteína Associada ao transporte
TDR	<i>tropical disease research</i>
TGF- β	Fator de Crescimento e Transformação beta
TGN	Rede Trans Golgi
Th1	Linfócito T CD4+ auxiliar 1
Th2	Linfócito T CD4+ auxiliar 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
tPA	ativador do ativador de plasminogênio
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WNV	Vírus do Oeste do Nilo (<i>West Nile Virus</i>)
β 2m	beta 2 microglobulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Aspectos históricos da dengue	22
1.2	Distribuição epidemiológica da doença	24
1.2.1	Epidemiologia no Brasil.....	25
1.2.2	Transmissão vetorial.....	26
1.2.3	Impacto sócio-econômico na população.....	27
1.3	Genoma viral	28
1.3.1	Proteínas não estruturais e a replicação viral.....	31
1.4	Fatores do hospedeiro	35
1.4.1	Antígenos Leucocitários Humanos – HLA.....	35
1.5	Aspectos clínicos e laboratoriais da dengue	42
1.5.1	Diagnóstico clínico.....	42
1.5.2	Dagnóstico Laboratorial.....	45
1.6	Imunopatogenia da dengue	49
1.7	Modelo experimental para as formas severas da dengue	52
1.8	Desenvolvimento de uma vacina contra dengue	53
1.8.1	Vacina viva atenuada.....	54
1.8.2	Vacina quimérica recombinante.....	55
1.8.3	Vacina de vetores virais e de DNA.....	56
1.8.4	Vacinas inativadas.....	56
1.9	Mapeamento de epítomos de células T	57
1.10	Modelos preditivos de identificação de resposta de célula T	60
2	JUSTIFICATIVA	62
3	HIPÓTESE	63
4	OBJETIVOS	64
4.1	Objetivo Geral	64

4.2	Objetivos Específicos	64
5	MATERIAIS E MÉTODOS	65
5.1	Casuística	65
5.2	Diagnóstico	66
5.2.1	Isolamento e identificação viral.....	66
5.2.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	66
5.2.3	Reação em cadeia da polimerase pela ação da transcriptase reversa-RT-PCR.....	66
5.3	Classificação clínica dos pacientes	67
5.4	Ensaio de ELISPOT	68
5.4.1	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico – PBMC.....	68
5.4.2	Peptídeos sintéticos.....	68
5.4.3	Obtenção de IFN- γ	72
5.4.4	Análise dos ensaios.....	74
5.5	Tipagem dos Antígenos Leucocitários Humanos – HLA	75
5.5.1	Extração do DNA genômico.....	75
5.5.2	Amplificação do DNA genômico e eletroforese para identificação alélica.....	76
5.6	Ensaio de afinidade de ligação: peptídeos imunodominantes e alelos HLA-DRB1	76
5.7	Predição dos epítopos reativos de células T	78
5.8	Análise estatística	79
5.9	Aspectos éticos	80
6	RESULTADOS	81
6.1	Seleção dos peptídeos em <i>pools</i>	81
6.1.1	Caracterização da população de estudo	81
6.1.2	Peptídeos.....	82
6.2	Seleção dos peptídeos individuais	83

6.2.1	Caracterização da população de estudo.....	83
6.2.2	Peptídeos da proteína NS1.....	88
6.2.3	Peptídeos da proteína NS3.....	88
6.3	Identificação dos Antígenos Leucocitários Humanos – HLA	89
6.3.1	Classificação dos Antígenos Leucocitários Humanos em Supertipos....	92
6.4	Associação entre o peptídeo e o HLA	95
6.5	Associação entre o peptídeo e a forma clínica da doença	98
6.6	Efeito combinado do peptídeo:HLA na severidade da doença	98
6.6.1	Forma clínica.....	98
6.6.2	Tipo de infecção.....	101
6.7	Avaliação dos ensaios de afinidade de ligação ao gene	
	HLA-DRB1	105
6.8	Associação entre o peptídeo e a afinidade de ligação para o gene	
	HLA-DRB1	116
6.9	Predição Teórica para os alelos HLA de classe I e II e análise das	
	sequências conservadas entre os sorotipos	117
6.10	Peptídeos de NS1 e NS3 propostos como epítomos de células T .	126
7	DISCUSSÃO	129
7.1	Peptídeos candidatos a epítomos de células T	134
7.1.1	Peptídeos da proteína NS1.....	134
7.1.2	Peptídeos da proteína NS3.....	135
7.2	Associação entre o peptídeo e o haplótipo HLA	137
7.3	Associação entre o peptídeo e a forma clínica da doença	140
7.4	Efeito combinado do peptídeo e o genótipo HLA na severidade da	
	doença	140
7.5	Avaliação dos ensaios de afinidade de ligação ao gene	
	HLA-DRB1	146
7.6	Associação entre os resultados do ELISPOT e a afinidade de	
	ligação para o gene HLA-DRB1	148

7.7	Predição teórica para os alelos HLA de classe I e II e análise das sequências conservadas entre os sorotipos implicações para proposição de epítomos de células T.....	150
8	CONCLUSÕES	156
9	PERSPECTIVAS	157
	REFERÊNCIAS	158
	APÊNDICE A – Questionário Clínico Epidemiológico.....	180
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	182
	ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ.....	184
	ANEXO B – Parecer de Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.....	185
	APÊNDICE C – Resultados da Predição Teórica para os alelos HLA..	186
	APÊNDICE D – Produções acadêmicas obtidas durante o curso de doutorado.....	263

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da dengue

É interessante observar as diversas denominações utilizadas e registradas relacionadas à doença hoje denominada dengue. No final do século XVIII, a dengue ficou conhecida como febre “quebra ossos” devido à forte dor que provocava nas articulações. Além disso, podemos citar a expressão "urucubaca" utilizada em 1816, durante um surto epidêmico em São Paulo, por acreditarem ser esta uma obra de mau olhado. No entanto, em Zanzibar, uma ilha africana, durante uma epidemia, em 1823, os nativos a denominaram "kidenga pepo", que significava pancada ou golpe por maus espíritos. Desta hipótese veio o nome "dinga" ou "denga", sendo que este último talvez tenha sido levado através do trabalho escravo ao Novo Mundo, onde foi chamado de "dandy fever" ou "the dandy" em Sanit Thomas, outra ilha caribenha, durante epidemia em 1827 (CASEIRO et al., 2003).

Dessa maneira, a expressão dengue, segundo alguns autores, é de origem hispanocaribenho (que quer dizer “melindre”, “manha”, referindo-se ao estado de moleza e prostração em que fica o indivíduo contaminado), e tem sido utilizada desde 1827 para identificar síndromes febris epidêmicas, além de ser mundialmente adotada, tanto para designar a doença como os vírus que a causam (BRASIL, 2010a; GUBLER, 1998). No entanto, é importante salientar que existem relatos de sua sintomatologia e registros da doença conhecida como “veneno d’água” na enciclopédia médica chinesa no ano de 992 a.C., devido ao pensamento em se associar insetos voadores e a água (HOLMES; TWIDDY, 2003). Outra hipótese correlacionada, é que o termo dengue tenha origem árabe, significando neste caso “fraqueza” (CASEIRO et al., 2003).

No Brasil, as primeiras referências sobre a dengue datam de 1845, com o registro de casos no Rio de Janeiro. No período de 1846-48, uma vasta epidemia foi reportada no país, ficando naquela ocasião conhecida como “polca” e “patuléia”. Entre os anos de 1851-53, o Brasil experimentou uma nova epidemia de dengue, e, em 1923, registros clínicos comprovaram a doença na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, o que ocasionou uma nova epidemia neste estado. Em 1942, a Conferência

Sanitária Pan Americana fez a primeira menção de prevenção e controle do mosquito vetor, o *Aedes aegypti*, também relacionado à transmissão do vírus da febre amarela, e que naquela ocasião, as autoridades sanitárias desenvolviam o programa de controle e combate a esta doença. Este programa obteve grande sucesso, sendo consagrado, no ano de 1958, durante uma nova Conferência Sanitária Pan Americana, na qual certificou-se a erradicação deste vetor em vários países das Américas incluindo o Brasil (HOLMES; TWIDDY, 2003; SCHNEIDER; DROLL, 2001;). Entretanto, em 1976, devido ao crescimento urbano rápido e desorganizado associado à descontinuidade de uma política de programa de combate à febre amarela, a reintrodução e o estabelecimento do vetor foram facilitadas em áreas urbanas de vários estados brasileiros (SCHNEIDER; DROLL, 2001; SIQUEIRA et al., 2005).

No entanto, os primeiros casos de dengue confirmados laboratorialmente ocorreram em Boa Vista, Roraima, em 1981-82 com o isolamento dos sorotipos 1 e 4, ficando porém, naquela ocasião, restritos a essa região (OSANAI et al., 1983). Em março de 1986, ocorreu uma grande epidemia de dengue no Brasil, com uma estimativa de mais de 2.000.000 de casos clínicos, iniciada no Rio de Janeiro e associada à entrada do sorotipo 1. Neste mesmo ano, houve o primeiro registro de uma doença semelhante à forma clínica hemorrágica e o achado de uma nova espécie do mosquito vetor, o *Aedes albopictus*, em três estados da federação. Em 1990, houve o primeiro relato do sorotipo 2 no Brasil, isolado no Rio de Janeiro, ocasionando em 1990-1991 uma grande epidemia com formas hemorrágicas neste estado. Neste mesmo período, ocorreu uma epidemia no estado de São Paulo ocasionada pelo sorotipo 1. Em 1993, no estado do Ceará, surtos epidêmicos da forma hemorrágica foram notificados (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007; PASSOS et al., 2004; SCHNEIDER; DROLL, 2001).

Outros países das Américas experimentavam várias epidemias e uma grande propagação dos mosquitos vetores ao longo da década de 1990 com vários relatos de casos graves da doença. Assim, em 1997, a Organização Pan Americana da Saúde adotou um plano hemisférico intitulado “Dengue e Febre Hemorrágica da Dengue nas Américas: um guia para prevenção e controle” que incluía dentre outros objetivos, o fomento de centros de pesquisas, a implementação do plano e promoção de colaborações entre os vários países das Américas, incluindo a vacinação contra a

febre amarela em programas nacionais de imunização (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 2000).

A existência de uma população susceptível, o alto poder virulento e a elevada densidade vetorial corroboraram para que em 2001-2002, o Brasil voltasse a experimentar uma nova epidemia de dengue, desta vez atribuída a entrada do sorotipo 3, isolado no Rio de Janeiro e disseminado em vários estados da federação. Naquela ocasião, mais de 390.000 casos com 670 da forma hemorrágica da doença foram registrados, sendo destes, 40.000 casos registrados em Recife, capital do estado de Pernambuco, com 138 apresentando a forma grave e 18 mortes confirmadas por este sorotipo (PASSOS et al., 2004; NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007).

Vários surtos epidêmicos vêm surgindo no Brasil no decorrer desta década de 2000. Um dos mais recentes, ocorreu em 2008, no estado do Rio de Janeiro, atribuído aos sorotipos 2 e 3 com mais de 250.000 casos registrados. Recentemente, em 30 de julho de 2010, o estado de Roraima confirmou a entrada do sorotipo 4 em um caso autóctone de Boa Vista, capital do estado. Até 18 de agosto de 2010, três casos foram confirmados e 9 se encontram em investigação neste município, relacionados com este sorotipo viral (BRASIL, 2010a).

1.2 Distribuição epidemiológica da doença

A dengue é uma das principais arboviroses humana, sendo considerada um grave problema de saúde pública em várias regiões do mundo, devido a sua rápida expansão epidemiológica. A doença pode ser causada por um dos quatro sorotipos distintos do vírus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, da qual estão relacionados também, os vírus da febre amarela, das encefalites Japonesa, Saint Louis e Oeste do Nilo (BURKE; MONATH, 2001; HALSTEAD, 1988; WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009). Até o presente momento, não existe ainda nenhuma vacina ou tratamento anti viral específico aprovado e em uso contra esta doença.

Nas últimas décadas, a prevalência global da dengue vem crescendo significativamente, aumentando nos últimos 50 anos em mais de 30 vezes, atingido

novos países, e, estimando-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas habitem em áreas de risco. Anualmente, ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de novos casos de dengue, dos quais cerca de 500.000 são infecções graves (GUBLER, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Regiões endêmicas da dengue compreendem mais de 100 países da África, as Américas, o Leste do Mediterrâneo, o Sudeste da Ásia e o Oeste do Pacífico, sendo estas duas últimas seriamente afetadas, atingindo cerca de 75% da carga da doença no mundo. Surtos epidêmicos têm sido relatados frequentemente em várias regiões do mundo, contribuindo com um grande impacto na vida sócio econômica e na saúde global (GUZMAN; KOURI, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

Nas Américas, entre 2001 – 2007, mais de 30 países notificaram um total de 4.332.731 casos de dengue, com 106.037 da forma grave da doença, sendo 1,2% destes casos fatais. Entre os países do Cone Sul, neste mesmo período, 98,5% dos casos registrados foram notificados pelo Brasil, com a circulação dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2008).

Em todo o planeta, os relatos de casos de dengue mostram uma variação cíclica com anos de alta epidemia e anos não epidêmicos. Frequentemente, a dengue se apresenta como amplas epidemias. Contudo, também existe um caráter sazonal nesta doença, onde os surtos epidêmicos ocorrem em diferentes períodos do ano. Esta sazonalidade é determinada pelos picos de transmissão da doença, coincidindo com o verão, em virtude da maior ocorrência de precipitação e o aumento da temperatura nesta estação, fatores que favorecem a elevação da densidade vetorial. Contudo, epidemias também podem ocorrer durante o período seco, estando estas, relacionadas ou não com a presença de alta infestação do vetor. Além da população vetorial, as características do hospedeiro e do agente etiológico podem também influenciar esta sazonalidade (GUBLER, 1998; HALSTEAD, 1997; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.2.1 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, conforme Portaria nº5/2006 do Ministério da Saúde, a dengue é uma doença que compõe a lista nacional de doenças e agravos de notificação

compulsória, devendo, pois, qualquer caso suspeito de dengue ser notificado, investigado e classificado. Desde 1999, o país dispõe do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), uma rede informatizada de acompanhamento dos casos incluídos pelos municípios, que retroalimentam os dados nacionais, constituindo-se a fonte oficial dos casos (BRASIL, 2009).

Recentemente, o Ministério da Saúde publicou um estudo sobre a série histórica dos casos da doença no país, que compreende o período de 1990 a 2009, informando o número de óbitos por dengue, o número de casos incidentes e o número de casos em relação às formas clínicas da doença por grandes regiões e unidades federadas (BRASIL, 2010b). Neste estudo, observa-se que a Região Nordeste, a segunda região mais populosa, compreendendo 28% da população brasileira total, foi responsável por 31,70% dos casos reportados de dengue no país para ano de 2009. Convém destacar, que para este mesmo ano, dos 2.251 casos da forma hemorrágica da doença no país, 696 foram nesta região (BRASIL, 2010b).

Por convenção internacional, os agravos de notificação compulsória são contabilizados em semanas epidemiológicas (SE). Estas são contadas de domingo a sábado, sendo a primeira semana do ano aquela que contém o maior número de dias de janeiro e a última a que contém o maior número de dias de dezembro. Em 2010, até a 17ª semana epidemiológica, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou 737.756 casos notificados de dengue no Brasil, sendo 56.672 casos na Região Nordeste (BRASIL, 2010b). O estado de Pernambuco, o segundo estado mais populoso desta região (com cerca de 20% do total de habitantes), registrou até a 38ª SE, um total de 47.752 notificações distribuídas em 174 municípios. Isto representa um aumento de 581,39% dos casos notificados de dengue em relação ao mesmo período de 2009, que notificou 7.008 casos, confirmando 1.471 destes (PERNAMBUCO, 2010).

1.2.2 Transmissão vetorial

O vírus da dengue é transmitido em um ciclo envolvendo humanos e mosquitos do gênero *Aedes* (A= privativo, sem; edos=prazer). Assim, a distribuição da doença está condicionada, dentre outros fatores, a propagação do seu mosquito

vetor. O *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus*, presentes em áreas tropicais e subtropicais povoadas, principalmente nas Américas, Ásia, Oceania, África e Austrália, são os principais vetores da infecção (CHEN et al., 1996). O *Ae. aegypti* é considerado o principal vetor da doença, por ser uma espécie predominantemente urbana. Sua reprodução e propagação são favorecidas pelo crescimento populacional, formação de centros urbanos com moradia e sistemas de armazenamento de água doméstica inadequados e pelo mau tratamento do esgoto e do lixo doméstico (GUZMAN; KOURI, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997;). Contudo, migração populacional favorecida, sobretudo, por viajantes internacionais, dificuldades de controle efetivo ao mosquito vetor e aspectos climáticos podem também contribuir para a propagação da doença (HSIEH; CHEN, 2009).

1.2.3 Impacto sócio-econômico na população

Frequentemente, numerosas epidemias urbanas de dengue têm sido relatadas contribuindo com um significativo impacto na saúde e na vida social e econômica de várias regiões mundiais (LUZ; GRINSZTEJN; GALVANI, 2009). O número estimado de anos de vida perdido em decorrência da doença no mundo (DALYs – *disability-adjusted life years*), muitas vezes denominada carga da doença, foi de 528 em 2001 (CATTAND et al., 2006).

No Sudeste Asiático, os dados são normalmente derivados de registros de hospitalização entre crianças. Neste caso, a carga é relativa à forma não severa. Na Tailândia, um dos países endêmicos desta região, a média anual da carga da doença entre escolares foi de 465,3 DAYLs/milhão, considerando pacientes sem hospitalização (ANDERSON et al., 2007).

Segundo Suaya et al. (2009), durante o período de 2005-2006, em um estudo incluindo o Brasil, a média de um episódio de dengue representa a perda de 14,8 dias de qualidade de vida para pacientes ambulatoriais e 18,9 dias para pacientes hospitalizados. O custo global de um caso ambulatorial não fatal é em média US\$ 514, enquanto o custo de um caso não fatal hospitalizado é cerca de US\$ 1491. Considerando o número de casos oficiais registrados no período de 2001-2005 (532.000 casos), o gasto total foi de US\$ 440 milhões. Vale salientar que é uma

estimativa otimista se considerarmos as subnotificações e os gastos com os programas de vigilância epidemiológica, de combate ao mosquito vetor e com a infra-estrutura para o correto diagnóstico.

Assim, a dengue é uma doença que impõe um custo substancial nos setores da saúde, economia e social de uma região. Se uma vacina ou um tratamento específico, seguro e eficaz estivessem disponíveis, a prevenção da carga da doença e o ganho econômico seriam substanciais para um país ou região, sobretudo, endêmica (PHUA; LEE, 2007).

1.3 Genoma viral

O DENV apresenta um genoma que consiste de um RNA, fita simples com polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb e que carece da cauda poli-A em sua região 3'-terminal. Após tradução, o RNA viral codifica uma poliproteína, que após clivagem origina três proteínas estruturais – capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As proteínas estruturais estão envolvidas na formação do capsídeo e montagem das partículas virais. As proteínas não estruturais estão implicadas na replicação eficiente do vírus (CHAMBERS et al., 1990).

Além disso, o DENV é particularmente notável devido a sua relevante antigenicidade, que ocasiona sua distinção em quatro sorotipos, os quais divergem em aproximadamente 30% ao longo da poliproteína. Essa divergência denota uma variabilidade genética, que filogeneticamente definem os subtipos (genótipos) virais dentro de cada sorotipo (HOLMES, 2007).

Estudos baseados em análises filogenéticas permitiram estimar as taxas e datas da evolução do DENV. Essas análises revelaram taxas de substituição de $\sim 10^{-3}$ substituições por sítio, por ano, similarmente ao que ocorre com outros vírus RNA (JENKINS et al, 2002; TWIDDY et al., 2003). Essas taxas têm permitido inferir sobre a origem viral, de seus sorotipos e de seus respectivos genótipos. Os genótipos diferem frequentemente em suas distribuições espaciais, alguns com grande poder de propagação (cosmopolitas), indicando que o fluxo gênico e a

subdivisão populacional são importantes na estruturação da diversidade no DENV (HOLMES, 2007). Um exemplo disto é observado no DENV-2, onde dois subtipos são aparentemente restritos ao Sudeste Asiático, outro subtipo é encontrado nas Américas e outro subtipo é encontrado em várias regiões sendo, portanto, cosmopolita (TWIDDY et al., 2002).

Além disso, as análises filogenéticas permitem ainda retratar que existem subtipos que co-circulam em uma mesma localidade, há outros que circulam em localidades particulares por um amplo período (subtipos endêmicos), outros ainda que parecem se propagar rapidamente através de múltiplas populações (subtipos epidêmicos) e subtipos que atuam como “fonte” populacional (KLUNGTHONG et al., 2004). Entretanto, essas diferenças genéticas são importantes, sobretudo, quando os genótipos estão associados com os diferentes graus de virulência da cepa (LEITMEYER et al., 1999), sugerindo que estas possuam habilidades de infecção em diferentes tipos celulares ou na severidade da doença (DIAMOND et al., 2000; VAUGHN et al., 2000).

Estruturalmente, em sobrenadantes de células infectadas, o DENV é encontrado como uma partícula madura ou imatura, com cerca de 50 nm e 60 nm de diâmetro, respectivamente. Ambas as partículas consistem de uma glicoproteína externa e uma bicamada lipídica interna derivada do hospedeiro. Dentro desta bicamada está um core RNA-proteína consistindo de um genoma RNA e as proteínas do capsídeo. A glicoproteína consiste de 180 cópias de uma proteína de membrana e uma do envelope. Essas duas proteínas apresentam diferentes conformações nas partículas virais imaturas ou maduras, o que lhes conferem características únicas em ambas as partículas. No *virion* imaturo, as proteínas prM e E formam 90 heterodímeros que se estendem como 60 trímeros pontiagudos (*spikes*) na superfície da partícula. No *virion* maduro, a proteína E é encontrada como 90 homodímeros que repousam contra a superfície viral formando uma proteína homogênea (Figura 1). O peptídeo ‘pr’ é clivado da prM durante a maturação e a proteína M permanece na partícula madura como uma proteína transmembrana sob a proteína E (MODIS et al., 2003; 2004; ZHANG et al., 2004).

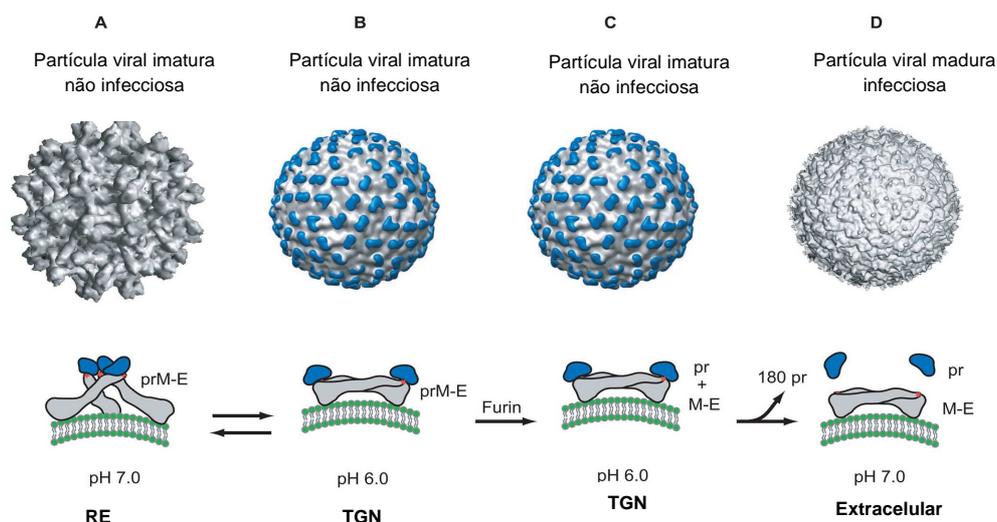


Figura 1. Estrutura da partícula dengue e conformações da proteína E.
Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2004).

Essas alterações morfológicas entre as partículas virais imatura e madura ocorrem durante o transporte através da rede Trans-Golgi (TGN) e são dirigidas predominantemente pelas mudanças conformacionais na proteína E. Essas mudanças são desencadeadas pelo baixo pH (5,8 – 6,0) e ocorrem antes da clivagem maturativa da prM por uma furina protease codificada pelo hospedeiro. Após clivagem, o peptídeo 'pr' permanece associado com a proteína E até a liberação da partícula madura em pH neutro no meio extracelular (LI et al., 2008; YU et al., 2008).

A proteína E fornece o primeiro ponto de contato entre a partícula viral e a célula hospedeira. Isso ocorre através de diferentes moléculas de carboidratos e proteínas, que atuam como fatores de adesão que facilitam a infecção viral. Alguns fatores celulares têm sido identificados como moléculas importantes para entrada do vírus dengue na célula hospedeira. Entre esses fatores de adesão temos: GRP78/BiP (JINDADAMRONGWECH; THEPPARIT; SMITH, 2004), proteína de choque térmico 70 (HSP70), HSP90, heparansulfato (REYES-DEL VALLE et al., 2005), proteínas ligantes de lipopolissacarídeo/grupamento de diferenciação 14 (LPS/CD14) (MILLER et al., 2008) e a proteína ligante específico da molécula-3 de adesão intercelular (ICAM-3), expressa em células dendríticas, denominada DC-SIGN ou CD209 (TASSANEETRITHEP et al., 2003). É possível que essas moléculas possam funcionar como receptores celulares específicos para o vírus. Contudo, se

faz necessário demonstrar que esses fatores promovam endocitose mediada por clatrina da partícula viral, para serem denominados receptores específicos para DENV (PERERA; KUHN, 2008).

1.3.1 Proteínas não estruturais e a replicação viral

As proteínas não estruturais do DENV apresentam diferentes funções enzimáticas importantes para a replicação da partícula viral no interior da célula hospedeira. A adesão da partícula viral à célula promove a fusão da bicamada lipídica viral com a membrana celular e a liberação do RNA viral no citoplasma hospedeiro. O genoma viral serve como um RNAm, o qual pode ser traduzido pela maquinaria celular, como uma única cadeia aberta de leitura, em uma poliproteína, a qual é direcionada para o retículo endoplasmático (RE). Sequências sinalizadoras dentro da poliproteína translocam a proteína NS1 e os ectodomínios da prM e E para dentro do lúmen do RE. As proteínas NS2A/B e NS4A/B permanecem predominantemente como proteínas transmembrana, enquanto as proteínas C, NS3 e NS5 localizam-se na porção citoplasmática. (Figura 2). Eventos de clivagem por proteases celulares e virais estão envolvidos no processamento desta poliproteína, que antecede a replicação do genoma viral (KUHN et al., 2002; PERERA; KUHN, 2008).

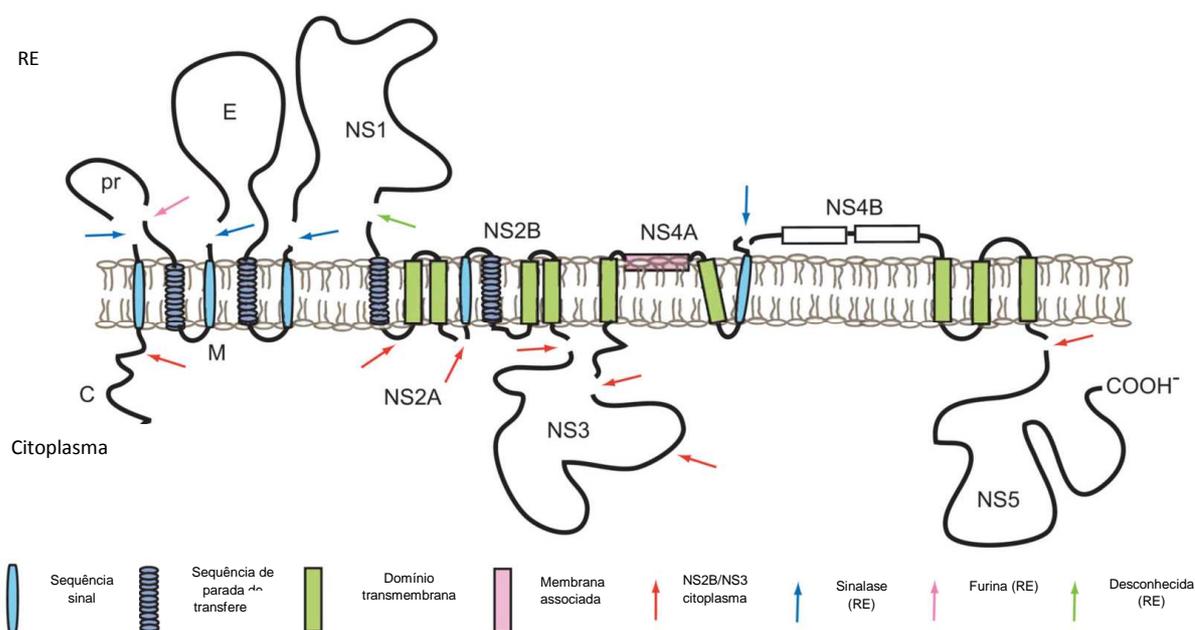


Figura 2. Diagrama esquemático da poliproteína do vírus dengue.

Fonte: Adaptado de Perera e Kuhn (2008)

Legenda: pr – pré-membrana; M – membrana; E – envoltório; NS – não-estrutural

A proteína NS1 é uma glicoproteína de 46-50 kDa, encontrada na forma expressa na membrana celular (mNS1) das células infectadas ou secretada no meio extracelular (sNS1), apresentando determinantes tipo-específico (FALCONAR; YOUNG, 1990; HENCHAL; HENCHAL; THAISOMBOONSUK, 1997). Inicialmente, a NS1 é translocada para o lúmen do RE, onde rapidamente forma dímeros, via sequência sinalizadora hidrofóbica codificada pela região C-terminal da proteína E (WINKLER et al., 1989).

Embora sua função não esteja completamente elucidada, Lindenbach e Rice (1997) mostraram que a proteína NS1 interage com a NS4A e parece estar implicada na síntese precoce do RNA de dupla fita (dsRNA), uma forma intermediária do genoma viral, durante a replicação. Além disso, recentes estudos têm demonstrado um papel imunomodulador da NS1 ao se ligar ao fator H da via alternativa do sistema complemento, impossibilitando sua atuação no impedimento da formação da C3 convertase nas células hospedeiras (CHUNG et al., 2006b).

Em acréscimo, a forma intermediária dsRNA viral pode se ligar a receptores semelhantes à Toll 3 (TLR-3) e ativar uma cascata de mediadores envolvidos com a resposta imune inata anti-viral dependente de IFNs tipo I e citocinas pró-inflamatórias. Neste aspecto, Wilson et al. (2008) demonstraram que a NS1 apresenta um papel inibitório na produção da interleucina 6 (IL-6) via ativação TLR3 estudando um outro *Flavivirus* denominado vírus do Oeste do Nilo (WNV). Além disso, uma forma associada da NS1 com a região 5´terminal da NS2A parece estar envolvida com o mecanismo de invasão nervosa observada na Encefalite Japonesa e com o WNV (FIRTH; ATKINS, 2009; MELIAN et al., 2010).

Em sua forma solúvel, a NS1 pode se acumular no meio extracelular e formar hexâmeros. Primariamente, a sNS1 foi caracterizada como um antígeno de fixação do complemento presente no soro e tecidos de animais infectados (BRANDT et al., 1970) e induzindo uma forte resposta imune humoral (FALGOUT et al., 1990). A presença de anticorpos no soro anti-NS1 também tem sido associada com a severidade da doença dengue (SHU et al., 2000). Nesse sentido, estudos relacionados com uma autoimunidade transitória durante a evolução da dengue, têm demonstrado que anticorpos anti-NS1 podem reagir cruzadamente contra células hepáticas, plaquetas e células endoteliais. (CHANG et al., 2002; LIN et al., 2003; OISHI et al., 2003; SUN et al., 2007). Recentemente, a sNS1 tem se apresentado como uma valiosa ferramenta diagnóstica, sendo considerado um antígeno de detecção precoce, presente no soro dos pacientes infectados pelo DENV logo no primeiro dia dos sintomas clínicos (XU et al., 2006).

A proteína NS3 tem cerca de 70 kDa, constituída por 618 aminoácidos, e apresenta três diferentes funções enzimáticas relevantes na replicação viral. A função de serina-protease, realizada pelo domínio *NS3 pro*, contém 180 aminoácidos na porção N-terminal, e em associação com o seu co-fator NS2B, prover o processamento da poliproteína. A porção hidrofílica da proteína NS2B, contendo os resíduos 49-95, é requerida para forma ativa da NS3. Na ausência deste co-fator, a NS3 tende a formar agregados que a tornam inativa na sua função de protease (ASSENBERG et al., 2009). A NS3 apresenta ainda uma atividade de helicase/NTPase, envolvida no desenrolar da forma intermediária dsRNA (XU et al., 2006).

Recentemente, Chernov et al. (2008), em um estudo envolvendo a NS3 do WNV, demonstraram que esta proteína poderia promover o desenrolar tanto do

dsRNA quanto do DNA. Entretanto, quando associado ao co-fator NS2B, apenas o dsRNA é utilizado como substrato em sua função de helicase/protease. Experimentos realizados com o vírus da febre amarela sugerem que a NS3 participa da montagem da partícula viral (PATKAR; KUHN, 2008). Uma terceira funcionalidade atribuída a NS3 é a de RNA trifosfatase, necessária para estimular a função RNA guaniltransferase da proteína NS5, que conjuntamente contribuem para formação da estrutura do *cap* metilado de um RNA nascente (ISSUR et al., 2009).

A proteína NS5 é a maior e mais conservada entre os *Flavivirus* consistindo de 900 resíduos de aminoácidos, com 104 kDa. Seu domínio N-terminal, resíduos 1-296, apresenta atividade metiltransferase (MTase), enquanto a porção C-terminal, 320-900 resíduos, é uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp). Sua atividade MTase catalisa a adição de uma guanina N-7 e um radical metil no 2' da ribose, denominado de revestimento ou *cap*: 7-metilguanossina. Este revestimento é adicionado à extremidade 5' do RNAm e parece desenvolver uma ação protetora contra a ação de degradação por nucleases (DAVIDSON et al. 2009).

O domínio polimerase da NS5 (NS5 pol) uma vez sintetizado e liberado da poliproteína precursora, inicia a transcrição do RNA viral, formando uma fita de RNA negativa (3' - 5') complementar ao genoma positivo do DENV. Posteriormente, esta fita é novamente utilizada para transcrever a fita positiva do RNA (5' - 3'). Um dsRNA intermediário é então formado durante este processo, devendo ser separado em suas fitas simples com a finalidade de serem acessadas pela NS5 pol. A replicação viral ocorre no RE e em vesículas intracelulares derivadas do Complexo de Golgi (CG) onde o dsRNA é concentrado. A montagem da partícula viral ocorre na superfície do RE onde as proteínas estruturais e o RNA recém sintetizado reúnem-se, são empacotados e direcionados ao CG para maturação da partícula. Posteriormente, a partícula madura é liberada para o meio extracelular por meio de vesículas exocíticas (PASTORINO et al., 2010).

As proteínas NS2A (22 kDa), NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa) parecem estar implicadas no complexo protéico envolvido na replicação do DENV, atuando como proteínas integrantes de membrana, que parecem induzir alterações importantes na membrana do RE que contribuem para replicação viral. Contudo, suas funções particulares ainda não foram bem elucidadas (PERERA; KUHN, 2008).

1.4 Fatores do hospedeiro

A maioria das infecções pelo DENV apresenta-se assintomática ou causa uma doença febril auto-limitada. Contudo, algumas infecções desenvolvem-se com grande severidade e podem ser fatais se não tratadas prontamente e eficientemente. Fatores do hospedeiro como idade, *status* nutricional, polimorfismos genéticos e prévia imunidade celular parecem contribuir para o desfecho das infecções pelo DENV (STEPHENS, 2010).

Entre os polimorfismos genéticos, podemos encontrar diferenças na severidade da doença em nível individual ou populacional. Aparentemente, na população haitiana, onde há registros de grande hiperendemicidade na transmissão dos diferentes sorotipos do DENV, não há relatos de doença severa (HALSTEAD et al., 2001). Outro aspecto, é que indivíduos de etnia negra são menos freqüentes no desenvolvimento de manifestações severas da doença que indivíduos de etnia branca (KOURI et al., 1998).

Entre os principais fatores do hospedeiro associados com a severidade da infecção pelo DENV merecem destaque os polimorfismos do CD209 (SAKUNTABHAI et al., 2005), TNF- α 308A (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004), do receptor da vitamina D e do receptor da Fc γ (LOKE et al., 2002), CTLA-4 e TGF- β (CHEN et al., 2009). A deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase - G6PD- (CHAO et al., 2008) e do gene da lectina ligadora de manose – MBL2 – (ACIOLI-SANTOS et al., 2008), das proteínas transportadoras associadas ao antígeno – TAP - e de antígenos de plaquetas humanas – HPA (SOUNDRAVALLY; HOTI., 2007).

1.4.1 Antígenos Leucocitários Humanos - HLA

Outras variantes genéticas que podem contribuir para o fenótipo protetor ou de maior susceptibilidade às formas severas da dengue encontram-se compreendidas dentro do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), localizado no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, englobando mais de

4 Mb de DNA, com mais de 220 genes. O *locus* foi identificado e nomeado pelo seu papel na rejeição de tecidos nos transplantes alogênicos e pelo seu envolvimento nas respostas imunológicas. Primariamente identificado nos glóbulos brancos sanguíneos, em humanos o MHC é também denominado antígeno leucocitário humano (HLA). Esses genes são classificados em três regiões principais: classe I, II e III. Os genes de classe III codificam proteínas de diversas funções, destacando-se entre essas os fatores do sistema complemento (C2, C4 e Fator B) e citocinas como o fator de necrose tumoral. (RHODES; TROWSDALE, 1999).

Os genes HLA de classe I e II participam na indução da resposta imune adaptativa por apresentar peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, desencadeando sinalização intracelular e ativando funções efetoras das células T (EREN; TRAVERS, 2000). Essas funções particulares determinam como a infecção pode ser eliminada e a resposta imune ineficiente ou inapropriada pode resultar em imunodeficiência, imunopatologia ou autoimunidade (STONE et al., 2005).

Devido ao intenso polimorfismo genético e as diferentes técnicas utilizadas em sua identificação, uma nomenclatura internacional para esses alelos foi recentemente padronizada pelo Comitê de Nomenclatura dos Fatores do Sistema HLA da Organização Mundial de Saúde em abril de 2010. Desta forma, cada alelo HLA possui um código único, que pode conter até quatro grupos numéricos separados por colunas, podendo conter uma letra adicional que indica o *status* de expressão (Figura 3). Assim temos: “N” – alelos nulos; “L” – baixa expressão na superfície; “S” – alelo que codifica uma proteína secretada; “C” – indica alelo de expressão citoplasmática; “A” – alelo de expressão aberrante; “Q” – expressão questionável (quando uma mutação parece afetar os níveis de expressão protéica). O separador “*” indica que a tipagem foi por métodos moleculares; quando este está ausente, a identificação foi realizada por técnicas sorológicas (INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS/HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN, 2010). No entanto, convém mencionar que as tipagens atuais têm sido expressas ainda com dois dígitos (por ex: HLA-A*02, quando a técnica é de baixa resolução) e quatro dígitos (por ex: HLA-A*0201, quando o método é de alta resolução), uma vez que, os laboratórios possuem dois anos para se adequarem a nova nomenclatura.

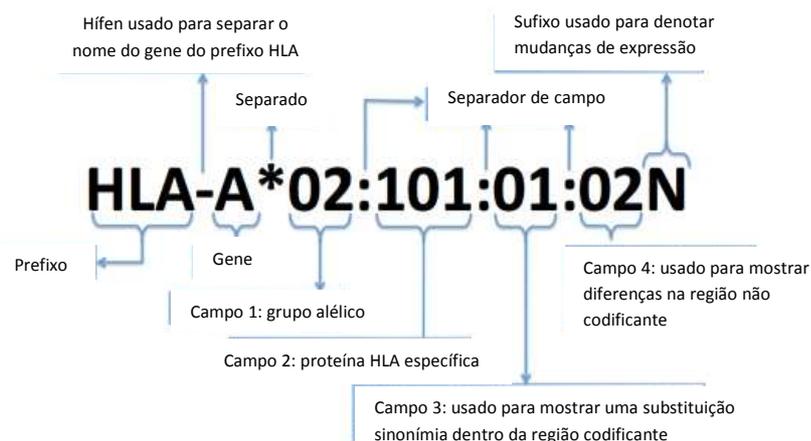


Figura 3. Representação esquemática da nova nomenclatura para os alelos HLA.
 Fonte: International Immunogenetics/Human Leucocyte Antigen (2010)

A região HLA de classe I situa-se telomericamente em relação às classes II e III e ocupa um segmento de 1600 kb. Os genes de classe I codificam para as moléculas clássicas HLA-A, HLA-B, HLA-C e para as moléculas não clássicas HLA-E, HLA-F, HLA-G, dentre outras. Estruturalmente, as moléculas HLA de classe I consistem em complexos trimoleculares constituídos por uma cadeia pesada – alfa (α) -, uma cadeia leve – beta2 -microglobulina ($\beta 2m$) - e o peptídeo antigênico apresentado. A cadeia alfa possui cinco domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, domínio transmembranar e domínio intracitoplasmático (Figura 4). A cadeia $\beta 2m$ é codificada por um gene localizado no cromossomo 15, e, portanto, não faz parte do complexo gênico MHC. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam a fenda de ligação aos peptídeos antigênicos, que em geral, possuem entre oito a onze aminoácidos. O domínio $\alpha 3$ é invariável e constitui o local de interação com a molécula $CD8^+$ da célula T. As moléculas HLA de classe I são expressas em todas as células nucleadas, com um padrão de expressão dependente do tecido (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2007; KLEIN; SATO, 2000).

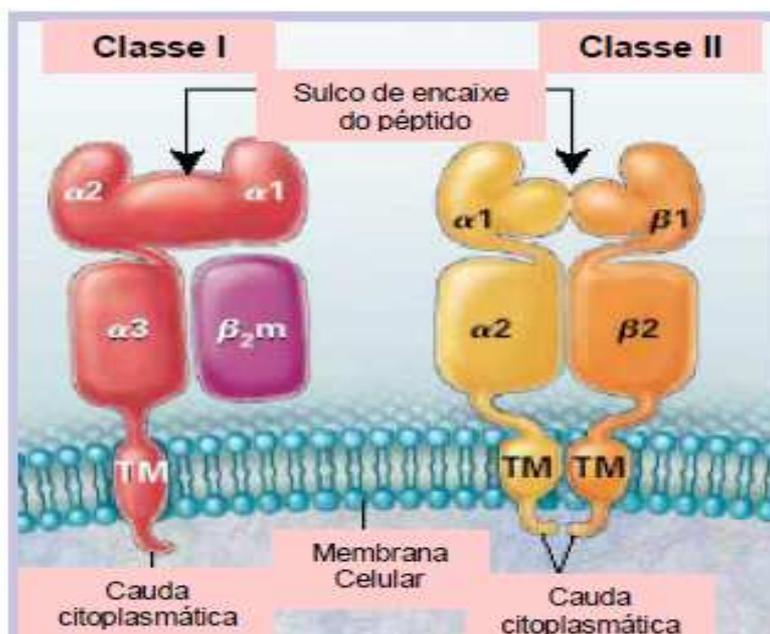


Figura 4. Representação esquemática das estruturas das moléculas HLA.
Fonte: Adaptado de Klein e Sato (2000).

A região HLA de classe II é mais centromérica e compreende cerca de 900 kb. É dividida em três subregiões: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, sendo os respectivos alelos constituídos por cadeias α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), cadeias β ($\beta 1$ e $\beta 2$), região transmembranar e cauda citoplasmática (Figura 4). Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ formam o sulco de ligação ao peptídeo, que em geral contém entre dez e trinta aminoácidos. O domínio $\beta 2$, não polimórfico, interage com o marcador $CD4^+$ na superfície do linfócito T. As moléculas HLA de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos, as quais compreendem os linfócitos B, as células dendríticas, os monócitos/macrófagos e as células epiteliais tímicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2007).

Nas moléculas HLA, o sulco ou fenda de ligação ao peptídeo está estruturado em várias subcavidades denominadas *pockets*; estes variam na sua constituição aminoacídica, o que lhes confere especificidade na ligação a diferentes peptídeos. As cadeias laterais dos antígenos protéicos interagem nesses *pockets* ancorando o peptídeo na fenda da molécula HLA. Esses aminoácidos que interagem com a fenda são denominados de resíduos de ancoragem (Figura 5). A fenda das moléculas HLA de classe I são mais fechadas e delimitadas e os *pockets* A e F correspondem as

subcavidades de ligação dos aminoácidos terminais do peptídeo (KLEIN; SATO, 2000).

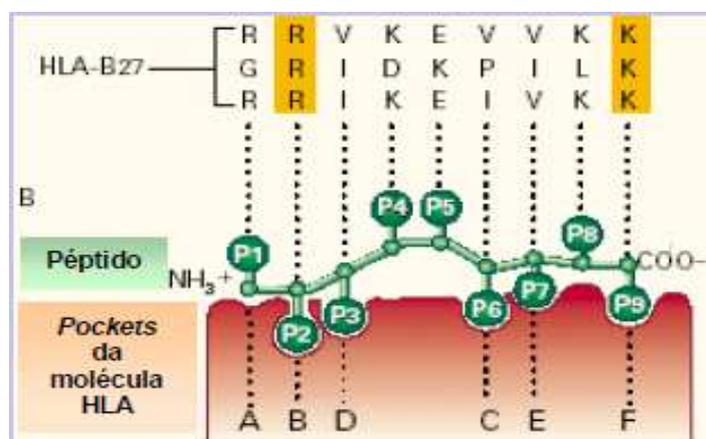


Figura 5. Interação entre os *pockets* de uma molécula HLA e os resíduos peptídicos. Os resíduos âncoras (R=Arginina; K=Lisina) estão destacados em amarelo. Fonte: Adaptado de Klein e Sato (2000)

No entanto, a fenda das moléculas HLA de classe II é mais aberta pelo fato de ser constituída por duas cadeias. Isto implica em uma maior flexibilidade para o tamanho do peptídeo, além do fato dos resíduos terminais do peptídeo não estarem interagindo com a fenda (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2007). Os peptídeos são estruturas bioquímicas pequenas, constituídos por resíduos aminoacídicos. Assim, é comum a denominação oligômero para representar uma estrutura pequena como um peptídeo e o sufixo *mer* após um valor numérico para indicar uma unidade de repetição, que neste caso trata-se do número de aminoácidos na molécula (KANGUEANE; SAKHARKAR, 2007).

As moléculas MHC humanas são extremamente polimórficas. Contudo, estudos baseados em características físico-químicas dos seus peptídeos ligantes podem favorecer o agrupamento dessas moléculas. Assim, embora as cadeias laterais carregadas positivamente ou negativamente possam influenciar na capacidade de ligação do peptídeo com a molécula HLA, tipicamente, as moléculas HLA de classe I possuem como energia principal de ligação, a interação do resíduo na posição 2 (P2) e o resíduo C-terminal (C-t) do peptídeo com os *pockets* B e F da molécula MHC, respectivamente. A especificidade química das cadeias laterais do

peptídeo com sítios específicos na molécula HLA é denominada motivo ligante (FALK et al., 1991; RAMMENSEE, 1995; SIDNEY et al., 2008). Desta forma, essas moléculas HLA de classe I podem ser agrupadas em supertipos, os quais representam grupos de moléculas MHC que compartilham especificidade de ligação entre uma ampla quantidade de peptídeos. Cada supertipo pode ser descrito por um supermotivo que reflete amplamente um motivo âncora principal reconhecido por moléculas MHC dentro do supertipo correspondente (SETTE; SIDNEY, 1999). O quadro 1 apresenta a funcionalidade físico-química das cadeias laterais dos peptídeos.

Especificidade do <i>pocket</i>	Resíduos de aminoácidos associado
Ácido	DE
Alifático	LIVMQ
Aromático	FWY
Aromático e Alifático	FWYLIVMQ
Aromático e Básico	YRK
Aromático e hidrofóbico com cadeia longa	FWYLIM
Básico	RHK
Hidrofóbico	LIVMFWYA
Hidrofóbico com cadeia longa	FLIM
Prolina	P
Cadeia lateral curta	AST
Cadeia lateral curta e alifático	ATSVLIMQ
Hidrofóbico com cadeia lateral curta	AV
Cadeia curta, alifático e aromático	ASTVLIMQFWY

Quadro 1. Funcionalidade físico-química das cadeias laterais dos peptídeos

Fonte: Adaptado de Sidney et al. (2008)

Nota: D=aspartato; E=glutamato; R=arginina; K=lisina; H=histidina; Q=glutamina; N=asparagina; T=treonina; S=serina; W=triptofano; Y=tirosina; F=fenilalanina; C=cisteína; P=prolina; M=metionina; I=isoleucina; L=leucina; V=valina; A=alanina; G=glicina.

Com base nessas observações, Sette e Sidney (1998; 1999) classificaram as moléculas HLA de classe I em nove supertipos: A01, A02, A03, A24, B07, B27, B44, B58 e B62. Recentemente, Sidney et al. (2008) realizaram uma atualização do grupo de moléculas HLA por supertipos e reconheceram alguns alelos que possuíam suas especificidades em ambos os supertipos A01 e A03, outros alelos em ambos os supertipos A01 e A24 e alelos que compartilhavam sequências e similaridades

sorológicas antigênicas, os quais foram primariamente chamados B08. No entanto, este último demonstra muitas similaridades com o grupo B07 e ainda há dúvidas se este constitui um novo supertipo. O quadro 2 reúne as principais características destes supertipos com base na especificidade química dos aminoácidos ligantes nos *pockets* B e F das moléculas HLA.

Supertipos	Especificidade para o aminoácido ligante do <i>pocket</i> B	Especificidade para o aminoácido ligante do <i>pocket</i> F
A01	Hidrofóbico com cadeia lateral curta e alifático	Aromático e com cadeia hidrofóbica grande
A01 A03	Hidrofóbico com cadeia lateral curta e alifático	Aromático e Básico
A01 A24	Hidrofóbico com cadeia lateral curta, alifático e aromático	Aromático e Hidrofóbico com cadeia lateral longa
A02	Hidrofóbico com cadeia lateral curta e alifático	Alifático e Hidrofóbico com cadeia lateral curta
A03	Hidrofóbico com cadeia lateral curta e alifático	Básico
A24	Aromático e alifático	Aromático, alifático e hidrofóbico
B07	Prolina	Aromático, alifático e hidrofóbico
B08	Não definido	Aromático, alifático e hidrofóbico
B27	Básico	Aromático, alifático, básico e hidrofóbico
B44	Ácido	Aromático, alifático e hidrofóbico
B58	Cadeia lateral curta	Aromático, alifático e hidrofóbico
B62	Alifático	Aromático, alifático e hidrofóbico

Quadro 2. Descrição das especificidades dos supertipos HLA de classe I (A e B)
Fonte: Adaptado de Sidney et al. (2008)

Estudos de associação entre os alelos HLA e os tipos de infecções da dengue vêm sendo correlacionados com a gravidade da doença e o sorotipo de infectividade viral visando a caracterização dos alelos mais freqüentemente encontrados em populações infectadas e determinando o grau de resistência ou suscetibilidade à infecção (LA FLEUR et al., 2002; LAN et al., 2008; LOKE et al., 2002; POLIZEL et al., 2004; SIERRA et al., 2007; STEPHENS et al., 2002; STEPHENS, 2010; VEJBAEYSA et al., 2009; ZIVNA et al., 2002).

1.5 Aspectos clínicos e laboratoriais da dengue

1.5.1 Diagnóstico clínico

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do dengue pode provocar uma variedade de síndromes clínicas variando desde uma infecção indiferenciada a uma doença aguda febril auto limitada (dengue clássica - DC), ou ainda, uma doença grave com aumento de permeabilidade capilar (febre hemorrágica da dengue - FHD) e choque (síndrome do choque da dengue - SCD). Esta classificação é baseada nos critérios da Organização Mundial da Saúde de 1999 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999).

Nesta classificação, a DC inicia abruptamente após 3 a 15 dias de incubação, e é caracterizada por febre alta com dois ou mais dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retro-orbital, mialgia e artralgia. Podem estar presentes exantema maculopapular com ou sem prurido, náusea, vômitos, anorexia, fenômenos hemorrágicos e sinais de prostração, fadiga e depressão. Laboratorialmente podem ocorrer leucopenia e trombocitopenia sem evidências de extravasamento de plasma (ENDY et al., 2002; GUZMAN; KOURI, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999; RIGAU-PEREZ et al., 2002; TSAI et al., 1991).

Ainda segundo esta classificação, as formas clínicas severas da infecção compreendem a FHD e a SCD. As características principais dessas formas compreendem febre, episódios hemorrágicos (com pelo menos um dos seguintes critérios: teste do torniquete positivo; petéquias, equimoses ou púrpura; sangramentos de mucosa, no trato gastrointestinal, em sítios de injeções), extravasamento de plasma (devido ao aumento da permeabilidade vascular) e trombocitopenia ($\leq 100.000 \text{ mm}^3$). As diáteses hemorrágicas ocasionam hemoconcentração (hematócrito $\geq 20\%$ do valor referencial), hipotensão arterial, hipóxia tissular, acidose láctica, insuficiência circulatória, cianose periférica e choque hipovolêmico (DEUBEL et al., 1997; GUZMAN; KOURI, 2002; MONATH, 1994). Frequentemente ocorre hipoproteinemia com diminuição das proteínas do sistema complemento (principalmente C3) e aumento das transaminases hepáticas. Em geral, a FHD apresenta uma taxa de mortalidade entre 1 a 10% dos casos,

requerendo hospitalização com um cuidadoso controle hemodinâmico (GUZMAN; KOURI, 2002).

A FHD é subclassificada em quatro graus dependendo da gravidade da sintomatologia apresentada. No Grau I, têm-se os sintomas apresentados pela forma clássica acrescido do teste do torniquete positivo. Trombocitopenia $\leq 100.000/\text{mm}^3$ e hematócrito $\geq 20\%$ do valor referencial são achados laboratoriais presentes. O grau II apresenta todos os achados do grau I mais episódios de sangramento espontâneos. No grau III, falhas no sistema circulatório com pulso fraco, hipotensão e agitação estão presentes. O grau IV é marcado por profundo choque com pulsação e pressão arterial quase que indetectáveis. A síndrome do choque da dengue compreende os graus III e IV da FHD (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999).

Contudo, mudanças na epidemiologia da dengue somadas a dificuldade em se aplicar na prática clínica os critérios de classificação da OMS, aliado ao fato da existência de casos de dengue severa, os quais não preenchem completamente os critérios pressupostos da FHD, levaram a uma reconsideração na classificação dos casos de dengue (BANDYOPADHYAY; LUM; KROEGER, 2006; DEEN et al., 2006; RIGAU-PEREZ, 2006). Assim, recentemente, a OMS publicou uma nova diretriz para o gerenciamento e manejo clínico da dengue sugerindo um novo sistema de classificação para a doença. Neste sistema, os casos de dengue são classificados em dengue não-complicada (ou não grave) e dengue grave. No entanto, o grupo de dengue não grave pode ser separado em pacientes com sinais de alerta e pacientes sem sinais de alerta (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

São considerados sinais de alerta: dor ou sensibilidade abdominal, vômito persistente, acumulação clínica de líquido, sangramento de mucosa, letargia, agitação, aumento do fígado > 2 cm, aumento do hematócrito com simultânea e rápida diminuição de plaquetas. Estes sinais demandam uma estrita observação e intervenção médica. Contudo, convém mencionar que, pacientes sem sinais de alerta podem desenvolver a forma grave da dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

De acordo com o novo sistema de classificação da OMS, são casos suspeitos de dengue: residir ou viajar para área endêmica de dengue; apresentar febre com dois dos seguintes critérios: náusea, vômito, exantema, dores agudas e contínuas, teste do torniquete positivo, leucopenia ou qualquer sinal de alerta. A confirmação

laboratorial é de fundamental relevância, sobretudo, quando nenhum sinal de extravasamento de plasma é visualizado..

Assim, esta nova classificação demanda um rigoroso controle clínico. Para isso, diante do início abrupto da febre, considerado classicamente como o primeiro dia de doença, três fases clínicas podem ser observadas: febril, crítica e de recuperação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

A fase febril desenvolve-se com uma febre alta (40°C) de início insidioso, que pode durar entre 2-7 dias, frequentemente acompanhada de rubor facial, eritema, dores em todo o corpo, mialgia, artralgia e cefaléia. São comuns a presença de vômito, náusea e anorexia. Alguns pacientes desenvolvem conjuntivite, dor de garganta, faringite. Pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias e sangramento nasal e gengival podem acontecer. Aumento do fígado, sangramento gastrointestinal e hemorragia vaginal (em mulheres férteis) têm sido relatados. Laboratorialmente, podem ser observada uma leucopenia progressiva (NIMMANNITYA, 1987; RIGAU-PEREZ et al., 1998).

A fase crítica é marcada pela defervescência, ou seja, queda da temperatura para 37,5 – 38 °C ou menor, permanecendo abaixo deste nível entre 3-7 dias da doença. Pode ocorrer aumento da permeabilidade capilar com elevação do hematócrito (Ht), sendo as últimas 24-48 horas de extrema relevância clínica para o grau de extravasamento de plasma ocorrido. A leucopenia aparece acompanhada de trombocitopenia que usualmente precede o extravasamento de plasma. Alguns pacientes evoluem sem este aumento de permeabilidade capilar. Contudo, efusão pleural e ascite podem ser detectados dependendo do grau do extravasamento de plasma e da terapia de fluidos administrada. Isto pode ocasionar uma angústia respiratória e insuficiência cardíaca congestiva. Esses sinais podem ser elucidados diante de exames de raio x de tórax, ultrassonografia abdominal e avaliação cardíaca (NIMMANNITYA, 1987; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Alguns pacientes melhoram após o período de defervescência sendo classificados em dengue não grave. Outros pacientes apresentam esta fase crítica com extravasamento de plasma sem defervescência, e há ainda aqueles que manifestam os sinais de alerta e evoluem para dengue grave. Após 24-48 horas na fase crítica, o paciente entra na fase de recuperação nas 48-72 horas seguintes. Observam-se neste período a diminuição dos sintomas gastrointestinais, recuperação do apetite, estabilização hemodinâmica com bem estar geral, presença

do exantema com ou sem prurido, mudanças no eletrocardiograma e bradicardia, normalização do hematócrito e no total de leucócitos (NIMMANNITYA, 1987; SRICHAIKUL; NIMMANNITYA, 2000).

Quando há um severo extravasamento de plasma, o choque pode ocorrer. Este achado é precedido pelos sinais de alerta e a temperatura do corpo pode estar subnormal. Este extravasamento severo induz ao choque e acúmulo de fluido com angústia respiratória; à hipoperfusão, que ocasiona acidose metabólica e o comprometimento de órgãos, como o sistema nervoso central (alteração de consciência, encefalite), o fígado (hepatite com elevação das transaminases ≥ 1000 mg/dl), o coração (miocardite), dentre outros; e à severa hemorragia ocasionada pela coagulação intravascular disseminada. A pressão arterial diastólica aumenta em direção a pressão sistólica e a diferença da pressão de pulsação diminui (≤ 20 mm Hg) como o aumento de resistência vascular periférica. Segue-se com uma descompensação de pressão, que no choque prolongado causa intensa hipotensão e hipóxia que podem ocasionar falência múltipla em vários órgãos e a grande hemorragia. Neste período pode haver elevação dos leucócitos em vez de leucopenia. Este quadro caracteriza a dengue grave (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; SRIKIATKHACHORN et al., 2007).

Este novo modelo de classificação tem sido sugerido por um grupo de especialistas com base em estudos multicêntricos de pesquisas em doenças tropicais (TDR, *tropical disease research*), proposto em Gênova, Suíça, 2008, e está atualmente sendo testado em 18 países, comparando-se seu desempenho na prática clínica. Contudo, convém mencionar que, atualmente, a classificação DC, FHD e SCD continua sendo amplamente utilizada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

1.5.2 Diagnóstico laboratorial

A redução da taxa de mortalidade por dengue requer um bom gerenciamento e o correto manejo clínico dos pacientes, sobretudo, acometidos pela forma grave da doença. O reconhecimento e a confirmação dos casos suspeitos se fazem necessários para o monitoramento clínico ideal, o diagnóstico diferencial entre

outras doenças febris e exantemáticas, pesquisas científicas, desenvolvimento de vacinas e drogas anti-virais específicas, vigilância epidemiológica e vetorial, controle de epidemias e da patogênese da doença (WHITEHORN; FARRAR, 2010). Assim, a acurácia e a eficiência no diagnóstico diferencial da dengue são fundamentais para condução dos casos suspeitos.

Neste aspecto, o diagnóstico laboratorial específico para confirmação da doença, pode ser feito por técnicas sorológicas para pesquisa de antígenos ou anticorpos contra o vírus, pela detecção do ácido nucléico viral ou pela detecção das partículas virais em amostras clínicas. Entretanto, a acurácia dessas metodologias é influenciada pelo período ou estágio da doença em que se encontra o paciente (o tempo de coleta da amostra), pela infraestrutura laboratorial, pela equipe técnica envolvida e pela disponibilidade de recursos financeiros (DE SOUZA et al., 2007).

Nos estágios precoces da doença, o isolamento viral, a detecção de seu ácido nucléico ou de seus antígenos podem ser utilizados como diagnóstico da infecção pelo DENV. Já ao final da fase aguda, a sorologia para detecção de anticorpos é utilizada como método de escolha.

As partículas virais podem ser detectadas em amostras clínicas como soro, plasma, células mononucleares do sangue periférico e outros tecidos em uma autópsia (como fígado, timo, pulmão, linfonodos, medula óssea) por até o 4^o-5^o dia de doença (período de viremia). Devido a termosensibilidade dos vírus, as amostras devem ser mantidas sob refrigeração (processamento em até 24h) ou congeladas -70°C ou em nitrogênio líquido (por longos períodos) antes de sua utilização (SHU; HUANG, 2004).

No isolamento viral, as amostras são inoculadas em cultura de células C6/36 (linhagem do *Ae. albopictus*) ou células AP61 (linhagem de *Ae. pseudoscutellaris*) que não sofrem efeito citopático viral. Assim, o antígeno viral é detectado por uma imunofluorescência direta (IFD) utilizando um anticorpo anti-*Flavivirus*, seguida por uma imunofluorescência indireta sorotipo-específica, quando há positividade na IFD. Contudo, o diagnóstico final é emitido entre 1-2 semanas e dependente do dia da coleta, do processamento da amostra, da infraestrutura laboratorial para cultura celular e microscopia de fluorescência, além de uma equipe técnica especializada (DE SOUZA et al., 2007; IGARASHI et al., 1978).

No período de viremia também pode ser feita a pesquisa do ácido nucléico viral através da técnica de reação em cadeia da polimerase pela transcriptase

reversa (RT-PCR). Neste caso, o ácido nucléico da amostra é extraído e purificado, normalmente em métodos de separação de fase líquida (como formol e clorofórmio) ou em *kits* comerciais baseados em sílica (*beads* ou coluna). A seguir, ocorre sua amplificação, com conseguinte detecção do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose. Um protocolo universal desenvolvido por Lanciotti et al. (1992) e recomendado pela Organização Pan-Americana da Saúde, permite detectar os quatro sorotipos do DENV em um ensaio do tipo *nested-PCR* (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2000). Neste ensaio, no primeiro ciclo, utiliza-se iniciadores de uma sequência consenso localizada nos genes do capsídeo e pré-membrana, amplificando um fragmento de 511 pb. Este produto é utilizado numa segunda etapa utilizando-se os iniciadores específicos que permitem a identificação do sorotipo através da formação de produtos de DNA com tamanhos diferentes. Esta técnica é 80% a 100% mais sensível que o isolamento viral e leva cerca de 1-2 dias para emissão do laudo (LANCIOTTI et al., 1992).

A quantificação do RNA viral também pode ser medida em tempo real (RT-PCR em tempo real) utilizando-se iniciadores específicos e sondas marcadas com fluorocromos (TaqMan) que permitem a detecção dos produtos da PCR em cada ciclo, sem a necessidade de uma eletroforese (KONG et al., 2006).

Nos anos 1990, ensaios baseados na detecção da glicoproteína viral NS1 têm sido avaliados e utilizados em triagem de casos suspeitos de dengue. A NS1 é secretada e encontrada precocemente no soro de indivíduos infectados por *Flavivirus*, circulando em média até o 6º dia da doença. Recentemente tem sido introduzida como teste imunocromatográfico ou imunoensaiosenzimáticos para o diagnóstico da dengue, demandando cerca de algumas horas ou um dia para a liberação do resultado do teste (HANG et al., 2009)

A infecção pelo DENV ocasiona, em geral, uma boa resposta humoral baseada em anticorpos da classe IgM e IgG, que dependem, evidentemente, do estado imunitário do hospedeiro. Diante de uma infecção primária, considerando-se que o paciente nunca entrou em contato com outro *Flavivirus* (naturalmente ou através de vacinação), existe um lento aumento de anticorpos específicos. Os anticorpos IgM surgem entre 3-5º dia após o início da doença, alcançando o pico em torno do 10º dia e declinando a níveis indetectáveis entre 2-3 meses. Os anticorpos IgG são produzidos em baixas concentrações e geralmente aparecem no final da

primeira semana da doença, aumentando gradualmente e permanecendo por toda a vida (CHANAMA et al., 2004; CORDEIRO et al., 2007).

Em uma infecção secundária, os títulos de anticorpos aumentam rapidamente, tendo a IgG como isotipo predominante, sendo detectado mesmo durante a fase aguda da infecção. É comum a realização de coleta de amostras pareadas (a primeira na fase aguda – até o 5º dia - e a segunda durante a convalescência após 15º dia). No início da convalescência, os títulos de IgM são cerca de 50% mais baixos que em uma infecção primária, sendo em alguns casos indetectáveis. Títulos de IgG quatro vezes maior em amostras pareadas, é indicativo de uma infecção secundária (CORDEIRO et al., 2007; SHU et al., 2003; VASQUEZ et al., 2005).

Os ensaios sorológicos utilizados para detecção de anticorpos específicos, utilizados no diagnóstico da dengue, compreendem os testes imunoenzimáticos, imunocromatográficos e o teste de inibição da hemaglutinação. Além desses, em ensaios de triagem de vacinas, o teste de neutralização em placas é utilizado para detecção de anticorpos neutralizantes no soro do paciente, os quais inativam o vírus, impedindo-os de infectarem as células hospedeiras (MORENS et al., 1985).

Testes imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos IgM (MAC-ELISA) e IgG (GAC) permitem a quantificação do título do anticorpo, utilizando-se microplacas sensibilizadas com anticorpos de captura contra o isotipo. Após a adição da amostra, antígenos do DENV são acrescentados, seguidos por anticorpos de detecção conjugados com uma enzima, que após adição do substrato, forma um produto colorido e solúvel, cuja densidade óptica (DO) é proporcional à concentração do anticorpo na amostra. A proporção IgM/IgG pode ser utilizada para distinguir entre uma infecção primária e secundária. Em geral, quando a DO IgM/IgG > 1,2, define-se uma infecção primária (CHANAMA et al., 2004; FALCONAR; PLATA; ROMERO-VIVAS, 2006).

O teste de inibição da hemaglutinação (IH) também permite quantificar o título do anticorpo específico no soro. Este teste baseia-se na habilidade que os antígenos virais possuem em aglutinar hemácias de ganso ou hemácias humanas previamente tratadas com tripsina. Quando há presença de anticorpos no soro, estes inativam os antígenos virais impedindo a aglutinação. Numa infecção secundária, o título do anticorpo aumenta rapidamente, excedendo 1:1280 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Recentemente, os testes imunocromatográficos para pesquisa de IgM e IgG tem sido incorporados na prática diagnóstica. Estes testes são realizados em uma membrana de nitrocelulose, contendo anticorpos de captura anti isotipo específicos e um conjugado formado por antígenos do envelope viral e o ouro ou a prata coloidal, os quais permitem a identificação qualitativa do anticorpo na amostra de soro (SHU; HUANG, 2004).

1.6 Imunopatogenia da dengue

A patogênese das formas severas da dengue é multifatorial. As condições ecológicas, epidemiológicas, virais e do hospedeiro são fatores que podem contribuir para o desenvolvimento dos quadros graves da doença. Diferenças na virulência da cepa parecem estar relacionadas com a capacidade de infecção em diferentes tipos celulares que podem favorecer o grau de severidade (TWIDDY et al., 2002; HOLMES, 2007). A experiência anterior de uma infecção por DENV pode favorecer o desenvolvimento de uma forma clínica mais grave durante uma segunda infecção por um sorotipo distinto (SIMMONS et al., 2005). Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro também podem contribuir para um fenótipo mais severo da dengue (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Imunologicamente, o rápido início e desencadeamento da resposta inata pode ser limitante na infecção pelo vírus dengue. Uma das grandes questões na patogênese da doença é identificar o papel crucial da imunidade antiviral nos estágios iniciais da infecção. Neste âmbito, células dendríticas imaturas e células de Langerhans residentes na pele, parecem ser as primeiras células-alvo do vírus dengue dada à infecção natural (WU et al, 2000). Essas células, em resposta à infecção secretam interferons (IFN) tipo I (α/β) devido a interação viral com receptores padrão de reconhecimento (PRR). Não apenas as células dendríticas, mas, a maioria das células infectadas pelo DENV produz IFNs. O IFN- γ , que é o interferon tipo II também é secretado em decorrência da ativação dos linfócitos natural killer (NK), o qual parece estar relacionado ao *clearance* viral pelo organismo hospedeiro (AZEREDO et al., 2006).

A imunidade humoral desenvolve-se em aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado. Neste caso, anticorpos anti-E, prM e NS1 tem sido identificados no decurso da infecção. Os anticorpos contra a proteína E e prM demonstram a propriedade de neutralização viral (GROMOWSKI; BARRET, 2007). Enquanto os anticorpos anti-NS1 estão envolvidos na ativação do sistema complemento (KUROSU et al., 2007) e na resposta cruzada contra células endoteliais, fígado e plaquetas, a qual remete a uma auto-imunidade transitória observada nos pacientes com dengue (LIN et al., 2006). Anticorpos anti-E também tem sido associados a reatividade cruzada com o plasminogênio humano, contribuindo com isto, para o caráter autoimune observado nesta infecção viral (HUANG et al., 1997).

Há evidências de que uma segunda infecção por um sorotipo diferente esteja correlacionada com a patogenia da FHD/SCD (ZIVNY et al., 1999; SIMMONS et al., 2005). Infectividade viral aumentada por anticorpos (“antibody-dependent enhancement”- ADE), postula que anticorpos resultantes de uma primeira infecção, não-neutralizantes para uma segunda infecção por um sorotipo diferente, poderiam aumentar a adsorção de partículas virais à membrana de células que contenham receptores Fc específicos, como monócitos-macrófagos, favorecendo a internalização do virion. De fato, os monócitos e macrófagos ativados secretam várias citocinas pró-inflamatórias e vasoativas que contribuem para patogênese das formas severas da dengue (HALSTEAD, 1970; HALSTEAD; O’ROURKE, 1977; HALSTEAD; DEEN, 2002).

Além disso, a associação entre infecções primárias envolvendo crianças dentro do primeiro ano de vida, filhos de mães imunes ao DENV, demonstram maior incidência de FHD (HALSTEAD, 1981). Isto reflete o envolvimento de anticorpos IgG opsonizantes e fixadores do complemento, que contribuem para a severidade da doença e que se relacionam ao fenômeno ADE.

Ainda em relação a imunidade adaptativa, a presença de citocinas T helper 1 (Th1) e (Th2) tem sugerido o envolvimento dos linfócitos T CD4⁺ na patogênese da doença. Em acréscimo, a presença de marcadores de ativação de células T CD8⁺ sugerem que essas células também contribuem para severidade da doença (LIBRATY et al., 2002).

As células T de memória oriundas de uma infecção primária, reconhecem cruzadamente epítomos de proteínas não-estruturais, sobretudo NS3, em resposta

aos sorotipos heterólogos em uma infecção secundária, resultando em uma exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e IL-2. Estas citocinas provocam aumento da permeabilidade vascular que contribui para imunopatogênese da FHD/SCD (ROTHMAN; ENNIS, 1999).

Este fenômeno das células T de memória da primeira infecção reagir mais eficientemente a epítopos heterólogos de uma segunda infecção tem sido denominado “pecado antigênico original”. Neste caso, as células T de memória competem pelas células T virgens específicas da infecção atual reconhecendo com elevada avides os epítopos conservados (HALSTEAD; ROJANASUPHOT; SANGKAWIBHA, 1983; MONGKOLSAPAYA et al., 2003).

Uma das características marcantes da FHD/SCD é a perda da integridade endotelial, que resulta no extravasamento de plasma, hipotensão e choque. Esta anormalidade decorre de uma exacerbada produção de citocinas e mediadores inflamatórios em resposta a ativação das células T não protetoras e monócitos e macrófagos infectados (ROTHMAN, 2010).

Assim, altos níveis plasmáticos das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 β , TNF- α e IFN- γ tem sido encontrados nas formas severas da dengue. Outros fatores solúveis como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator estimulador de colônia granulócito-monócito (GM-CSF), proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1), fator tecidual, molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1), trombosmodulina, inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), ativador do plasminogênio tecidual (tPA), óxido nítrico (NO), CD4+ e CD8+ solúveis, receptor solúvel da IL-1(sIL-1R), receptores solúveis para o TNF (sTNFR-I e sTNFR-II) também têm sido descritos relacionados com a severidade da doença (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010).

As análises de variados estudos relacionados aos níveis plasmáticos dessas citocinas e fatores solúveis da inflamação são divergentes. A maioria desses estudos é baseada em modelos animais desafiados com o DENV, que diferem em cepas, tempo de infecção, título viral, testes laboratoriais e análise estatística utilizadas (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Outra questão importante é que o extravasamento de plasma observado em humanos ocorre principalmente entre a cavidade pleural e peritoneal, sugerindo que

os níveis desses mediadores no plasma refletem concentrações em diferentes compartimentos. Em acréscimo, os pacientes que desenvolvem as formas severas da dengue não apresentam nenhuma alteração morfológica significativa de lesão tecidual. Na verdade, os pacientes com SCD podem recuperar-se rapidamente após cuidadoso controle hemodinâmico, o que sugere que essas citocinas não causam destruição, mas apenas uma disfunção endotelial reversível (NACHMAN; RAFII, 2008).

1.7 Modelo experimental para as formas severas da dengue

Os tecidos oriundos de autópsia de pacientes infectados pelo DENV poderiam revelar muitas informações sobre a patogenia da doença. Todavia, a taxa de mortalidade por dengue é baixa e essas amostras são extremamente raras e provavelmente não seriam representativas do amplo espectro clínico causado e desenvolvido pelos pacientes. Assim, uma das grandes limitações para o entendimento da patogênese da dengue é a falta de um modelo animal adequado que desenvolva a sintomatologia das formas severas da doença. Neste aspecto, vários sistemas têm sido propostos na tentativa de refletir a patogenia observada em humanos combinada com as limitações técnica e de pessoal, custo e acessibilidade (MATHEW; ROTHMAN, 2008).

Os primatas não humanos têm sido apresentados como um forte modelo experimental para FHD. Onlamoon et AL. (2010), em experimentos realizados com macacos Rhesus (*Macaca mulatta*, RM), demonstraram que quando infectados pela cepa DENV-2 16681, os animais desenvolviam viremia, discreta trombocitopenia e neutropenia. As manifestações hemorrágicas variaram entre petéquias a severa coagulopatia e concomitante a uma leve diminuição de hemoglobina e hematócrito. Entretanto, os animais não desenvolveram sinais clínicos detectáveis da doença, incluindo manifestações de FHD. Pequenas hemorragias cutâneas foram observadas em 3/6 animais sob indução de altas doses intravenosa do vírus. Outro aspecto, é que a viremia detectada nesses animais foi 2x mais baixa àquela observada em humanos.

Outro estudo envolvendo macacos da espécie *Macaca fascicularis*, revelaram altos títulos de anticorpos neutralizantes homótipo específico (DENV-1) entre o 10º dia e 58ª semana após a infecção. Contudo, quando desafiados para uma segunda infecção pelo DENV-2, a ausência ou a baixa titulação de anticorpos de reação cruzada foi detectada (ITO et al., 2009).

Camundongos humanizados, nocauteados para os genes RAG2 (recombinases) e enxertados com células-tronco humanas CD34+, e, expressando, portanto, células funcionais do sistema imune adaptativo humano têm sido desafiados com o DENV-2. Esses animais apresentaram viremia e anticorpos IgM e IgG anti-DENV-2 no soro. Contudo, aspectos relacionados às manifestações hemorrágicas da dengue severa não foram observados (KURUVILLA et al., 2007).

Outro modelo, camundongos AG129 nocauteados para a via de sinalização dos interferons $\alpha/\beta/\gamma$, demonstraram uma doença com características semelhantes à dengue com extravasamento de plasma e morte mediada por TNF- α . Todavia a infecção ocorria diante de altos títulos virais por via intravenosa (TAN et al., 2010).

Assim, um modelo animal ideal que seja acessível, com facilidade de manipulação, dentro das limitações técnicas e que mimetize a sintomatologia e os aspectos laboratoriais das formas graves da dengue ainda não se encontra disponível.

1.8 Desenvolvimento de uma vacina contra a dengue

A alta incidência global, a rápida propagação vetorial e os elevados custos com os serviços de saúde têm colocado a dengue como uma doença de grande prioridade pela OMS. Em acréscimo, a prevalência dos quatro sorotipos virais circulando em várias regiões do mundo tem contribuído para o aumento das formas severas da doença. Até o momento não existe um tratamento específico nem uma vacina licenciada disponível contra a dengue (MILLER, 2010).

Uma vacina ideal deve prover proteção contra os quatro sorotipos, sem, contudo, facilitar o risco de desenvolver as formas severas. Além disso, a vacina deve fornecer um delicado balanço entre o nível de imunogenicidade induzida e a atenuação da patogenicidade viral. Assim, entender a base imunológica envolvida

durante a infecção viral é crucial para o sucesso da vacinação. Contudo, esse mecanismo é dificultado devido à falta de um modelo animal que desenvolva as formas severas semelhantes às aquelas visualizadas em humanos (YAUCH; SHRESTA, 2008).

Outro fator importante, é que a vacina deve ser economicamente viável com alto grau de proteção, uma vez que, as mais altas taxas de infecção ocorrem em países em desenvolvimento. Além disso, uma vacina de sucesso também deve prover que os títulos virais em humanos vacinados não permitam que o mosquito vetor se infecte durante o repasto sanguíneo (MURREL; WU; BUTLER, 2011).

Desta forma, vários grupos incluindo: *The Pediatric Dengue Vaccine Initiative*, *the WHO*, *the US military*, bem como indústrias farmacêuticas e governos de vários países têm contribuído para ajudar e acelerar o desenvolvimento de uma vacina de sucesso contra a dengue (MURREL; WU; BUTLER, 2011).

1.8.1 Vacina viva atenuada

Esse tipo de vacina tende a mimetizar a infecção natural induzindo resposta celular e humoral com uma imunidade duradoura, utilizando uma única dose. O mecanismo de atenuação normalmente é conduzido através de várias passagens sucessivas em cultura celular. Esse processo apresenta a desvantagem de não prever as mudanças moleculares. Alguns grupos de pesquisa utilizam a mutação genética específica no genoma viral de forma a interferir na sua replicação (HALSTEAD; MARCHETTE, 2003).

Nesse tipo de vacina algumas limitações têm ocorrido, como: dificuldades em conseguir a atenuação ideal para cada sorotipo do DENV; a possibilidade de reverter o fenótipo selvagem da cepa viral; quando cada sorotipo é atenuado isoladamente e tenta-se a formulação tetravalente, o balanço entre imunogenicidade e reatogenicidade é perdido (EDELMAN, 2007). Além disso, a introdução de uma deleção na região 3´ não traduzida tem proporcionado a estabilidade dessas vacinas com base genética (HALSTEAD; MARCHETTE, 2003). Contudo o balanço desejado na atenuação (imunogenicidade x patogenicidade) da formulação tetravalente, ainda não foi alcançado.

Pesquisas nessa linha têm sido realizadas e *The Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)* e *GlaxoSmithKline (GSK)* têm conduzido vários ensaios clínicos em humanos de formulações monovalentes de cada sorotipo. Resultados foram obtidos como a subatenuação (títulos de anticorpos neutralizantes baixos) encontrada para o DENV-1-3 e para o DENV-4 foi demonstrada uma superatenuação (patogenicidade). Diante disso, ajustes nas diluições para cada cepa viral e os níveis de múltiplas passagens são necessários para novos ensaios clínicos (EDELMAN, 2007).

1.8.2 Vacinas quiméricas recombinantes

Uma nova abordagem no desenvolvimento de vacinas é a introdução da genética molecular, formando-se as vacinas quiméricas. Uma quimera é construída utilizando-se um *backbone* de um vírus relacionado, substituindo alguns genes pelos seus correspondentes do vírus de interesse. Neste caso, tem sido utilizado como *backbone* o vírus da febre amarela, substituindo os genes da prM/E pelos genes correspondentes do DENV. O objetivo principal é reter a atenuação do *backbone* e incorporar a antigenidade do DENV (GUY, 2009).

Os laboratórios Acambis e Sanofi-Pasteur têm desenvolvido as vacinas quiméricas dos quatro sorotipos obtendo resultados promissores como: baixo nível de replicação no vetor, efeitos adversos de leve a moderado, não indução de resposta celular significativa LT CD8+ para NS3 do *backbone* e resposta celular sorotípica-específica contra as proteínas do dengue (GUY, 2009). Além disso, após a administração de três doses da vacina, houve indução de anticorpos neutralizantes entre os voluntários contra os quatro sorotipos. Diante disso, esta vacina é apresentada como mais promissora e com melhores resultados (MORRISON et al., 2010). Contudo, o alto custo, a estabilidade da construção, a determinação do calendário de vacinação e o risco em desenvolver as formas severas da dengue devido ao fenômeno ADE são algumas limitações que ainda precisam ser sanadas (MURPHY; WHITEHAED, 2011).

1.8.3 Vacinas de vetores virais e de DNA

As vacinas de DNA têm as vantagens de induzir o processamento de antígeno intracelular, estabilidade em não reverter ao fenótipo selvagem e relativa facilidade de manufatura. Contudo, a baixa imunogenicidade é sua principal desvantagem. Isso pode ser devido à inadequada entrada na célula e a conseguinte, baixa expressão antigênica observada. Além disso, apenas as proteínas estruturais têm sido incorporadas na vacina. A introdução das proteínas NS necessitaria da incorporação de adjuvantes, o que elevaria ainda mais seu custo para as áreas endêmicas da doença (MURREL; WU; BUTLER, 2011).

A utilização de um vetor adenovirus permitiu a construção de um recombinante multivalente, expressando as proteínas prM/E dos quatro sorotipos. Altos títulos de anticorpos neutralizantes foram observados para todos os sorotipos, exceto para o DENV-2. Além disso, as vacinas podem ter menos eficiência em indivíduos previamente expostos a adenovirose ou outras vacinas com este vetor. Outro fato que precisa ser analisado é a investigação em pacientes imunossuprimidos (RAVIPRAKASH et al., 2008).

1.8.4 Vacinas inativadas

As vacinas inativadas são seguras em não permitirem a reversão do fenótipo selvagem das vacinas atenuadas. Contudo, possuem apenas as proteínas estruturais e falham em induzir a imunidade contra qualquer proteína NS. Necessitam de adjuvantes, podem ser reatogênicas no período pós-vacinal, múltiplas dosagens são requeridas, além de elevado custo com a manufatura do DENV. Esse tipo de vacina possui menos atrativo entre as grandes indústrias, embora ela possa ser utilizada entre militares e viajantes (PUTNAK et al., 2005).

Outras formulações antigênicas encontram-se em desenvolvimento como as vacinas de proteínas recombinantes, de subpartículas virais, quiméricas com deleções na região 3' não traduzida. Contudo, algumas limitações ainda impedem o

desenvolvimento de uma formulação disponível, sobretudo, para as regiões endêmicas (MURPHY, WHITEHEAD, 2011).

O exato entendimento dos mecanismos imunopatológicos entre o DENV e as células alvo de infecção é necessário para o desenvolvimento de uma vacina completamente protetora. Não há um consenso sobre como um indivíduo é protegido contra o DENV. Geralmente, há evidências de proteção por anticorpos neutralizantes, mas, o título requerido entre cada indivíduo com ou sem imunidade pré-existente contra um sorotipo pode variar. O calendário, a dosagem e a via de administração ainda são limitações presentes (SWAMINATHN; BATRA; KHANNA, 2010).

1.9 Mapeamento de epítomos de células T

O mapeamento de epítomos de células T é uma ferramenta utilizada para a identificação de sequências proteicas patogênicas, sobretudo de aminoácidos âncoras, que são reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, desencadeando uma resposta imune específica. O termo *epítomo* é frequentemente permutável por *peptídeo imunodominante*. Contudo, de forma exata e precisa, *epítomo* refere-se a uma curta sequência que mantém propriedade estimulatória diante das células T, ou seja, são sítios ou regiões imunologicamente ativas de antígeno, enquanto *peptídeo imunodominante* pode ter comprimentos variáveis e sua deleção pode permitir a identificação de um epítomo correspondente (PIRA et al, 2010).

A identificação de epítomos de células T vem se tornando uma estratégia para o desenho de vacinas profiláticas ou terapêuticas, contra diversos alvos patogênicos. Entre as principais razões para a utilização desta ferramenta para o desenvolvimento de vacinas merecem destaque: a) epítomos são apresentados por alelos HLA (um ou poucos alelos; em alguns casos, vários alelos, referida como promiscuidade alélica, e até pela maioria dos alelos, neste caso definida como um alelismo universal); b) os epítomos representam a região antigênica de uma proteína, portanto, as demais regiões podem ser deletadas; c) epítomos restritos a diferentes alelos podem ser utilizados para construção de uma biblioteca de peptídeos selecionados que serão reconhecidos pela maioria da população imune, deste

modo, poderiam ser utilizados como ferramenta diagnóstica; d) epítomos podem ser selecionados para construir vacinas baseadas em peptídeos antigênicos selecionando clones de linfócitos T com resposta imune específica (FRAHM et al., 2007).

Em relação à construção de vacinas baseadas em epítomos, podemos inferir que fragmentos peptídicos podem ser reunidos como um mosaico protéico para produzir vacinas polivalentes com ampla cobertura em potencial para epítomos de células T. Desta forma, poderíamos minimizar ou evitar o mecanismo de escape, sobretudo viral, que as freqüentes mutações produzem ao induzir ampla variabilidade peptídica patogênica. Por outro lado, regiões definidas como desenssibilizantes, podem ser removidas da proteína e re-construídas para formação de agentes terapêuticos. Neste caso, a antigenicidade em potencial poderia ser evitada com o objetivo de melhorar a efetividade clínica (GROOT; SCOTT, 2007).

Entre as principais estratégias para o mapeamento de epítomos, o *Enzyme-Linked Immunospot* (ELISPOT) é um ensaio de alta sensibilidade baseado no princípio do *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que utiliza células como amostra clínica, detectando a secreção de citocinas induzida por antígenos captada por anticorpos imobilizados e visualizada por um segundo anticorpo conjugado a uma enzima (LETSCH; SCHEIBENBOGEN, 2003). Marcadores de ativação da resposta imune celular em pacientes com dengue incluem moléculas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e rIL-2 solúvel (JUFFRIE et al., 2001; KITTIGUL et al., 2000). A alta reprodutibilidade com baixo limite de detecção de células T antígeno-específicas secretoras de IFN- γ vem sedimentando esta citocina nos ensaios de ELISPOT para a identificação de peptídeos (SCHEIBENBOGEN et al., 2000). Com isto, o mapeamento de epítomos reativos vem sendo realizado, através de ELISPOT para IFN- γ , utilizando-se células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados com os quatro sorotipos da dengue frente aos antígenos peptídicos virais que varrem todo o genoma, visando o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra esta doença (SIMMONS et al., 2005).

Contudo, o custo dos reagentes, o tempo dos ensaios, a quantidade de amostras biológicas viáveis, a síntese química dos peptídeos e recursos humanos

capacitados são algumas limitações desta sensível ferramenta na identificação de epítomos.

Assim, a estratégia de se construir uma matriz de *pool* de peptídeos tem sido utilizada como uma forma de redução de custos e material biológico (PRECOPIO et al., 2008). Desta forma, a intersecção de pools reativos apresentaria um provável peptídeo candidato a epítomo, que evidentemente, seria testado posteriormente de forma individual (Figura 6).

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
H11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H12	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
H13	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
H14	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
H15	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
H16	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
H17	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
H18	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
H19	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
H20	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Figura 6. Representação esquemática de uma matriz 10x10 de 100 peptídeos agrupados em *pools*.

Fonte: PIRA et al.(2010)

Entretanto, a utilização de peptídeos nessa abordagem deve ser feita com sobreposição de resíduos de aminoácidos. De fato, a não observância a esta estratégia poderia clivar uma região imunorreativa, portanto, um epítomo, que evidentemente não induziria ativação linfocitária.

1.10 Modelos preditivos de identificação de resposta de célula T

O desenvolvimento de métodos computacionais avançados (“Artificial Neural Networks” – ANN) baseados em algoritmos para predição de epítomos de células T vêm sendo utilizados para identificar peptídeos candidatos ao locus HLA (BRUSIC et al., 2001; BRUSIC et al., 2002).

Esses métodos *in silico* são rápidos, de baixo custo e permitem a exclusão de certos peptídeos com baixo potencial de ligação à fenda do HLA. A predição preliminar pode resultar na redução do número de peptídeos a ser sintetizados e de ensaios a serem realizados. Outra vantagem é que os epítomos de células T podem ser definidos independentemente do *status* naïve ou de memória linfocitária (RAPIN et al., 2010).

No entanto, os algoritmos de predição aos alelos HLA de classe I parecem ser mais criteriosos na ligação ao peptídeo antigênico. Este fato decorre da característica fisiológica destas moléculas HLA possuírem uma fenda de ligação ao peptídeo antigênico mais fechada e com sítios interiores que interagem com os resíduos de aminoácidos âncora do peptídeo. Desta forma, a funcionalidade físico-química das cadeias laterais desses aminoácidos permitem a formação de ligações químicas específicas dentro de cada sítio no interior da fenda (SINGH; MISHRA, 2008).

Assim, em observância as análises químicas e estruturais desses resíduos de aminoácidos, Sidney et al. (2008) agruparam os alelos HLA em nove supertipos baseados na especificidade dos resíduos âncoras. Entretanto, convém mencionar que alguns alelos podem pertencer a diferentes supertipos e que outros alelos ainda não foram categorizados. Outro ponto relevante, é que devido aos padrões de transplantação de órgãos e a maior associação de rejeição de enxertos relacionada aos alelos A e B, apenas esses alelos de classe I tem sido explorados tanto para o agrupamento em supertipos quanto para o desenvolvimento de algoritmos. Desta forma, algoritmos para predição do alelo C são escassos e pouco confiáveis (WANG et al., 2008).

Os algoritmos para predição dos alelos HLA de classe II têm sido avaliados com maior cuidado. O fato fisiológico da fenda da molécula HLA de classe II ser mais aberta e, desta forma, comportar resíduos peptídicos longos, torna difícil

estabelecer um padrão de resíduos âncora que permita agrupar esses alelos em supertipos. Assim, os algoritmos para HLA de classe II também são direcionados ao alelo DRB1 devido a sua alta antigenicidade na transplantação. Entretanto, esses algoritmos são menos criteriosos e os seus resultados são obtidos em percentil. Algoritmos para predição dos alelos DP e DQ ainda estão em caráter preliminar (LIN et al., 2008; WANG et al., 2008).

De maneira geral, tanto a predição dos alelos HLA de classe I quanto os de classe II necessitam de comprovação experimental para validarem os algoritmos e assegurarem que uma dada sequência antigênica é reconhecida e apresentada pela maioria dos alelos HLA da população. Outra observação relevante é se uma dada sequência apresentada por um dado alelo induziria uma resposta patogênica ou protetora.

2 JUSTIFICATIVA

Algumas dificuldades têm limitado o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue. Primeiramente, a vacina precisa promover imunidade duradoura contra os quatro sorotipos virais. Devido aos fenômenos ADE e do pecado antigênico original, uma das principais preocupações referentes ao desenvolvimento de uma vacina contra dengue é a possibilidade da imunização aumentar a incidência das formas graves da doença.

As vacinas atualmente em desenvolvimento baseiam-se em epítomos não definidos e experimentos em camundongos e macacos. Embora alguns modelos experimentais tenham desenvolvido sintomatologia semelhante as formas graves da doença, esses animais não reproduziram as formas severas da dengue condizente com aquela observada em humanos, e, portanto, os ensaios clínicos preliminares não são suficientes para avaliar este tipo de risco.

Além disso, falta uma metodologia segura para prever como as respostas imunes induzidas pela vacina iriam interferir na imunopatologia das manifestações clínicas da dengue, de modo a reduzir seus efeitos deletérios.

Existem algumas vacinas candidatas contra dengue em desenvolvimento com base em vírus atenuados, selecionados pelo crescimento dos quatro sorotipos em múltiplas gerações em culturas celulares e outras utilizando engenharia genética ou geração de quimeras (HALSTEAD; DEEN, 2002). Os laboratórios Acambis e Sanofi Pasteur têm desenvolvido vacinas tetravalentes quiméricas com resultados promissores, encontrando-se em fase III. Porém, o alto custo, a estabilidade da construção, a determinação do calendário de vacinação e o risco de desenvolver as formas graves da dengue são algumas limitações existentes (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

O desenvolvimento final de uma vacina exige um conhecimento detalhado das respostas imunes induzidas pela infecção natural nas diversas regiões, bem como o tipo de resposta imune que é induzida pela vacina (MARQUES, 2002).

Assim, a identificação de epítomos reativos a células T das proteínas NS1 e NS3 viral, pode contribuir para o entendimento das respostas imune protetora ou patogênica, visando a construção de uma vacina baseada em epítomos múltiplos.

3 HIPÓTESE

Existem epítomos constituintes das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue-3 capazes de estimular células T CD4+ e CD8+ de pacientes infectados com dengue.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar os epítomos constituintes das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 que compõem o vírus dengue 3 (DENV-3) capazes de estimular células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes infectados com dengue, visando a sua utilização em uma vacina contra esta doença.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar os epítomos das proteínas NS1 e NS3 do vírus DENV-3 reativos a células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com dengue, através de ELISPOT para IFN- γ , mediante estimulação com peptídeos sintéticos.
- b) Comparar os epítomos para células identificadas experimentalmente com aqueles propostos teoricamente.
- c) Correlacionar as respostas imunes obtidas através de ELISPOT para células T com atributos clínicos e imunogenéticos (haplótipos HLA).
- d) Propor epítomos para serem, subseqüentemente, utilizados em uma vacina contra dengue.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Casuística

Pacientes infectados com o DENV-3 ($n = 72$, sendo $n = 20$ para triagem dos *pools* de peptídeos e $n = 52$ para realização dos ensaios individuais), bem caracterizados do ponto de vista clínico e laboratorial, foram selecionados de uma coorte previamente iniciada em 2003, mediante colaboração entre o Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) e o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira de Pernambuco (IMIP), o Hospital Santa Joana (HSJ) e o Hospital HOPE/Esperança (HHE) da cidade do Recife (MARQUES; MACIEL; NORDSTRON, 2008). Em cada uma destas instituições, os casos suspeitos de dengue admitidos, foram investigados com base em um questionário clínico epidemiológico (APÊNDICE A), submetidos a um exame clínico, e convidados a participar desta coorte. Foram excluídos da coorte indivíduos em uso de anti-coagulantes, drogas imunossupressoras, com doenças crônicas, auto-imunidade e/ou imunodeficiências.

Os indivíduos participantes deste projeto, após avaliação clínica, tiveram suas amostras sanguíneas (20 ml) coletadas e divididas em 3 tubos (2 com heparina e 1 sem anticoagulante) nos dias 1, 3, 5, 7, 15 dias e 6 meses após o início das manifestações clínicas. Para definição do diagnóstico, os pacientes realizaram exames laboratoriais complementares como hemograma, contagem de plaquetas, enzimas hepáticas e teste do torniquete. Além disso, foram realizados exames laboratoriais específicos como a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) para diagnóstico dos sorotipos (LANCIOTTI et al., 1992), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para IgM (Biomanguinhos™) e IgG (PanBio™) anti-dengue e isolamento viral em cultura de células do clone C6/36 do *Ae. albopictus* (IGARASHI, 1978). Após caracterização da infecção pelo DENV-3, sorotipo epidêmico do período 2002-2009, as amostras sanguíneas com heparina foram coletadas para obtenção de células frescas mononucleares do sangue periférico, para utilização para o mapeamento de epítomos realizado entre 2006-2009.

5.2 Diagnóstico

5.2.1 Isolamento e identificação viral

As amostras de soro dos pacientes coletadas na fase aguda da doença foram inoculadas (20 µl) nas células de *Ae albopictus* clone C6/36 mantidas em meio de cultura Leibovitz L-15 contendo 2% de soro fetal bovino (IGARASHI, 1978). A identificação viral foi realizada por anticorpos monoclonais sorotipo-específico por imunofluorescência (GUBLER et al., 1984).

5.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os anticorpos IgM e IgG anti-dengue foram detectados nas amostras de soro dos pacientes conforme recomendações dos fabricantes (Biomanguinhos™ e PanBio™, respectivamente). Resumidamente, as placas de ELISA previamente sensibilizadas com o anticorpo de captura específico receberam as amostras de soro. Posteriormente, o conjugado enzimático foi adicionado e, após incubação, o substrato foi acrescentado às placas para revelação. Em seguida, a reação enzimática foi paralisada com solução específica e a densidade óptica (DO) determinada com o comprimento de onda variando entre 450 nm – 620 nm.

5.2.3 Reação em cadeia da polimerase pela ação da transcriptase reversa – RT-PCR

As amostras de RNA viral foram extraídas através do kit de purificação (QIAquick, Qiagen™) e submetidas a transcrição reversa conforme descrito em Lanciotti et al., 1992. Sucintamente, cópias do cDNA viral da região C/prM foram sintetizadas e amplificadas usando dois iniciadores consenso desenhados para os quatro sorotipos. Em seguida, nova amplificação foi realizada utilizando iniciadores

sorotipo-específicos, os quais geraram DNA com tamanho molecular específico para cada sorotipo. Eletroforese em gel de agarose 2% corada com brometo de etídeo foi utilizada para identificação dos produtos de PCR.

5.3 Classificação clínica dos pacientes

Os pacientes com dengue foram então classificados segundo as formas clínicas em Dengue Clássica = DC e Febre Hemorrágica da Dengue = FHD, conforme critérios da OMS (1999). Assim, os pacientes com a forma clássica apresentaram febre alta acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaléia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia ou exantema. A forma hemorrágica foi caracterizada pela mesma sintomatologia da DC acompanhada de fenômenos hemorrágicos como hemoconcentração, teste do torniquete positivo, trombocitopenia $\leq 100.000/ \text{mm}^3$ e extravasamento de plasma. Em acréscimo, uma nova classificação denominada Dengue Clássica Complicada = DCC, na qual o paciente apresenta os sintomas de DC mais trombocitopenia, mas não preenche os critérios da OMS para FHD, foi atribuída pelo nosso grupo de estudo conforme descrito em Cordeiro et al. (2007).

Além disso, a infecção pelo DENV foi classificada em primária ou secundária em observação aos títulos de anticorpos IgM e IgG mensurados por ELISA e RT-PCR, conforme descrito por Cordeiro et al. (2007). A infecção primária foi caracterizada pela ausência de anticorpos IgG dengue-específico e pela presença de anticorpos IgM anti-dengue, ambos detectados por teste imunoenzimático, isolamento viral em células C6/36 de *Ae. albopictus* identificada por imunofluorescência e/ou detecção do RNA viral por RT-PCR. A infecção secundária foi caracterizada por detecção de IgG em amostras de fase aguda e ausência de IgM anti-dengue, associada com RT-PCR positiva e/ou isolamento viral, seguida pela presença de IgM em amostras na fase da convalescência.

5.4 Ensaios de ELISPOT

5.4.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As amostras sanguíneas coletadas com heparina foram processadas utilizando-se gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque para obtenção das PBMCs, visando sua utilização nos ensaios de ELISPOT (KREHER et al., 2003). Inicialmente, as amostras sanguíneas foram diluídas em PBS pH 7,2 na proporção 1:2. Em seguida, o sangue diluído foi adicionado a outro tubo contendo Ficoll-Hypaque em igual volume inicial do sangue, evitando-se misturar. As amostras foram centrifugadas por 30min a 931xg a 20°C.

Após centrifugação, a camada de células mononucleares foi aspirada e transferida para outro recipiente, onde foi diluída em PBS pH 7,2 na proporção 1:3. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 335 xg por 15min à 20°C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e 1ml de tampão de lise eritrocitário (deixando este atuar por 5 min), e 9 ml de meio de cultura livre de soro (SFM) foram adicionados. Nova centrifugação foi realizada a 335 xg/15min a 4°C. Após esta etapa, o *pellet* celular foi ressuscitado em 10 ml de meio SFM, e uma alíquota desta amostra quantificada. Para esta análise, a suspensão celular (100 µl da amostra foi diluída em 900 µl de SFM) foi devidamente quantificada e sua viabilidade avaliada através do Vi-cell® (Analisador de Viabilidade Celular, Biosystems™, BD).

5.4.2 Peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos (Shaffer®, USA) foram produzidos a partir da seqüência de aminoácidos que compõem a poliproteína do sorotipo DENV-3 (SWISS-PROT: P27915) da cepa circulante no estado do Rio de Janeiro, que coincide com a mesma circulante em Pernambuco (MIAGOSTOVICH et al., 2002). Setenta e seis peptídeos da proteína NS1 e cento e cinquenta da proteína NS3 foram arranjados em uma extensão de 15 aminoácidos com uma justaposição (*overlap*) de 11 aminoácidos, o que representa um bom estímulo para as células T, uma vez que o núcleo (*core*) de aminoácidos de cada peptídeo será suficiente para

preencher as fendas HLA de classe I (8-9 mers) e HLA de classe II (11-15 mers) (MAECKER et al., 2001; KIECKER et al., 2004). Os peptídeos foram diluídos em dimetilsufóxido a 10 % para uma concentração final de 10 µg/ml. Em seguida, estes peptídeos foram agrupados em *pools* e combinados em matrizes (Quadro 3 e Quadro 4).

	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9
Pool 10	Den3-Brazil-NS1-5-19	Den3-Brazil-NS1-9-23	Den3-Brazil-NS1-13-27	Den3-Brazil-NS1-21-35	Den3-Brazil-NS1-25-39	Den3-Brazil-NS1-29-43	Den3-Brazil-NS1-33-47	Den3-Brazil-NS1-37-51	Den3-Brazil-NS1-41-55
Pool 11	Den3-Brazil-NS1-45-59	Den3-Brazil-NS1-49-63	Den3-Brazil-NS1-53-67	Den3-Brazil-NS1-57-71	Den3-Brazil-NS1-61-75	Den3-Brazil-NS1-65-79	Den3-Brazil-NS1-69-83	Den3-Brazil-NS1-85-99	Den3-Brazil-NS1-89-103
Pool 12	Den3-Brazil-NS1-93-107	Den3-Brazil-NS1-97-111	Den3-Brazil-NS1-101-115	Den3-Brazil-NS1-105-119	Den3-Brazil-NS1-109-123	Den3-Brazil-NS1-113-127	Den3-Brazil-NS1-117-131	Den3-Brazil-NS1-121-135	Den3-Brazil-NS1-125-139
Pool 13	Den3-Brazil-NS1-129-143	Den3-Brazil-NS1-133-147	Den3-Brazil-NS1-137-151	Den3-Brazil-NS1-141-155	Den3-Brazil-NS1-145-159	Den3-Brazil-NS1-153-167	Den3-Brazil-NS1-161-175	Den3-Brazil-NS1-165-179	Den3-Brazil-NS1-169-183
Pool 14	Den3-Brazil-NS1-173-187	Den3-Brazil-NS1-177-191	Den3-Brazil-NS1-181-195	Den3-Brazil-NS1-185-199	Den3-Brazil-NS1-189-203	Den3-Brazil-NS1-193-207	Den3-Brazil-NS1-197-211	Den3-Brazil-NS1-201-215	Den3-Brazil-NS1-205-219
Pool 15	Den3-Brazil-NS1-209-223	Den3-Brazil-NS1-213-227	Den3-Brazil-NS1-217-231	Den3-Brazil-NS1-221-235	Den3-Brazil-NS1-225-239	Den3-Brazil-NS1-229-243	Den3-Brazil-NS1-233-247	Den3-Brazil-NS1-237-251	Den3-Brazil-NS1-241-255
Pool 16	Den3-Brazil-NS1-245-259	Den3-Brazil-NS1-249-263	Den3-Brazil-NS1-253-267	Den3-Brazil-NS1-257-271	Den3-Brazil-NS1-261-275	Den3-Brazil-NS1-265-279	Den3-Brazil-NS1-269-283	Den3-Brazil-NS1-281-295	Den3-Brazil-NS1-285-299
Pool 17	Den3-Brazil-NS1-289-303	Den3-Brazil-NS1-293-307	Den3-Brazil-NS1-297-311	Den3-Brazil-NS1-301-315	Den3-Brazil-NS1-305-319	Den3-Brazil-NS1-309-323	Den3-Brazil-NS1-313-327	Den3-Brazil-NS1-317-331	Den3-Brazil-NS1-321-335
Pool 18	Den3-Brazil-NS1-325-339	Den3-Brazil-NS1-329-343	Den3-Brazil-NS1-333-347	Den3-Brazil-NS1-337-352	X	X	X	X	X

Quadro 3. Matriz dos pools de peptídeos da proteína NS1

	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10	Pool 11	Pool 12	Pool 13
Pool 14	Den3-Brazil-NS3-1-15	Den3-Brazil-NS3-5-19	Den3-Brazil-NS3-9-23	Den3-Brazil-NS3-13-27	Den3-Brazil-NS3-17-31	Den3-Brazil-NS3-21-35	Den3-Brazil-NS3-25-39	Den3-Brazil-NS3-29-43	Den3-Brazil-NS3-33-47	Den3-Brazil-NS3-37-51	Den3-Brazil-NS3-41-55	Den3-Brazil-NS3-45-59	Den3-Brazil-NS3-49-63
Pool 15	Den3-Brazil-NS3-53-67	Den3-Brazil-NS3-57-71	Den3-Brazil-NS3-61-75	Den3-Brazil-NS3-65-79	Den3-Brazil-NS3-69-83	Den3-Brazil-NS3-73-87	Den3-Brazil-NS3-77-91	Den3-Brazil-NS3-81-95	Den3-Brazil-NS3-85-99	Den3-Brazil-NS3-89-103	Den3-Brazil-NS3-93-107	Den3-Brazil-NS3-97-111	Den3-Brazil-NS3-101-115
Pool 16	Den3-Brazil-NS3-105-119	Den3-Brazil-NS3-109-123	Den3-Brazil-NS3-113-127	Den3-Brazil-NS3-117-131	Den3-Brazil-NS3-121-135	Den3-Brazil-NS3-125-139	Den3-Brazil-NS3-129-143	Den3-Brazil-NS3-133-147	Den3-Brazil-NS3-137-151	Den3-Brazil-NS3-141-155	Den3-Brazil-NS3-145-159	Den3-Brazil-NS3-149-163	Den3-Brazil-NS3-157-171
Pool 17	Den3-Brazil-NS3-161-175	Den3-Brazil-NS3-165-179	Den3-Brazil-NS3-169-183	Den3-Brazil-NS3-173-187	Den3-Brazil-NS3-177-191	Den3-Brazil-NS3-181-195	Den3-Brazil-NS3-185-199	Den3-Brazil-NS3-189-203	Den3-Brazil-NS3-193-207	Den3-Brazil-NS3-197-211	Den3-Brazil-NS3-201-215	Den3-Brazil-NS3-205-219	Den3-Brazil-NS3-209-223
Pool 18	Den3-Brazil-NS3-213-227	Den3-Brazil-NS3-217-231	Den3-Brazil-NS3-221-235	Den3-Brazil-NS3-225-239	Den3-Brazil-NS3-229-243	Den3-Brazil-NS3-233-247	Den3-Brazil-NS3-237-251	Den3-Brazil-NS3-241-255	Den3-Brazil-NS3-245-259	Den3-Brazil-NS3-249-263	Den3-Brazil-NS3-253-267	Den3-Brazil-NS3-257-271	Den3-Brazil-NS3-261-275
Pool 19	Den3-Brazil-NS3-265-279	Den3-Brazil-NS3-269-283	Den3-Brazil-NS3-273-287	Den3-Brazil-NS3-277-291	Den3-Brazil-NS3-281-295	Den3-Brazil-NS3-285-299	Den3-Brazil-NS3-289-303	Den3-Brazil-NS3-293-307	Den3-Brazil-NS3-297-311	Den3-Brazil-NS3-301-315	Den3-Brazil-NS3-305-319	Den3-Brazil-NS3-309-323	Den3-Brazil-NS3-313-327
Pool 20	Den3-Brazil-NS3-317-331	Den3-Brazil-NS3-325-339	Den3-Brazil-NS3-329-343	Den3-Brazil-NS3-333-347	Den3-Brazil-NS3-337-351	Den3-Brazil-NS3-341-355	Den3-Brazil-NS3-345-359	Den3-Brazil-NS3-349-363	Den3-Brazil-NS3-353-367	Den3-Brazil-NS3-357-371	Den3-Brazil-NS3-361-375	Den3-Brazil-NS3-365-379	Den3-Brazil-NS3-369-383
Pool 21	Den3-Brazil-NS3-373-387	Den3-Brazil-NS3-377-391	Den3-Brazil-NS3-381-395	Den3-Brazil-NS3-385-399	Den3-Brazil-NS3-389-403	Den3-Brazil-NS3-393-407	Den3-Brazil-NS3-397-411	Den3-Brazil-NS3-401-415	Den3-Brazil-NS3-405-419	Den3-Brazil-NS3-409-423	Den3-Brazil-NS3-413-427	Den3-Brazil-NS3-417-431	Den3-Brazil-NS3-421-435
Pool 22	Den3-Brazil-NS3-425-439	Den3-Brazil-NS3-429-443	Den3-Brazil-NS3-433-447	Den3-Brazil-NS3-437-451	Den3-Brazil-NS3-441-455	Den3-Brazil-NS3-445-459	Den3-Brazil-NS3-449-463	Den3-Brazil-NS3-453-467	Den3-Brazil-NS3-457-471	Den3-Brazil-NS3-461-475	Den3-Brazil-NS3-465-479	Den3-Brazil-NS3-469-483	Den3-Brazil-NS3-473-487
Pool 23	Den3-Brazil-NS3-477-491	Den3-Brazil-NS3-481-495	Den3-Brazil-NS3-485-499	Den3-Brazil-NS3-489-503	Den3-Brazil-NS3-493-507	Den3-Brazil-NS3-497-511	Den3-Brazil-NS3-501-515	Den3-Brazil-NS3-505-519	Den3-Brazil-NS3-509-523	Den3-Brazil-NS3-513-527	Den3-Brazil-NS3-517-531	Den3-Brazil-NS3-521-535	Den3-Brazil-NS3-525-539
Pool 24	Den3-Brazil-NS3-529-543	Den3-Brazil-NS3-533-547	Den3-Brazil-NS3-537-551	Den3-Brazil-NS3-541-555	Den3-Brazil-NS3-545-559	Den3-Brazil-NS3-549-563	Den3-Brazil-NS3-553-567	Den3-Brazil-NS3-557-571	Den3-Brazil-NS3-561-575	Den3-Brazil-NS3-565-579	Den3-Brazil-NS3-569-583	Den3-Brazil-NS3-573-587	Den3-Brazil-NS3-577-591
Pool 25	Den3-Brazil-NS3-581-595	Den3-Brazil-NS3-585-599	Den3-Brazil-NS3-589-603	Den3-Brazil-NS3-593-607	Den3-Brazil-NS3-597-611	Den3-Brazil-NS3-601-615	Den3-Brazil-NS3-605-619	X	X	X	X	X	X

Quadro 4. Matriz dos pools de peptídeos da proteína NS3

5.4.3 Obtenção de IFN- γ

A obtenção do IFN- γ através dos ensaios ELISPOT foram realizados para triagem de epítomos reativos do sorotipo DENV-3, de acordo com as recomendações do kit comercial ELISPOT IFN- γ humano da BD-Biosciences Pharmingen. Nós iniciamos o mapeamento utilizando os ensaios ELISPOT através da triagem dos *pools* de peptídeos das proteínas NS1 e NS3 (quadro 5).

A	Pool 1	Pool 1	Pool 2	Pool 2	Pool 3	Pool 3	Pool 4	Pool 4	Pool 5	Pool 5	Pool 6	Pool 6	} NS1
B	Pool 7	Pool 7	Pool 8	Pool 8	Pool 9	Pool 9	Pool 10	Pool 10	Pool 11	Pool 11	Pool 12	Pool 12	
C	Pool 13	Pool 13	Pool 14	Pool 14	Pool 15	Pool 15	Pool 16	Pool 16	Pool 17	Pool 17	Pool 18	Pool 18	
D	B	B	PMA IONO	X	X	X	Pool 1	Pool 1	Pool 2	Pool 2	Pool 3	Pool 3	} NS3
E	Pool 4	Pool 4	Pool 5	Pool 5	Pool 6	Pool 6	Pool 7	Pool 7	Pool 8	Pool 8	Pool 9	Pool 9	
F	Pool 10	Pool 10	Pool 11	Pool 11	Pool 12	Pool 12	Pool 13	Pool 13	Pool 14	Pool 14	Pool 15	Pool 15	
G	Pool 16	Pool 16	Pool 17	Pool 17	Pool 18	Pool 18	Pool 19	Pool 19	Pool 20	Pool 20	Pool 21	Pool 21	
H	Pool 22	Pool 22	Pool 23	Pool 23	Pool 24	Pool 24	Pool 25	Pool 25	B	B	PMA IONO	X	

Quadro 5. Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT em *pools*

Os *pools* que apresentaram reatividade nos ensaios imunológicos tiveram os seus peptídeos testados individualmente. Esses foram distribuídos nas placas de ELISPOT conforme apresentado no quadro 6.

A	NS1 45-59	NS1 45-59	NS1 93-107	NS1 93-107	NS1 85-99	NS1 85-99	NS1 173-187	NS1 173-187	NS1 201-215	NS1 201-215	NS1 105-119	NS1 105-119	NS1 105-119
B	NS1 121-135	NS1 121-135	NS1 177-191	NS1 177-191	NS1 285-299	NS1 285-299	NS1 41-55	NS1 41-55	NS1 65-79	NS1 65-79	NS1 181-195	NS1 181-195	NS1 181-195
C	NS1 185-199	NS1 185-199	NS1 209-223	NS1 209-223	NS1 237-251	NS1 237-251	NS1 241-255	NS1 241-255	NS1 245-259	NS1 245-259	NS1 253-267	NS1 253-267	NS1 253-267
D	NS1 289-303	NS1 289-303	NS1 297-311	NS1 297-311	NS1 309-323	NS1 309-323	NS1 321-335	NS1 321-335	NS3 497-511	NS3 497-511	NS3 393-407	NS3 393-407	NS3 393-407
E	NS3 389-403	NS3 389-403	NS3 385-399	NS3 385-399	NS3 413-427	NS3 413-427	NS3 485-499	NS3 485-499	NS3 493-507	NS3 493-507	NS3 525-539	NS3 525-539	NS3 525-539
F	NS3 89-103	NS3 89-103	NS3 177-191	NS3 177-191	NS3 181-195	NS3 181-195	NS3 185-199	NS3 185-199	NS3 209-223	NS3 209-223	NS3 277-291	NS3 277-291	NS3 277-291
G	NS3 281-295	NS3 281-295	NS3 285-299	NS3 285-299	NS3 381-395	NS3 381-395	NS3 405-419	NS3 405-419	NS3 409-423	NS3 409-423	NS3 501-515	NS3 501-515	NS3 501-515
H	NS3 513-527	NS3 513-527	PMA IONO	B	B	B	B	X	X	X	X	X	X

Quadro 6. Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT por peptídeo individual

Para realização destes ensaios, as placas de ELISPOT foram sensibilizadas com 100 µl do anticorpo de captura anti-IFN-γ (5 µg/ml) diluídos em PBS pH 7,2 (salina tamponada com fosfato) e incubadas por 18h a 4°C, cobertas com papel alumínio. Em seguida, as placas foram lavadas 1x com 200 µl da solução de bloqueio RPMI-10 (meio RPMI-1640 contendo soro fetal bovino 10%; penicilina/estreptomicina 1%; L-glutamina 2 mM), sendo incubadas (200 µl/poço) com esta mesma solução por 2h à temperatura ambiente (TA). Após incubação, a solução de bloqueio foi descartada, e os *pools* de peptídeos (100µl/poço) adicionados, em duplicata, às placas na concentração final de 10 µg/ml. A seguir, as PBMCs dos pacientes (100 µL/poço) foram adicionadas numa concentração final de $1-3 \times 10^5$ células/poço diluídas em meio livre de soro (SFM). Como controles positivos foram usados o acetato de forbol miristato (PMA – 2,5 µg/ml) e a ionomicina (250 ng/ml); e como controle negativo (CN), 100 µl meio sem soro fetal bovino (SFB). As placas foram então incubadas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por 18h.

A suspensão celular foi aspirada mediante pressão à vácuo, e em seguida, as placas foram lavadas 2x com água estéril filtrada em um intervalo de 5min em cada etapa, e 5x com o tampão de lavagem 1 (PBS contendo Tween 20 0,05%). Posteriormente, 100 µl/poço do anticorpo de detecção biotilado (1:250), diluído em PBS 10 (PBS contendo 10% SFB) foi adicionado às placas e incubado por 2h à TA. A seguir, a enzima peroxidase conjugada à avidina diluída (1:100) em PBS 10 foi adicionada às placas e incubada por 1h à TA. Nessas etapas de incubação tanto

com o anticorpo de detecção quanto com o conjugado enzimático, as placas foram cobertas com papel alumínio.

Após esse período, as placas foram lavadas 5x com a solução de lavagem 1 e 3x com PBS pH 7,2. A seguir, foram adicionados 100 µl do substrato AEC (3 amino-9-etil-carbazole) em cada poço. A reação foi interrompida com água filtrada estéril após 30 minutos. Posteriormente, após 18h, as placas foram analisadas e os “spots” contados utilizando-se os programas Image Acquisition e CTL-Immunospot (BD Biosciences) do analisador ImmunoSpot®. A média das duplicatas dos poços foi determinada e normalizada para células formadoras de spots (SFC) por 1×10^6 PBMC. A figura 7 ilustra o princípio da técnica ELISPOT.

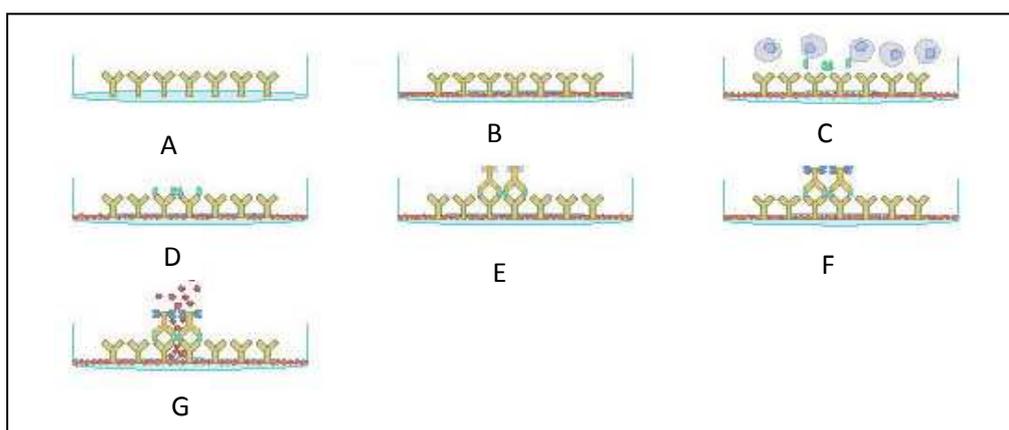


Figura 7. Etapas da técnica ELISPOT.

Fonte: BD Biosciences™

Legenda: A = sensibilização da placa; B = bloqueio; C = Adição de PBMC; D = Citocina capturada; E = Adição do anticorpo biotilado; F = Conjugado enzimático; G = Substrato enzimático

5.4.4 Análise dos Ensaios

Para fins de avaliação das respostas obtidas pelos ensaios de ELISPOT, os seguintes parâmetros foram analisados para identificação dos peptídeos reativos: P1= média do pool peptídeos – 2^* (DP) > média do CN; P2= média do pool peptídeos > média do CN + 2^* DP; P3= média do pool peptídeos – média do CN > 10; P4=P1+P2+P3 positivos; P5= média dos 25% resultados mais reativos pelo P4 + 3^* EPM (erro padrão da média). Assim, um dado *pool* era considerado positivo quando esses cinco parâmetros eram considerados simultaneamente reagentes.

A avaliação dos *pools* reativos através das matrizes de peptídeos NS1 e NS3 possibilitou a identificação de um provável peptídeo como epítipo de célula T. Neste caso, um novo modelo de ensaio de ELISPOT foi utilizado para compor os ensaios individuais de cada peptídeo.

A análise dos ensaios individuais para cada peptídeo obedeceu aos mesmos parâmetros de avaliação dos ensaios em *pools*. Neste caso, nas respectivas fórmulas, substituímos o termo *pool* pelo peptídeo considerado (peptídeo candidato a epítipo).

5.5 Tipagem dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA)

Os pacientes selecionados para triagem individual dos peptídeos candidatos foram submetidos a uma nova coleta de sangue (10 ml) com ácido etilenodiamino tetracético dipotássico (K2-EDTA, 15 mg/ml sangue) para tipagem dos *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 e HLA-DQB1 através da técnica da reação em cadeia da polimerase com sequências de iniciadores específicas (PCR-SSP Unitray®, Invitrogen™) de baixa resolução (BUNCE et al., 1995).

As amostras sanguíneas coletadas em K2-EDTA foram centrifugadas a 200 xg por 2 min, e o sobrenadante foi centrifugado a 1000 xg por 5 min. O sedimento, contendo os leucócitos, foi ressuspenso em uma pequena quantidade de plasma para contagem de células.

5.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de cada amostra foi purificado através da ligação seletiva do DNA a uma membrana à base de sílica na presença de íons caotrópicos conforme recomendações do fabricante (*Purelink™ Genomic DNA kits – Invitrogen™*). As células foram digeridas com proteinase K a 55°C e todo resíduo de RNA removido por digestão com RNase antes de sua ligação à sílica da membrana. O lisado é misturado com etanol e tampão *Purelink™ Genomic Binding* que permite

a elevada ligação de DNA à coluna *Purelink™ Spin*. O DNA liga à membrana de sílica na coluna e as impurezas são removidas através de lavagens com tampões de lavagem. Todo DNA genômico foi então eluído da membrana com tampão de eluição e amplificado através de PCR-SSP.

5.5.2 Amplificação do DNA genômico e eletroforese para identificação alélica

O DNA genômico foi amplificado através do método SSP Unitray® (Invitrogen™) com base na técnica de reação em cadeia da polimerase para seqüências específicas (PCR-SSP) de cada alelo HLA de classe I e de classe II previamente descritas pelo Comitê de Nomenclatura Internacional da Organização Mundial de Saúde (BUNCE et al, 1995). A reação de PCR ocorreu seguindo as seguintes etapas: primeira, 1min a 96°C; segunda, cinco ciclos de 96°C – 25seg, 70°C – 50seg e 72°C – 45seg; terceira, 21 ciclos de 96°C – 25seg, 65°C – 50seg, 72°C – 45seg; quarta, 4 ciclos de 96°C – 25seg, 55 °C de 60seg e 72°C – 120seg; quinta, manutenção a 4°C por tempo específico. Posteriormente, os produtos de PCR foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 2%. O gel foi preparado em tampão TBE 0,5x (Tris base, ácido bórico e EDTA) com 2µl de 10 mg/ml de brometo de etídeo para cada 100 ml de solução de agarose. A separação eletroforética do DNA ocorreu a 100 volts/200mA por 30min. A seguir, o gel foi fotografado e a identificação das bandas analisadas para cada *locus* com o auxílio do software SSP Unitray®.

5.6 Ensaios de afinidade de ligação: peptídeos imunodominantes e alelos HLA-DRB1

Os peptídeos mais freqüentes e candidatos a epítomos de células T foram testados através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura para o gene HLA-DRB1 mediante colaboração com o grupo do Dr. Alessandro Sette do *La Jolla Institute for Allergy and Immunology* (CA, USA). Foram considerados

nesse estudo, onze alelos HLA-DRB1*: 0101; 0301; 0401; 0404; 0405; 0701; 0802; 0901; 1101; 1302; 1501 e seus respectivos peptídeos ligante padrão, previamente descritos por Sidney et al. (1998) e Southwood et al 1998, e apresentados no Quadro 7.

Alelo	Peptídeo padrão
HLA-DRB1*0101	YPKYVKQNTLKLAT
HLA-DRB1*0301	YKTIAFDEEARR
HLA-DRB1*0401	YARFQAQTTLKQKT
HLA-DRB1*0404	YARFQAQTTLQRAV
HLA-DRB1*0405	YARFQAQTTLKQKT
HLA-DRB1*0701	QYIKANSKFIGITE
HLA-DRB1*0802	QYIKANSKFIGITE
HLA-DRB1*0901	QYIKANSKFIGITE
HLA-DRB1*1101	QYIKANSKFIGITE
HLA-DRB1*1302	QYIKANAKFIGITE
HLA-DRB1*1501	VVHFFKNIVTPRTPPY

Quadro 7. Ensaio de ligação moléculas HLA-DRB1 e o seu respectivo peptídeo ligante padrão

Resumidamente, as moléculas DR foram purificadas de fibroblastos transfectados por cromatografia de alta afinidade. As moléculas DR purificadas em concentrações variáveis entre 5 e 500 nM foram incubadas com peptídeos candidatos em várias concentrações e com um peptídeo controle marcado com radioisotopo (15000 cpm, 0,1-1,0 nM) por 48h em PBS contendo 0,05-0,15% de Nonidet P-40 em presença de um coquetel inibidor de protease (SIDNEY et al., 1998). A ligação do HLA ao peptídeo marcado foi determinada por complexos de captura HLA-peptídeo em placas Lumitrac 600 previamente sensibilizadas por anticorpos específicos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemanha). Esta ligação foi

contada por minuto utilizando-se um microcintilador (Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA). A concentração do peptídeo teste necessária para inibir 50% de ligação do peptídeo controle (IC50) foi então determinada. Os peptídeos foram tipicamente testados em seis concentrações diferentes com variações de até 100.000x em três ou mais ensaios independentes.

5.7 Predição dos epítomos reativos de células T

A análise de bioinformática com base em metodologias computacionais avançadas foi realizada utilizando-se a seqüência dos peptídeos das proteínas NS1 e NS3 do sorotipo DENV-3, mais frequentemente reativos nos ensaios de ELISPOT, e portanto, candidatos a epítomos de células T. O *Artificial Neural Network* (ANN) foi o método escolhido para a predição epítomos de células T para os alelos HLA de classe I dos genes A e B através das ferramentas de análise de predição disponíveis no *The Immune Epitope Database 2.0* (IEDB, www.iedb.org) até setembro de 2010, o qual fornece um catalogo de epitopos de celulas T e B experimentalmente caracterizados, bem como experimentos sobre ensaios de ligação de um dado peptídeo ao locus HLA (VITA et al., 2010). O algoritmo de predição foi utilizado para identificar as moléculas HLA com diferentes afinidades para os peptídeos analisados. Peptídeos com valores IC50 previsto < 50 nM, foram considerados de alta afinidade, < 500 nM afinidade intermediária e < 5000 nM baixa afinidade (ZHANG; LUNDEGAARD; NIELSEN, 2009). Em seguida, as previstas moléculas HLA com diferentes afinidades para os peptídeos analisados foram classificadas de acordo com a definição de supertipos de HLA descrito por Sidney et al (2008). Para os alelos HLA de classe II, DRB1, a afinidade foi obtida através do método *consensus* e representada em percentil (VITA et al., 2010).

Convém mencionar que os algoritmos disponíveis para determinação da afinidade de peptídeos ligantes para o gene C de classe I e os genes DP e DQ de classe II, ainda estão em fase muito preliminar. Portanto, nós consideramos nesta predição os alelos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1.

5.8 Análise Estatística

Análise de associação entre os diferentes grupos: tipo de infecção: (primária x secundária); formas clínicas: (DC x DCC x FHD); frequência de um dado alelo HLA e a resposta aos ensaios de ELISPOT aos peptídeos virais (positivo x negativo) foi realizada através do teste de Fisher ou do teste do qui-quadrado para análise multivariada e de regressão logística. Os resultados incluíram o valor p e a “odds ratios” (OR). O valor de p indica a evidência para rejeitar a hipótese nula de OR=1 (sem associação). A OR reproduzida é a probabilidade condicional máxima estimada [conditional maximum likelihood (CML) estimate].

Em acréscimo, o efeito combinado entre a presença de um dado alelo HLA e a resposta positiva para um dado peptídeo nos ensaios de ELISPOT influenciando a gravidade da doença através de um modelo de regressão logística foi realizado. Neste caso, a gravidade da doença (DC x DCC) foi considerada como a variável resposta, e o alelo HLA (presente ou ausente) e a resposta ELISPOT ao peptídeo (positiva x negativa) como variáveis preditoras, seguindo a formulação padrão: log-odds da DCC = $\beta_0 + \beta_1|presença + \beta_2|positivo + \beta_3|presença:positivo$, onde I_x é uma variável binária, a qual tem o valor 1 se o evento X ocorrer e 0 se o evento X não ocorre. Assim, considerando cada alelo A e o peptídeo P, temos: log-odds de DCC = β_0 se o paciente não tem A e P é negativo; log-odds de DCC = $\beta_0 + \beta_1$ se o paciente tem A e P é negativo; log-odds de DCC = $\beta_0 + \beta_2$ se o paciente não tem A e P é positivo; log-odds de DCC = $\beta_0 + \beta_1 + \beta_2 + \beta_3$ se o paciente tem A e P é positivo. Portanto, o efeito combinado é dado pelo $\beta_3 \neq 0$; sendo $\beta_3 > 0$, indicador de aumentar o risco de dengue hemorrágica; e $\beta_3 < 0$, indicador de diminuir o risco de gravidade da doença. O valor p corresponde ao teste do qui-quadrado para o coeficiente β_3 .

A associação existente entre a resposta dos ensaios de ELISPOT a um dado peptídeo e a afinidade de ligação ao gene HLA-DRB1 foi realizada através do coeficiente de *Pearson* e teste monocaudal. A IC50 foi normalizada para cada alelo subtraindo-se o valor da afinidade obtida por um número extremamente grande, resultando em novo valor diretamente proporcional com maior afinidade de ligação, com zero significando nenhuma afinidade. Para cada peptídeo nós avaliamos o perfil de afinidade dos nove alelos (01, 03, 04, 07, 08, 09, 11, 13 e 15) com o valor normalizado e o perfil de resposta positiva aos nove alelos, ou seja, um vetor de

proporção cuja razão é o número de pacientes positivos para o alelo em questão/total de pacientes. Como nossa tipagem HLA foi realizada em baixa resolução (dois dígitos), os dados de afinidade estavam contidos para valores finais “01” (0101, 0301, etc), com exceção para os alelos 0401, 0404 e 0405, para os quais utilizamos a mediana das três afinidades.

Todos os dados foram compilados e todas as análises realizadas utilizando-se o software estatístico *R* versão 2.5 (IHAHA; GENTLEMAN, 1996).

5.9 Aspectos éticos

O presente trabalho é um subprojeto da proposta “Identificação de marcadores biológicos preditivos de respostas clínicas ao dengue através de análise proteômica” envolvendo o CPqAM/FIOCRUZ (Brasil) e a Johns Hopkins University (EUA). Desta forma, os indivíduos participantes deste estudo (ou seus responsáveis legais) foram selecionados e convidados a participar desta pesquisa mediante termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) - (APÊNDICE B), elaborado de acordo com os procedimentos éticos, aprovado através do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/FIOCRUZ nº 07/2007 (ANEXO A) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP – nº 4909 (ANEXO B) – do Ministério da Saúde do Brasil. Em acréscimo, devida à cooperação estrangeira existente entre o Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LAViTE), Recife, Brasil e a Universidade Johns Hopkins, em Baltimore, Maryland, Estados Unidos, os aspectos éticos desta proposta também foram revisados conforme protocolo JHM-IRB-3: 03-08-27-1.

6 RESULTADOS

6.1 Seleção dos peptídeos entre os ensaios de *pools*

6.1.1 Caracterização da população de estudo

O mapeamento de epítomos de células T das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 iniciou com a realização de ensaios de ELISPOT para IFN- γ utilizando-se peptídeos sintéticos agrupados em *pools* em formato de matrizes. Setenta e seis peptídeos de NS1 agrupados em 18 *pools* (matriz 9x9) e cento e cinquenta peptídeos de NS3 agrupados em 25 *pools* (matriz 12x13) foram utilizados para triagem em cinquenta e dois ($n = 52$) pacientes DENV-3 positivos. Entretanto, os ensaios ($n = 32$) com elevada resposta inespecífica (*background*), positivos a apenas um único *pool*, com número de células insuficiente ou em baixa viabilidade ou ainda sem resposta específica, foram excluídos deste estudo.

Assim, vinte ensaios ($n=20$) que obtiveram ao menos dois *pools* positivos e que permitiram identificar o provável peptídeo reativo através da matriz, foram reunidos e os peptídeos mais frequentemente reativos nestes ensaios, selecionados para teste individual. Dentro dessa amostragem, a idade dos pacientes esteve compreendida entre 08 e 69 anos, sendo 60% do sexo masculino e 40% do sexo feminino. Além disso, oito pacientes foram classificados como portadores da dengue clássica, nove com a forma clássica complicada e três com a forma hemorrágica da doença. Entre estes, doze apresentaram infecção primária e oito a infecção secundária. A Tabela 1 mostra as características demográficas dos pacientes selecionados para o mapeamento de epítomos em *pools*.

Tabela 1 Características da população de estudo (n=20) utilizada para triagem do mapeamento de epítomos através de matrizes de peptídeos em *pools*

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Tipo de Infecção
339	61	F	FHD	Primária
347	39	M	DC	Secundária
355	58	M	DCC	Primária
361	15	M	DC	Secundária
372	23	M	DC	Primária
382	27	M	DC	Secundária
394	8	M	DCC	Primária
400	47	M	DCC	Primária
402	13	M	DCC	Primária
405	12	M	DCC	Primária
406	10	F	DCC	Primária
411	37	F	DC	Primária
420	37	F	FHD	Secundária
428	69	M	FHD	Secundária
436	12	F	DC	Secundária
446	13	M	DC	Secundária
559	33	F	DCC	Primária
571	24	F	DCC	Primária
582	41	M	DC	Secundária
608	34	F	DCC	Primária

Nota: DC=Dengue Clássica; DCC=Dengue Clássica Complicada; FHD= Febre Hemorrágica da Dengue

6.1.2 Peptídeos

A identificação dos *pools* reativos observando-se os cinco parâmetros considerados (item 5.4.4) e a análise de intersecção desses *pools* através da matriz de peptídeos permitiu-nos enumerar os peptídeos mais frequentes dentro dessa população de estudo. Desta forma, vinte dois (n=22) peptídeos da proteína NS1 com frequência maior ou igual a 10% nos ensaios ELISPOT (Figura 8A) e vinte e um (n=21) peptídeos de NS3 com frequência maior ou igual a 25% nestes ensaios (Figura 8B) foram considerados potenciais candidatos a epítomos de células T e tiveram, portanto, sua imunogenicidade testada individualmente.

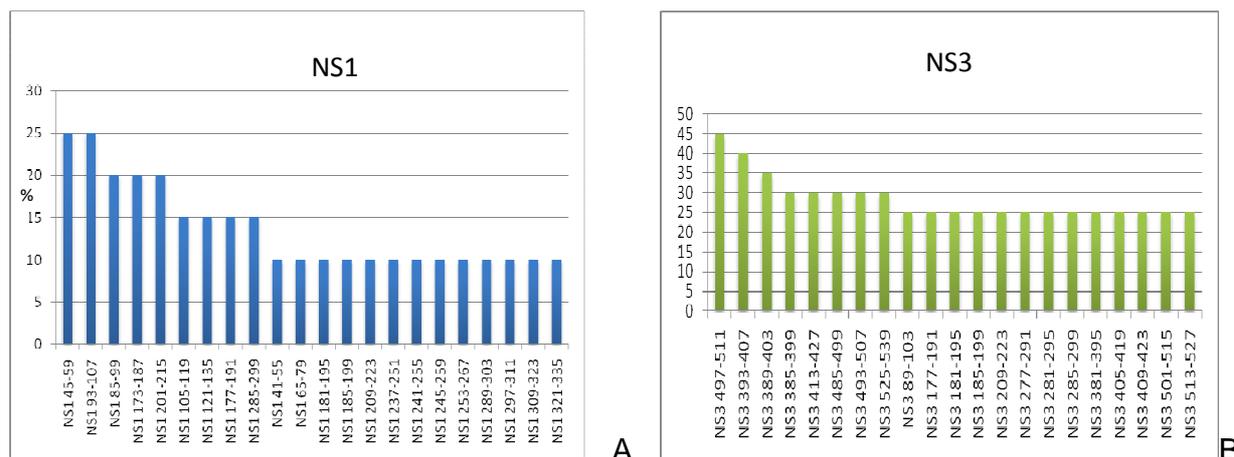


Figura 8. Frequencia dos peptídeos da proteína NS1 (A) e NS3 (B) selecionados através de matriz para teste individual

6.2. Seleção dos peptídeos em ensaios individuais

6.2.1 Caracterização da população de estudo

Os peptídeos candidatos a epítopos de células T tiveram sua reatividade testada individualmente através de ELISPOT para IFN- γ entre cinquenta e dois ($n = 52$) pacientes caracterizados como dengue positivo para o sorotipo 3. A idade dos pacientes esteve entre 05 e 42 anos. Nenhum caso de FHD foi comprovadamente determinado conforme critérios da OMS (1999). Entretanto, doze pacientes foram categorizados como dengue clássica complicada (DCC), os quais apresentavam sintomatologia da dengue clássica acompanhada com manifestações hemorrágicas e trombocitopenia $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Não houve diferença significativa entre os sexos, sendo 25 pacientes femininos e 27 pacientes masculinos, e a maioria dos pacientes ($n=33$) apresentaram infecções secundárias. A Tabela 2 apresenta as características demográficas destes pacientes.

Tabela 2. Características da população de estudo (n=52) utilizada para o mapeamento de epítomos os peptídeos candidatos

(continua)

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Tipo de Infecção
641	7	F	DC	Primária
721	6	M	DCC	Primária
750	5	F	DC	Primária
751	25	F	DCC	Primária
760	6	M	DC	Primária
764	9	F	DCC	Primária
765	30	F	DC	Secundária
770	10	M	DC	Primária
775	12	M	DC	Secundária
776	7	M	DCC	Secundária
777	11	M	DC	Inconclusiva
778	7	M	DCC	Inconclusiva
784	7	F	DCC	Secundária
787	19	F	DC	Primária
788	11	F	DC	Secundária
790	6	M	DC	Secundária

Tabela 2. Características da população de estudo (n=52) utilizada para o mapeamento de epítomos os peptídeos candidatos

(continua)

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Tipo de Infecção
792	41	M	DC	Secundária
799	12	F	DC	Primária
800	9	M	DCC	Secundária
801	6	M	DC	Secundária
802	11	F	DC	Secundária
803	ND	F	DC	Secundária
804	ND	M	DC	Secundária
805	8	M	DC	Primária
807	10	F	DC	Primária
809	5	M	DC	Primária
810	28	M	DC	Secundária
811	6	F	DCC	Secundária
813	32	F	DC	Secundária
814	11	M	DCC	Primária
819	5	F	DC	Secundária
820	9	F	DC	Secundária

Tabela 2. Características da população de estudo (n=52) utilizada para o mapeamento de epítomos os peptídeos candidatos (cont)

(continua)

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Tipo de Infecção
821	8	M	DC	Secundária
823	13	F	DC	Secundária
826	8	M	DC	Secundária
827	12	F	DC	Primária
828	12	M	DC	Secundária
829	12	F	DC	Primária
830	6	M	DCC	Primária
832	7	F	DC	Secundária
833	13	F	DC	Secundária
835	9	F	DC	Primária
837	42	M	DC	Secundária
839	12	F	DC	Secundária
842	12	M	DC	Secundária
843	6	M	DC	Secundária
846	13	M	DC	Secundária
847	8	M	DCC	Secundária

Tabela 2. Características da população de estudo (n=52) utilizada para o mapeamento de epítomos os peptídeos candidatos (cont)

(conclusão)

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Tipo de Infecção
849	12	M	DCC	Secundária
850	11	M	DC	Secundária
853	8	F	DC	Secundária
856	13	F	DC	Secundária

Nota: DC=Dengue Clássica; DCC=Dengue Clássica Complicada; ND=não determinado

6.2.2 Peptídeos da proteína NS1

Analisando esta nova população de estudo, a resposta positiva nos ensaios de ELISPOT a pelo menos um peptídeo ocorreu em 73% (n=38) dos pacientes utilizando-se os 22 peptídeos candidatos da proteína NS1. Desta forma, os peptídeos com frequência superior ou igual a 15% (n=16), considerando-se apenas os ensaios reativos (n=38) foram propostos como potenciais epítomos de células T (Figura 9).

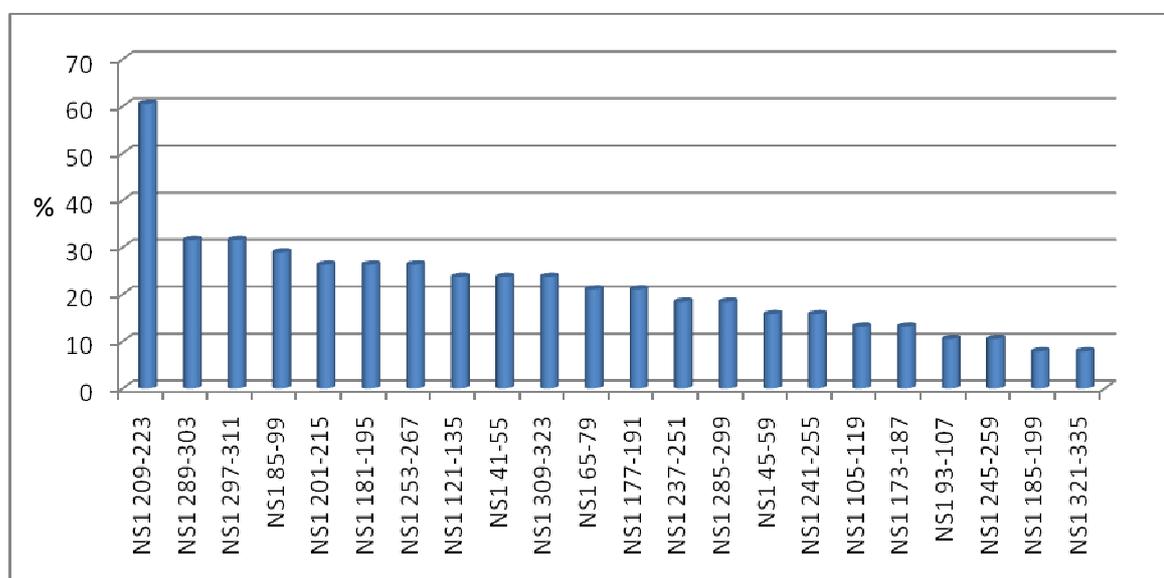


Figura 9. Frequência dos peptídeos da proteína NS1 considerando-se os ensaios individuais

6.2.3 Peptídeos da proteína NS3

De forma semelhante, avaliando-se a resposta positiva aos ensaios realizados com os 21 peptídeos candidatos da proteína NS3, 57,7% (n = 30) dos pacientes foram responsivos a pelo menos um peptídeo. Assim, os peptídeos com frequência superior ou igual a 20% (n = 14), considerando-se apenas os ensaios reativos (n = 30) foram propostos como potenciais epítomos de células T (Figura 10).

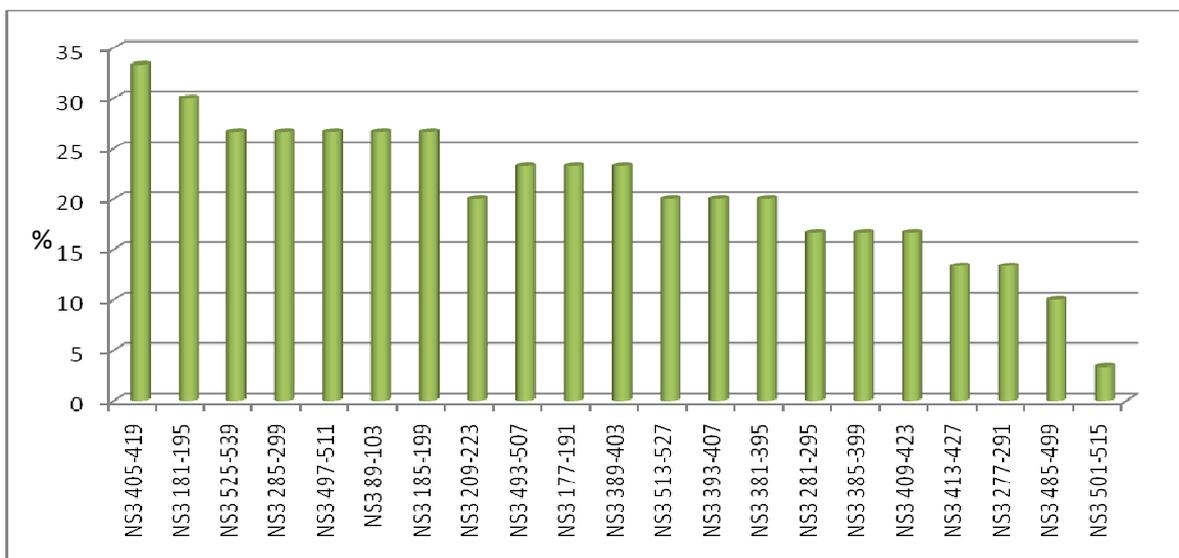


Figura 10. Frequência dos peptídeos da proteína NS3 considerando-se os ensaios individuais

6.3 Identificação dos antígenos leucocitários humanos (HLA)

Uma das características dos epítomos de células T é que eles devem ser processados por outra célula e apresentados através de moléculas MHC. Desta forma, entre a população de estudo utilizada para triagem dos peptídeos individualmente ($n = 52$), quarenta e três ($n = 43$) pacientes tiveram seus haplótipos HLA tipados para os *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 e HLA-DQB1 através da técnica de PCR-SSP de baixa resolução. Infelizmente, nove pacientes não foram localizados para um novo recrutamento de amostras e foram excluídos de nosso estudo.

Dentro da nossa população de estudo, os alelos mais frequentes foram HLA-A*02 ($n=18$), HLA-B*08 ($n=08$), HLA-C*07 ($n=21$), HLA-DRB1*07 ($n=11$) e HLA-DQB1*03 ($n=18$). A tabela 3 apresenta os resultados da tipagem HLA desses pacientes.

Tabela 3. Tipagem dos *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 dos pacientes (n=43) utilizados na triagem individual dos peptídeos candidatos a epítomos de células T

(continua)

Paciente	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*		HLA-DRB1*		HLA-DQB1*	
641	23	31	7	15	7	7	7	8	2	4
721	2	33	41	45	16	17	3	ND	4	6
750	2	74	45	ND	4	45	8	13	3	4
751	30	31	39	ND	7	15	8	15	4	6
760	34	ND	14	40	8	8	7	7	2	ND
764	2	24	45	51	15	16	10	13	5	6
765	2	68	50	51	6	15	8	13	3	6
770	3	30	ND	ND	4	5	13	13	6	ND
775	23	66	44	58	4	6	7	15	2	6
776	1	26	8	38	7	12	7	7	2	3
778	1	2	8	8	7	ND	3	3	2	ND
784	2	11	15	51	3	15	4	9	3	3
787	26	31	40	41	3	7	4	11	2	3
788	2	29	15	58	6	8	11	13	3	6
790	24	31	40	51	15	15	4	4	3	3
799	2	68	51	ND	4	16	13	13	3	5
801	2	30	15	35	4	14	14	14	3	3
802	24	ND	18	44	5	ND	3	3	2	3
804	24	31	39	ND	3	7	4	8	3	4
805	11	25	7	18	7	12	15	16	5	6
807	2	29	51	ND	4	4	8	13	4	6
809	1	11	13	57	6	ND	7	7	2	ND

Tabela 3. Tipagem dos *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 dos pacientes (n=43) utilizados na triagem individual dos peptídeos candidatos a epítomos de células T

(conclusão)

Paciente	HLA-A*		HLA-B*		HLA-C*		HLA-DRB1*		HLA-DQB1*	
810	1	31	15	41	7	16	4	8	3	4
811	2	24	27	58	7	7	4	7	2	3
813	2	68	7	39	7	7	8	13	4	6
814	66	68	15	58	3	6	13	15	3	6
819	2	3	48	51	4	15	1	4	3	5
820	2	3	48	51	4	15	1	4	3	5
821	1	2	8	14	7	8	1	7	2	5
826	24	34	18	44	5	ND	3	4	2	3
827	68	ND	14	40	3	8	1	1	5	ND
828	1	2	15	58	3	4	4	13	3	6
829	3	29	7	13	6	7	1	9	2	5
830	24	68	8	51	7	16	7	0	2	ND
833	24	ND	8	50	6	7	7	13	2	ND
835	2	31	38	39	7	12	4	8	4	ND
842	2	23	15	56	1	2	1	7	2	5
846	1	24	8	15	7	ND	14	15	3	6
847	30	32	7	8	7	7	14	15	6	ND
849	30	31	8	35	4	7	3	8	2	4
850	1	29	7	44	7	16	7	15	2	6
853	23	68	49	51	7	15	8	9	3	3
856	3	24	7	18	5	7	5	15	2	6

Nota: Tipagem HLA realizada através de PCR-SSP de baixa resolução. ND=não determinado

6.3.1 Classificação dos antígenos leucocitários humanos em supertipos

Posteriormente, em atenção à classificação proposta por Sidney et al., (2008), nós também classificamos os alelos HLA-A e HLA-B de classe I em supertipos (Tabela 4). Nesta classificação, os supertipos HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*07 e HLA-B*44 foram os mais freqüentes dentro da população de estudo.

Tabela 4. Classificação dos alelos HLA-A e HLA-B em supertipos

(continua)

Paciente	Supertipos HLA-A				Supertipos HLA-B			
	Alelo 1	Supertipo	Alelo 2	Supertipo	Alelo 1	Supertipo	Alelo 2	Supertipo
641	23	24	31	3 / SC	7	7 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC
721	2	2	33	3 / SC	41	44 / SC	45	44 / SC
750	2	2	74	3	45	44 / SC	ND	ND
751	30	1 / 3 / SC	31	3 / SC	39	27 / SC	ND	ND
760	34	3 / SC	ND	ND	14	27 / SC	40	44 / SC
764	2	2	24	24 / SC	45	44 / SC	51	7 / SC
765	2	2	68	2 / 3 / SC	50	44	51	7 / SC
770	3	3	30	1 / 3 / SC	ND	ND	ND	ND
775	23	24	66	3	44	7 / 44 / 62 / SC	58	58
776	1	1	26	1 / SC	8	8 / SC	38	7 / 27 / SC
778	1	1	2	2	8	8 / SC	0	8 / SC
784	2	2	11	3	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	51	7 / SC
787	26	1	31	1 / 3 / SC	40	27 / 44 / SC	41	44 / SC
788	2	2	29	1 / 24 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	58	58
790	24	24 / SC	31	3 / SC	40	44 / SC	51	7 / SC
799	2	2	68	2 / 3 / SC	51	7 / SC	ND	ND
801	2	2	30	1 / 3 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	35	7 / 27 / 62 / SC
802	24	24 / SC	ND	ND	18	44 / SC	44	7 / 44 / 62 / SC
804	24	24 / SC	31	1 / 3 / SC	39	27 / SC	ND	ND
805	11	3	25	1	7	7 / SC	18	44 / SC
807	2	2	29	1 / 24 / SC	51	7 / SC	ND	ND
809	1	1	11	3	13	62 / SC	57	58
810	1	1	31	1 / 3 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	41	44 / SC
811	2	2	24	24 / SC	27	27 / SC	58	58
813	2	2	68	2 / 3 / SC	7	7 / SC	39	27 / SC
814	66	3	68	2 / 3 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	58	58
819	2	2	3	3	48	SC	51	7 / SC
820	2	2	3	3	48	SC	51	7 / SC
821	1	1	2	2	8	8 / SC	14	27 / SC

Tabela 4. Classificação dos alelos HLA-A e HLA-B em supertipos

(conclusão)

Paciente	Supertipos HLA-A				Supertipos HLA-B			
	Alelo 1	Supertipo	Alelo 2	Supertipo	Alelo 1	Supertipo	Alelo 2	Supertipo
826	24	24 / SC	34	3 / SC	18	44 / SC	44	7 / 44 / 62 / SC
827	68	2 / 3 / SC	ND	ND	14	27 / SC	40	27 / 44 / SC
828	1	1	2	2	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	58	58
829	3	3	29	1 / 24 / SC	7	7 / SC	13	SC
830	24	24 / SC	68	2 / 3 / SC	8	8 / SC	51	7 / SC
833	24	24 / SC	ND	ND	8	8 / SC	50	44
835	2	2	31	1 / 3 / SC	38	7 / 27 / SC	39	27 / SC
842	2	2	23	24	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC	56	7 / SC
846	1	1	24	24 / SC	8	8 / SC	15	7 / 27 / 44 / 58 / 62 / SC
847	30	1 / 3 / SC	32	1	7	7 / SC	8	8 / SC
849	30	1 / 3 / SC	31	1 / 3 / SC	8	8 / SC	35	7 / 27 / 62 / SC
850	1	1	29	1 / 24 / SC	7	7 / SC	44	7 / 44 / 62 / SC
853	23	24	68	2 / 3 / SC	49	44 / SC	51	7 / SC
856	3	3	24	24 / SC	7	7 / SC	18	44 / SC

Nota: Esta classificação esta de acordo com Sidney et al. (2008).

Legenda: ND=não determinado. SC=sem classificação

6.4 Associação entre o peptídeo e o HLA

Para verificarmos se existe associação entre a presença de um dado alelo HLA e a resposta positiva ao peptídeo nos ensaios de ELISPOT, nós analisamos o tipo de resposta dos 30 peptídeos candidatos (16 peptídeos de NS1 e 14 peptídeos de NS3) nos ensaios ELISPOT (positiva x negativa) e a presença de cada alelo dentro da população de estudo (n=40). Entre os 43 pacientes genotipados e utilizados na triagem individual dos peptídeos candidatos, 3 apresentaram resposta negativa a todos os 30 peptídeos e foram excluídos deste estudo. Os resultados foram expressos através de uma probabilidade condicional máxima estimada (CML), representada aqui pela *odds ratio* (OR). O teste bicaudal de Fisher foi utilizado para $OR \neq 1$ e o valor de p foi indicado em cada caso (Tabela 5).

Tabela 5. Associação entre a resposta peptídica e a presença do alelo HLA

(continua)

Peptídeo Sequência	Pacientes Respondedores	Associação HLA (Supertipos)	Odds ratio (CML)
NS1_41_55_RLATAIAGAWENGVC	P641, P760, P787, P788, P804, P827, P842, P849, P853	HLA-A*23 (A24)	OR = 12,96 p=0,028
		HLA-B*40 (B27,B44,SC)	OR = 11,47 p=0,036
		HLA-C*8 (desconhecido)	OR = 11,21 p=0,038
NS1_65_79_NLLWKQIANELNYIL	P775, P787,P788, P804, P826, P828, P842, P853	HLA-A*23 (A24)	OR = 12,96 p=0,028
NS1_85_99_KLTVVVGDIIGVLEQ	P641, P751, P760, P787, P801, P826, P828, P829, P835, P849, P853	HLA-A*31 (A01,03, SC)	OR = 5,27 p=0,033
NS1_121_135_AKIVTAETQNSSFII	P751, P760, P787, P788, P804, P809, P826, P835, P853	HLA-A*34 (A03,SC)	OR =Inf, p=0,048
		HLA-B*39 (B27,SC)	OR = 12,52, p=0,030
NS1_209_223_SWKLEKASLIEVKTC	P760, P778, P787, P799, P804,P807,P809,P810,P811,P819, P820,P821, P826, P830, P833, P842,P846,P847,P849,P850,P853,P856	HLA-B*8 (B08,SC)	OR = 6,85 p=0,047
NS1_285_299_VITENCGTRGPSLR	P760, P788, P804, P811, P826, P828, P853	HLA-A*34 (A03, SC)	OR = Inf p=0,027
		HLA-B*58 (B58)	OR =8,45, p=0,035
NS3_177_191_PELEEEMFKRNLTI	P760, 787, P788, P790, P802, P842, P853	HLA-B*40 (B44, SC)	OR=15,18 p=0,020

Tabela 5. Associação entre a resposta peptídica e a presença do alelo HLA

(conclusão)

Peptídeo Sequência	Pacientes Respondedores	Associação HLA (Supertipos)	Odds ratio (CML)
NS3_185_199 - KKRNLTIMDLHPGSG	P775, P787, P788, P790, P802, P809, P814, P853	HLA -A*66 (A03) HLA-C*06 (desconhecido) HLA-DR*11	OR=Inf p=0,037 OR=7,36 p=0,021 OR=Inf p=0,030
NS3_209_223_VREAIKRRRLTLILA	P751, P760, P787, P788, P802, P819, P853	HLA-DR*11	OR=Inf p=0,025
NS3_285_299_DEAHFTDPASIAARG	P760, P775, P787, P788, P790, P799, P811, P828	HLA-B*40 (B44, SC) HLA-B*58 (B58)	OR=13,74 p=0,025 OR=19,80 p=0,005
NS3_381_395_KKVIQLSRKTFDTEY	P787, P760, P788, P804, P811, P853	HLA-DR*11 (DR11)	OR=Inf p=0,021
NS3_525_539_RLKGESRKTFFVELMR	P750, P760, P765, P775, P787, P788, P804, P811	HLA-B*58 (B58) HLA-DR*11	OR=7,58 p=0,044 OR=Inf p=0,040

Nota: OR=*odds ratio*; Inf= infinito. OR=Inf: A probabilidade máxima de apresentação peptídeo:HLA não pode ser estimada com precisão devido ao pequeno valor amostral, o que ocasiona falta de observações em algumas das posições na matriz 2x2.

6.5 Associação entre o peptídeo e a forma clínica da doença

Verificou-se a existência de associação entre a resposta positiva ao peptídeo e a gravidade da doença. Contudo, entre a população utilizada para os ensaios individuais não havia casos de FHD. Assim, consideramos aqui gravidade da doença os casos de DCC. A OR (CML) e o respectivo valor de p foram gerados através de uma tabela de contingência 2x2. A análise dos resultados revelou que apenas o peptídeo NS1_297_311 mostrou associação significativa com a gravidade da doença ($p=0,041$; $OR=5.417$).

Convém mencionar que foi também verificada a associação entre a resposta positiva ao peptídeo candidato e o tipo de infecção (primária x secundária). Contudo, nenhuma associação significativa foi encontrada.

6.6 Efeito combinado do peptídeo:HLA na severidade da doença

6.6.1 Forma clínica

Com o objetivo de avaliar se o efeito combinado peptídeo:HLA influencia a gravidade da doença, foi investigada a interação desses dois fatores favorecendo ou diminuindo o risco de desenvolver a dengue complicada. Neste sentido, foi construído um modelo de regressão logística tendo a gravidade da doença como variável resposta (log-odds para DCC), e o alelo HLA (presença x ausência) e a resposta ao peptídeo (positiva x negativa) nos ensaios de ELISPOT como variáveis preditoras. O valor de p e o log-odds ratio para DCC estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA na severidade da doença

(continua)

Peptídeo – Sequência	Associação HLA	Log odds-ratio para DCC
NS1_41_55 -RLATAIAGAWENGVC	HLA-B*35	Log OR= 34,70, p<0,04
	HLA-C*04	Log OR=38,81, p<0,003
NS1 45-59 - AIAGAWENGVCGIRS	HLA-A*31	Log OR=18,27, p<0,045
	HLA-B*39	Log OR=54,62, p<0,010
NS1_85_99 - KLTVVVGDIIIGVLEQ	HLA-A*31	Log OR=17,52, p<0,044
	HLA-DR*8	Log OR=17,96, p<0,039
	HLA-DQ*4	Log OR=18,11, p<0,049
NS1 177-181- QLCDHRLMSAAVKDE	HLA-A*24	Log OR=18,88, p<0,024
NS1_237_251 - LESDMIIPKSLAGPI	HLA-A*30	Log OR= - 34,97, p<0,049
NS1 201-215 -WIESQKNGSWKLEKA	HLA-B*39	Log OR=36,20, p<0,041
	HLA-B*58	Log OR=33,93, p<0,046
NS1 297-311 - SLRTTVSGKLIHEW	HLA-C*06	Log OR=34,09, p<0,049
	HLA-DQ*06	Log OR=18,65, p,0,032
	HLA-A*24	Log OR=18,00,p<0,048
NS1 289_303- ENCGTRGPSLRTTV	HLA-A*24	Log OR=18,00,p<0,048

Tabela 6. Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA na severidade da doença

(conclusão)

Peptídeo – Sequência	Associação HLA	Log odds-ratio para DCC
NS1_309_323-HEWCCRSTLPPLRY	HLA-A*24	Log OR=35,05, p<0,005
NS3_89_103_WQKGEEVQVIAVEPG	HLA-A*24	Log OR=18,63, p<0,032
NS3_181_195 –EEMFKRNLTIMDLH	HLA-A*24	Log OR=18,88, p<0,024
NS3_209_223 – VREAIKRRLRTLILA	HLA-B*39	Log OR=54,67, p<0,007
NS3_285_299- DEAHFTDPASIAARG	HLA-C*07	Log OR=36,61, p <0,019
NS3_405_419– FVVTTDISEMGANFK	HLA-A*31	Log OR=19,00, p<0,022
	HLA-B*39	Log OR=54,80, p<0,004
	HLA-DQ*04	Log OR=18,93, p<0,023
NS3_493_507 – KMLLDNINTPEGIIP	HLA-A*11	Log OR=34,36, p<0,025
NS3_497_511 - DNINTPEGIIPALFE	HLA-A*11	Log OR=34,61, p<0,020
	HLA-B*51	Log OR=18,95, p<0,023
	HLA-C*15	Log OR=18,44, p<0,038
	HLA-DQ*03	Log OR=17,47, p<0,043

6.6.2 Tipo de infecção

Para avaliar se o fato de um indivíduo ter tido contato prévio com a sequência candidata (infecção secundária) influencia a apresentação desta sequência pelo alelo HLA considerado na gravidade da doença, nós construímos um modelo de regressão logística tendo como variável resposta a influência da infecção secundária na gravidade da doença (log-odds da infecção secundária), e o alelo HLA (presença x ausência) e a resposta ao peptídeo (positiva x negativa) nos ensaios de ELISPOT como variáveis preditoras. O valor de p e o log-odds ratio para infecção secundária estão indicados na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA no *status* da infecção

(continua)

Peptídeo – Sequência	Associação HLA	Log Odds Ratio para Infecção Secundária
NS1_41_55 - RLATAIAGAWENGVC	HLA-B*40	Log OR= - 34,83, p=0,049
NS1 45-59 - AIAGAWENGVCGIRS	HLA-B*14	Log OR=34,62, p=0,017
	HLA-C*08	Log OR=18,24, p=0,044
NS1_85_99 - KLTVVVGDIIGVLEQ	HLA A*31	Log OR= - 17.36, p=0.045
	HLA C*04	Log OR=18.11, p0.012
NS1_121_135 - AKIVTAETQNSSFII	HLA-A*01	Log OR = - 34,44, p=0,036
NS1 177-181- QLCDHRLMSAAVKDE	HLA-A*34	Log OR = - 34,39, p=0,046
NS1 181_195_HRLMSAAVKDERAVH	HLA-C*04	Log OR=17,52, p=0,030
NS1 65-79 - NLLWKQIANELNYIL	HLA-A*26	Log OR= - 35,45, p=0,022
	HLA-B*41	Log OR = -35,23, p=0,027
NS1 201-215- WIESQKNGSWKLEKA	HLA-C*06	Log OR=18,04, p=0,032
NS1 209-223 – SWKLEKASLIEVKTC	HLA-B*51	Log OR= - 17,68, p=0,021
	HLA-DR*01	Log OR=34,34, p=0,020
	HLA-DQ*05	Log OR=17,39, P=0,042

Tabela 7. Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA no *status* da infecção

(continua)

Peptídeo – Sequência	Associação HLA	Log Odds Ratio para Infecção Secundária
NS1_241-255 - MIIPKSLAGPISQHN	HLA-A*68	Log OR= 18,14, p=0,038
NS1_253-267_QHNHRPGYHTQTAGP	HLA-C*4	Log OR= - 18,23, p=0,029
NS1_309_323-HEWCCRSTLPPLRY	HLA-A*24	Log OR= - 18,25, p=0,037
NS1_289_303- ENCGTRGPSLRITTV	HLA-A*03	Log OR= - 32,91,p=0,044
	HLA-A*29	Log OR= - 33,00, p=0,025
	HLA-B*51	Log OR= - 19,16, p=0,006
	HLA-C*03	Log OR= 18,61, p=0,019
	HLA-C*16	Log OR= - 34,89, p=0,028
NS1_297-311 - SLRTTTVSGKLIHEW	HLA-B*07	Log OR=18,13, p=0,018
	HLA-C*07	Log OR=3,23, p=0,015
	HLA-C*15	Log OR= - 35,04, p=0,021
NS3_89_103 - WQKGEEVQVIAVEPG	HLA-B*58	Log OR=18,02, p=0,044
NS3_181_195- EEMFKRNLTIMDLH	HLA-A*01	Log OR= - 34,99, p=0,022
NS3_185_199- KKRNLTIMDLHPGSG	HLA-A*01	Log OR= - 35,22, p=0,018
	HLA-C*03	Log OR= - 18,07, p=0,043
NS3_209_223 - VREAIKRRRLTLILA	HLA-A*30	Log OR= - 33,10,p=0,040
NS3_285_299- DEAHFTDPASIAARG	HLA-B*58	Log OR=35,72,p=0,017

Tabela 7. Efeito combinado da resposta positiva ao peptídeo candidato e o genótipo HLA no *status* da infecção

(conclusão)

Peptídeo – Sequência	Associação HLA	Log Odds Ratio para Infecção Secundária
NS3_393_407-TEYQKTKLNDWDFVV	HLA-C*06	Log OR=17,98,p=0,039
NS3_405_419 - FVVTTDISEMGANFK	HLA-B*15	Log OR=17,97,p=0,046
NS3_497_511 – DNINTPEGIIPALFE	HLA- A*11	Log OR= 33,99,p=0,028
NS3_525_539-RLKGESRKTVELMR	HLA-C*06	Log OR=18,21, p=0,017

6.7 Avaliação dos ensaios de afinidade de ligação ao gene HLA-DRB1

Os peptídeos das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 mais frequentemente encontrados entre os pacientes com dengue tiveram sua afinidade de ligação aos alelos HLA-DRB1 testada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura. A concentração do peptídeo teste necessária para inibir 50% de ligação do peptídeo controle (IC50) foi determinada em 1000 nM.

A Tabela 8 apresenta a afinidade de ligação entre um dado peptídeo da proteína NS1 do DENV-3 e onze alelos HLA-DRB1 (0101, 0301, 0401, 0404, 0405, 0701, 0802, 0901, 1101, 1302, 1501). Quanto menor o valor da IC50, maior a afinidade de ligação entre o peptídeo teste e o alelo considerado. Portanto, uma concentração muito baixa deste peptídeo teste é suficiente para inibir a ligação do peptídeo controle com o respectivo alelo. Em negrito, destacamos os peptídeos com forte afinidade de ligação com o alelo em questão.

Tabela 8. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS1 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS1-41-55	RLATAIAGAWENGVC	4226	-	15339	-	10306	-	-	7332	-	-	9145
Den3-Brazil-NS1-45-59	AIAGAWENGVCGIRS	400	-	1162	9619	12203	2776	-	1724	7871	2875	8064
Den3-Brazil-NS1-65-79	NLLWKQIANELNYIL	13517	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Den3-Brazil-NS1-85-99	KLTVVVVDIIGVLEQ	56	533	88	2664	1400	70	210	42	807	483	21
Den3-Brazil-NS1-93-107	IIGVLEQ GKRTLTPQ	234	3932	15362	-	-	483	296	1649	16640	-	1002
Den3-Brazil-NS1-105-119	TPQPMEKYSWKTWG	290	3912	9732	18480	-	5943	927	1849	393	8918	56
Den3-Brazil-NS1-121-135	AKIVTAETQNSSFII	355	1011	11	1029	1103	2558	45	2183	-	1105	2923
Den3-Brazil-NS1-173-187	EVYTQLCDHRLMSAA	26	787	502	1288	1449	1658	900	608	651	4598	1040
Den3-Brazil-NS1-177-191	QLCDHRLMSAAVKDE	183	2827	4489	617	684	6136	4578	300	7463	10066	817
Den3-Brazil-NS1-181-195	HRLMSAAVKDERAVH	518	9513	1229	116	569	13186	5858	1733	-	-	1428
Den3-Brazil-NS1-185-199	SAAVKDERAVHADMG	211	979	605	16906	7430	9099	6001	1880	-	8797	8519
Den3-Brazil-NS1-201-215	WIESQKNGSWKLEKA	477	4593	318	4755	17388	6814	527	6783	1806	6205	1575

Tabela 8. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS1 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS1-209-223	SWKLEKASLIEVKTC	247	2543	338	2961	4411	376	4124	299	17295	3777	3497
Den3-Brazil-NS1-237-251	LESDMIIPKSLAGPI	1578	8099	11412	15728	-	5240	10551	4702	9612	4498	9584
Den3-Brazil-NS1-241-255	MIIPKSLAGPISQHN	51	-	9212	-	9393	7899	7055	1309	6920	5627	1066
Den3-Brazil-NS1-245-259	KSLAGPISQHNHRPG	326	-	14822	-	-	15324	-	15463	-	-	-
Den3-Brazil-NS1-253-267	QHNHRPGYHTQTAGP	3130	-	3074	13681	11658	18235	-	-	-	-	-
Den3-Brazil-NS1-285-299	VVITENCGRGPSLR	3280	9859	-	-	12732	3595	7845	11488	-	348	19126
Den3-Brazil-NS1-289-303	ENCGTRGPSLRITTV	3753	-	-	-	-	8102	-	-	-	9568	-
Den3-Brazil-NS1-297-311	SLRITTVSGKLIHEW	228	2419	484	15548	15199	262	561	2311	-	2406	736
Den3-Brazil-NS1-309-323	HEWCCRSTLPPLRY	481	8237	1609	14434	7056	4060	10506	8096	16540	3792	5026
Den3-Brazil-NS1-321-335	LRYMGEDGCWYGMEI	9938	8674	4247	-	14907	4200	15874	7462	-	6001	5689
Den3-Brazil-NS1-5-19	VINWKGKELKCGSGI	12726	14029	-	-	-	10241	14875	18083	13186	-	1116
Den3-Brazil-NS1-29-43	TEQYKFQADSPKRLA	43	192	48	2842	1510	1706	13592	1013	11244	29	8359

Tabela 8. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS1 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS1-33-47	KFQADSPKRLATAIA	46	1601	2415	-	-	9697	15578	1534	5248	318	-
Den3-Brazil-NS1-69-83	KQIANELNYILWENN	54	730	333	1238	575	4482	448	2414	19002	413	224
Den3-Brazil-NS1-117-131	TWGKAKIVTAETQNS	1089	4163	28	695	285	6691	56	2633	18205	1235	3750
Den3-Brazil-NS1-129-143	QNSSFIIDGPNTPEC	2570	307	39	325	254	8581	7661	3577	6255	1774	4389
Den3-Brazil-NS1-133-147	FIIDGPNTPECPSAS	10677	10088	2064	1151	1278	6020	-	-	-	14022	5911
Den3-Brazil-NS1-169-183	LKLREVVYQLCDHRL	226	2357	474	457	277	136	2579	650	4803	9964	441
Den3-Brazil-NS1-193-207	AVHADMGYWIESQKN	1198	2590	3541	5805	3242	7975	12946	9887	13906	33	6336
Den3-Brazil-NS1-225-239	WPKSHTLWSNGVLES	3919	520	322	3925	4419	5694	4834	9388	12905	59	4122
Den3-Brazil-NS1-229-243	HTLWSNGVLESDMII	10735	170	178	-	7661	7632	3794	15450	-	1001	8964
Den3-Brazil-NS1-233-247	SNGVLESDMIIPKSL	4296	73	87	5936	3623	-	2437	17283	-	1664	5086
Den3-Brazil-NS1-261-275	HTQTAGPWHLGKLEL	4007	761	-	14575	18728	7943	14002	5831	7451	4112	5923
Den3-Brazil-NS1-269-283	HLGKLELDFNYCEGT	6339	18	56	2517	87	10992	1120	16658	-	1911	4165

Tabela 8. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS1 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

Peptídeo	Sequência	(conclusão)										
		DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS1-293-307	TRGPSLRTTTVSGKL	2596	156	655	3311	3012	83	12293	17081	-	14522	11266
Den3-Brazil-NS1-305-319	GKLIHEWCCRSCTLP	2600	841	1768	4392	3498	1205	7198	11406	4397	3193	227
Den3-Brazil-NS1-313-327	CRSCTLPPLRYMGED	1983	598	7349	6706	7110	13742	5241	18308	655	16406	1871

Os resultados são expressos como IC50 (nM). Em negrito destacamos os peptídeos com forte afinidade de ligação ao alelo HLA-DRB1 em questão. O sinal – representa que não houve ligação dentro da variação estudada (100.000x).

De forma semelhante, foi mensurada a afinidade de ligação entre um dado peptídeo da proteína NS3 do DENV-3 e os onze alelos HLA-DRB1 (0101, 0301, 0401, 0404, 0405, 0701, 0802, 0901, 1101, 1302, 1501) para verificarmos os peptídeos mais freqüentes e candidatos a epítomos de células T. Os dados são apresentados na Tabela 9. Encontram-se destacados em negrito os valores da IC50 que remetem uma forte ligação do peptídeo teste ao alelo HLA-DRB1 em questão.

Tabela 9. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS3-89-103	WQKGEEVQVIAVEPG	2582	1963	5791	3150	785	4902	3498	3491	7256	17556	4530
Den3-Brazil-NS3-177-191	PELEEEMFKKRNLTI	6349	1866	7065	-	-	-	-	14825	11865	13807	16958
Den3-Brazil-NS3-181-195	EEMFKKRNLTIMDLH	-	15220	12602	7811	7494	6263	-	10072	336	9317	891
Den3-Brazil-NS3-185-199	KKRNLTIMDLHPGSG	317	870	171	2361	972	-	21	6192	72	3640	1836
Den3-Brazil-NS3-209-223	VREAIKRRRLTLILA	4209	12788	4788	2542	1572	1860	12438	7310	147	3284	622
Den3-Brazil-NS3-277-291	PNYNLIIMDEAHFTD	383	37	142	1532	402	2697	396	2601	4615	68	1323
Den3-Brazil-NS3-281-295	LIIMDEAHFTDPASI	716	118	98	1000	3443	505	284	5357	8654	58	2285
Den3-Brazil-NS3-285-299	DEAHFTDPASIAARG	2963	1337	536	-	11638	1161	4869	6748	-	1090	5987
Den3-Brazil-NS3-381-395	KKVIQLSRKTFDTEY	424	54	3639	16265	3458	5389	1899	875	78	2512	2174
Den3-Brazil-NS3-385-399	QLSRKTFDTEYQKTK	7169	-	12022	-	-	14014	1288	-	13203	14073	-
Den3-Brazil-NS3-389-403	KTFDTEYQKTKLNDW	2276	3179	11672	-	15152	1562	-	15553	676	16404	6118
Den3-Brazil-NS3-393-407	TEYQKTKLNDWDFVV	7645	1660	10813	8123	7326	456	8797	11520	5943	17769	-

Tabela 9. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS3-405-419	FVVTTDISEMGANFK	1954	44	17	903	206	3629	165	11639	2961	1791	1364
Den3-Brazil-NS3-409-423	TDISEMGANFKADRV	7720	470	1825	12131	4656	18988	5098	17963	-	4058	10807
Den3-Brazil-NS3-413-427	EMGANFKADRVIDPR	-	261	40	3112	1756	-	11163	-	7126	3230	9348
Den3-Brazil-NS3-485-499	DHAHWTEAKMLLDNI	888	1068	5316	3478	1650	15	3461	2079	-	4151	159
Den3-Brazil-NS3-493-507	KMLLDNINTPEGIIP	7562	1748	201	535	157	979	44	7801	-	246	3564
Den3-Brazil-NS3-497-511	DNINTPEGIIPALFE	1650	-	-	-	-	2418	-	13823	-	1839	5340
Den3-Brazil-NS3-501-515	TPEGIIPALFEPERE	-	5098	-	16903	18481	15764	-	-	-	-	15901
Den3-Brazil-NS3-513-527	EREKSAIDGEYRLK	14932	184	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Den3-Brazil-NS3-525-539	RLKGESRKTFVELMR	32	5682	21	58	24	16	10669	30	633	-	2857
Den3-Brazil-NS3-53-67	TRGAVLTYNGKRLEP	89	434	5914	7189	2049	362	14748	885	279	86	6,8
Den3-Brazil-NS3-57-71	VLTYNGKRLEPNWAS	882	1741	4469	7442	10779	1905	-	4156	2312	250	196
Den3-Brazil-NS3-61-75	NGKRLEPNWASVKKD	236	1690	4587	-	-	2347	2065	9460	4747	84	1497

Tabela 9. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS3-69-83	WASVKKDLISYGGGW	3077	4490	1353	7058	9788	2376	2067	5048	1352	1900	30
Den3-Brazil-NS3-73-87	KKDLISYGGGWRLSA	21	11861	7102	15266	-	56	12661	117	1570	4404	6,1
Den3-Brazil-NS3-77-91	ISYGGGWRLSAQWQK	139	-	227	2207	1432	133	3604	268	286	6609	52
Den3-Brazil-NS3-101-115	EPGKNPKNFQTMPGT	201	5440	1467	410	725	1479	18390	1858	-	2092	447
Den3-Brazil-NS3-105-119	NPKNFQTMPGTFQTT	49	11616	5,4	39	96	2791	175	407	86	2393	268
Den3-Brazil-NS3-109-123	FQTMPGTFQTTTGEI	148	16413	222	961	874	1015	557	1849	3862	7038	2182
Den3-Brazil-NS3-113-127	PGTFQTTTGEIGAIA	226	-	18	2082	3927	158	7886	333	231	7563	3040
Den3-Brazil-NS3-121-135	GEIGAIALDFKPGTS	3958	8,6	7859	-	17534	2301	3612	9794	-	2704	14424
Den3-Brazil-NS3-125-139	AIALDFKPGTSGSPI	3327	47	3849	16294	13148	2122	-	2490	-	5444	15640
Den3-Brazil-NS3-137-151	SPIINREGKVVGlyG	843	127	4382	-	11228	12648	3211	7518	56	3511	502
Den3-Brazil-NS3-201-215	TRKYLPAIVREAIKR	10	1232	23	321	125	49	7025	37	20	14603	3372
Den3-Brazil-NS3-205-219	LPAIVREAIKRRRLRT	170	65	1666	3967	1806	2413	-	1528	106	2444	334
Den3-Brazil-NS3-237-251	KGLPIRYQTTATKSE	110	1821	13	310	150	2987	36	928	807	2624	638

Tabela 9. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(continua)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS3-241-255	IRYQTTATKSEHTGR	1126	-	303	142	75	525	5438	4912	2574	5911	14463
Den3-Brazil-NS3-265-279	TFTMRLSPVRVPNY	17	10752	7045	1646	763	93	327	151	848	9,8	204
Den3-Brazil-NS3-293-307	ASIAARGYISTRVGM	91	12077	569	1068	852	156	8126	473	669	360	44
Den3-Brazil-NS3-297-311	ARGYISTRVGMGEAA	458	7291	16	127	90	77	-	1909	35	2297	371
Den3-Brazil-NS3-309-323	EAAAFMTATPPGTA	27	276	2,4	350	32	48	31	129	93	2641	363
Den3-Brazil-NS3-313-327	IFMTATPPGTADAFP	56	14720	55	3820	2251	650	40	2011	1045	13496	3751
Den3-Brazil-NS3-345-359	WNSGNEWITDFAGKT	1762	2618	806	7204	5337	8128	324	10910	10086	6570	5324
Den3-Brazil-NS3-349-363	NEWITDFAGKTWVWV	1675	6890	1137	8118	16340	3299	2497	8481	-	-	608
Den3-Brazil-NS3-353-367	TDFAGKTWVWVPSIK	1072	16613	4193	858	884	87	1615	2148	238	-	2689
Den3-Brazil-NS3-357-371	GKTWVWVPSIKAGND	16	436	41	866	56	29	52	100	38	573	16
Den3-Brazil-NS3-373-387	ANCLRKNGKKVIQLS	163	11426	2754	11279	5302	630	16124	3567	372	331	452
Den3-Brazil-NS3-417-431	NFKADRVDPVPRCLK	1744	656	405	18504	4122	7909	16125	13279	4262	4667	3083

Tabela 9. Afinidade de ligação dos peptídeos da proteína NS3 do DENV-3 aos alelos HLA-DRB1 mensurada através de ensaio de inibição competitiva baseado em anticorpo de captura

(conclusão)

Peptídeo	Sequência	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB1*0404	DRB1*0405	DRB1*0701	DRB1*0802	DRB1*0901	DRB1*1101	DRB1*1302	DRB1*1501
Den3-Brazil-NS3-429-443	CLKPVILTDGPVERVI	742	4,9	7316	5464	1765	3412	5366	7158	4932	3,2	5911
Den3-Brazil-NS3-433-447	VILTDGPERVILAGP	621	69	4183	5108	3980	18783	8715	3762	-	24	1729
Den3-Brazil-NS3-465-479	NPQKENDQYIFTGQP	6753	15708	11830	9800	-	17028	9410	-	-	18076	-
Den3-Brazil-NS3-605-619	PLALKEFKDFAAGRK	4350	4440	4729	2223	5547	3451	37	9318	8887	19608	28

Nota: Os resultados são expressos como IC50 (nM). Em negrito destacamos os peptídeos com forte afinidade de ligação ao alelo DRB1 em questão. O sinal – representa que não houve ligação dentro da variação estudada (100.000x).

6.8 Associação entre os peptídeos e a afinidade de ligação para o gene HLA-DRB1

Para verificarmos se um determinado alelo HLA-DRB1 com alta afinidade a um peptídeo responsivo é muito freqüente entre a população de estudo, nós correlacionamos a afinidade de ligação de cada peptídeo para cada alelo com o perfil de positividade para cada alelo na população (ou seja, a frequência de pacientes com resposta positiva para o alelo em questão dentro da população estudada).

Neste caso, os dados de afinidade foram normalizados, utilizando-se um número extremamente grande, de forma que, o valor normalizado é diretamente proporcional à afinidade de ligação. Devido ao fato de nossa metodologia para tipagem HLA ser de baixa resolução (expressa em apenas dois dígitos), e os dados de afinidade ser de alta resolução (quatro dígitos), nós agrupamos os valores dos alelos HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404 e HLA-DRB1*0405 para obtermos um único valor. Desta forma, a mediana das três afinidades foi considerada. A Figura 11 apresenta o perfil dos nove alelos HLA-DRB1 para os dois peptídeos mais bem correlacionados [NS1_297_311 (A) e NS3_181_195 (B)].

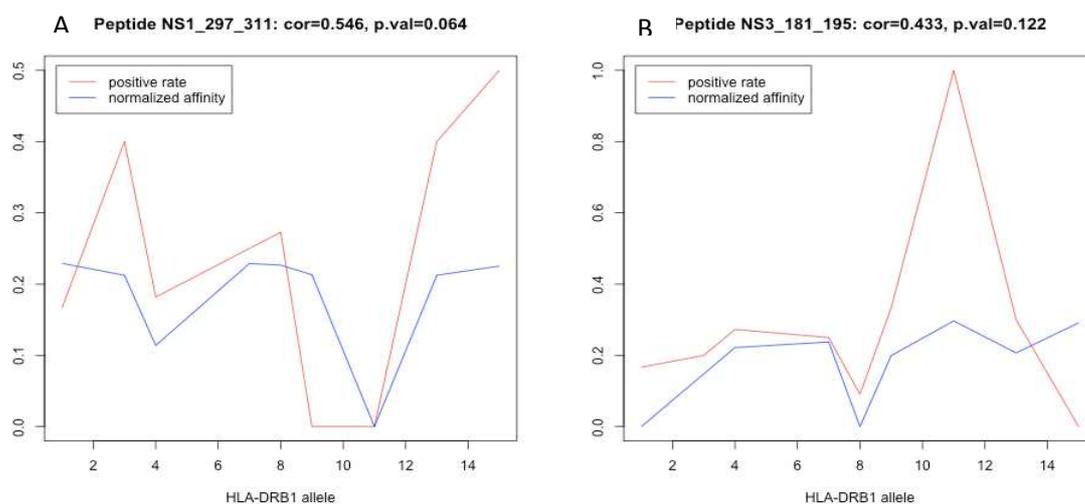


Figura 11: Correlação entre afinidade de ligação peptídica ao alelo HLA-DRB1 (em azul) e o perfil de positividade do alelo na população de estudo (em vermelho) para o peptídeo NS1_297_311 (A) e NS3_181_195 (B)

6.9 Predição Teórica para os alelos HLA de classe I e II e análise das sequências conservadas entre os sorotipos

As sequências candidatas a epítomos de células T das proteínas NS1 e NS3 foram avaliadas através de ferramentas computacionais avançadas (*ANN* e *consensus*) disponíveis no *Immune Epitope Database* (IEDB) até setembro de 2010 (www.iedb.org). Com base nesses algoritmos, os prováveis alelos HLA de classe I (HLA-A e HLA-B) e de classe II (HLA –DRB1) foram preditos para cada peptídeo. Para os alelos HLA de classe I, nós investigamos apenas aqueles com $IC_{50} < 500$ nM (alta e intermediária afinidade de ligação) pelo método *ANN* e consideramos que o comprimento do peptídeo ligante era de 9 mers. Para os alelos HLA de classe II, o método *consensus* foi utilizado e os alelos foram considerados com boa afinidade ao peptídeo quando seu percentil estava abaixo de 15%. Os alelos C, DP e DQ possuem algoritmos em fase muito preliminar e não foram considerados nesta predição. Os resultados dessa predição teórica encontram-se descritos no APÊNDICE C.

Adicionalmente a nossa proposta inicial, nós verificamos se as sequências das proteínas NS1 e NS3 candidatas a epítomos de células T do DENV-3, identificadas nesse estudo, possuem regiões conservadas entre os demais sorotipos do dengue. Para isso, nós comparamos nossas sequências candidatas com aquelas conservadas dos quatro sorotipos (Pan-DENV) previamente descritas por Khan et al., (2008) em um estudo baseado nas sequências dos quatro sorotipos virais depositadas *online* no *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) e análise *in silico* de diferentes algoritmos preditores de HLA.

Assim, nós reunimos as principais características do estudo de Khan et al., (2008) com os resultados deste estudo envolvendo o mapeamento de epítomos das proteínas NS1 e NS3 do vírus dengue 3. A Tabela 10 reúne todas essas informações.

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV.

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
NS1_41_55	HLA-A*23 (A24)	HLA B*35	HLA-A*0201, HLA-A*0202,	HLA-A*0211 ^a , HLA-A*0250 ^b ,	-	-
RLATAIAGAWENGVC	HLA-B*40 (B27,B44,SC) HLA-C*8 (desconhecido)	HLA C*04	HLA-A*0203, HLA-A*0206, HLA-A*0211 ^a , HLA-A*0212, HLA-A*0216, HLA-A*0219, HLA-A*0250 ^b , HLA-B*5801	HLA-B*1517, HLA-B*3501, HLA-B*5301, HLA-B*5701,		
NS1 45-59 AIAGAWENGVCGIRS	-	HLA A*31 HLA B*39	-	HLA-A*0211, HLA-A*0250	HLA-DRB1*0101	-
NS1_65_79 NLLWKQIANELNYIL	HLA-A*23 (A24)	-	HLA-A*0202 ^C , HLA-A*0206, HLA-A*2403, HLA-A*8001, HLA-B*1503	HLA-A*0202 ^C , HLA-A*0203, HLA-A*2902, HLA-A*3002, HLA-A*6802, HLA-A*6901, HLA-B*1501, HLA-B*5301, HLA-B*5801	-	-

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
NS1_85_99 KLTVVVGDIIGVLEQ	HLA-A*31	HLA A*31	HLA-A*0206, HLA-A*0211 ^d ,	HLA-A*0201, HLA-A*0202,	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1501	-
	(A01,03, SC)	HLA DR*8	HLA-A*0216 ^e , HLA-A*0219,	HLA-A*0203, HLA-A*0211 ^d ,		
		HLA DQ*4	HLA-A*0250 ^f	HLA-A*0212, HLA-A*0216 ^e , HLA-A*0250 ^f , HLA-A*2602, HLA-A*6802, HLA-A*6901, HLA-B*5801		
NS1_121_135 AKIVTAETQNSSFII	HLA-A*34 (A03,SC)	-	-	HLA-A*3201, HLA-A*6802,	HLA-DRB1*0101	-
	HLA-B*39 (B27,SC)			HLA-A*6901, HLA-B*1517,	HLA-DRB1*0401,	
				HLA-B*3501, HLA-B*4001, HLA-B*4002, HLA-B*4402, HLA-B*4403, HLA-B*4501	HLA-DRB1*0802	
NS1_177_181 QLCDHRLMSAAVKDE	-	HLA A*24	HLA-B*2705	HLA-B*4002	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1501	-

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

(continua)

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
			NS1 201-215 WIESQKNGSWKLEKA	-		
NS1_209_223 SWKLEKASLIEVKTC	HLA-B*8 (B08,SC)	-	-	HLA-A*6801, HLA-B*1503, HLA-B*4001, HLA-B*4002, HLA-B*4501	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0901	-
NS1_237_251 LESDMIIPKSLAGPI	-	HLA A*30	HLA-B*0702	HLA-B*1801, HLA-B*4002	-	LESDMIIPKSLAGPI
NS1_241_255 MIIPKSLAGPISQHN	-	-	HLA-B*0702	HLA-A*0250, HLA-A*3001, HLA-B*1502	HLA-DRB1*0101	-

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

(continua)

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
			NS1_285_299 VVITENCGTRGPSLR	HLA-A*34 (A03, SC) HLA-B*58 (B58)		
NS1_289_303 ENCGTRGPSLRRTTV	-	HLA A*24 HLA DR*07	-	HLA-B*0702, HLA-B*1517	-	ENCGTRGPSLRRT TV
NS1_297-311 SLRTTTTVSGKLIHEW	-	HLA B*58 HLA C*06 HLA DQ*06	HLA-B*1517 ^g , HLA-B*5701, HLA-B*5801 ^h	HLA-A*3001, HLA-B*1517 ^g , HLA-B*2705, HLA-B*5801 ^h	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*1501	SLRTTTTVSGKLIHE W
NS1_309_323 HEWCCRSCTLPPLRY	HLA-C*08 (desconhecido)	HLA A*24	HLA-A*3101	HLA-A*1101, HLA-A*2902, HLA-A*3001, HLA-A*8001, HLA-B*1503, HLA-B*4002	HLA-DRB1*0101	-

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

(continua)

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
NS3_89_103 WQKGEEVQVIAVEPG	-	HLA A*24	-	HLA-A*0250, HLA-B*1501, HLA-B*1503, HLA-B*4001, HLA-B*4002, HLA-B*4501	HLA-DRB1*0405	-
NS3_177_191 PELEEEMFKKRNLTI	HLA-B*40 (B44, SC)	-	HLA-A*3001, HLA-B*0801	HLA-A*2301, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*6801	-	PELEEEMFKKRNLTI
NS3_181_195 EEMFKKRNLTIMDLH	-	HLA-A*24	HLA-A*3001, HLA-B*0801, HLA-B*1503 ⁱ	HLA-A*2301, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-B*1503 ⁱ , HLA-B*2705	HLA-DRB1*0101	
NS3_185_199 KKRNLTIMDLHPGSG	HLA -A*66 (A03) HLA-C*06 (desconhecido) HLA-DR*11	-	-	HLA-B*1503, HLA-B*2705	HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1501	EEMFKKRNLTIMDLH
NS3_209_223 VREAIKRRRLRTLILA	HLA-DR*11	HLA B*39	HLA-B*0801 ^j , HLA-B*2705 ^k	HLA-A*0203, HLA-A*3001, HLA-B*0801 ^j , HLA-B*1503, HLA-B*2705 ^k	HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1501	-

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

(continua)

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
NS3_285_299 DEAHFTDPASIAARG	HLA-B*40 (B44, SC) HLA-B*58 (B58)	HLA C*07	HLA-A*0206, HLA-A*6901	HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0211, HLA-A*6802, HLA-B*1503, HLA-B*1801, HLA-B*3901, HLA-B*4501	HLA-DRB1*0401	DEAHFTDPASIAARG
NS3_381_395 KKVIQLSRKTFDTEY	HLA-DR*11	-	-	HLA-B*1503, HLA-B*1517	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101	KKVIQLSRKTFDTEY
NS3 389-403 - KTFDTEYQKTKLNDW	-	-	HLA-A*1101, HLA-A*3001, HLA-A*3101, HLA-A*6801	HLA-A*0301, HLA-A*3201	HLA-DRB1*1101	KTFDTEYQKTKLNDW

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

(continua)

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
NS3_393_407 TEYQKTKLNDWDFVV	-	-	HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0206 ^l , HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0216, HLA-A*0219, HLA-A*0250, HLA-B*1517	HLA-A*0206 ^l , HLA-A*3201, HLA-B*5701	HLA-DRB1*0701	TEYQKTKLNDWDFVV
NS3_405_419 FVVTDDISEMGANFK	-	HLA A*31 HLA B*39 HLA DQ*04	HLA-A*2602	HLA-A*1101, HLA-A*3001, HLA-A*6801	HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0802	FVVTDDISEMGANFK
NS3_493_507 KMLLDNINTPEGIIP	-	HLA A*11	HLA-A*0211, HLA-A*0250	HLA-A*0202, HLA-A*0212	HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*1302	KMLLDNINTPEGIIP

Tabela 10. Características dos peptídeos NS1 e NS3 reconhecidos pelos pacientes DENV-3 positivos e suas associações com o genótipo HLA, predições teóricas HLA e conservação dessas sequências entre os sorotipos do DENV

Peptídeo Sequência	Associação HLA (Supertipos)	Efeito Combinado Peptídeo:HLA	Afinidade Teórica para os alelos HLA (Supertipos)		Afinidade de Ligação (HLA-DRB1*) (IC50<1000nM)	Sequência Conservada (PAN DENV)
			Alta (IC50<50 nM)	Média (50nM<IC50<500nM)		
			(conclusão)			
NS3_497_511	-	HLA A*11	HLA-A*6802, HLA-B*3901	HLA-A*0206, HLA-A*6901,	-	DNINTPEGIIPALFE
DNINTPEGIIPALFE		HLA B*51 HLA C*15 HLA DR*04 HLA DR*09 HLA DQ*03		HLA-B*0702, HLA-B*3501		
NS3_525_539	HLA-B*58 (B58)	-	HLA-B*1503 ^m	HLA-A*2603, HLA-A*1503 ^m ,	HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101,	RLKGESRKTFVELMR
RLKGESRKTFVELMR	HLA-DR*11			HLA-B*1517, HLA-B*2705		

Nota: A previsão teórica utilizou algoritmos depositados no IEDB até 21 de setembro de 2010 e considerou como *cut-off* IC50<500nM com peptídeos de 9 aminoácidos (mers). Em a: IC50=19,0 nM tendo como 9mers a sequência 1-9; IC50=156,0 nM tendo como 9mers a sequência 6-14. b: IC50=7,9 nM tendo como 9mers 1-9; IC50=118,8 nM tendo como 9mers a sequência 6-14. c: IC50=14,0 nM tendo como 9 mers a sequência 6-14; IC50=190,6 nM tendo como 9mers a sequência 7-15. d:IC50=7,9 nM tendo como 9mers a sequência 4-12;IC50=246,1 tendo como 9 mers a sequência 5-13. e:IC50=30,0 tendo como 9mers a sequência 4-12; IC50=154,4 nM tendo como 9mers a sequência 1-9. f:IC50=3,4 nM tendo como 9 mers a sequência 4-12; IC50=161,1 nM tendo como 9mers a sequência 5-13. g:IC50=15,0 nM tendo como 9mers a sequência 3-11; IC50=135,2 nM tendo como 9mers a sequência 4-12. h:IC50=13,1 nM tendo como 9mers a sequência 7-15; IC50=470 nM tendo como 9mers a sequência 3-11. i:IC50=8,5 nM tendo como 9 mers a sequência 4-12; IC50=305 nM tendo como 9 mers a sequência 6-14. j:IC50=18,5 nM tendo como 9 mers a sequência 4-12; IC50=199 nM tendo como 9 mers a sequência 6-14; k: IC50=36 nM tendo como 9 mers a sequência 7-15; IC50=191 nM tendo como 9 mers a sequência 6-14. l:IC50=63 nM tendo como 9 mers a sequência 7-15; IC50=238 nM tendo como 9 mers a sequência 6-14. m: IC50=5,2 nM tendo como 9 mers a sequência 2-10; IC50=181 nM tendo como 9 mers a sequência 5-13.

6.10 Peptídeos de NS1 e NS3 propostos como epítomos de células T

A análise associativa entre os peptídeos das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3, os atributos clínicos e imunogenéticos identificados experimentalmente e teoricamente e comparados entre as sequências conservadas nos permitiram propor algumas regiões peptídicas como epítomos de células T (Quadro 8).

As sequências mais frequentemente associadas entre os alelos HLA de classe I (A e B) e correlacionadas de forma teórica foram propostas como epítomos de LT CD8+. Contudo, convém mencionar que ensaios bioquímicos e de imunofenotipagem são necessários para esta validação. Em acréscimo, as sequências correlacionadas com os alelos HLA de classe II (DRB1) foram propostas como epítomos de células T CD4+. Semelhantemente, ensaios de imunofenotipagem são necessários para esta validação. Quando essas duas observações foram visualizadas (correlação entre a sequência e os alelos HLA de classe I e II), os peptídeos foram propostos como epítomos de células T para o DENV-3. Adicionalmente, quando essas regiões eram conservadas entre os demais sorotipos (Pan-DENV), esses peptídeos foram propostos como epítomos de células T para o DENV.

Sequências Peptídicas	Tipos de epítomos
NS1_41_55	LT CD8+ apenas para DENV-3
NS1_45_59	LT CD4+ para DENV-3
NS1_65_79	LT CD8+ para DENV-3
NS1_85_99	LT CD4+ apenas para DENV-3
NS1_121_135	LT para DENV-3
NS1_177_181	LT CD4+ para DENV-3
NS1_201_215	LT para DENV
NS1_209_223	LT CD4+ para DENV-3
NS1_241_255	LT CD4+ para DENV-3
NS1_285_299	LT para DENV
NS1_297_311	LT para DENV
NS1_309_323	LT para DENV-3
NS3_89_103	LT CD4+ para DENV-3
NS3_181_195	LT para DENV-3

Quadro 8. Sequências peptídicas propostas como epítomos de células T

(continua)

Sequências Peptídicas	Tipos de epítomos
NS3_185_199	LT CD4+ para DENV
NS3_209_223	LT para DENV-3
NS3_285_299	LT para DENV
NS3_381_395	LT CD 4+ para DENV
NS3_393_407	LT CD 4+ para DENV
NS3_389_403	LT CD 4+ para DENV
NS3_405_419	LT para DENV
NS3_493_507	LT CD4+ para DENV
NS3_497_511	LT CD8+ para DENV
NS3_525_539	LT para DENV

Quadro 8. Sequências peptídicas propostas como epítomos de células T
Nota: Em negrito, destacam-se os peptídeos propostos como epítomos

(conclusão)

7 DISCUSSÃO

O sistema imunológico, devido à complexidade natural existente entre suas células, moléculas e a sequência de mecanismos entre elas, é classificado como um dos tópicos mais desafiantes das ciências biomédicas. Entender como uma resposta em particular será patogênica ou protetora, ineficiente ou exacerbada, passageira ou duradoura permanece como um ponto intrigante no entendimento dos pesquisadores imunologistas. Frequentemente, seus estudos dependem de modelos animais *in vitro* ou *in vivo*, experimentos *ex-vivo*, modelos matemáticos ou computacionais (*in silico*).

Realizar o processamento e a integração entre as várias informações produzidas, sobretudo oriundas do surgimento da genômica, proteômica e imunômica, tem contribuído para o desenvolvimento de sistemas computacionais e algoritmos utilizados para aumentar e melhorar os conhecimentos gerados e prever as especificidades moleculares deste imenso sistema. Entretanto, deve haver uma retroalimentação entre as informações teóricas e experimentais que mutuamente cooperam entre si validando as previsões teóricas e diminuindo o orçamento com os custos de reagentes e equipamentos, a disponibilidade de amostras biológicas e a equipe técnica especializada necessária para os ensaios experimentais.

Dentro desse contexto, o mapeamento de epítomos de células T permite identificar regiões imunodominantes em proteínas antigênicas apresentadas por múltiplas moléculas HLA, presentes em alta frequência dentro de uma população. Essas sequências são, portanto, denominadas peptídeos promíscuos e são consideradas alvos perfeitos para a imunoterapia e o desenvolvimento de vacinas. Várias tecnologias teóricas e experimentais têm sido utilizadas para a identificação desses peptídeos. Com isso, essas tecnologias são fundamentais e podem ser complementares para a elucidação de vários mecanismos imunológicos desconhecidos ou pouco explorados.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo mapear os peptídeos das proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3 que eram capazes de elicitar uma resposta de célula T com alta frequência dentro de uma população de pacientes DENV-3 positivos. No entanto, o fato de identificarmos uma sequência

com potencial de desencadear uma resposta imunológica, não a coloca, por si, na condição de epítopo de célula T. Isto se deve a necessidade de apresentação desta sequência por moléculas HLA. Assim, é primordial que esta sequência seja um peptídeo promíscuo, e, que, portanto, seja apresentada por várias moléculas HLA freqüentes dentro de uma população. Além disso, seria interessante que esta sequência fosse conservada entre os diferentes sorotipos e/ou subtipos do DENV para facilitar a engenharia biomédica na construção da vacina ou do agente terapêutico específico contra esta doença.

Assim, nós iniciamos o mapeamento dos epítopos de células T através de matrizes de peptídeos, onde esses foram organizados em *pools* e testados em amostras de PBMCs de pacientes caracterizados como dengue 3 positivos. Nesta etapa, vale salientar que 52 pacientes foram incluídos nesta triagem. Entretanto, devido aos ensaios não respondedores ou com elevado *background*, ou ainda, positivos a apenas um pool, e que, portanto, não permitiram a identificação do provável peptídeo, apenas n=20 pacientes foram considerados nesta etapa. No entanto, esse resultado nos levou a algumas reflexões e considerações sobre esta grande quantidade de ensaios descartados no estudo.

Para os ensaios não respondedores nesta etapa, nós podemos inferir algumas variáveis que podem ter contribuído para este resultado. Primeiramente, a capacidade em potencial de um peptídeo se ligar a fenda do HLA não significa necessariamente em ativação linfocitária. É necessário que o linfócito T com o seu receptor de célula T (TCR) específico para o complexo peptídeo:MHC esteja presente no repertório linfocitário do indivíduo (PIRA et al., 2010). Além disso, o comprimento do peptídeo antigênico e a disposição dos resíduos âncoras à fenda do HLA são fundamentais para apresentação eficiente aos linfócitos.

Outro fator limitante é o estágio funcional do linfócito (naïve x memória) no ensaio *in vitro*, que influencia este co-reconhecimento. A célula T específica pode estar em baixa freqüência no repertório naïve, enquanto sua freqüência poderia estar muito mais elevada em um repertório celular de memória (PIRA et al., 2010). Este é favorecido também pela maturação da afinidade para o peptídeo, onde baixas concentrações deste seriam necessárias para uma rápida e eficaz ativação (SCHIRLE; WEINSCHENK; STEVANOVIC, 2001). Neste caso, uma infecção secundária seria favorecida pela maturação da afinidade pela sequência candidata.

Outro fator é o sítio de clivagem do peptídeo antigênico durante o processamento (KLOETZEL; OSSENDORP, 2004). De fato, diante da arbitrariedade desta clivagem, muitos fragmentos peptídicos não originam sequências com propriedades físico-químicas com base imunogênicas capazes de se ligar a um dado HLA; ou ainda, o fragmento se liga a uma molécula HLA, mas o linfócito T específico não existe no repertório do indivíduo ou é bem tolerado ou ignorado pelo linfócito hospedeiro.

Outro ponto avaliado é que as células T reconhecem antígenos processados por outra célula. O modo de administração antigênica e o tipo de célula apresentadora de antígenos (APC) definirão qual será o determinante antigênico apresentado. Além disso, o comprimento e a solubilidade do antígeno são fatores que podem influenciar a apresentação antigênica. Os antígenos solúveis são preferencialmente apresentados pelas moléculas MHC de classe II gerando ativação dos linfócitos T CD4+. Quando um antígeno solúvel é utilizado no ensaio baseado em PBMC, os linfócitos B e os monócitos são as APCs mais prevalentes. Todavia, isto pode ser diferente do que ocorre em um sítio inflamatório, onde uma outra população celular pode estar com seu estágio de ativação aumentado. Por conseguinte, um peptídeo prevalente no sítio inflamatório pode não ser aquele gerado em uma PBMC quando a proteína antigênica é utilizada na geração de uma segunda resposta *in vitro* (ANTHONY; LEHMAN, 2003).

Além desses fatores, existem variáveis inerentes à experimentação. Um deles é a viabilidade celular tanto linfocitária como das APCs, uma vez que, uma etapa primordial da ativação das células T é a apresentação antigênica por outra célula. Assim, as condições de cultura devem prover que todas as células T presentes naquela região (poço da placa) possuam igual chance de interagir com a APC específica (KERN et al., 2005). Portanto, a densidade celular (célula x superfície) é mais importante que a concentração celular (células x volume). Outro ponto, é que o fenótipo de célula T específico pode ter sido distribuído em outro poço e assim, as células secretoras e formadoras do *spot* serão subestimadas (GAZANE et al., 2003)

Em relação aos ensaios que apresentaram *background* elevado, devemos considerar duas vertentes: o *background* específico e o *background* inespecífico. Contudo, convém mencionar que, nos ensaios ELISPOT, denomina-se *background* toda coloração em parte ou em toda a membrana dos poços das placas. O *background* específico é uma ligação específica de moléculas secretadas pelas

células capturadas pelos anticorpos de captura. As moléculas liberadas ou dissociadas de uma célula difusamente podem se ligar aos anticorpos em uma área livre de célula. Isto pode ocorrer devido a distúrbios durante a etapa de incubação celular. Assim, a placa não deve ser tocada ou movida durante esta fase. Isto implica na não abertura da incubadora durante este processo (KALYUZHNY, 2005). De fato, devido a intenso fluxo de experimentos e ao compartilhamento de equipamentos como a incubadora em nosso laboratório, em algumas ocasiões isto pode ter contribuído para este tipo de inconveniente.

Em acréscimo, o número de células plaqueadas parece influenciar na coloração desenvolvida, além de subestimar o número de *spots* formados, uma vez que, um *spot* pode conter mais que uma célula específica (GAZANE et al., 2003). Na verdade, é recomendada uma diluição seriada de células em 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 /poço em uma mesma placa. Isto geraria uma demanda de poços para otimizar células enquanto o experimento propriamente dito estaria em segundo plano.

Já o *background* inespecífico remete à adsorção de componentes de detecção como os anticorpos desta etapa, o conjugado enzimático e o substrato precipitante, sobre a membrana. A razão é difícil de ser identificada, embora, a utilização de papel alumínio sobre a placa parece diminuir sua ocorrência. Outro ponto é o número de células mortas no ensaio (KALYUZHNY, 2005). Mesmo dispondo de um excelente aparelho analisador de viabilidade celular, quando o número de células mortas é baixo, podemos estar diante de um início de apoptose, que culminará durante a incubação celular. Também pode ocorrer contaminação no experimento devido às freqüentes utilizações da incubadora para outros fins experimentais.

Os ensaios ELISPOT são particularmente adequados para mensurar o tamanho clonal e a função efetora de populações de células T antígeno-específica presentes em baixa freqüência *ex-vivo*. A ativação linfocitária pode ser mensurada através da produção de citocinas, anticorpos ou granzimas liberadas pelas células após estimulação antigênica. Durante uma resposta imunológica, as células T naíve antígeno-específica em baixa freqüência proliferam em vários clones gerando massas celulares efetoras correlacionadas com a magnitude da resposta adquirida (ANTHONY; LEHMAN, 2003).

Deste modo, o contato inicial com o antígeno permite a diferenciação das células naíve em células de memória com função imunológica bem definida. Durante

a experimentação, os antígenos contidos nos poços estimulam essas células que rapidamente secretam suas substâncias com funções imunológicas, as quais são capturadas por anticorpos específicos. Assim, em um ensaio otimizado, cada *spot* reflete a atividade de uma única célula, e, portanto, o tamanho e a intensidade do *spot* refletem a quantidade de citocina secretada por cada célula.

A estratégia em se utilizar matrizes de *pools* de peptídeos permite a redução do número de ensaios a ser testado, o que reflete uma economia de reagentes e materiais biológicos. Uma matriz é desenhada de maneira a garantir que cada peptídeo esteja contido em dois *pools* separados (KIECKER et al., 2004). Portanto, quando apenas um peptídeo do arranjo é reconhecido em um ensaio, dois *pools* separados apresentarão o ensaio positivo, e assim, o peptídeo alvo será facilmente identificado. Contudo, se porventura, uma matriz apresenta muitos *pools* reativos, a interpretação e identificação do peptídeo alvo não é tão clara.

Outro ponto fundamental é o comprimento do peptídeo e a sua solubilidade. Os peptídeos de 9 mers são considerados estimulantes ideais, pois, podem ser apresentados pelas moléculas HLA de classes I e II. A sobreposição entre dois peptídeos consecutivos assegura que durante o processamento nenhum possível epítipo seja clivado e, que, portanto, evita que este esteja ausente. Assim, peptídeos de 15 mers com sobreposição de 11 mers conteriam cada possível 9 mers presente em dois 15 mers. Quanto a solubilidade, esta é uma característica inerente de cada peptídeo. Contudo, a adição dos íons H^+ e OH^- em suas extremidades, estabiliza e promove maior solubilidade a molécula (PIRA et al., 2010).

Quando iniciamos a triagem dos peptídeos candidatos a epítopos de células T através das matrizes de *pools* de peptídeos, os ensaios ELISPOT para IFN- γ permitiram selecionar 22 peptídeos da proteína NS1 e 21 peptídeos da proteína NS3 os quais foram mais freqüentemente encontrados entre os ensaios respondedores. Como mencionado anteriormente, apesar do número elevado de ensaios descartados durante a etapa de *pool*, nós seguimos a investigação com os ensaios de peptídeos individuais e a subsequente análise desses peptídeos candidatos devido à criteriosa avaliação utilizada para considerarmos um ensaio reagente. A maioria dos fabricantes dos *kits* ELISPOT considera o ensaio reagente quando o número de células formadoras de *spot* por 1 milhão de PBMC ($SFC/10^6$ PBMC) é igual ou superior a 20 ou ainda quando a diferença entre o poço teste e o poço branco é igual ou superior a 4 (BD Biosystems™, R&D Systems™). Nós utilizamos

cinco parâmetros para considerarmos os poços dos ensaios reagentes. Convém mencionar, que os quatro primeiros parâmetros foram instituídos em um dos nossos laboratórios colaboradores e o quinto parâmetro foi instituído por nosso grupo. Desta forma, os 22 peptídeos da proteína NS1 e 21 peptídeos da proteína NS3 reativos nos ensaios de *pools* foram, subsequentemente testados de forma individual, onde os mesmos critérios para avaliação de um ensaio positivo foram utilizados.

7.1 Peptídeos candidatos a epítomos de células T

7.1.1 Peptídeos da proteína NS1

Os ensaios realizados com os 22 peptídeos mais frequentemente respondedores nos ensaios de *pools* da proteína NS1 foram realizados entre n=52 pacientes DENV-3 positivos. Desta forma, após avaliarmos os cinco parâmetros considerados para os critérios de reatividade antigênica, 16 peptídeos que apresentaram freqüência superior a 15% entre a maioria dos ensaios reagentes (n=38) foram considerados potenciais candidatos a epítomos de células T (Figura 9).

Estudos na literatura com o objetivo de identificar potenciais epítomos de células T da proteína NS1 do DENV são escassos. A maioria dos trabalhos tem identificado epítomos de célula B para esta proteína. Isto talvez seja favorecido pelo fato desta proteína ser secretada e induzir forte resposta humoral durante a vigência da infecção pelo DENV (FALCONAR, 1997).

Entre os epítomos de células B da NS1 identificados durante a infecção natural pelo DENV em humanos encontram-se: NS1_{29_43}, do DENV-1, NS1_{149_157}, NS1_{29_37}, NS1_{53_61}, NS1_{267_275}, NS1_{135_143}, NS1_{329_337}, NS1_{25_33} e NS1_{331_339} do DENV-2, NS1_{29_43} do DENV-3, NS1_{29_43} do DENV-4 e NS1_{133_149}, NS1_{572_591}, NS1_{33_49}, NS1_{169_179}, NS1_{311_330} e NS1_{330_346} de especificidade sorotípica inespecífica (VAUGHAN et al., 2010).

A NS1 é uma glicoproteína versátil atuando como cofator para replicação viral e proporcionando um mecanismo de escape do vírus ao antagonizar funções do

sistema complemento quando expressa na superfície celular ou secretada no meio extracelular (CHUNG et al., 2006a). Imunização com anticorpos anti-NS1 do DENV, WNV e vírus da Febre Amarela protege animais de experimentação quando esses são desafiados a níveis letais (DIAMOND et al., 2003; CHUNG et al., 2006b; HENCHAL; HENCHAL; SCHLESINGER, 1988). Contudo, quando secretada, a NS1 induz a formação de auto-anticorpos que provocam dano endotelial e favorecem a patogênese da dengue (LIN et al., 2003).

Falconar (2007) identificou forte resposta humoral contra epítomos N-terminais da NS1 que compartilham o motivo ELR (RPQPTELRY, QPTELRYSW, TELRYSWKT) associados com FHD em humanos e camundongos.

Youn et al. (2010) identificaram um curto motivo peptídico N-terminal da NS1 responsável por direcionar a proteína para a superfície celular ou secretada no meio extracelular. No WNV, a NS1 encontra-se em alta expressão na superfície celular e é pouco secretada. Este fato ocorre de forma contrária no DENV. Marcadamente, os seguintes aminoácidos são encontrados nas posições 10 e 11 desses vírus: WNV – RQ – e o DENV em seus quatro sorotipos – NK. A substituição do R pelo N na posição 10 foi suficiente para modular o alvo de expressão do WNV.

Em nosso trabalho, 16 peptídeos da NS1 foram associados com forte indução de resposta de células T. De fato, o mapeamento de epítomos pode auxiliar na identificação de sequências sinalizadoras, de escape viral e que favoreçam a replicação. Especificamente, na NS1 podemos encontrar sequências que possam ser responsáveis pela indução dos auto-anticorpos envolvidos na patogênese da dengue. Assim, a caracterização do tipo de resposta imune mediada pelas células T pode contribuir para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e de uma vacina eficiente contra a dengue.

7.1.2 Peptídeos da proteína NS3

Após a realização dos ensaios de ELISPOT em matrizes de *pools* de peptídeos, 21 peptídeos reativos foram selecionados e subsequentemente testados de forma individual entre n=52 pacientes DENV-3. Nesta etapa, 14 peptídeos com

freqüência superior a 20% entre os ensaios reagentes (n=30) foram considerados candidatos a epítomos de célula T (Figura 10).

A proteína NS3 é bastante imunogênica provocando uma resposta imune celular robusta e normalmente associada com a forma grave da dengue. A razão para esta dominância imunogênica não está clara. Como mencionado anteriormente, durante o ciclo biológico viral, uma única poliproteína é degradada em 10 polipeptídeos por proteases do hospedeiro e pela própria NS3, a qual detém as funções de protease, helicase e NTPase. A clivagem proteolítica desta poliproteína provavelmente deve ser feita em concentrações equimolares dos polipeptídeos. Contudo, possíveis diferenças em alvos intracelulares e de estabilidade podem levar a uma “preferência” no processamento e apresentação dos peptídeos da NS3 em relação às demais proteínas (YEWDELL, 2006).

Assim, vários peptídeos da NS3 têm sido identificados como epítomos de células T durante a vigência de infecções naturais entre os quatro sorotipos do DENV (VAUGHAN et al., 2010). Alguns desses epítomos encontram-se entre os 14 peptídeos frequentemente reativos em nosso estudo e assim propostos como epítomos de células T. Entre eles temos: NS3_405_419, NS3_525_539, NS3_285_299, NS3_209_223, NS3_493_507. Convém mencionar que os epítomos são numerados pelo sorotipo e subtipo viral. Portanto pequenas diferenças entre a sequência de aminoácidos são esperadas.

É freqüente a correlação entre os epítomos e o fenótipo do linfócito T (CD4+ ou CD8+), a restrição aos alelos HLA e a severidade da doença. Nesse sentido, vários trabalhos têm enfatizado uma associação entre a forma hemorrágica da dengue e os linfócitos T contra os epítomos da NS3.

Loke et al. (2001) identificaram três epítomos de NS3 (TVWVPSIK, NYADRRWCF, EALRGLPIR) reconhecidos por células T CD8+ em pacientes FHD. Simmons et al (2005) também associaram o epítomo NS3 – GINYADRRWCF com forte resposta de célula T em Vietnamitas com FHD em infecções secundárias. Em acréscimo, esse estudo revelou que numerosos epítomos da NS3 estão compreendidos entre a região 200-324. Esta apresenta cerca de 78% de homologia entre os sorotipos, sugerindo esta região como boa candidata para uma vacina de dengue baseada em epítomos.

Zivna et al., (2002), em estudo realizado entre dez crianças na Tailândia, demonstraram uma forte resposta de células T CD8+ peptídeo-específica para

NS3_221_232 - LAPTRVVAEEME do DENV-4 restrito ao HLA-B*07. Essa resposta foi correlacionada com pacientes que apresentam a FHD em infecções secundárias. Em outro estudo, Mongkolsapaya et al. (2003) também identificaram uma forte resposta de linfócitos T CD8+ específica em pacientes com FHD contra o epítipo NS3_130_144 – GTSGSPIIDKK e seus variantes naturais entre os quatro sorotipos restrito ao HLA-A*1101. Esse fato também foi descrito por Duangchinda et al. (2010), os quais colocaram este epítipo como uma sequência imunodominante envolvida com a forma hemorrágica da dengue.

7.2 Associação entre o peptídeo e o haplótipo HLA

O extremo polimorfismo dos genes HLA de classe I e II tem uma grande influência na função biológica de suas moléculas. A maioria desses polimorfismos resulta em mudanças significativas na composição de seus aminoácidos nos domínios protéicos das moléculas HLA, os quais interferem na ligação e subsequente apresentação dos peptídeos antigênicos para as células T (PARHAM, 2005).

Libraty et al. (2001) demonstraram que o DENV induz maior expressão das moléculas HLA nas células infectadas. Desta forma, essas moléculas apresentam um papel importante na resposta imune do hospedeiro contra este vírus, o que tem contribuído para vários estudos de associação genética e a dengue.

Contudo, vários fatores têm dificultado a interpretação de estudos de associação caso-controle e o alelo HLA. Dentre esses podemos mencionar: os aspectos étnicos e o tamanho da população de estudo, a frequência e composição dos alelos e haplótipos HLA detectado, o grau de resolução das técnicas de tipagem alélica e as definições biológicas e clínicas do diagnóstico da dengue em investigação (CARDON; BELL, 2001). Assim, uma ampla amostragem incluindo pacientes e controles é essencial para prover alto poder estatístico na detecção de verdadeiras associações HLA e fenótipo da doença. Neste contexto, a maioria dos estudos genéticos e a dengue tem sido realizados em populações do Sul e Sudeste Asiático e no Caribe. Poucos estudos têm sido realizados nas Américas (STEPHENS et al., 2010).

Diante disso, nosso estudo pode contribuir na avaliação preliminar desses estudos de associação genética e a dengue nas Américas. Portanto, além da identificação dos peptídeos das proteínas NS1 e NS3 frequentemente capazes de elicitar uma resposta de célula T entre os pacientes DENV-3, nós tipificamos os alelos HLA de nossa amostra (n = 43) e agrupamos em supertipos de acordo com as características físico-químicas dos *pockets* das fendas HLA (item 6.3.1). Em acréscimo, nós investigamos se existe associação entre os alelos HLA e o peptídeo candidato (Tabela 5), ou seja, quais os alelos que frequentemente apresentam a sequência antigênica aos linfócitos T.

Para a construção de uma vacina baseada em epítomos de células T, é necessário conhecer se a sequência peptídica é apresentada pela maioria dos alelos HLA da população alvo, uma vez que, uma sequência antigênica apresentada por alelos HLA raros na população não permitirá a esta vacina uma grande eficiência.

Avaliando a resposta antigênica aos alelos mais freqüentes em nossa população, nós encontramos forte associação entre nossas sequências peptídicas frequentemente respondedoras e os alelos: HLA-A*23 (supertipo A24) e HLA-A*31, 34, 66 (supertipo A03); HLA-B*40 (supertipos B27 ou B44), HLA-B*39 (B27), HLA-B*08 (B08) e HLA-B*58 (B58); HLA-C*06 e HLA-C*08; HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*14.

A análise físico-química das especificidades dos *pockets* B e F utilizados no agrupamento dos supertipos propostos por Sidney et al. (2008) foram claramente observadas entre esses nossos resultados. Destacamos em negrito a provável sequência de 9 mers e sublinhado os aminoácidos âncoras dos *pockets* B e F.

Neste aspecto, o peptídeo NS1_41_55 mostrou forte associação (OR=12,96) com o alelo HLA-A*23, agrupado no supertipo A24. Este supertipo apresenta especificidade para aminoácidos aromáticos e alifáticos (*pocket* B) e aromático, alifático e hidrofóbico (*pocket* F). Neste peptídeo poderíamos considerar por exemplo, a sequência de 9 mers **RLATAIAGAWENGVC** como o provável epítopo. Semelhantemente, esta especificidade pode ser vista no peptídeo NS1_65_79 – **NLLWKQIANELNYIL** ou **NLLWKQIANELNYIL**.

Outro supertipo associado com a apresentação dos peptídeos antigênicos foi o A03. Suas especificidades são aminoácidos pequeno e alifático (*pocket* B) e básico (*pocket* F). Este fato pode ser visualizado no peptídeo NS1_285_299 – **VITENCGTRGPSLR**.

Em relação ao supertipo B27, o qual apresenta especificidade para aminoácidos básicos (*pocket B*) e aromáticos, alifáticos, básicos e hidrofóbicos (*pocket F*), forte associação também foi vista entre NS1_41_55 (OR=11,47) - **RLATAIAGAWENGVC** e NS1_121_135 (OR=12,52) – **AKIVTAETQNSSFII**.

A análise dos peptídeos candidatos e o supertipo B44, o qual apresenta especificidades para aminoácidos ácido (*pocket B*) e aromático, alifático e hidrofóbico (*pocket F*) revelou associação entre o peptídeo NS3_177_191 - **PELEEEEMFKKRNLTI** ou **PELEEEEMFKKRNL**TI (OR=15,18). De forma análoga, esta especificidade pode ser vista também para o peptídeo NS3_285_299 – **DEAHFTDPASIAARG** (OR=13,74)

Para o supertipo B58, nós encontramos forte associação entre os peptídeos NS1_285_299 - **VITENCGTRGPSLR** (OR=8,45), NS3_285_299 – **DEAHFTDPASIAARG** (OR=19,80) e NS3_525_539 – **RLKGESRKTFVELMR** (OR=7,58). Este supertipo é caracterizado pela especificidade de aminoácidos pequenos (*pocket B*) e aromáticos, alifáticos e hidrofóbicos (*pocket F*).

Em relação ao supertipo B08, o *pocket B* ainda permanece com especificidade indefinida, embora o *pocket F* seja específico para interações com aminoácidos aromáticos, alifáticos e hidrofóbicos. Para este supertipo, o peptídeo NS1_209_223 – **SWKLEKASLIEVKTC** - apresentou forte associação (OR=6,85). Devido a indefinição da posição 2 (*pocket B*), várias possibilidades de epítomos de 9mers podem ser associadas para este peptídeo.

É digno de nota que o alelo HLA-DRB1*11 foi associado de forma significativa entre 17 dos 30 peptídeos candidatos. Contudo, esse resultado pode ser devido a chance, uma vez que, nosso n amostral é muito pequeno e múltiplas análises foram feitas. Considerando-se que tivemos um total de 67 alelos, sendo 16, 21, 13, 12 e 5 alelos para os genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR e HLA-DQ, respectivamente, e que tivemos análise feita para 30 peptídeos, 2010 testes foram realizados (30 x 67 = 2010). Se considerarmos que todas essas associações não são verdadeiras, para um erro alfa = 5%, teríamos em média 100 falsas associações possíveis (2010 x 5%). Nós encontramos 37 associações entre todos os alelos e os 30 peptídeos. Pode ser que algumas dessas sejam falsas. Entretanto, outras são verdadeiras associações. Métodos bioquímicos são necessários para esta validação.

Desta forma, nós realizamos ensaios de afinidade de ligação para os alelos do gene HLA-DRB1 entre os peptídeos candidatos para validarmos essas prováveis

associações (ver item 7.5) Infelizmente, devido ao seu alto custo, esses ensaios não puderam ser realizados para os demais genes HLA.

7.3 Associação entre o peptídeo e a forma clínica da doença

Para avaliarmos se uma dada sequência peptídica estava correlacionada com a gravidade da doença, nós verificamos a associação entre as resposta dos peptídeos candidatos e a forma clínica da dengue. Neste caso, apenas o peptídeo NS1_297_311 mostrou-se associado com a doença severa (OR=5,4).

No entanto, enquanto este peptídeo NS1_297_311 – **SLRTTTVSGKLIHEW** - do DENV-3 apresentou associação com a gravidade da doença em humanos, considerando-se a infecção natural, estudos *in vitro* utilizando animais de experimentação (camundongos suíços), revelaram um caráter protetor durante imunização com o análogo peptídeo NS1_297_310 - **SVRTTTDSGKLITD** - do vírus da encefalite japonesa. Este estudo revelou forte resposta humoral nesses animais associando este peptídeo como um epítipo de célula B (DIEWASTHALY et al., 2007).

É importante salientar que o nosso estudo apresenta um caráter exploratório com o objetivo de indicarmos possíveis regiões do DENV-3 que elicitam forte resposta de célula T. Assim, poucos resultados referentes ao mapeamento deste vírus têm sido publicados ou enfatizados na literatura.

7.4 Efeito combinado do peptídeo e o genótipo HLA na severidade da doença

Uma das características marcantes dos epítopos de células T é sua necessidade de apresentação pelas moléculas MHC, denominada restrição MHC (ABBAS; LITCHMAN; POBER, 2007). Muitos epítopos podem ser apresentados por uma, poucas ou várias moléculas HLA. Nesse contexto, é importante não apenas identificar a associação entre uma sequência antigênica candidata e um dado alelo,

mas também avaliar o efeito combinado, ou seja, a presença simultânea de um dado alelo HLA e a resposta positiva a uma sequência candidata.

Desta forma, nós avaliamos este efeito combinado peptídeo:HLA influenciando na gravidade da doença através de um modelo de regressão logística (Tabela 6).

Nossos resultados revelaram que associação conjunta entre os peptídeos NS1_45_59, NS1_85_99, NS3_405_419 e o alelo HLA-A*31(supertipo 01/03) influenciam na gravidade da doença. Esses resultados corroboram com o trabalho de Sierra et al., (2007) em um estudo realizado na população cubana (n=120), o qual associou este alelo favorecendo a susceptibilidade em desenvolver FHD durante infecção secundária pelo DENV-2. Além disso, nesse mesmo estudo, os autores também associaram o alelo HLA-B*15 com a FHD. O alelo HLA-B*15 pode ser agrupado entre os supertipos B7, B27 ou B44. A precisa determinação deste agrupamento não pode ser determinada devido a utilização de técnicas de tipagem de baixa resolução. Contudo, nossos resultados revelaram maior susceptibilidade a dengue grave na associação NS1_45_59:HLA-B*39 (B07/B27), NS1_41_55:HLA-B*35 (B7), NS1_201_215:HLA-B*39, NS3_209_223:HLA-B*39, NS3_405_419:HLA-B*39. Em acréscimo, o peptídeo NS3_497_511:HLA-B*51 (B7) também esteve associado com a gravidade da doença.

Esses resultados sugerem que os alelos pertencentes aos supertipos B7, B27 e B44 parecem estar associados com a susceptibilidade das formas severa da dengue. Em um estudo realizado na população Tailândesa (n=263), Stephens et al. (2002) demonstraram maior susceptibilidade a FHD para os alelos HLA-B*51 (B07) para todos os sorotipos do DENV durante infecção secundária. Entretanto, nesse mesmo trabalho, quando a infecção secundária foi determinada apenas pelo DENV-3, houve associação deste alelo HLA-B*51 favorecendo a forma clássica da dengue. Os estudos de Zivna et al. (2002) também relacionaram forte associação entre o peptídeo NS3_221-232 do DENV-4 com o alelo HLA-B*07 (B07) correlacionado com a FHD. Em acréscimo, recentemente, Vejbaeysa et al. (2009) associaram o alelo HLA-B*48 (B27) influenciando a FHD em infecções secundárias com todos os sorotipos de DENV.

Ainda em relação ao efeito combinado peptídeo:HLA, nossos resultados revelaram associação entre NS1_177_181, NS1_289_303, NS1_309_323, NS3_89_103 e NS3_181_195 com o alelo HLA-A*24 (A*24) favorecendo a

gravidade da doença. Esses achados são concordantes com os trabalhos de Loke et al. (2001), os quais associaram a presença deste alelo com a SCD na população Vietnamita (n=352). Além disso, Lan et al. (2008) também estudando n=629 pacientes com infectados pelo DENV no Vietnã, avaliando o polimorfismo no códon 70 do HLA-A*24, onde podemos encontrar o aminoácido histidina (HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2410) ou o aminoácido glutamina (HLA-A*2407) correlacionou a presença de SCD para o aminoácido histidina no códon 70 deste alelo em infecções primárias com DENV-1 e DENV-2.

Adicionalmente, Stephens et al. (2002) encontraram o alelo HLA-A*0203 (A02) associado com susceptibilidade em desenvolver a forma clássica da dengue em infecções secundárias com todos os sorotipos do DENV na Tailândia. Um outro alelo, o HLA-A*0207, nesse mesmo estudo, foi associado com maior susceptibilidade para FHD em infecções secundárias para os sorotipos 1 e 2. Chiewsilp et al. (1981) também encontraram o alelo HLA-A*02 associado com a FHD na Tailândia (n=87). Em outro estudo desenvolvido em Cuba com n=82 pacientes, Paradoa Perez et al. (1987) associaram o alelo HLA-A*01 com maior susceptibilidade em desenvolver FHD.

Estudos de associação entre os alelos HLA-C, DP e DQ ainda são muito preliminares e escassos na literatura. Nossos resultados revelaram forte associação entre: HLA-C*04:NS1_41_55, HLA-C*06:NS1_297_311, HLA-C*07:NS3_285_299, HLA-C*15:NS3_497_511, NS1_85_99:HLA-DQ*04, NS3_405_419:HLA-DQ*04, NS1_297_311:HLA-DQ*06 e NS3_497_511:HLA-DQ*03.

Em um estudo conduzido por Polizel et al. (2004) envolvendo n=64 pacientes brasileiros com DENV-1, os alelos HLA-DRB1*01 e HLA-DQ1 apresentaram maior susceptibilidade em desenvolver a DC em infecção primária. Nascimento et al., (2006) encontraram forte associação entre o alelo HLA-C*01 e a FHD numa coorte de DENV-3 em Recife, Brasil.

Por outro lado, alguns alelos têm sido associados com um caráter protetor em desenvolver as formas graves da dengue. Em nosso estudo, nós encontramos forte associação entre: NS1_237_251:HLA-A*30 (A01A03). Associações negativas entre os alelos HLA e a forma hemorrágica da dengue também foi encontrada entre os alelos HLA-A*33 (LOKE et al., 2001; STEPHENS et al., 2002); HLA-B*15 e HLA-B*44 em infecções secundárias por todos os sorotipos (STEPHENS et al., 2002); HLA-DRB1*0901 em infecções secundárias pelo DENV-2 (LAN et al., 2008); HLA-

A*29 (PARADOA PEREZ et al., 1987); HLA-DRB1*04 (LA FLEUR et al., 2002; SIERRA et al, 2007) e HLA-DRB1*07 (SIERRA et al., 2007). Nascimento et al (2006) associaram o alelo HLA-C*15 com resistência à infecção secundária.

Nós também avaliamos se o fato de um indivíduo tiver tido contato prévio com a sequência candidata (infecção secundária) influencia a apresentação desta sequência pelo alelo HLA considerado na gravidade da doença (Tabela 7). Este fato foi observado com forte associação entre HLA-A*68 (A03):NS1_241_255, HLA-A*11 (A03):NS3_497_511, HLA-B*14 (B27):NS1_45_59, HLA-B*07 (B07):NS1_297_311, HLA-B*58 (B58):NS3_89_103, HLA-B*15 (B07, B27, B58, B62):NS3_405_419.

Podemos inferir que o *status* naïve x memória do linfócito T pode contribuir para a patogênese da doença. Neste *status*, uma maturação de afinidade entre o TCR e o co-reconhecimento do peptídeo:MHC favorece a resposta linfocitária durante a infecção secundária. Este é o caso de epítomos de baixa imunogenicidade e conservados, que só induzem resposta após infecções múltiplas. Especificamente, os peptídeos NS1_297_311, NS1_497_511 e NS3_405_419 apresentam regiões conservadas entre os sorotipos e estiveram associados com o *status* secundário da infecção.

Adicionalmente, a combinação peptídeo:MHC também pode aparecer com maior frequência na infecção secundária, diante de epítomos sorotipo específico, o que foi evidenciado entre os peptídeos NS1_45_59, NS1_241_255 e NS3_89_103, os quais foram propostos em nosso estudo como epítomos do DENV-3.

Outras associações genéticas têm sido identificadas e associadas com a patogênese da dengue. Estudo de polimorfismo de um único nucleotídeo para os haplótipos do TNF e da linfotóxina α (LTA), compreendidos dentro da classe III do MHC, foram avaliados em um estudo na Tailândia. Essas citocinas compartilham o mesmo receptor e possuem cerca de 50% de homologia entre si. Polimorfismos nas posições -308 (G/A), -208 (G/A) e +488 (G/A) do TNF e nas posições +249 (A/G), +365 (G/C) e +720 (C/A) da LTA foram analisados. O haplotipo TNF-4, caracterizado pela substituição de um A em vez de G na posição -238) foi substancialmente aumentado em pacientes com FHD em infecções secundárias. Devido ao evidente desequilíbrio de ligação existente entre esse haplotipo e a LTA-3 (A = +249, G =+365, C=+720), essa associação TNF-4/LTA3 foi correlacionado com a gravidade da doença. Os autores também analisaram os alelos HLA de classe I e II nesta mesma coorte e verificaram uma maior frequência dos alelos HLA-B*48 e B*57 de

classe I e HLA-DRB1*0701 e HLA-DQB1* 03032 de classe II correlacionados com o haplotipo TNF-4 e LTA-3 (VEJBAESYA et al., 2009).

Epidemiologicamente, casos de SCD têm sido reportados em infecções secundárias em pacientes Tailandeses pertencentes ao grupo AB do sistema ABO sanguíneo (KALAYANARROJ et al., 2007). Os autores sugerem que os anticorpos naturais pertencentes a esse sistema, podem reagir cruzadamente contra o DENV, atribuindo aos pacientes certo grau de proteção. Isto não aconteceria com esses indivíduos AB, uma vez que, no soro destes não se encontram tais anticorpos.

Outros fatores genéticos associados com a patogênese da dengue são os polimorfismos na região promotora do CD-209, DCSIGN1-336, foram avaliados em um estudo na Tailândia, o qual revelou que o alelo G desta variante estava associado com uma forte resposta protetora contra a forma clássica da dengue (SAKUNTABHAI et al., 2005). Em outro estudo realizado no Vietnã, avaliando polimorfismos para o gene codificante para receptor da vitamina D, demonstrou uma baixa frequência do alelo *t* entre os pacientes com febre hemorrágica da dengue (FHD), sugerindo que este alelo pode exercer um caráter protetor em relação à severidade da doença. Neste mesmo estudo, a análise de polimorfismos na posição 131 do gene do FcγRII, cujo produto é capaz de mediar a ligação com anticorpos opsonizantes da classe IgG, revelou que a variante alélica R (para o aminoácido arginina), pode estar associada com a redução do risco de FHD facilitada por esses anticorpos (LOKE et al., 2002).

O genótipo selvagem AA para o gene da lectina ligadora de manose (MBL2) tem sido relacionado com trombocitopenia e maior susceptibilidade à dengue severa por ligação da MBL a resíduos carboidratos na superfície viral. Isso resultaria em ativação do sistema complemento e conseqüente lise das plaquetas (ACIOLISANTOS et al., 2008). A deficiência da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima ligada ao cromossomo X, pode contribuir para o aumento da replicação do DENV por provocar anormalidades na síntese dos intermediários reativos do oxigênio como os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (CHAO et al., 2008).

Proteínas transportadoras de antígenos (TAP) existentes na membrana do RE são fundamentais para o processamento de antígenos endógenos e apresentação aos linfócitos T CD8+, por moléculas MHC de classe I. A análise de polimorfismo genético nos resíduos 333 e 637 da TAP1 e dos resíduos 379, 565 e 665 da TAP2

foi avaliada por Soundravally e Hoti (2008) em pacientes com infecções primária e secundária. Este estudo revelou que a frequência do genótipo Ile/Ile para o locus 333 da TAP1 estava significativamente associado a uma diminuição de FHD entre infecções primária, quando comparada a dengue clássica. De forma semelhante, o genótipo Val/Val para o locus 379 da TAP2 estava associado com uma baixa frequência para FHD nas infecções primária. Este genótipo também estava associado com a diminuição do risco, em torno de 50%, para FHD em infecções secundárias. Indivíduos infectados que desenvolveram SCD nas infecções primárias mostraram baixa frequência do genótipo Asp/Asp para o resíduo 637 da TAP1. Em acréscimo, este genótipo foi associado a uma redução do risco em 0,643x para SCD em infecções primárias.

Polimorfismos genéticos também têm sido associados com a produção de várias citocinas que conjuntamente ou isoladamente podem contribuir para as manifestações clínicas graves da dengue. Perez et al (2010), em um estudo realizado com um grupo de indivíduos com antecedência de FHD durante infecção secundária, tendo como sequência DENV-1/DENV-2, demonstraram que o alelo A para TNF- α (-308) e os haplótipos ACC/ATA para a IL-10 (-1082/-819/-592) estavam associados com o fenótipo FHD. No entanto, o genótipo GG para o TNF- α (-308) e para o códon 25 do TGF- β 1 estavam associados com o fenótipo protetor. Neste caso, os autores concluíram que alta produção de TNF- α e a baixa produção da IL-10 parece aumentar o fenótipo severo da infecção pelo DENV-2 durante a infecção secundária, enquanto altas concentrações de TGF- β 1 parece exercer um caráter protetor contra a FHD.

Ainda em relação ao polimorfismo apresentado entre as citocinas, Fernandez-Mestre et al (2004) relataram uma alta associação do alelo TNF- α 308A entre os pacientes com DC que apresentavam manifestações hemorrágicas, atribuindo a este alelo um fator de risco para hemorragias. Além disso, esse estudo revelou que a associação entre o genótipo para alta produção de TNF- α e baixa concentração de IL-10 estava envolvido na forma severa da dengue.

Moléculas imunorregulatórias como o antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β 1) são importantes para manutenção das células T regulatórias (Treg). Desta forma, Cheng et al (2009) realizaram um estudo de associação entre o polimorfismo para os genes CTLA-4 +49A/G e TGF- β 1 -509C/T com a FHD e a carga viral em uma epidemia do DENV-2

ocorrida na Tailândia entre 2002 e 2003. Nesse estudo, a frequência do genótipo CC para TGF- β 1 -509 estava aumentada entre os pacientes com FHD quando comparados com a forma DC. Além disso, quando combinaram os efeitos do alelo G no CTLA-4 +49 e o genótipo CC para TGF- β 1 -509C, o risco aumentou em cerca de 2x para FHD além de estar correlacionado significativamente com elevada carga viral.

7.5 Avaliação dos ensaios de afinidade de ligação ao gene HLA-DRB1

Um elemento chave na resposta imune celular baseada em células T é o reconhecimento do peptídeo antigênico:MHC pelo receptor de célula T (TCR). Contudo, o alto grau de polimorfismo das moléculas MHC expressas na população humana é um obstáculo para identificação dessas sequências peptídicas capazes de elicitar uma resposta imune celular. Assim, ensaios de inibição competitiva realizados entre um peptídeo controle e um peptídeo teste têm sido utilizados para identificação de moléculas MHC com forte afinidade de ligação ao peptídeo teste. Esses ensaios permitem demonstrar que tipo de peptídeo antigênico pode se ligar com alta ou baixa afinidade a uma ou a múltiplas moléculas MHC (HLA degeneradas), e assim, identificar aqueles que podem ser reconhecidos pela maioria da população (SIDNEY et al., 1995).

Southwood et al., 1998 desenvolveram e validaram sistemas de ensaios para identificação de várias moléculas HLA-DR, as quais são representativas e predominante entre os alelos da população humana mundial. Assim, a aplicação desta metodologia de ensaios de ligação peptídeo:MHC tem sido utilizada com o objetivo de identificar peptídeos ligantes a moléculas HLA degeneradas contribuindo para o desenvolvimento de uma vacina baseada em epítopos. Contudo, os ensaios de afinidade de ligação são restritos e escassos devido ao seu alto custo, e assim, métodos *in silico* baseados nas características físico-química dos aminoácidos âncoras tem sido desenvolvidos e aprimorados para auxiliar na identificação e caracterização de peptídeos antigênicos (BRUSIC; BAJIC; PETROVSKY, 2004).

Em colaboração com a equipe do Dr. Alessandro Sette, nós avaliamos a afinidade de ligação entre os peptídeos das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 para

nove alelos HLA-DRB1: 0101, 0301, 0401, 0404, 0405, 0701, 0802, 0901, 1101, 1302, 1501. Esses alelos são os mais representativos da população mundial (SOUTHWOOD et al., 1998). A restrição aos alelos HLA-DR foi associada com alta e intermediária afinidade para uma $IC_{50} < 1000$ nM (Tabelas 8 e 9).

Nossos resultados revelaram que vários peptídeos NS1 e NS3 se ligam com alta afinidade aos alelos HLA-DRB1, e que, por conseguinte, são potenciais indutores de uma resposta celular mediada por linfócitos T CD4+. O exato papel das células T na dengue ainda permanece incerto. Contudo, podemos inferir que a interação dos diferentes mecanismos de resposta entre essas células e demais células imunológicas pode determinar a patologia evidenciada na dengue.

Conforme mencionamos no item 7.2, o alelo HLA-DRB1*11 apresentou forte resposta associativa entre os peptídeos candidatos. Contudo, devido ao pequeno tamanho da amostra analisada, algumas dessas associações podem não ser verdadeiras. Assim, os ensaios de afinidade de ligação foram utilizados para validar os reais peptídeos associados com este alelo. Nossos resultados revelaram que os peptídeos NS1_85_99, NS1_105_119, NS1_173_187, NS1_313_327, NS3_181_195, NS3_185_199, NS3_209_223, NS3_381_395, NS3_389_403, NS3_525_539, NS3_53_67, 77_91, NS3_105_119, NS3_113_127, NS3_137_151, NS3_201_215, NS3_205_219, NS3_237_251, NS3_265_279, NS3_293_307, NS3_297_311, NS3_309_323, NS3_353_367, NS3_357_371, NS3_373_387 apresentaram alta e intermediária força de ligação ($IC_{50} < 1000$ nM) para este alelo, e portanto, representam associações verdadeiras, mesmo considerando-se o pequeno valor amostral.

O número de estudos que mencionam associação de alelos HLA e peptídeos antigênicos na dengue são muito escassos. Em relação ao alelo HLA-DRB1*11, La Fleur et al. (2002) em estudo realizado no México com 47 pacientes com DC e 38 com FHD, revelaram uma associação negativa para este alelo. Portanto, este genótipo esteve relacionado com a resistência ao desenvolvimento da forma clássica da doença. Em acréscimo, esse estudo também revelou uma associação negativa entre o alelo HLA-DRB1*04 e o desenvolvimento de FHD. Dados semelhantes foram encontrados por Sierra et al. (2007) em 120 pacientes cubanos. Nesse estudo, além do HLA-DRB1*04, o alelo HLA-DRB1*07 também esteve associado negativamente com a FHD, em pacientes com infecção secundária (DENV-1/DENV-2).

7.6 Associação entre os resultados do ELISPOT e os dados de afinidade de ligação para o gene HLA-DRB1

Nós verificamos se um dado alelo HLA-DRB1 com alta afinidade a um peptídeo responsivo é muito freqüente entre a população de estudo. Desta forma, nós correlacionamos a afinidade de ligação de cada peptídeo candidato para cada alelo com o perfil de positividade para cada alelo na população de estudo (ou seja, freqüência de pacientes com resposta positiva para o alelo em questão dentro da população estudada).

Assim, nós apresentamos os dois peptídeos mais bem correlacionados, sendo o peptídeo NS1_297_311 o único que apresentou associação significativa considerando-se o valor de $p < 0,1$. Um outro peptídeo, NS3_181_195, também apresentou-se bastante “interessante” com um pequeno valor de p (Figura 11). Esses resultados podem ser mais facilmente elucidados com o aumento do tamanho amostral. Contudo, podemos discutir alguns pontos para considerarmos esses dois peptídeos como fortes candidatos a epítomos de células T e que podem ser subsequentemente utilizados como candidatos a formulação de uma vacina.

Vejamos, para o peptídeo NS1_297_311, quando houve alta afinidade de ligação para os alelos HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0802 e HLA-DRB1*1302, houve também uma alta proporção de positividade de pacientes que contém esses alelos entre o total de pacientes estudados. Semelhantemente, para o peptídeo NS3_181_195, alta proporção de positividade entre a população de estudo foi visualizada para os alelos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*1101. Esses resultados são primordiais e de grande contribuição para a construção de uma vacina, pois, quando houve afinidade entre o alelo e o peptídeo, houve uma proporção de positividade de pacientes que contém este alelo na população. Isto significa que é um alelo de grande afinidade e freqüente, ou seja, muitos indivíduos o possuem entre a população de estudo.

Além disso, quando o peptídeo NS1_297_311 revelou baixa afinidade de ligação para o alelo HLA-DRB1*1101, houve também uma diminuição da proporção de indivíduos positivos a este alelo entre a população estudada. Isto significa que o alelo é pouco freqüente na população de estudo e sem afinidade (0%) ao peptídeo.

Dados semelhantes foram observados para o peptídeo NS3_181_195 e o alelo HLA-DRB1*0802.

Estudos que mencionem este tipo de associação utilizando-se vetor de proporções, considerando-se a proporção de positividade a um dado alelo e a frequência de positividade deste alelo na população, são escassos na literatura.

7.7 Predição teórica para os alelos HLA de classe I e II e análise das sequências conservadas entre os sorotipos implicações para a proposição de epítomos de células T

As sequências candidatas a epítomos de células T das proteínas NS1 e NS3 do DENV-3 foram avaliadas por métodos computacionais avançados: *ANN* para os alelos HLA de classe I (A e B) e *consensus* para os alelos HLA de classe II (DRB1). Esses algoritmos retornaram os alelos ligantes e o peptídeo proposto permitindo uma análise comparativa entre os dados experimentais e teóricos (Apêndice C e Tabela 10).

Assim, o peptídeo NS1_41_55 apresentou forte associação teórica entre os alelos HLA-B*3501 (B07, B27), HLA-B*5301 (B7) e HLA-B*3501 (B07, B27). Esses dados condizem com associação experimental vista entre os alelos HLA-B*40 (B27, B44) e HLA-B*35 (B07, B27), os quais pertencem aos mesmos supertipos. Desta forma, nós sugerimos esta sequência como um epítomo de LT CD8+ apenas para o DENV-3.

O peptídeo NS1_85_99 apresentou forte associação de ligação, comprovada pelos ensaios de afinidade para o alelo HLA-DRB1*08. Essa associação também foi predita pelo método *consensus*. Além disso, esse peptídeo apresentou forte afinidade de ligação experimental para os alelos HLA-DRB1*0101, 0301, 0401, 0701, 0901, 1101, 1302 e 1501, sendo, portanto, promíscuo entre vários alelos de classe II. Este fato coloca esse peptídeo como um epítomo de célula T CD4+ do DENV-3.

Quando avaliamos o peptídeo NS1_121_135 a associação teórica e experimental foi observado para o alelo HLA-B*3501 (B07) e HLA-B*39 (B07, B27), respectivamente. Em acréscimo, os ensaios de afinidade foram correlacionados com os alelos HLA-DRB1*0401 e HLA-DRB1*0802. Assim, propõe-se este peptídeo como epítomo de célula T para dengue 3.

A análise do peptídeo NS1_201_215 comprovou a previsão teórica com a experimental para os alelos HLA-B*1503 (B27) e HLA-B*39 (B27), os quais pertencem ao mesmo supertipo. Também é fato que este peptídeo apresentou forte afinidade de ligação experimental para os alelos HLA-DR1*0101, 0401 e 0802. Além disso, parte desta sequência é conservada entre os sorotipos do DENV. Esses achados colocam esse peptídeo como epítomo de célula T.

A avaliação comparativa do peptídeo NS1_285_299 revelou associação entre os alelos HLA-A*34 (A*03) e HLA-A*6801 (A03), experimental e predito, respectivamente. Além disso, essa sequência apresentou alta afinidade experimental para o alelo HLA-DRB1*1302, encontrando-se parcialmente conservada entre os sorotipos. Desta forma, esse peptídeo é proposto como epítipo de célula T.

Outro peptídeo proposto como epítipo de célula T é o NS1_297_311. Associação comparativa foi encontrada entre os alelos preditos HLA-B*1517, HLA-B*5701, HLA-B*5801, todos pertencentes ao supertipo B58, e o alelo HLA-B*58 experimentalmente. A afinidade de ligação para o gene HLA-DRB1, foi encontrada para os alelos HLA-DRB1*0101, 0401, 0701, 0802 e 1501. Essa sequência é também conservada entre os sorotipos do DENV. Desta forma, este peptídeo também é proposto como epítipo de célula T.

A sequência peptídica NS1_309_323 apresentou forte afinidade de ligação para o alelo HLA-DRB1*0101. Além disso, houve associação teórica entre os alelos HLA-A*2902 (A24) e experimental HLA-A*24, os quais pertencem ao mesmo supertipo. Contudo esta sequência não encontra-se conservada entre os sorotipos. Assim, ela é proposta apenas como um epítipo de célula T para o DENV-3. Dados semelhantes foram visualizados para o peptídeo NS3_181_195.

O peptídeo NS3_185_199 apresentou alta afinidade de ligação para os alelos HLA-DRB1*1101 e 1501. De fato, o alelo HLA-DRB1*1101 apresentou forte correlação estatística para este alelo. Além disso, parte desta sequência encontra-se conservada entre os sorotipos do DENV. Assim, propõe-se este peptídeo com epítipo de célula T CD4+.

A avaliação do peptídeo NS3_209_223 demonstrou associação teórica entre os alelos HLA-B*2705 (B27) e HLA-B*1503 (B27) com o alelo HLA-B*39 o qual pode pertencer ao mesmo supertipo (B27). A afinidade foi vista entre os alelos HLA-DRB1*15 e HLA-DRB1*1101. Este último também foi predito teoricamente. Contudo, este peptídeo não se encontra conservado entre os sorotipos do dengue. Assim, apenas propomos esta sequência como epítipo de célula T para o sorotipo 3.

O peptídeo NS3_285_299 apresentou forte afinidade de ligação para o alelo HLA-DRB1*0401. Também este correlacionado com o alelo HLA-B*40 (B44) cujo supertipo foi predito teoricamente para o alelo HLA-B*4501 (B44). Devido a sua conservação entre os sorotipos, este peptídeo é proposto como epítipo de célula T.

Um dos mais conservados peptídeos entre os sorotipos dos DENV é o NS3_405_419. Suas associações experimentais com os alelos HLA-DRB1*0301, 0401, 0404, 0405, 0802 também foram preditas para todos esses alelos. Em acréscimo, percebe-se que associação teórica para os alelos HLA-A*1101 (A03), HLA-A*2601 (A03), HLA-A*3001 (A03) e HLA-A*6801 (A03) foi correlacionada experimentalmente com HLA-A*31 (A03) de mesmo supertipo. Assim, propõe-se este peptídeo como um forte epítipo de célula T.

A avaliação comparativa do peptídeo NS3_493_507 revelou que este peptídeo apresenta múltipla afinidade de ligação para os alelos HLA-DRB1. Em acréscimo, este peptídeo é parcialmente conservado entre os sorotipos. Isto define este peptídeo como epítipo de célula T CD4+.

O peptídeo NS3_525_539 também revelou múltiplas associações experimentais entre os alelos HLA-DRB1. Entre esses, o alelo HLA-DRB1*11 apresentou associação significativa com este peptídeo. Além disso, a análise comparativa revelou associação entre o alelo HLA-B*58 (B58) experimentalmente e o alelo HLA-B*1517 predito teoricamente. Parte deste peptídeo é conservado entre os sorotipos do dengue, o que o coloca como epítipo de célula T.

O peptídeo NS3_497_511 não apresentou associação com os ensaios de afinidade. Contudo, mostrou-se fortemente associado com o alelo HLA-B*51 (B07), o qual foi predito experimentalmente com os alelos HLA-B*0702 (B07), HLA-B*2501 (B07) pertencentes ao mesmo supertipo. Devido a sua conservação entre os sorotipos podemos sugeri-lo como epítipo de linfócito T CD8+.

A avaliação do peptídeo NS1_65_79 revelou associação entre o alelo HLA-A*23 (A24). Este dado foi predito teoricamente com alta afinidade de ligação para o alelo HLA-A*2403 (A24) e com afinidade intermediária para o alelo HLA-A*2902 (A24). Não apresenta conservação entre os sorotipos nem resposta aos ensaios de afinidade. Neste caso, podemos sugerir este peptídeo como epítipo de LT CD8+ para o dengue 3.

Os peptídeos NS1_45_59, NS1_177_181, NS1_209_223, NS1_241_255, NS3_89_103 apresentaram forte afinidade nos ensaios de ligação aos alelos HLA-DRB1 e não são conservados entre os sorotipos. Desta forma, podemos classificá-los como epítopos de células LT CD4+ apenas para o dengue 3. Adicionalmente, os peptídeos NS3_381_395, NS3_389_403 e NS3_393_407 apresentaram forte afinidade de ligação aos alelos HLA-DRB1 e sequencias conservadas entre os

sorotipos. Desta forma, essas sequências são consideradas epítomos de LT CD4+ entre os sorotipos.

Embora exista uma correlação entre carga viral e severidade, a forma hemorrágica da infecção pelo DENV é comum em infecções secundárias e durante a queda da viremia. Desta forma, tem sido proposto que a FHD pode resultar da imunopatologia mediada por célula T. Este fato tem ganhado notoriedade diante da hipótese do “pecado antigênico original”, onde células T de reatividade cruzada oriundas de uma primoinfecção são ativadas durante uma infecção secundária por um sorotipo distinto resultando em forte expressão de citocinas pró inflamatórias e diminuição de desgranulação celular (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; MONGKOLSAPAYA et al., 2006).

Desta forma, uma produção intensa de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α pelas células T, promovem disfunção endotelial que contribuem para o extravasamento de plasma característico da FHD/SCD. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel das células T durante infecções primárias ou secundárias da dengue. Células T CD8+ sorotipo-específica ou de reatividade cruzada citolíticas ou produtoras de citocinas têm sido detectadas na vigência de infecção pelo DENV em humanos e em modelo animal (BEAUMIER et al., 2008; MONGKOLSAPAYA et al., 2006)

Assim, não apenas a expressão de citocinas, mas também a presença de células T multifuncionais com alta taxa de proliferação celular e que desenvolvem mecanismos citotóxicos são importantes durante o desenvolvimento de uma resposta mediada por célula T. O tipo de resposta que é induzida pode modular as características clínicas da doença.

Duangchinda et al. (2010) em um estudo envolvendo uma coorte de crianças Tailândesas (n=10) infectadas pelo DENV-2 frente ao proteoma do dengue, identificaram que as células T da maioria dos pacientes são oligofuncionais ou monofuncionais, onde entre os pacientes com FHD, 80% das células apresentavam-se apenas secretoras de citocinas e 20% exibiam um fenótipo citotóxico. Contrariamente, na vigência de uma infecção primária e ou com a forma clínica DC, o fenótipo exibido pelas células T era citotóxico e com menor secreção de citocinas. Esses resultados sugerem que o fenótipo e a magnitude da resposta por célula T tem um papel importante na severidade da doença, e que no caso da dengue grave, exhibe elevada secreção de citocinas e baixa desgranulação celular.

Entender o papel das células T CD8+ na dengue é primordial para o desenvolvimento de uma vacina baseada em epítomos. Nesse aspecto, Yauch et al (2009) caracterizaram a resposta LT CD8+ contra o DENV, utilizando-se uma cepa do DENV-2 (S221), altamente virulenta em animais C57BL/6 (H-2^b), geneticamente deficientes nos receptores de interferons IFN- α/β R e IFN- γ R. Nesse estudo, os autores realizaram uma imunização baseada em epítomos restritos a moléculas H-2K^b e H-2D^b (equivalentes aos alelos HLA-A e B humano). Após 12-13 dias de imunização, os animais foram infectados. A imunização com peptídeo resultou no controle da infecção viral, reduzindo a viremia em cerca de 350x em relação ao controle. Esse experimento revelou ainda que a resposta da célula T CD8+ na dengue é polifuncional, ou seja, inclui proliferação, desgranulação e produção de citocinas e que pode desenvolver independentemente da rota de sinalização IFN- α/β .

Adicionalmente, Yauch et al (2010) investigaram o papel das células T CD4+ nesse mesmo modelo animal e avaliaram a imunização com epítomos dirigidos para este tipo celular. Os autores concluíram que as células T CD4+ DENV-2 específica apresentaram um fenótipo Th1 com secreção intracelular de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e CD40L e poderiam mediar citotoxicidade *in vivo*. Contudo, a depleção de LT CD4+ não apresentou efeito significativo no *clearance* viral antes da infecção. Um ponto importante é que a resposta humoral, com troca de isotipo e a resposta do LT CD8+ não foi dependente das células LT CD4+ na primoinfecção. A imunização com epítomos de LT CD4+ melhorou a resposta de citocinas e diminuiu significativamente a carga viral no baço e nos rins dos animais.

Esses últimos resultados favorecem o desenvolvimento de uma vacinação baseada em epítomos de células T. Contudo, convém mencionar que esses epítomos devem ser regiões altamente conservadas entre os sorotipos, uma vez que, células T de reatividade cruzada podem favorecer uma produção de citocinas exacerbada e culminar com as formas severas da dengue.

Em acréscimo, a vacina baseada em epítomos de células T, incluindo resposta de células LT CD4+ e LT CD8+ pode não ser capaz de prevenir a infecção. Contudo, apresenta eficiência em reduzir a carga viral e a severidade da doença, além de eliminar o risco do fenômeno ADE.

As pesquisas atuais que buscam desenvolver uma vacina contra a dengue, são baseadas em vírus vivos atenuados, inativados e quimeras moleculares. As

vacinas inativadas contém apenas proteínas estruturais e falham em desenvolver uma imunidade contra as proteínas não estruturais; além disso, necessitam de adjuvantes e múltiplas dosagens para indução de imunidade duradoura; apresentam alta custo devido a maior manipulação e combinação de vários fatores (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

As vacinas atenuadas devem ser imunogênicas, mas não reatogênicas, devem induzir imunidade celular e humoral semelhante a infecção natural, o calendário de vacinação deve ser determinado com cautela, sobretudo entre os indivíduos que já apresentam imunidade ou são imunocomprometidos (EDELMAN, 2007).

As vacinas quiméricas são semelhantes a um vírus atenuado, porém apresentam um alto custo. Em acréscimo, múltiplas construções são necessárias para assegurar a imunogenicidade e atenuação. Essas vacinas necessitam ser tetravalente e se baseiam nos níveis de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos. Entretanto, o risco de desenvolver as formas severas da dengue devido à indução do fenômeno ADE é iminente (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

8 CONCLUSÕES

- a) Seis peptídeos foram propostos como epítomos de células T: NS1_201_215, NS1_285_299, NS1_297_311, NS3_285_299, NS3_405_419 e NS3_525_539, sendo desta forma, potenciais candidatos para imunização em animais de experimentação;
- b) Dentre esses peptídeos, o NS1_297_311 apresentou-se associado com a gravidade da doença quando associado ou não aos alelos HLA, sugerindo sua eventual capacidade de eliciar uma resposta de célula B;
- c) Além disso, esse peptídeo esteve correlacionado com os ensaios de afinidade aos alelos HLA-DRB1 apresentando um perfil de positividade alélica entre a população de estudo. Isto significa que para os alelos muito freqüentes, ele apresenta alta afinidade, enquanto que a afinidade é praticamente nula, diante de alelos raros, o que no caso de uma vacina é primordial;
- d) O peptídeo NS3_405_419 é um dos mais conservados entre os sorotipos do dengue (13 de seus 15 aminoácidos são conservados), sendo, portanto, um excelente alvo para uma vacina baseada em epítomos;
- e) A associação NS1_237_251:HLA-A*30 (A01A03) apresentou-se correlacionada com um efeito protetor em desenvolver a dengue grave.

9 PERSPECTIVAS

- a) Caracterizar o fenótipo das células T diante dos peptídeos imunogênicos;
- b) Avaliar a reatividade antigênica das células T restrito aos alelos HLA mais frequentemente associados;
- c) Avaliar a resposta imune celular através da imunização de animais de experimentação com os peptídeos imunorreativos;
- d) Realizar o mapeamento e caracterização da resposta imunológica das demais proteínas não estruturais do vírus dengue 3.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Immunologia celular e molecular. 6^a Ed. São Paulo: Revinter, 2008.

ACIOLI – SANTOS, B. et al. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. Human Immunology, New York, v. 69, n. 2, p. 122-128, 2008.

ANDERSON, K. et al. Burden of symptomatic dengue infection in children at primary school in Thailand: a prospective study. Lancet, London, v. 369, n. 9571, p. 1452-1459, 2007.

ANTHONY, D. D.; LEHMANN, P. V. T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. Methods, San Diego, v. 29, n. 3, p. 260-269, 2003.

ASSENBERG, R. et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. Journal of Virology, Washington, v. 83, n. 24, p. 12895-12906, 2009.

AZEREDO, E.L. et al. NK cells displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules are associated with mild dengue disease. Clinical Experimental Immunology, London, v.143, n.2, p.345-356, 2006.

BANDYOPADHYAY, S.; LUM, L. C.; KROEGER, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 11, n. 8, p. 1238-1255, 2006.

BEAUMIER, C. M.; ROTHMAN, A. L. Cross-Reactive Memory CD4+ T Cells After the CD8+ T Cells Responses to Heterologous Secondary Dengue Virus Infections in Mice in a Sequence-Specific Manner. Viral Immunology, New York, v.22, n. 3, p. 215-219, 2008.

BRASIL, Portaria nº5 de 21 de Fevereiro de 2006 dispõe sobre as doenças de notificação compulsória. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=32618> . Acesso em: 10 set 2010.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim sobre a dengue. Brasília, DF, 2010a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/svs/>>. Acesso em: 10 set 2010.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Série Histórica sobre a dengue. Brasília, DF, 2010b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/notasriehtoricadenguemaro2009.pdf>>. Acesso em: 10 set 2010.

BRANDT, W. E. et al. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. Journal of Immunology, Baltimore, v. 105, n. 6, p. 1565-1568, Dec. 1970.

BRUSIC, V. et al. Efficient discovery of immune response targets by cyclical refinement of QSAR models of peptide binding. Journal Molecular Graphs and Modeling, New York, v.19, n.5, p.405-11, 467. 2001.

BRUSIC, V. et al. Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules. Immunology Cell Biology, Adelaide, v.80, n.3, Jun, p.280-5. 2002.

BRUSIC, V, BAJIC, V. PETROVSKY, N. Computation methods for prediction of T-cell epitopes – a framework for modeling testing, and applications. Methods. San Diego, v. 34, n. 4, p. 436-443, 2004.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1043-1125.

BUNCE, M. et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens, Copenhagen, v. 46, n.5, p.355-367, 1995.

CARDON, L. R.; BELL, J. I. Association study designs for complex diseases. Nature Reviews Genetics, London, v. 2, n. 2, p. 91-99, 2001.

CASEIRO, M.M. et al. Dengue. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo, v.60, n.9, p.716-724, 2003.

CATTAND, P. et al. Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis, and African trypanosomiasis. In: JAMISON, D. T. et al.(Ed.) Disease

control priorities in developing countries, 2. ed. Washington, Worldbank, 2006, p. 451-466.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANAMA, S. et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 185-189, 2004.

CHANG, H. H. et al. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v.186, n. 6, p. 743-51, 2002.

CHAO, Y. C. et al. Higher infection of dengue virus serotype 2 in human monocytes of patients with G6PD deficiency. PLOS one, San Francisco, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2008.

CHEN, W. J. et al. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. American Journal Tropical Medicine Hygiene, Baltimore, v.55, n.1, Jul, p.12-6. 1996.

CHEN, R. F. et al. Combination of CTLA – 4 and TGF β 1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue – 2 outbreak. Clinical Immunology, New York, v. 131, n. 3, p. 404-409, 2009.

CHENG, H. J. et al. Anti – dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. Molecular Immunology, Oxford, v. 47, n. 2 – 3, p. 398-406, 2009.

CHERNOV , A.V. et al. The Two-component NS2B-NS3 Proteinase Represses DNA Unwinding Activity of the West Nile Virus NS3 Helicase. Journal Biology Chemistry., London, v. 283, n.25, p.17270–17278, 2008.

CHIEWSLIP, P. et al. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. American Journal Tropical medicine and Hygiene., Baltimore, v.30, n.5, p.1100-1105, 1981.

CHUNG, K. M. et al. West Nile virus non-structural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. Proceeding of the National

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006a.

CHUNG, K. M. et al. Antibodies against West Nile virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and independent mechanisms. Journal of Virology, Washington, v. 80, n. 3, p. 1340-1351, 2006b.

CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of dengue patient cohort in Recife, Brazil. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v. 77, n.6, p. 1128-1134, 2007.

DAVIDSON, A. D. Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. Advances in Virus Research, New York, v. 74, p. 41-101, 2009.

DEUBEL, V. et al. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. Journal Medicine Virology, v.53, n.3, Nov, p.212-7. 1997.

DEEN, J. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. Lancet, London, v. 368, n. 9530, p. 170-173, 2006.

DE SOUZA, V. A. et al. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. Journal Clinical Virology, v. 39, n. 3, p. 230-233, 2007.

DIEWASTHALY, S. et al. Chimeric T helper-B cell peptides induce protective response against Japanese encephalitis virus in mice. Protein peptide letter. Gainesville , v. 14, p. 543-551, 2007.

DIAMOND, M. S. et al. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. Journal of Virology, Washington, v. 74, n. 17, p. 7814-7823, 2000.

DIAMOND, M. S. et al. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile Encephalitis virus. Journal of Virology, Washington, v. 77, n. 4, p. 2578-2586, 2003.

DUANGCHINDA, T. et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 107, n. 39, p. 1073-1083, 2010.

EDELMAN, R. Dengue vaccines approach the finish line. Clinical infectious diseases. Chicago, v. 45, p. 56-60, 2007.

ENDY, T. P. et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v. 156, n.1, p. 40-51, 2002.

EREN E, TRAVERS, P. The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions. In: Lechler R. A e Warrens, A. (Ed.). HLA in Health and Disease. 2^a ed., San Diego, Academic Press, 2000, p.23-33.

FALCONAR, A. K. I.; YOUNG, P. R. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non – structural glycoprotein, NS1. Journal of Virological Methods, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 323-332, 1990.

FALCONAR, A.K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. Archives of Virology, Wien, v. 142, n. 5, p. 897-916, 1997.

FALCONAR, A. Antibody responses are generated to immonodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. Clinical vaccine immunology, Washington, v. 14, p. 493-504, 2007.

FALCONAR, A. K.; DE PLATA, E.; ROMERO – VIVAS, C. M. Altered enzyme – linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM) / IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. Clinical and Vaccine Immunology, Washington, v. 13, n. 9, p. 1044-1051, 2006.

FALGOUT, B. et al. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. Journal of Virology, Washington, v. 64, n. 9, p. 4356-4363, 1990.

FALK, K. et al. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature, London, v. 351, n. 6324, p. 290-6, 1991

FERNANDEZ – MESTRE, M. T. et al. TNF – alpha – 308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. Tissue Antigens, Copenhagen, v. 64, n. 4, p. 469-472, 2004.

FIRTH, A.E.; ATKINS, J.F. Evidence for a novel coding sequence overlapping the 5'-terminal approximately 90 codons of the gill-associated and yellow head okavirus envelope glycoprotein gene. Virology Journal. London, v.6, p.222, 2009.

FRAHM, N. et al. Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. European journal of immunology, Weinheim, v. 37, n. 9, p. 2419-2433, 2007.

GAZANE, A. et al. A fluorospot assay to detect single T lymphocytes simultaneously producing multiple cytokines, Journal of immunological methods, Amsterdam, v. 283, n. 1-2, p. 91-98, 2003.

GROMOWSKI, G.D.; BARRET, A.D. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. Virology, New York, v.366, n.2, p.349-360, 2007.

GROOT, A. SCOTT, D. Immunogenicity of protein therapeutics. Trends in Immunology, Oxford, v. 28, n. 11, p. 482-490, 2007.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell culture and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Reviews in Microbiology, Washington DC, v. 11, n. 3, p. 480-496, July 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUY, B. Immunogenicity of sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. Journal Clinical Virology, Amsterdam, v.46, s.2, s16-s19, 2009.

GUZMAN, M. G. ; KOURI, G. Dengue: an update. Lancet Infectious Disease, New York, v.2, n.1, Jan, P.33-42. 2002.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. International Journal of Infectious Disease, v.8, n.2, Mar, p.69-80. 2004.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. The Yale Journal of biology and Medicine, v.42, n. 5, p. 350-62, 1970.

HALSTEAD, M. O'ROURKE, E. Antibody enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. Nature, London, v. 265, p. 739-741, 1977.

HALSTEAD, S. B. The pathogenesis of dengue: molecular epidemiology in infectious disease. American Journal Epidemiology. Baltimore, v.114, p.632-648, 1981.

HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 32, n. 1, p. 154-156, 1983.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science, New York, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.

HALSTEAD, S. B. DEEN, J. The future of dengue vaccines. Lancet, London, v. 360, p. 1243-6, 2002.

HALSTEAD, S.B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. Baltimore, v.65, n.3.,p.180-183, 2001.

HALSTEAD, S. B.; MARCHETTE, N. J. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. Baltimore, v.69, s.6, p.5-11, 2003.

HANG, V. T. et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. PLoS Neglected Tropical Diseases, São Francisco, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2009.

HENCHAL, E. A.; HENCHAL, L. S.; THAISOMBOONSUK, B. K. Topological mapping of unique epitopes on the dengue – 2 virus NS1 protein using monoclonal antibodies. Journal of General Virology, London, v. 68, n. 3, p. 845 – 851, 1997.

HENCHAL, E. A.; HENCHAL, L. S.; SCHLESINGER, J. J. Synergistic interactions on anti- NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. Journal of General Virology, London, v. 69, n. 8, p. 2101-2107, 1988.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v.3, p.19-28, 2003.

HOLMES, E.C. The evolution and epidemiology of dengue virus. Salud Publica Mexico. Cuernavaca. v.49, p.296-300, 2007.

HSIEH, Y.H.; CHEN, CWS. Turning points, reproduction number, and impact of climatological events for multiwave dengue outbreaks. Tropical Medicine and International Health. Oxford, v.14, n.6, p. 628638, 2009.

HUANG, Y. H. et al. Antibodies against dengue virus E protein peptide bind to human plasminogen and inhibit plasmin activity. Clinical and experimental Immunology, London, v. 110, n. 1, p. 35-40, 1997.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. The Journal of General Virology, London, v. 40, n. 3, p. 531-44, 1978.

IHAKA, R.; Gentleman, R. R. A language for data analysis and graphics. Journal Computer Graph Statical, v. 5, p. 299, 1996

INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS/HUMAN LEUCOCYTE ANTIGENS. Nomenclature for Factors of the HLA System. London, 2010. Disponível em: <<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.htm>> Acesso em: 30 out 2010.

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

ITO, M. et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. Archives of Virology, Wien, v.10, p. 741-749, 2009.

JENKINS, G.M.A. et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. Journal Molecular Evolution, New York, v.54, p.152–161, 2002.

JINDADAMRONGWECH, S.; THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. Archives of Virology, Wien, v. 149, n. 5, p. 915 – 927, 2004.

JUFFRIE, M., G. et al. Thijs. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. American Journal Tropical Medicine Hygiene, Baltimore, v.65, n.1, Jul, p.70-5. 2001.

KANGUEANE, P.; SAKHARKAR, M. Structural basis for HLA-A2 supertypes. Methods in molecular biology. Totowa, v.409, p.155-162, 2007.

KALAYANAROOJ, S. et al. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. The Journal Infectious Diseases, Chicago, v. 195, n. 7, p. 1014, 2007.

KALYUZHNY, A.E. ELISPOT assay on membrane microplates. Methods in molecular biology. Totowa, v..536, p.355-365, 2005.

KERN, F. et al. Measuring Ag-specific immune responses: understanding immunopathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer. Trends in immunology, Oxford, v. 26, n. 9, p. 477-484, 2005.

KHAN, A. et al. Conservation and variability of dengue virus proteins: implications for vaccine design. PLOs Neglected tropical diseases. San Francisco, v. 2, n. 8, p. 1-15, 2008.

KIECKER, F. et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides – what kind of peptide for which purpose? Human Immunology, New York, v. 65, n. 5, p. 523-36, 2004.

KITTIGUL, L., W. et al.. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. Journal Virology Methods, San Diego, v.90, n.1, Oct, p.51-7. 2000.

KLEIN, J; SATO, A. The HLA System. New England Journal Medicine. Boston, v. 343, p.702-709, 2000.

KLOETZEL, R. OSSENDORP, F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. Current opinion in immunology, Philadelphia,. v. 16, n. 1, p. 76-81, 2004.

KLUNGTHONG, C. et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. Virology, New York, v.329, p.168-179, 2004.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real – time one – step RT – PCR. Journal of Virological Methods, San Diego, v. 138, n.1-2, p. 123-130, 2006.

KOURI, G. et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. Emergence Infection Disease. New York, v.4, n.1, p.89-92, 1998.

KREHER, C. R. et al. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality incytokine ELISPOT assays. Journal Immunology Methods, New York, v.278, n.1-2, p.79-93, 2003.

KUROSU, T. P. et al. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. Biochemical and biophysical research communications, New York, v. 362, n. 4, p. 1051-6, 2007.

KURUVILLA J. G. et al. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2^{-/-} γ c^{-/-} (RAG-hu) mice. Virology, New York, v. 369, n. 1, p. 143-152, 2007.

KUHN, R.J. et al. Structure of dengue virus:implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell. Georgetown, v.108, p.717-725, 2002.

LA FLEUR, C. et al. HLA – DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA – DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. Human Immunology, New York, v. 63, n. 11, p. 1039 – 1044, 2002.

LAN, N. et al. Protective and enchancing HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. PLOS Neglected Tropical Diseases., San Francisco, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2008

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase – polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. Journal of Virology, Washington, v. 73, n. 6, p. 4738 – 4747, 1999.

LETSCH, A. E C. SCHEIBENBOGEN. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. Methods, San Diego, v.31, n.2, Oct, p.143-9. 2003.

LI, L. et al. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. Science., Washington, v319, n. 5871, p. 1830-1834, 2008.

LIBRATY D. H. et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. Journal of Virology, Washington, v. 75, p. 3501-4747, 2001.

LIBRATY, D. H. et al. Differing influences of viral burden and immune activation on disease severity in secondary dengue 3 virus infections. The Journal of Infectious diseases, Chicago, v. 185, n. 9, p. 1213-1221, 2002b.

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. Journal of Medical Virology, New York, v. 69, n. 1, p. 82-90, 2003.

LIN, C. F. et al. Autoimmune Pathogenesis in dengue virus infection. Viral Immunology, New York, v. 19, n. 2, p. 127-32 2006.

LIN, H. et al. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. BMC bioinformatics. London, v. 9, n. 12, p. 1-10, 2008.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. trnas-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. Journal of Virology, Washington, V.71, p.9608-9617, 1997.

LOKE, H. et al. Strong HLA class I – restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double – edged sword? The Journal of Infectious diseases, Chicago, v. 184, n. 11, p. 1369-1373, 2001.

LOKE, H. et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor Fc gamma receptor IIa genes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 67, n. 1, p. 102-106, 2002.

LUZ, P. M.; GRINSZTEJN, B.; GALVANI, A. P. Disability adjusted life years lost to dengue in Brazil. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 14, n. 2, p. 237 – 246, 2009.

MAECKER, H. T. et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. Journal Immunology Methods, New York, v.255, n.1-2, p.27-40, 2001.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue vírus pathogenesis: an integrated view. Clinical Microbiology Reviews, Washigton DC, v. 22, n. 4, p. 564-81, 2009.

Marques, E. T. A. Vacina para a Dengue. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, São Paulo, v. 25, p. 4-7, 2002.

MARQUES, E. T. A.; MACIEL, R.; NORDSTRON, P. A. Overcoming health inequity: potencial benefits of a patient-centric, open source public health infostructure. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 547-557, 2008.

MATHEW, A.; ROTHMAN A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. Immunological Reviews, Copenhagen, v. 225, p. 300-313, 2008.

MELIAN, E.B.et al.NS1 of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. Journal of Virology. Washington, v.84, n.3, p.1641-1647, 2010.

MILLER, N. Recent progress in degue vaccine research and development. Current Opinion Molecular Therapeutics, London, v.12, n.1, p.31-38, 2010.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. Public Library of Science Pathogens, San Francisco, v. 4, n. 2, p. 0001-11, 2008.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the state of Rio de Janeiro, 2001. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Rio de Janeiro, v. 35, n. 8, p. 869-872, 2002.

MODIS, Y. et al. A ligand – binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. Nature, London, v. 427, n. 6972, p. 313-319, 2004.

MONATH, T. H. Dengue: The risk to developed and developing countries. Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 91, n. 11, p. 2395-2400, 1994.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross – reactive T cells suboptimal? Journal of Immunology, Baltimore, v. 176, n. 6, p. 3821 – 3829, 2006.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Nature Medicine, New York, v. 9, n. 7, p. 921 – 927, 2003.

MORENS, D. M. et al. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK – 21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 22, n. 2, p. 250 – 254, 1985.

MURRELL, S.; WU, S. C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. Biotechnology advances, New York, 2011

MORRISON, D. et al. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. Journal Infectious Disease, London, v.201, n.3, p.370-377, 2010.

MURPHY, B.R.; WHITEHEAD, S.S. Immune responses to dengue virus and prospects for a vaccine. The Annual Review of Immunology, Palo Alto, v.29, p.587-619, 2011.

NACHMAN, R. L.; RAFII, S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 359, n. 12, p. 1261-70, 2008.

NASCIMENTO, E. et al. Association of dengue severity with the hla-c1 allele in patient cohort in Recife-PE. In: National Meeting of Virology, 17, 2006, Campos do Jordão. Anais XVII National Meeting of Virology, Brasília: Virus Reviews & Research, 2006, p.51.

NIMMANNITYA, S. Clinical spectrum and management of dengue hemorrhagic fever. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 18, p.392-397, 1987.

NOGUEIRA, R.M.; ARAÚJO, J.M.; SCHATZMAYR, HG. Dengue vírus in Brazil, 1986-2006. Revista Panamericana Salud Publica, Washington, v.22, p.359-363, 2007.

OISHI, K. et al. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. Journal of Medical Virology, New York, v. 71, n. 2, p. 259-64, 2003.

ONLAMOON, N. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. Blood, Berlin, v.115, n.9, p.1823-1834, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3 ed. Geneva, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, 4 ed. Geneva: 2009.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Divisão de prevenção e Controle de Doença. A timeline for dengue in the Americas to decemer and noted first occurrences, Geneva, 2000. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue_finalltime.doc> Acesso: 10 set 2010

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever. Geneva, 2008. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>> Acesso em: 10 Set 2010

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; AMARAL, S. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, 1:53-54, 1983.

OTHMAN, S. RAHMAN, N. A. YUSOF, ROHANA. All serotypes of dengue virus induce HLA-A2 major histocompatibility complex class I promoter activity in human liver cells. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, V. 104, p. 806-808, 2010.

OSATORNI, K. SUMIYOSHI, H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. Virology, New York, v. 176, p. 643-647, 1990.

PARHAM, P. Putting a face to MHC restriction. Journal of Immunology, Baltimore, v. 174, p. 3-5, 2005.

PARADOA-PEREZ, M. L.; TRUJILLO, Y BASANTA, P. Association of dengue hemorrhagic fever with the HLA system. Haematologia, Budapeste, v.20, n.2, p.83-87, 1987.

PASSOS, MNP et al. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília, v. 37, n.4, p.293-295, 2004.

PASTORINO, B. et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. Antiviral Research. Amsterdam, v.87, N.3, P.281-294, 2010.

PATKAR, C. G; KUHN, R. J. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. Journal of Virology, Washington, V.82, n.7, p.3342-3352, 2008.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. Current Opinion in Microbiology, New York. v. 11, n. 4, p. 369 – 377, 2008.

PEREZ, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. Human immunology, New York, v. 71, p. 1135-1140, 2010.

PERNAMBUCO –Secretaria de Saúde Informe Dengue , Recife, 39ª Semana Epidemiol., 2010.

PIRA, G. et al. High throughput T epitope mapping and vaccine development. Journal of biomedicine and biotechnology. Cairo, v. 2010, p. 1-12, 2010.

PHUA KH, LEE VJ. Towards a comparative study of national health systems and policies in responding to newly emerging infectious diseases. In LEE, V. WILDER-SMITH, A. Demographic and epidemiological transitions in Asia., World scientific; 2007.

POLIZEL, J. R. et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white southern Brazilian population. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 559-562, 2004.

PRECOPIO, M. et al. Optimizing peptide matrices for identifying T-cell antigens. Cytometry Washington, v. 73, n. 11, p. 1071-1078, 2008.

PUTNAK, R. et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. Vaccine. Kidlington, v. 23, p.4442-4452, 2005.

RAMMENSEE, H. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. Current opinion immunology. London, v. 7, n. 1, p. 85-96, 1995.

RAPIN, N. et al. Computational Immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. PLoS.one, San Francisco, v.5, n.4, p.1-14, 2010.

RAVIPRAKASH, K. et al. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. Journal Virology, Washington, v.82, n.14, p.6927-6934, 2008.

REYES-DEL VALLE, J. et al. Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells . Journal of Virology, Washington, V. 79, n.8, p.4558-4567, 2005.

RHODES, D. A.; TROWSDALE, J. Genetics and molecular genetics of the MHC. Review Immunogenetics. Washington, v.1, p. 21-31, 1999.

RIGAU – PEREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Lancet, London, v. 352, p. 971-977, 1998.

RIGAU-PEREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. American Journal Tropical Medicine Hygiene, Baltimore, v.67, n.4, Oct, p.355-62. 2002.

RIGAU – PEREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 6, n. 5, p. 297 – 302, 2006.

ROTHMAN, A. L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. Current Topics Microbiology Immunology, New York, v.338, p.83-98, 2010.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Virology, New York, v.257, p.1-6, 1999.

SAKUNTABHAI, A. C. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nature Genetics, New York, v. 37, n. 5, p. 507-13, 2005.

SCHEIBENBOGEN, C., P. et al. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. Journal Immunology Methods, New York, v.244, n.1-2, Oct 20, p.81-9. 2000.

SCHIRLE, M. WEINSCHENK, T. STEVANOVIĆ, S. Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens, Journal of immunological methods, Amsterdam, v. 257, n. 1-2, p. 1-16, 2001.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. A timeline for dengue in the Americas to december 31, 2000 and noted first occurrences. 2001. Disponível em: <http://www.paho.org/> Acesso em 10 set 2010

SETTE, A.; SIDNEY, J. HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. Current Opinion in Immunology, Philadelphia, v.10, n. 4, p. 478-82, 1998.

SETTE, A.; SIDNEY, J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and –B polymorphism. Immunogenetics, v. 50, n.3-4, p. 201-12, 1999.

SIDNEY, J. et al. Several HLA alleles share overlapping peptide specificities. Journal of immunology, Baltimore, v. 154, n.1, p. 247, 1995.

SIDNEY, J. et al. Measurement of MHC/peptide interactions by gel filtration. Current protocols in immunology, New York, 1998.

SIDNEY, J. et al. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. BMC Immunology, London, v.9, n. 1, p. 1-15, 2008.

SIMMONS, C. P. et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. Journal of Virology, Washington, v. 79, n.9, p. 5665-5675, 2005.

SINGH, A. P.; MISHRA, B. N. Prediction of MHC binding peptide using Gibbs motif sampler, weight matrix and artificial neural network. Bioinformatics, Singapura, v. 3, n. 4, p. 150-155, 2008.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SHU, P. Y. et al. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Journal of Medical Virology, New York, v. 62, n. 2, p. 224-32, 2000.

SHU, P. Y. et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype – specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 10, n.4, p. 622-630, 2003.

SHU, P.Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 11, n. 4, p. 642 – 650, 2004.

SIERRA, B. et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. Human Immunology, New York, v. 68, n. 6, p. 531-540, 2007.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S. L. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. Human Immunology, New York, v. 68, n. 12, p. 973-9, 2007.

SOUNDRAVALLY, R. HOTI, S. Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. Clinical immunology Orlando, v. 67, p. 618-625, 2008.

SOUTHWOOD, S. et al. Several Common HLA-DR Types Share Largely Overlapping Peptide Binding Repertoires. Journal of Immunology, Baltimore, v. 160, n. 7, p. 3363-3373, 1998.

SRICHAIKUL, T. NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. Baillière's Clinical Haematology, London, v. 13, n. 2, p. 261-276, 2000.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, v. 338, p. 67-82, 2010.

SRIKIATKHACHORN, A. et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonic study. The Pediatric Infectious Disease Journal, Dallas, v. 26, n. 4, p. 283-290, 2007.

STEPHENS, H. A. et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. Tissue Antigens, Copenhagen, v. 60, n. 4, p. 309-18, 2002.

STEPHENS, H. A. F. HLA and other gene associations with dengue disease severity. Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, v. 338, p. 99-114, 2010.

STONE, J. D., W. E. DEMKOWICZ, JR. E L. J. STERN. HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays. Proceedings National Academic Science U S A, Washington, v.102, n.10, Mar 8, p.3744-9. 2005.

SUAYA, J. A. et al. Costs of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: A prospective study. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 80, n. 5, p. 846 – 855, 2009.

SUN, D. S. et al. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein I cause thrombocytopenia and mortality in mice. Journal of Thrombosis and Haemostasis, Oxford, v. 5, n. 11, p. 2291-9, 2007

SWAMINATHN, S.; BATRA, G.; KHANNA, N. Dengue vaccines: state of the art. Expert Opinion Therapy and Pathology. London, v..20, p.819-835, 2010.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC – SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. The Journal of Experimental Medicine, New York, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-71, 2002.

TAN, G. K. et al. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2010.

TWIDDY, S.S. et al. Phylogenetic relationships and differential selection Pressures among genotypes of dengue-2 virus. Virology. New York, v. 298, p. 63–72, 2002.

TWIDDY, S.S et al. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. Molecular biology and evolution. Chicago, v.20, n.1, p.122-129, 2003.

TSAI, C. J. et al. Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever. American Journal of Gastroenterology, New York, v. 86, p. 33-5, 1991.

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

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 181, p. 2 – 9, 2000.

VAZQUEZ, S. et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 132 – 137, 2005.

VEJBAESYA, S. et al. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. The Journal infectious diseases. Oxford, v. 199, p. 1442-1448, 2009.

VITA, R.; et al. The immune epitope database 2.0. Nucleic Acids Research, London, v. 38, p, 854-862, 2010.

WANG, P et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach PLOS Computacional Biology, San Francisco,. v.4, n.4, p.1-10, 2008.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND – JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 9, n. 11, p. 678 – 687, 2009.

WHITEHORN, J.; FARRAR, J. Dengue. British Medical Bulletin, London, v. 95, p. 161 – 173, 2010.

WINKLER, G. et al. Newly synthesized dengue – 2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane – associated after dimerization. Virology, New York, v. 171, p. 302-305, 1989.

WILSON, J.R. et al. West Nile virus nonstructural protein1 inhibits TLR3 signal transduction. Journal of virology., Washington, v.82, n.17, p.8262-8271, 2008.

WU, S.J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. Nature Medicine, New York, v.6, n.7, p.748-749, 2000.

XU, H. et al. 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. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, n. 8, p. 2872- 2878, 2006.

YAUCH, L. E. et al. CD4+ Cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. Journal of Immunology, Baltimore, v. 10, n. 9, p. 4049-4059, 2010.

YAUCH, L.E. et al. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. Journal of Immunology, Baltimore, v. 182, n. 8, p. 4865-4873, 2009.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. Antiviral Research, Amsterdam, v.80, n.2, p.87-93, 2008.

YEWDELL, J. W. Confronting complexity: Real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. Immunity, Cambridge, v. 25, n. 4, p. 533-543, 2006.

YOUN, S. et al. A Short N-Terminal Peptide Motif on Flavivirus Nonstructural Protein NS1 Modulates Cellular Targeting and Immune Recognition. Journal of Virology, Washington, v. 84, n. 18, p. 9516- 9532, 2010.

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

ZIVNA, L. S. et al. T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. Journal of Immunology, Baltimore, v. 168, n. 11, p. 5959-65, 2002.

ZIVNY, J. et al. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. Journal immunology. Baltimore, v. 163, p. 2754-2760, 1999.

ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. Structure, London, v. 12, n. 9, p. 1607-1618, 2004.

ZHANG, H.; LUNDEGAARD, C.; NIELSEN, M. Pan-specific MHC class I predictors: a benchmark of HLA class I pan-specific prediction methods. Bioinformatics, Oxford, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2009.

O Senhor(a) está tendo ou teve **Dor no Corpo?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Moleza no Corpo?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Dor nas Articulações?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Coceiras?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Dor na Barriga?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Náuseas?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Vômitos?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Diarréia?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Dor na Batata das Pernas?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Falta de Ar sem Relação com Esforço Físico?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Outros Sintomas? _____

O Senhor(a) notou **Manchas avermelhadas no corpo?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Sangramento na Gengiva?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Escarro com Rastro de sangue?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Outros Tipos de sangramento?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Se Sim, **quais?** _____

O Senhor(a) tem **Pressão Alta (HAS)?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Diabetes?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

alguma Doença Cardíaca (Cardiopatia)?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Asma?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Lupus?..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) tem ou teve **Câncer?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) tem **AIDS?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) tem **Hepatite B ou C?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) já teve **Febre Amarela?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) já foi **Vacinado contra Febre Amarela?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) fez **transplante de órgão?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

O Senhor(a) toma **alguma medicação regularmente?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Se Sim, **quais?**

Anti-Hipertensivo/Diurético Imunosuppressores Corticoíde Coquetel de proteases Outros
 Hipoglicemiante oral/Insulina Interferon Anti-Inflamatório não Hormonal Psicotrópicos

Tomou **alguma medicação p/febre, dor ou anti-inflamatório na última semana?**..... 1-Sim 2-Não 9-Não Informou

Se Sim, **quais?** _____

AAS Dipirona Anti-Inflamatório Hormonal Anti-Emético Outros
 Paracetamol Anti-Inflamatório não Hormonal Anti-Alérgico Antibiótico

Pressão arterial em mmHg? _____ / _____ /

Resultado da **Prova do Laço?** 1-Pos 2-Neg 9-Não Registrado

Diagnóstico Final? 1-D.C. 2-D.C.C. 3-Febre Hemorrágica da Dengue
 sem Febre Hemorrágica da Dengue, **Grau:** 1-I 2-II 3-III 4-IV

Entrevistador _____

Assinatura _____

Hora _____

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLECentro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES

Ministério da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: *Vacina de Dengue baseada em epítomos tetravalente e direcionada ao compartimento MMCI*

Instituição: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Prezado Senhor (a),

Estamos realizando um estudo sobre a Dengue para conhecer mais sobre a doença. A dengue é causada por um vírus e transmitida por mosquitos, porém ainda não se sabe porque cada pessoa reage ao vírus de maneira diferente. Alguns desenvolvem a forma grave, a Dengue hemorrágica e a sua ocorrência pode aumentar quando se tem a virose várias vezes. Uma forma de proteger a população contra as epidemias da Dengue é evitar água acumulada para o mosquito não proliferar ou fazer uma vacina contra a dengue. Para isto precisamos saber quais os possíveis efeitos da vacina e torná-la mais segura e eficaz.

Para isso o que precisamos fazer é coletar no mínimo 3 (três) amostras de 21ml de sangue durante a doença, sendo a 1ª coleta no dia do atendimento na urgência, a 2ª cinco dias depois e a 3ª cerca de 21 dias após a primeira coleta. Será coletado uma outra amostra de 21ml de sangue entre 6 (seis) e 12 (doze) meses após com o objetivo de analisar a duração dos anticorpos e/ou verificar se o seu filho(a) se contaminou nesse período, mesmo sem apresentar sintomas. A coleta será feita através de punção venosa, de pacientes que foram atendidos nos serviços de saúde. Queremos também esclarecer que os riscos são mínimos, pois a coleta de sangue é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e a punção venosa será feita por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis.

Solicitamos a sua autorização para entrar em contato com as pessoas que tenham residido na sua casa nos últimos quinze dias, enquanto o seu filho(a) estava com suspeita de dengue, para que elas também possam colaborar com este estudo. Esclarecemos que os casos que forem confirmados como dengue serão tratados segundo as recomendações da Secretaria de Saúde do Estado.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

Serão também feitos todos os exames para o acompanhamento, tratamento e os exames necessários para conhecer melhor as características das diferentes formas clínicas da doença.

Ao participar o seu filho(a) estará contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre o dengue e para o desenvolvimento de uma vacina contra a doença e tem garantido os seguintes direitos:

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, risco e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e não deixar que seu filho(a) participe do estudo sem que isto traga prejuízo à continuação dos seus cuidados e tratamento;
3. A segurança de que seu filho(a) não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

Solicitamos ainda a sua autorização para que o material coletado, questionário e sangue, passe a fazer parte dos bancos de dados e de amostras para estudos posteriores, respeitando as mesmas garantias acima. Solicitamos também a sua autorização para que possamos ter acesso aos exames de Hemograma completo com VSH, Bioquímica e Imunologia. Se o senhor (a) concordar que seu filho(a) participe do estudo, pedimos que assine este papel dizendo que entendeu as explicações e que está concordando.

Autorização do responsável por menores de 18 anos, para participar da pesquisa.

Eu, _____, RG N° _____,
CPF _____,

Residente no Endereço _____,
Telefones para contato _____,

tendo recebido as informações e ciente dos meus direitos acima relacionados,
concordo que a criança/adolescente, nome _____,
participe do estudo.

Pesquisador responsável : Dr. Ernesto Marques

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos procurar os pesquisadores do LAVITE/CPqAM-
Ernesto Marques, Cecília Magalhães, Carlos Brito, Marli Tenório.

Telefones : 2101-2564, 2101-2622 e 2101-2624.

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/FIOCRUZ



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Mapeamento de epítomos reativos para células T das proteínas não estruturais do vírus dengue 3"

Pesquisador responsável: Joelma Rodrigues de Souza

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 29/01/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 04/07

CAAE: 0005.0.095.000-07

PARECER Nº 007/2007

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de maio de 2010. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 04 de maio de 2007.


 Dr. Zulma Maria de Medeiros
 Bióloga
 Coordenadora
 CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 04/05/2008.

CEP/CPqAM/FIOCRUZ - Av. Moraes Rego, s/nº
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3488.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 cep@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B – Parecer de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 197/2003

Registro CONEP: 4909 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 68/02

Processo nº 25000.119007/2002-03

Projeto de Pesquisa: " Identificação de marcadores biológicos preditivos de respostas clínicas ao dengue através de análise proteômica ".

Pesquisador Responsável: Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ / PE

Área Temática Especial: Genética Humana

Pesquisa com cooperação estrangeira

Ao se proceder à análise das respostas às considerações da CONEP no Parecer nº 1695/2002, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 11 de fevereiro de 2003

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICE C – RESULTADOS DA PREDIÇÃO TEÓRICA PARA OS ALELOS HLA DE CLASSE I e II E AS SEQUÊNCIAS CANDIDATAS

PROTEÍNA NS1 – PREDIÇÃO DOS ALELOS HLA DE CLASSE I (A e B) PARA AS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS MAIS FREQUENTES ENTRE OS ENSAIOS DE ELISPOT PARA OS PEPTÍDEOS TESTADOS INDIVIDUALMENTE

PEPTÍDEO	ALELO	POSIÇÃO	SEQUENCIA (9 mers)	IC50 (nM)
NS1 209-223 - SWKLEKASLIEVKTC	HLA A*6801	1:5-13	EKASLIEVK	267.5
	HLA B*1503	1:2-10	WKLEKASLI	219.4
	HLA B*4001	1:4-12	LEKASLIEV	289.2
	HLA B*4002	1:4-12	LEKASLIEV	97.7
	HLA B*4501	1:4-12	LEKASLIEV	147.4
NS1 289_303 - ENCGTRGPSLRTTTV	HLA B*0702	1:7-15	GPSLRTTTV	60.4
	HLA B*1517	1:4-12	GTRGPSLRT	378.4
NS1 297-311 - SLRTTTVSGKLIHEW	HLA A*3001	1:1-9	SLRTTTVSG	90.7
	HLA B*1517	1:3-11	RTTTVSGKL	15.0
	HLA B*1517	1:4-12	TTTVSGKLI	135.2
	HLA B*1517	1:7-15	VSGKLIHEW	22.2
	HLA B*2705	1:2-10	LRTTTVSGK	82.5
	HLA B*5701	1:7-15	VSGKLIHEW	48.9
	HLA B*5801	1:3-11	RTTTVSGKL	470.1
	HLA B*5801	1:7-15	VSGKLIHEW	13.1
NS1 85-99 - KLTVVVGDIIGVLEQ	HLA A*0201	1:4-12	VVVGDIIGV	197.5
	HLA A*0202	1:4-12	VVVGDIIGV	461.6
	HLA A*0203	1:1-9	KLTVVVGDI	103.5
	HLA A*0203	1:4-12	VVVGDIIGV	71.6
	HLA A*0206	1:4-12	VVVGDIIGV	7.3
	HLA A*0211	1:1-9	KLTVVVGDI	294.3
	HLA A*0211	1:4-12	VVVGDIIGV	7.9
	HLA A*0211	1:5-13	VVGDIIGVL	246.1
	HLA A*0212	1:4-12	VVVGDIIGV	106.3
	HLA A*0216	1:1-9	KLTVVVGDI	154.4
	HLA A*0216	1:4-12	VVVGDIIGV	30.0
	HLA A*0219	1:4-12	VVVGDIIGV	46.2
	HLA A*0250	1:4-12	VVVGDIIGV	3.4
	HLA A*0250	1:5-13	VVGDIIGVL	161.1
	HLA A*2602	1:4-12	VVVGDIIGV	379.3
	HLA A*6802	1:4-12	VVVGDIIGV	102.3
	HLA A*6901	1:4-12	VVVGDIIGV	367.6

	HLA B*5801	1:2-10	LTVVVGDI I	473.9
NS1 201-215 - WIESQKNGSWKLEKA	HLA A*0206	1:4-12	SQKNGSWKL	58.2
	HLA A*6801	1:3-11	ESQKNGSWK	54.8
	HLA B*1503	1:4-12	SQKNGSWKL	175.6
	HLA B*4402	1:2-10	IESQKNGSW	231.6
	HLA B*4403	1:2-10	IESQKNGSW	287.6
NS1 181-195 - HRLMSAAVKDERAVH	HLA A*3101	1:4-12	MSAAVKDER	53.6
	HLA A*6801	1:4-12	MSAAVKDER	3.3
	HLA B*2705	1:1-9	HRLMSAAVK	44.0
NS1 253-267 - QHNHRPGYHTQTAGP	HLA B*0702	1:5-13	RPGYHTQTA	46.6
NS1 285-299 - VVITENCGTRGPSLR	HLA A*6801	1:2-10	VITENCGTR	196.5
NS1 45-59 - AIAGAWENGVCGRS	HLA A*0211	1:2-10	IAGAWENGV	156.0
	HLA A*0250	1:2-10	IAGAWENGV	118.8
NS1 241-255 - MIIPKSLAGPISQHN	HLA A*0250	1:6-14	SLAGPISQH	421.4
	HLA A*3001	1:5-13	KSLAGPISQ	140.9
	HLA B*0702	1:3-11	IPKSLAGPI	44.2
	HLA B*1502	1:6-14	SLAGPISQH	473.7
NS1 121- 135 - AKIVTAETQNSSFII	HLA A*3201	1:7-15	ETQNSSFII	447.6
	HLA A*6802	1:7-15	ETQNSSFII	65.8
	HLA A*6901	1:7-15	ETQNSSFII	55.4
	HLA B*1517	1:5-13	TAETQNSSF	233.4
	HLA B*3501	1:5-13	TAETQNSSF	198.2
	HLA B*4001	1:6-14	AETQNSSFI	73.5
	HLA B*4002	1:6-14	AETQNSSFI	100.2
	HLA B*4402	1:6-14	AETQNSSFI	298.0
	HLA B*4403	1:6-14	AETQNSSFI	156.6
	HLA B*4501	1:6-14	AETQNSSFI	152.2
NS1 41-55 - RLATAIAGAWENGVC	HLA A*0201	1:1-9	RLATAIAGA	47.3
	HLA A*0202	1:1-9	RLATAIAGA	9.7
	HLA A*0203	1:1-9	RLATAIAGA	3.8
	HLA A*0206	1:1-9	RLATAIAGA	33.8
	HLA A*0211	1:1-9	RLATAIAGA	19.0
	HLA A*0211	1:6-14	IAGAWENGV	156.0
	HLA A*0212	1:1-9	RLATAIAGA	49.3
	HLA A*0216	1:1-9	RLATAIAGA	42.5
	HLA A*0219	1:1-9	RLATAIAGA	21.7
	HLA A*0250	1:1-9	RLATAIAGA	7.9
	HLA A*0250	1:6-14	IAGAWENGV	118.8
	HLA B*1517	1:2-10	LATAIAGAW	115.3
	HLA B*3501	1:2-10	LATAIAGAW	206.3
	HLA B*5301	1:2-10	LATAIAGAW	97.5

	HLA B*5701	1:2-10	LATAIAGAW	193.3
	HLA B*5801	1:2-10	LATAIAGAW	19.5
NS1 309-323 - HEWCCRSTLPPLRY	HLA A*1101	1:6-14	RSCTLPPLR	122.3
	HLA A*2902	1:7-15	SCTLPPLRY	219.0
	HLA A*3001	1:6-14	RSCTLPPLR	308.8
	HLA A*3101	1:6-14	RSCTLPPLR	15.8
	HLA A*8001	1:7-15	SCTLPPLRY	51.7
	HLA B*1503	1:5-13	CRSCTLPPL	198.5
	HLA B*4002	1:1-9	HEWCCRST	218.1
NS1 65-79 - NLLWKQIANELNYIL	HLA A*0202	1:6-14	QIANELNYI	14.0
	HLA A*0202	1:7-15	IANELNYIL	190.6
	HLA A*0203	1:6-14	QIANELNYI	51.7
	HLA A*0206	1:6-14	QIANELNYI	40.8
	HLA A*2403	1:3-11	LWKQIANEL	45.6
	HLA A*2902	1:5-13	KQIANELNY	293.2
	HLA A*3002	1:5-13	KQIANELNY	164.4
	HLA A*6802	1:6-14	QIANELNYI	115.4
	HLA A*6901	1:6-14	QIANELNYI	420.5
	HLA A*8001	1:5-13	KQIANELNY	18.5
	HLA B*1501	1:5-13	KQIANELNY	84.2
	HLA B*1503	1:5-13	KQIANELNY	5.2
	HLA B*5301	1:7-15	IANELNYIL	324.5
	HLA B*5801	1:7-15	IANELNYIL	325.1
NS1 177-191 - QLCDHRLMSAAVKDE	HLA B*2705	1:5-13	HRLMSAAVK	44.0
	HLA B*4002	1:3-11	CDHRLMSAA	305.8
NS1 237-251 - LESDMIIPKSLAGPI	HLA B*0702	1:7-15	IPKSLAGPI	44.2
	HLA B*1801	1:1-9	LESDMIIPK	155.6
	HLA B*4002	1:3-11	SDMIIPKSL	359.1

De forma semelhante, foram feitas as predições para a proteína NS3.

PEPTÍDEO	ALELO	POSIÇÃO	SEQUENCIA (9 mers)	IC50 (nM)
NS3 525-539 - RLKGESRKTFVELMR	HLA A*2603	1:5-13	ESRKTFVEL	302.0
	HLA B*1503	1:2-10	LKGESRKTF	5.2
	HLA B*1503	1:5-13	ESRKTFVEL	181.5
	HLA B*1503	1:6-14	SRKTFVELM	390.3
	HLA B*1517	1:5-13	ESRKTFVEL	234.5
	HLA B*2705	1:6-14	SRKTFVELM	137.5
NS3 181-195 - EEMFKKRNLTIMDLH	HLA A*2301	1:3-11	MFKKRNLTI	291.1
	HLA A*2402	1:3-11	MFKKRNLTI	309.7
	HLA A*2403	1:3-11	MFKKRNLTI	268.8
	HLA A*3001	1:3-11	MFKKRNLTI	14.4
	HLA B*0801	1:3-11	MFKKRNLTI	30.9

	HLA B*1503	1:4-12	FKKRNLTIM	8.5
	HLA B*1503	1:6-14	KRNLTIMDL	305.9
	HLA B*2705	1:6-14	KRNLTIMDL	346.8
NS3 405-419 - FVVTTDISEMGANFK	HLA A*1101	1:7-15	ISEMGANFK	121.3
	HLA A*2602	1:2-10	VVTTDISEM	25.1
	HLA A*3001	1:7-15	ISEMGANFK	442.3
	HLA A*6801	1:7-15	ISEMGANFK	128.0
NS3 393-407 - TEYQKTKLNDWDFV	HLA A*0201	1:7-15	KLNDWDFV	7.5
	HLA A*0202	1:7-15	KLNDWDFV	9.8
	HLA A*0203	1:7-15	KLNDWDFV	5.5
	HLA A*0206	1:6-14	TKLNDWDFV	238.7
	HLA A*0206	1:7-15	KLNDWDFV	6.3
	HLA A*0211	1:7-15	KLNDWDFV	1.9
	HLA A*0212	1:7-15	KLNDWDFV	2.5
	HLA A*0216	1:7-15	KLNDWDFV	4.5
	HLA A*0219	1:7-15	KLNDWDFV	2.2
	HLA A*0250	1:7-15	KLNDWDFV	2.0
	HLA A*3201	1:5-13	KTKLNDWDF	400.0
	HLA A*3201	1:7-15	KLNDWDFV	398.2
	HLA B*1517	1:5-13	KTKLNDWDF	17.9
	HLA B*5701	1:5-13	KTKLNDWDF	68.9
NS3 513-527 - EREKSAIDGEYRLK	HLA A*0101	1:4-12	KSAIDGEY	331.0
	HLA A*0250	1:6-14	AAIDGEYRL	210.9
	HLA A*1101	1:7-15	AIDGEYRLK	134.1
	HLA A*2902	1:4-12	KSAIDGEY	202.5
	HLA A*3002	1:4-12	KSAIDGEY	6.7
	HLA A*3101	1:5-13	SAAIDGEYR	354.8
	HLA A*6801	1:5-13	SAAIDGEYR	35.7
	HLA A*8001	1:4-12	KSAIDGEY	44.8
	HLA B*1501	1:4-12	KSAIDGEY	384.5
	HLA B*1517	1:4-12	KSAIDGEY	11.8
	HLA B*1517	1:6-14	AAIDGEYRL	34.4
	HLA B*3501	1:4-12	KSAIDGEY	442.6
	HLA B*5701	1:4-12	KSAIDGEY	297.8
	HLA B*5801	1:4-12	KSAIDGEY	20.0
NS3 285-299 - DEAHFTDPASIAARG	HLA A*0101	1:5-13	FTDPASIAA	159.6
	HLA A*0201	1:5-13	FTDPASIAA	321.6
	HLA A*0202	1:5-13	FTDPASIAA	484.2
	HLA A*0206	1:5-13	FTDPASIAA	10.8
	HLA A*0211	1:5-13	FTDPASIAA	197.0
	HLA A*6802	1:5-13	FTDPASIAA	329.3
	HLA A*6901	1:5-13	FTDPASIAA	30.3
	HLA B*1503	1:3-11	AHFTDPASI	66.4
	HLA B*1801	1:1-9	DEAHFTDPA	367.9
	HLA B*3901	1:3-11	AHFTDPASI	87.5
	HLA B*4501	1:1-9	DEAHFTDPA	119.5
NS3 389-403 - KTFDTEYQKTKLNDW	HLA A*0301	1:1-9	KTFDTEYQK	137.9
	HLA A*1101	1:1-9	KTFDTEYQK	10.1
	HLA A*3001	1:1-9	KTFDTEYQK	9.9
	HLA A*3101	1:1-9	KTFDTEYQK	18.0
	HLA A*3201	1:1-9	KTFDTEYQK	175.4
	HLA A*6801	1:1-9	KTFDTEYQK	17.4
NS3 177-191 - PELEEEMFKKRNLTI	HLA A*2301	1:7-15	MFKKRNLTI	291.1

	HLA A*2402	1:7-15	MFKKRNLT	309.7
	HLA A*2403	1:7-15	MFKKRNLT	268.8
	HLA A*3001	1:7-15	MFKKRNLT	14.4
	HLA A*6801	1:2-10	ELEEEMFKK	145.8
	HLA B*0801	1:7-15	MFKKRNLT	30.9
NS3 493-507 - KMLLDNINTPEGIIP	HLA A*0202	1:2-10	MLLDNINTP	402.8
	HLA A*0211	1:2-10	MLLDNINTP	47.6
	HLA A*0212	1:2-10	MLLDNINTP	187.3
	HLA A*0250	1:2-10	MLLDNINTP	46.0
NS3 209-223 - VREAIKRRRLTLILA	HLA A*0203	1:4-12	AIKRRRLTL	374.0
	HLA A*3001	1:4-12	AIKRRRLTL	62.3
	HLA A*3001	1:6-14	KRRRLTLIL	93.6
	HLA A*3001	1:7-15	RRLRTLILA	404.0
	HLA B*0801	1:4-12	AIKRRRLTL	18.5
	HLA B*0801	1:6-14	KRRRLTLIL	199.6
	HLA B*1503	1:5-13	IKRRRLTLI	63.6
	HLA B*1503	1:6-14	KRRRLTLIL	305.8
	HLA B*2705	1:6-14	KRRRLTLIL	191.3
	HLA B*2705	1:7-15	RRLRTLILA	36.7
NS3 497-511 - DNINTPEGIIPALFE	HLA A*0206	1:4-12	NTPEGIIPA	108.9
	HLA A*6802	1:4-12	NTPEGIIPA	15.3
	HLA A*6901	1:4-12	NTPEGIIPA	86.0
	HLA B*0702	1:5-13	TPEGIIPAL	304.3
	HLA B*3501	1:5-13	TPEGIIPAL	108.6
	HLA B*3901	1:5-13	TPEGIIPAL	23.1
NS3 185-199 - KKRNLTIMDLHPGSG	HLA B*1503	1:2-10	KRNLTIMDL	305.9
	HLA B*2705	1:2-10	KRNLTIMDL	346.8
NS3 89-103 - WQKGEEVQVIAVEPG	HLA A*0250	1:1-9	WQKGEEVQV	427.8
	HLA B*1501	1:7-15	VQVIAVEPG	443.3
	HLA B*1503	1:2-10	QKGEEVQVI	436.6
	HLA B*4001	1:4-12	GEEVQVI	77.0
	HLA B*4002	1:4-12	GEEVQVI	414.5
	HLA B*4501	1:4-12	GEEVQVI	81.0
	HLA B*4501	1:5-13	EEVQVIAVE	466.0
NS3 -381-395 - KKVIQLSRKTFDTEY	HLA B*1503	1:3-11	VIQLSRKTF	263.0
	HLA B*1503	1:7-15	SRKTFDTEY	76.8
	HLA B*1517	1:3-11	VIQLSRKTF	280.0

MHC de Classe II

PROTEÍNA NS1 – PREDIÇÃO DOS ALELOS HLA DE CLASSE II (DRB1) PARA AS SEQUENCIAS PEPTIDICAS MAIS FREQUENTES ENTRE OS ENSAIOS DE ELISPOT PARA OS PEPTIDEOS TESTADOS INDIVIDUALMENTE

Allele	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	WIESQKNGSWKLEKA	70.09
HLA DRB1*0101	HRLMSAAVKDERAVH	28.25
HLA DRB1*0101	QHNHRPGYHTQTAGP	82.93
HLA DRB1*0101	VVITENCGTRGPSLR	62.53
HLA DRB1*0101	AIAGAWENGVCGIRS	64.93
HLA DRB1*0101	MIIPKSLAGPISQHN	22.06
HLA DRB1*0101	AKIVTAETQNSSFII	44.85
HLA DRB1*0101	RLATAIAGAWENGVC	51.42
HLA DRB1*0101	HEWCCRCTLPLRLY	40.03
HLA DRB1*0101	NLLWKQIANELNYIL	11.59
HLA DRB1*0101	QLCDHRLMSAAVKDE	4.4
HLA DRB1*0101	LESDMIIPKSLAGPI	33.04
HLA DRB1*0102	WIESQKNGSWKLEKA	25
HLA DRB1*0102	HRLMSAAVKDERAVH	17
HLA DRB1*0102	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0102	VVITENCGTRGPSLR	1.83
HLA DRB1*0102	AIAGAWENGVCGIRS	17
HLA DRB1*0102	MIIPKSLAGPISQHN	8
HLA DRB1*0102	AKIVTAETQNSSFII	3
HLA DRB1*0102	RLATAIAGAWENGVC	17
HLA DRB1*0102	HEWCCRCTLPLRLY	30
HLA DRB1*0102	NLLWKQIANELNYIL	3.6
HLA DRB1*0102	QLCDHRLMSAAVKDE	17
HLA DRB1*0102	LESDMIIPKSLAGPI	8
HLA DRB1*0301	WIESQKNGSWKLEKA	13.30
HLA DRB1*0301	HRLMSAAVKDERAVH	8.05
HLA DRB1*0301	QHNHRPGYHTQTAGP	70.94
HLA DRB1*0301	VVITENCGTRGPSLR	9.61

HLA DRB1*0301	AIAGAWENGVCGIRS	55.40
HLA DRB1*0301	MIIPKSLAGPISQHN	6.18
HLA DRB1*0301	AKIVTAETQNSSFII	2.50
HLA DRB1*0301	RLATAIAGAWENGVC	54.52
HLA DRB1*0301	HEWCCRCTLPLRLY	32.29
HLA DRB1*0301	NLLWKQIANELNYIL	17.90
HLA DRB1*0301	QLCDHRLMSAAVKDE	10.92
HLA DRB1*0301	LESDMIIPKSLAGPI	2.16
HLA DRB1*0305	WIESQKNGSWKLEKA	1.36
HLA DRB1*0305	HRLMSAAVKDERAVH	19
HLA DRB1*0305	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0305	VVITENCGTRGPSLR	13
HLA DRB1*0305	AIAGAWENGVCGIRS	10
HLA DRB1*0305	MIIPKSLAGPISQHN	13
HLA DRB1*0305	AKIVTAETQNSSFII	1.37
HLA DRB1*0305	RLATAIAGAWENGVC	24
HLA DRB1*0305	HEWCCRCTLPLRLY	28
HLA DRB1*0305	NLLWKQIANELNYIL	15
HLA DRB1*0305	QLCDHRLMSAAVKDE	18
HLA DRB1*0305	LESDMIIPKSLAGPI	1.54
HLA DRB1*0306	WIESQKNGSWKLEKA	2.59
HLA DRB1*0306	HRLMSAAVKDERAVH	9.9
HLA DRB1*0306	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0306	VVITENCGTRGPSLR	8.2
HLA DRB1*0306	AIAGAWENGVCGIRS	22
HLA DRB1*0306	MIIPKSLAGPISQHN	6.18
HLA DRB1*0306	AKIVTAETQNSSFII	0.52
HLA DRB1*0306	RLATAIAGAWENGVC	22
HLA DRB1*0306	HEWCCRCTLPLRLY	32
HLA DRB1*0306	NLLWKQIANELNYIL	17
HLA DRB1*0306	QLCDHRLMSAAVKDE	9.9
HLA DRB1*0306	LESDMIIPKSLAGPI	1.09
HLA DRB1*0307	WIESQKNGSWKLEKA	2.59
HLA DRB1*0307	HRLMSAAVKDERAVH	9.9
HLA DRB1*0307	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0307	VVITENCGTRGPSLR	8.2
HLA DRB1*0307	AIAGAWENGVCGIRS	22
HLA DRB1*0307	MIIPKSLAGPISQHN	6.18
HLA DRB1*0307	AKIVTAETQNSSFII	0.52
HLA DRB1*0307	RLATAIAGAWENGVC	22
HLA DRB1*0307	HEWCCRCTLPLRLY	32

HLA DRB1*0307	NLLWKQIANELNYIL	17
HLA DRB1*0307	QLCDHRLMSAAVKDE	9.9
HLA DRB1*0307	LESDMIIPKSLAGPI	1.09
HLA DRB1*0308	WIESQKNGSWKLEKA	2.59
HLA DRB1*0308	HRLMSAAVKDERAVH	9.9
HLA DRB1*0308	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0308	VVITENCGTRGPSLR	8.2
HLA DRB1*0308	AIAGAWENGVCGIRS	22
HLA DRB1*0308	MIIPKSLAGPISQHN	6.18
HLA DRB1*0308	AKIVTAETQNSSFII	0.52
HLA DRB1*0308	RLATAIAGAWENGVC	22
HLA DRB1*0308	HEWCCRCTLPLRLY	32
HLA DRB1*0308	NLLWKQIANELNYIL	17
HLA DRB1*0308	QLCDHRLMSAAVKDE	9.9
HLA DRB1*0308	LESDMIIPKSLAGPI	1.09
HLA DRB1*0309	WIESQKNGSWKLEKA	1.97
HLA DRB1*0309	HRLMSAAVKDERAVH	15
HLA DRB1*0309	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0309	VVITENCGTRGPSLR	13
HLA DRB1*0309	AIAGAWENGVCGIRS	5.96
HLA DRB1*0309	MIIPKSLAGPISQHN	9.21
HLA DRB1*0309	AKIVTAETQNSSFII	1.98
HLA DRB1*0309	RLATAIAGAWENGVC	29
HLA DRB1*0309	HEWCCRCTLPLRLY	27
HLA DRB1*0309	NLLWKQIANELNYIL	15
HLA DRB1*0309	QLCDHRLMSAAVKDE	15
HLA DRB1*0309	LESDMIIPKSLAGPI	3.16
HLA DRB1*0311	WIESQKNGSWKLEKA	2.59
HLA DRB1*0311	HRLMSAAVKDERAVH	9.9
HLA DRB1*0311	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0311	VVITENCGTRGPSLR	8.2
HLA DRB1*0311	AIAGAWENGVCGIRS	22
HLA DRB1*0311	MIIPKSLAGPISQHN	6.18
HLA DRB1*0311	AKIVTAETQNSSFII	0.52
HLA DRB1*0311	RLATAIAGAWENGVC	22
HLA DRB1*0311	HEWCCRCTLPLRLY	32
HLA DRB1*0311	NLLWKQIANELNYIL	17
HLA DRB1*0311	QLCDHRLMSAAVKDE	9.9
HLA DRB1*0311	LESDMIIPKSLAGPI	1.09
HLA DRB1*0401	WIESQKNGSWKLEKA	20.82

HLA DRB1*0401	HRLMSAAVKDERAVH	13.22
HLA DRB1*0401	QHNHRPGYHTQTAGP	36.87
HLA DRB1*0401	VVITENCGTRGPSLR	24.05
HLA DRB1*0401	AIAGAWENGVCGIRS	34.29
HLA DRB1*0401	MIIPKSLAGPISQHN	11.83
HLA DRB1*0401	AKIVTAETQNSSFII	2.86
HLA DRB1*0401	RLATAIAGAWENGVC	27.92
HLA DRB1*0401	HEWCCRCTLPLRLY	27.16
HLA DRB1*0401	NLLWKQIANELNYIL	1.57
HLA DRB1*0401	QLCDHRLMSAAVKDE	11.97
HLA DRB1*0401	LESDMIIPKSLAGPI	9.45
HLA DRB1*0402	WIESQKNGSWKLEKA	21
HLA DRB1*0402	HRLMSAAVKDERAVH	7.7
HLA DRB1*0402	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0402	VVITENCGTRGPSLR	0.77
HLA DRB1*0402	AIAGAWENGVCGIRS	23
HLA DRB1*0402	MIIPKSLAGPISQHN	1.96
HLA DRB1*0402	AKIVTAETQNSSFII	0.01
HLA DRB1*0402	RLATAIAGAWENGVC	23
HLA DRB1*0402	HEWCCRCTLPLRLY	17
HLA DRB1*0402	NLLWKQIANELNYIL	13
HLA DRB1*0402	QLCDHRLMSAAVKDE	7.7
HLA DRB1*0402	LESDMIIPKSLAGPI	1.96
HLA DRB1*0404	WIESQKNGSWKLEKA	57.38
HLA DRB1*0404	HRLMSAAVKDERAVH	13.22
HLA DRB1*0404	QHNHRPGYHTQTAGP	37.14
HLA DRB1*0404	VVITENCGTRGPSLR	7.98
HLA DRB1*0404	AIAGAWENGVCGIRS	33.19
HLA DRB1*0404	MIIPKSLAGPISQHN	14.66
HLA DRB1*0404	AKIVTAETQNSSFII	11.30
HLA DRB1*0404	RLATAIAGAWENGVC	21.38
HLA DRB1*0404	HEWCCRCTLPLRLY	27.16
HLA DRB1*0404	NLLWKQIANELNYIL	0.30
HLA DRB1*0404	QLCDHRLMSAAVKDE	8.70
HLA DRB1*0404	LESDMIIPKSLAGPI	22.31
HLA DRB1*0405	WIESQKNGSWKLEKA	53.29
HLA DRB1*0405	HRLMSAAVKDERAVH	24.01
HLA DRB1*0405	QHNHRPGYHTQTAGP	67.58
HLA DRB1*0405	VVITENCGTRGPSLR	58.97
HLA DRB1*0405	AIAGAWENGVCGIRS	32.94
HLA DRB1*0405	MIIPKSLAGPISQHN	23.24

HLA DRB1*0405	AKIVTAETQNSSFII	13.16
HLA DRB1*0405	RLATAIAGAWENGVC	38.51
HLA DRB1*0405	HEWCCRCTLPLRLY	22.49
HLA DRB1*0405	NLLWKQIANELNYIL	1.90
HLA DRB1*0405	QLCDHRLMSAAVKDE	12.34
HLA DRB1*0405	LESDMIIPKSLAGPI	27.90
HLA DRB1*0408	WIESQKNGSWKLEKA	15
HLA DRB1*0408	HRLMSAAVKDERAVH	16
HLA DRB1*0408	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0408	VVITENCGTRGPSLR	1.79
HLA DRB1*0408	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*0408	MIIPKSLAGPISQHN	4.7
HLA DRB1*0408	AKIVTAETQNSSFII	0.30
HLA DRB1*0408	RLATAIAGAWENGVC	24
HLA DRB1*0408	HEWCCRCTLPLRLY	25
HLA DRB1*0408	NLLWKQIANELNYIL	2.56
HLA DRB1*0408	QLCDHRLMSAAVKDE	16
HLA DRB1*0408	LESDMIIPKSLAGPI	4.7
HLA DRB1*0410	WIESQKNGSWKLEKA	12
HLA DRB1*0410	HRLMSAAVKDERAVH	3.76
HLA DRB1*0410	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0410	VVITENCGTRGPSLR	0.96
HLA DRB1*0410	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*0410	MIIPKSLAGPISQHN	2.28
HLA DRB1*0410	AKIVTAETQNSSFII	0.38
HLA DRB1*0410	RLATAIAGAWENGVC	21
HLA DRB1*0410	HEWCCRCTLPLRLY	32
HLA DRB1*0410	NLLWKQIANELNYIL	3.23
HLA DRB1*0410	QLCDHRLMSAAVKDE	3.76
HLA DRB1*0410	LESDMIIPKSLAGPI	2.28
HLA DRB1*0423	WIESQKNGSWKLEKA	12
HLA DRB1*0423	HRLMSAAVKDERAVH	13
HLA DRB1*0423	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0423	VVITENCGTRGPSLR	1.04
HLA DRB1*0423	AIAGAWENGVCGIRS	21
HLA DRB1*0423	MIIPKSLAGPISQHN	3.29
HLA DRB1*0423	AKIVTAETQNSSFII	0.14
HLA DRB1*0423	RLATAIAGAWENGVC	21
HLA DRB1*0423	HEWCCRCTLPLRLY	31
HLA DRB1*0423	NLLWKQIANELNYIL	7.1
HLA DRB1*0423	QLCDHRLMSAAVKDE	13

HLA DRB1*0423	LESDMIIPKSLAGPI	3.29
HLA DRB1*0426	WIESQKNGSWKLEKA	11
HLA DRB1*0426	HRLMSAAVKDERAVH	13
HLA DRB1*0426	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0426	VVITENCGTRGPSLR	0.54
HLA DRB1*0426	AIAGAWENGVCGIRS	27
HLA DRB1*0426	MIIPKSLAGPISQHN	5.8
HLA DRB1*0426	AKIVTAETQNSSFII	0.33
HLA DRB1*0426	RLATAIAGAWENGVC	27
HLA DRB1*0426	HEWCCRCTLPLRLY	27
HLA DRB1*0426	NLLWKQIANELNYIL	2.16
HLA DRB1*0426	QLCDHRLMSAAVKDE	13
HLA DRB1*0426	LESDMIIPKSLAGPI	5.8
HLA DRB1*0701	WIESQKNGSWKLEKA	34.55
HLA DRB1*0701	HRLMSAAVKDERAVH	32.29
HLA DRB1*0701	QHNHRPGYHTQTAGP	63.92
HLA DRB1*0701	VVITENCGTRGPSLR	48.26
HLA DRB1*0701	AIAGAWENGVCGIRS	55.24
HLA DRB1*0701	MIIPKSLAGPISQHN	41.93
HLA DRB1*0701	AKIVTAETQNSSFII	16.29
HLA DRB1*0701	RLATAIAGAWENGVC	35.83
HLA DRB1*0701	HEWCCRCTLPLRLY	36.46
HLA DRB1*0701	NLLWKQIANELNYIL	16.00
HLA DRB1*0701	QLCDHRLMSAAVKDE	16.44
HLA DRB1*0701	LESDMIIPKSLAGPI	25.66
HLA DRB1*0703	WIESQKNGSWKLEKA	11.95
HLA DRB1*0703	HRLMSAAVKDERAVH	16
HLA DRB1*0703	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0703	VVITENCGTRGPSLR	3.56
HLA DRB1*0703	AIAGAWENGVCGIRS	19
HLA DRB1*0703	MIIPKSLAGPISQHN	4.50
HLA DRB1*0703	AKIVTAETQNSSFII	10.12
HLA DRB1*0703	RLATAIAGAWENGVC	19
HLA DRB1*0703	HEWCCRCTLPLRLY	23
HLA DRB1*0703	NLLWKQIANELNYIL	7.27
HLA DRB1*0703	QLCDHRLMSAAVKDE	16
HLA DRB1*0703	LESDMIIPKSLAGPI	4.50
HLA DRB1*0801	WIESQKNGSWKLEKA	14
HLA DRB1*0801	HRLMSAAVKDERAVH	3.05
HLA DRB1*0801	QHNHRPGYHTQTAGP	35

HLA DRB1*0801	VVITENCGTRGPSLR	7.8
HLA DRB1*0801	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*0801	MIIPKSLAGPISQHN	3.05
HLA DRB1*0801	AKIVTAETQNSSFII	4.81
HLA DRB1*0801	RLATAIAGAWENGVC	22
HLA DRB1*0801	HEWCCRCTLPLRLY	18
HLA DRB1*0801	NLLWKQIANELNYIL	0.26
HLA DRB1*0801	QLCDHRLMSAAVKDE	3.05
HLA DRB1*0801	LESDMIIPKSLAGPI	3.05
HLA DRB1*0802	WIESQKNGSWKLEKA	18.41
HLA DRB1*0802	HRLMSAAVKDERAVH	12.59
HLA DRB1*0802	QHNHRPGYHTQTAGP	47.30
HLA DRB1*0802	VVITENCGTRGPSLR	24.97
HLA DRB1*0802	AIAGAWENGVCGIRS	30.82
HLA DRB1*0802	MIIPKSLAGPISQHN	4.55
HLA DRB1*0802	AKIVTAETQNSSFII	1.81
HLA DRB1*0802	RLATAIAGAWENGVC	22.14
HLA DRB1*0802	HEWCCRCTLPLRLY	25.66
HLA DRB1*0802	NLLWKQIANELNYIL	1.37
HLA DRB1*0802	QLCDHRLMSAAVKDE	12.59
HLA DRB1*0802	LESDMIIPKSLAGPI	3.17
HLA DRB1*0804	WIESQKNGSWKLEKA	18
HLA DRB1*0804	HRLMSAAVKDERAVH	9.7
HLA DRB1*0804	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0804	VVITENCGTRGPSLR	5.7
HLA DRB1*0804	AIAGAWENGVCGIRS	27
HLA DRB1*0804	MIIPKSLAGPISQHN	1.19
HLA DRB1*0804	AKIVTAETQNSSFII	1.46
HLA DRB1*0804	RLATAIAGAWENGVC	19
HLA DRB1*0804	HEWCCRCTLPLRLY	25
HLA DRB1*0804	NLLWKQIANELNYIL	1.63
HLA DRB1*0804	QLCDHRLMSAAVKDE	9.7
HLA DRB1*0804	LESDMIIPKSLAGPI	1.19
HLA DRB1*0806	WIESQKNGSWKLEKA	23
HLA DRB1*0806	HRLMSAAVKDERAVH	1.84
HLA DRB1*0806	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0806	VVITENCGTRGPSLR	5.44
HLA DRB1*0806	AIAGAWENGVCGIRS	30
HLA DRB1*0806	MIIPKSLAGPISQHN	1.84
HLA DRB1*0806	AKIVTAETQNSSFII	3.10
HLA DRB1*0806	RLATAIAGAWENGVC	18

HLA DRB1*0806	HEWCCRCTLPLRLY	27
HLA DRB1*0806	NLLWKQIANELNYIL	0.09
HLA DRB1*0806	QLCDHRLMSAAVKDE	1.84
HLA DRB1*0806	LESDMIIPKSLAGPI	1.84
HLA DRB1*0813	WIESQKNGSWKLEKA	3.96
HLA DRB1*0813	HRLMSAAVKDERAVH	21
HLA DRB1*0813	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0813	VVITENCGTRGPSLR	12
HLA DRB1*0813	AIAGAWENGVCGIRS	25
HLA DRB1*0813	MIIPKSLAGPISQHN	4.23
HLA DRB1*0813	AKIVTAETQNSSFII	2.05
HLA DRB1*0813	RLATAIAGAWENGVC	25
HLA DRB1*0813	HEWCCRCTLPLRLY	4.89
HLA DRB1*0813	NLLWKQIANELNYIL	4.94
HLA DRB1*0813	QLCDHRLMSAAVKDE	21
HLA DRB1*0813	LESDMIIPKSLAGPI	4.23
HLA DRB1*0817	WIESQKNGSWKLEKA	16
HLA DRB1*0817	HRLMSAAVKDERAVH	3.53
HLA DRB1*0817	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*0817	VVITENCGTRGPSLR	12
HLA DRB1*0817	AIAGAWENGVCGIRS	26
HLA DRB1*0817	MIIPKSLAGPISQHN	4.43
HLA DRB1*0817	AKIVTAETQNSSFII	7.48
HLA DRB1*0817	RLATAIAGAWENGVC	25
HLA DRB1*0817	HEWCCRCTLPLRLY	16
HLA DRB1*0817	NLLWKQIANELNYIL	0.76
HLA DRB1*0817	QLCDHRLMSAAVKDE	3.53
HLA DRB1*0817	LESDMIIPKSLAGPI	4.43
HLA DRB1*1101	WIESQKNGSWKLEKA	4.40
HLA DRB1*1101	HRLMSAAVKDERAVH	10.67
HLA DRB1*1101	QHNHRPGYHTQTAGP	34.99
HLA DRB1*1101	VVITENCGTRGPSLR	23.03
HLA DRB1*1101	AIAGAWENGVCGIRS	44.62
HLA DRB1*1101	MIIPKSLAGPISQHN	7.10
HLA DRB1*1101	AKIVTAETQNSSFII	15.76
HLA DRB1*1101	RLATAIAGAWENGVC	34.18
HLA DRB1*1101	HEWCCRCTLPLRLY	27.74
HLA DRB1*1101	NLLWKQIANELNYIL	1.13
HLA DRB1*1101	QLCDHRLMSAAVKDE	2.32
HLA DRB1*1101	LESDMIIPKSLAGPI	0.89

HLA DRB1*1102	WIESQKNGSWKLEKA	9.2
HLA DRB1*1102	HRLMSAAVKDERAVH	7
HLA DRB1*1102	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1102	VVITENCGTRGPSLR	7.5
HLA DRB1*1102	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*1102	MIIPKSLAGPISQHN	5.59
HLA DRB1*1102	AKIVTAETQNSSFII	0.61
HLA DRB1*1102	RLATAIAGAWENGVC	24
HLA DRB1*1102	HEWCCRCTLPLRLY	30
HLA DRB1*1102	NLLWKQIANELNYIL	7
HLA DRB1*1102	QLCDHRLMSAAVKDE	7
HLA DRB1*1102	LESDMIIPKSLAGPI	5.59
HLA DRB1*1104	WIESQKNGSWKLEKA	16
HLA DRB1*1104	HRLMSAAVKDERAVH	8.2
HLA DRB1*1104	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1104	VVITENCGTRGPSLR	5.19
HLA DRB1*1104	AIAGAWENGVCGIRS	28
HLA DRB1*1104	MIIPKSLAGPISQHN	4.82
HLA DRB1*1104	AKIVTAETQNSSFII	1.72
HLA DRB1*1104	RLATAIAGAWENGVC	20
HLA DRB1*1104	HEWCCRCTLPLRLY	33
HLA DRB1*1104	NLLWKQIANELNYIL	14
HLA DRB1*1104	QLCDHRLMSAAVKDE	8.2
HLA DRB1*1104	LESDMIIPKSLAGPI	4.82
HLA DRB1*1106	WIESQKNGSWKLEKA	16
HLA DRB1*1106	HRLMSAAVKDERAVH	8.2
HLA DRB1*1106	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1106	VVITENCGTRGPSLR	5.19
HLA DRB1*1106	AIAGAWENGVCGIRS	28
HLA DRB1*1106	MIIPKSLAGPISQHN	4.82
HLA DRB1*1106	AKIVTAETQNSSFII	1.72
HLA DRB1*1106	RLATAIAGAWENGVC	20
HLA DRB1*1106	HEWCCRCTLPLRLY	33
HLA DRB1*1106	NLLWKQIANELNYIL	14
HLA DRB1*1106	QLCDHRLMSAAVKDE	8.2
HLA DRB1*1106	LESDMIIPKSLAGPI	4.82
HLA DRB1*1107	WIESQKNGSWKLEKA	5.36
HLA DRB1*1107	HRLMSAAVKDERAVH	15
HLA DRB1*1107	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1107	VVITENCGTRGPSLR	9
HLA DRB1*1107	AIAGAWENGVCGIRS	20

HLA DRB1*1107	MIIPKSLAGPISQHN	9.7
HLA DRB1*1107	AKIVTAETQNSSFII	0.68
HLA DRB1*1107	RLATAIAGAWENGVC	21
HLA DRB1*1107	HEWCCRCTLPLRLY	33
HLA DRB1*1107	NLLWKQIANELNYIL	21
HLA DRB1*1107	QLCDHRLMSAAVKDE	15
HLA DRB1*1107	LESDMIIPKSLAGPI	0.78
HLA DRB1*1114	WIESQKNGSWKLEKA	2.98
HLA DRB1*1114	HRLMSAAVKDERAVH	10
HLA DRB1*1114	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1114	VVITENCGTRGPSLR	11
HLA DRB1*1114	AIAGAWENGVCGIRS	27
HLA DRB1*1114	MIIPKSLAGPISQHN	8.3
HLA DRB1*1114	AKIVTAETQNSSFII	1.29
HLA DRB1*1114	RLATAIAGAWENGVC	27
HLA DRB1*1114	HEWCCRCTLPLRLY	22
HLA DRB1*1114	NLLWKQIANELNYIL	10
HLA DRB1*1114	QLCDHRLMSAAVKDE	10
HLA DRB1*1114	LESDMIIPKSLAGPI	8.3
HLA DRB1*1120	WIESQKNGSWKLEKA	4.13
HLA DRB1*1120	HRLMSAAVKDERAVH	6.70
HLA DRB1*1120	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1120	VVITENCGTRGPSLR	11
HLA DRB1*1120	AIAGAWENGVCGIRS	26
HLA DRB1*1120	MIIPKSLAGPISQHN	7.19
HLA DRB1*1120	AKIVTAETQNSSFII	1.86
HLA DRB1*1120	RLATAIAGAWENGVC	26
HLA DRB1*1120	HEWCCRCTLPLRLY	21
HLA DRB1*1120	NLLWKQIANELNYIL	6.70
HLA DRB1*1120	QLCDHRLMSAAVKDE	6.70
HLA DRB1*1120	LESDMIIPKSLAGPI	7.19
HLA DRB1*1121	WIESQKNGSWKLEKA	9.2
HLA DRB1*1121	HRLMSAAVKDERAVH	7
HLA DRB1*1121	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1121	VVITENCGTRGPSLR	7.5
HLA DRB1*1121	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*1121	MIIPKSLAGPISQHN	5.59
HLA DRB1*1121	AKIVTAETQNSSFII	0.61
HLA DRB1*1121	RLATAIAGAWENGVC	24
HLA DRB1*1121	HEWCCRCTLPLRLY	30
HLA DRB1*1121	NLLWKQIANELNYIL	7

HLA DRB1*1121	<u>QLCDHRLMSAAVKDE</u>	7
HLA DRB1*1121	<u>LESDMIIPKSLAGPI</u>	5.59
HLA DRB1*1128	<u>WIESQKNGSWKLEKA</u>	9.5
HLA DRB1*1128	<u>HRLMSAAVKDERAVH</u>	7.5
HLA DRB1*1128	<u>QHNHRPGYHTQTAGP</u>	35
HLA DRB1*1128	<u>VVITENCGTRGPSLR</u>	8.4
HLA DRB1*1128	<u>AIAGAWENGVCGIRS</u>	19
HLA DRB1*1128	<u>MIIPKSLAGPISQHN</u>	4.60
HLA DRB1*1128	<u>AKIVTAETQNSSFII</u>	3.87
HLA DRB1*1128	<u>RLATAIAGAWENGVC</u>	28
HLA DRB1*1128	<u>HEWCCRCTLPLRLY</u>	27
HLA DRB1*1128	<u>NLLWKQIANELNYIL</u>	14
HLA DRB1*1128	<u>QLCDHRLMSAAVKDE</u>	7.5
HLA DRB1*1128	<u>LESDMIIPKSLAGPI</u>	4.60
HLA DRB1*1301	<u>WIESQKNGSWKLEKA</u>	12
HLA DRB1*1301	<u>HRLMSAAVKDERAVH</u>	4.25
HLA DRB1*1301	<u>QHNHRPGYHTQTAGP</u>	35
HLA DRB1*1301	<u>VVITENCGTRGPSLR</u>	7.95
HLA DRB1*1301	<u>AIAGAWENGVCGIRS</u>	23
HLA DRB1*1301	<u>MIIPKSLAGPISQHN</u>	4.62
HLA DRB1*1301	<u>AKIVTAETQNSSFII</u>	0.94
HLA DRB1*1301	<u>RLATAIAGAWENGVC</u>	23
HLA DRB1*1301	<u>HEWCCRCTLPLRLY</u>	29
HLA DRB1*1301	<u>NLLWKQIANELNYIL</u>	4.25
HLA DRB1*1301	<u>QLCDHRLMSAAVKDE</u>	4.25
HLA DRB1*1301	<u>LESDMIIPKSLAGPI</u>	4.62
HLA DRB1*1302	<u>LESDMIIPKSLAGPI</u>	7.19
HLA DRB1*1302	<u>QLCDHRLMSAAVKDE</u>	33.85
HLA DRB1*1302	<u>NLLWKQIANELNYIL</u>	6.70
HLA DRB1*1302	<u>HEWCCRCTLPLRLY</u>	61.72
HLA DRB1*1302	<u>RLATAIAGAWENGVC</u>	43.87
HLA DRB1*1302	<u>AKIVTAETQNSSFII</u>	15.39
HLA DRB1*1302	<u>MIIPKSLAGPISQHN</u>	5.86
HLA DRB1*1302	<u>AIAGAWENGVCGIRS</u>	36.56
HLA DRB1*1302	<u>VVITENCGTRGPSLR</u>	18.59
HLA DRB1*1302	<u>QHNHRPGYHTQTAGP</u>	77.31
HLA DRB1*1302	<u>HRLMSAAVKDERAVH</u>	50.46
HLA DRB1*1302	<u>WIESQKNGSWKLEKA</u>	12.73
HLA DRB1*1304	<u>WIESQKNGSWKLEKA</u>	15
HLA DRB1*1304	<u>HRLMSAAVKDERAVH</u>	0.80

HLA DRB1*1304	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1304	VVITENCGTRGPSLR	7.76
HLA DRB1*1304	AIAGAWENGVCGIRS	27
HLA DRB1*1304	MIIPKSLAGPISQHN	6.72
HLA DRB1*1304	AKIVTAETQNSSFII	1.69
HLA DRB1*1304	RLATAIAGAWENGVC	27
HLA DRB1*1304	HEWCCRCTLPLRLY	31
HLA DRB1*1304	NLLWKQIANELNYIL	0.80
HLA DRB1*1304	QLCDHRLMSAAVKDE	0.80
HLA DRB1*1304	LESDMIIPKSLAGPI	6.72
HLA DRB1*1305	WIESQKNGSWKLEKA	9.5
HLA DRB1*1305	HRLMSAAVKDERAVH	7.5
HLA DRB1*1305	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1305	VVITENCGTRGPSLR	8.4
HLA DRB1*1305	AIAGAWENGVCGIRS	19
HLA DRB1*1305	MIIPKSLAGPISQHN	4.60
HLA DRB1*1305	AKIVTAETQNSSFII	3.87
HLA DRB1*1305	RLATAIAGAWENGVC	28
HLA DRB1*1305	HEWCCRCTLPLRLY	27
HLA DRB1*1305	NLLWKQIANELNYIL	14
HLA DRB1*1305	QLCDHRLMSAAVKDE	7.5
HLA DRB1*1305	LESDMIIPKSLAGPI	4.60
HLA DRB1*1307	WIESQKNGSWKLEKA	5.6
HLA DRB1*1307	HRLMSAAVKDERAVH	10
HLA DRB1*1307	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1307	VVITENCGTRGPSLR	4.8
HLA DRB1*1307	AIAGAWENGVCGIRS	21
HLA DRB1*1307	MIIPKSLAGPISQHN	11
HLA DRB1*1307	AKIVTAETQNSSFII	1.40
HLA DRB1*1307	RLATAIAGAWENGVC	20
HLA DRB1*1307	HEWCCRCTLPLRLY	30
HLA DRB1*1307	NLLWKQIANELNYIL	13
HLA DRB1*1307	QLCDHRLMSAAVKDE	10
HLA DRB1*1307	LESDMIIPKSLAGPI	11
HLA DRB1*1311	WIESQKNGSWKLEKA	16
HLA DRB1*1311	HRLMSAAVKDERAVH	8.2
HLA DRB1*1311	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1311	VVITENCGTRGPSLR	5.19
HLA DRB1*1311	AIAGAWENGVCGIRS	28
HLA DRB1*1311	MIIPKSLAGPISQHN	4.82
HLA DRB1*1311	AKIVTAETQNSSFII	1.72

HLA DRB1*1311	RLATAIAGAWENGVC	20
HLA DRB1*1311	HEWCCRCTLPLRLY	33
HLA DRB1*1311	NLLWKQIANELNYIL	14
HLA DRB1*1311	QLCDHRLMSAAVKDE	8.2
HLA DRB1*1311	LESDMIIPKSLAGPI	4.82
HLA DRB1*1321	WIESQKNGSWKLEKA	12
HLA DRB1*1321	HRLMSAAVKDERAVH	2.24
HLA DRB1*1321	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1321	VVITENCGTRGPSLR	7.77
HLA DRB1*1321	AIAGAWENGVCGIRS	28
HLA DRB1*1321	MIIPKSLAGPISQHN	5.22
HLA DRB1*1321	AKIVTAETQNSSFII	5.62
HLA DRB1*1321	RLATAIAGAWENGVC	23
HLA DRB1*1321	HEWCCRCTLPLRLY	29
HLA DRB1*1321	NLLWKQIANELNYIL	5.62
HLA DRB1*1321	QLCDHRLMSAAVKDE	2.24
HLA DRB1*1321	LESDMIIPKSLAGPI	5.22
HLA DRB1*1322	WIESQKNGSWKLEKA	9.2
HLA DRB1*1322	HRLMSAAVKDERAVH	7
HLA DRB1*1322	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1322	VVITENCGTRGPSLR	7.5
HLA DRB1*1322	AIAGAWENGVCGIRS	24
HLA DRB1*1322	MIIPKSLAGPISQHN	5.59
HLA DRB1*1322	AKIVTAETQNSSFII	0.61
HLA DRB1*1322	RLATAIAGAWENGVC	24
HLA DRB1*1322	HEWCCRCTLPLRLY	30
HLA DRB1*1322	NLLWKQIANELNYIL	7
HLA DRB1*1322	QLCDHRLMSAAVKDE	7
HLA DRB1*1322	LESDMIIPKSLAGPI	5.59
HLA DRB1*1323	WIESQKNGSWKLEKA	2.98
HLA DRB1*1323	HRLMSAAVKDERAVH	10
HLA DRB1*1323	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1323	VVITENCGTRGPSLR	11
HLA DRB1*1323	AIAGAWENGVCGIRS	27
HLA DRB1*1323	MIIPKSLAGPISQHN	8.3
HLA DRB1*1323	AKIVTAETQNSSFII	1.29
HLA DRB1*1323	RLATAIAGAWENGVC	27
HLA DRB1*1323	HEWCCRCTLPLRLY	22
HLA DRB1*1323	NLLWKQIANELNYIL	10
HLA DRB1*1323	QLCDHRLMSAAVKDE	10
	LESDMIIPKSLAGPI	8.3

HLA DRB1*1323		
HLA DRB1*1327	WIESQKNGSWKLEKA	12
HLA DRB1*1327	HRLMSAAVKDERAVH	4.25
HLA DRB1*1327	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1327	VVITENCGTRGPSLR	7.95
HLA DRB1*1327	AIAGAWENGVCGIRS	23
HLA DRB1*1327	MIIPKSLAGPISQHN	4.62
HLA DRB1*1327	AKIVTAETQNSSFII	0.94
HLA DRB1*1327	RLATAIAGAWENGVC	23
HLA DRB1*1327	HEWCCRCTLPLRLY	29
HLA DRB1*1327	NLLWKQIANELNYIL	4.25
HLA DRB1*1327	QLCDHRLMSAAVKDE	4.25
HLA DRB1*1327	LESDMIIPKSLAGPI	4.62
HLA DRB1*1328	WIESQKNGSWKLEKA	12
HLA DRB1*1328	HRLMSAAVKDERAVH	4.25
HLA DRB1*1328	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1328	VVITENCGTRGPSLR	7.95
HLA DRB1*1328	AIAGAWENGVCGIRS	23
HLA DRB1*1328	MIIPKSLAGPISQHN	4.62
HLA DRB1*1328	AKIVTAETQNSSFII	0.94
HLA DRB1*1328	RLATAIAGAWENGVC	23
HLA DRB1*1328	HEWCCRCTLPLRLY	29
HLA DRB1*1328	NLLWKQIANELNYIL	4.25
HLA DRB1*1328	QLCDHRLMSAAVKDE	4.25
HLA DRB1*1328	LESDMIIPKSLAGPI	4.62
HLA DRB1*1501	WIESQKNGSWKLEKA	31.42
HLA DRB1*1501	HRLMSAAVKDERAVH	35.37
HLA DRB1*1501	QHNHRPGYHTQTAGP	57.40
HLA DRB1*1501	VVITENCGTRGPSLR	55.90
HLA DRB1*1501	AIAGAWENGVCGIRS	52.16
HLA DRB1*1501	MIIPKSLAGPISQHN	19.54
HLA DRB1*1501	AKIVTAETQNSSFII	37.44
HLA DRB1*1501	RLATAIAGAWENGVC	41.17
HLA DRB1*1501	HEWCCRCTLPLRLY	48.06
HLA DRB1*1501	NLLWKQIANELNYIL	9.10
HLA DRB1*1501	QLCDHRLMSAAVKDE	8.71
HLA DRB1*1501	LESDMIIPKSLAGPI	13.30
HLA DRB1*1502	WIESQKNGSWKLEKA	20
HLA DRB1*1502	HRLMSAAVKDERAVH	31
HLA DRB1*1502	QHNHRPGYHTQTAGP	35

HLA DRB1*1502	VVITENCGTRGPSLR	2.74
HLA DRB1*1502	AIAGAWENGVCGIRS	20
HLA DRB1*1502	MIIPKSLAGPISQHN	2.25
HLA DRB1*1502	AKIVTAETQNSSFII	14
HLA DRB1*1502	RLATAIAGAWENGVC	23
HLA DRB1*1502	HEWCCRCTLPLRY	23
HLA DRB1*1502	NLLWKQIANELNYIL	12
HLA DRB1*1502	QLCDHRLMSAAVKDE	13
HLA DRB1*1502	LESDMIIPKSLAGPI	2.25
HLA DRB1*1506	WIESQKNGSWKLEKA	28
HLA DRB1*1506	HRLMSAAVKDERAVH	28
HLA DRB1*1506	QHNHRPGYHTQTAGP	35
HLA DRB1*1506	VVITENCGTRGPSLR	1.59
HLA DRB1*1506	AIAGAWENGVCGIRS	20
HLA DRB1*1506	MIIPKSLAGPISQHN	1.26
HLA DRB1*1506	AKIVTAETQNSSFII	10.91
HLA DRB1*1506	RLATAIAGAWENGVC	20
HLA DRB1*1506	HEWCCRCTLPLRY	31
HLA DRB1*1506	NLLWKQIANELNYIL	9.10
HLA DRB1*1506	QLCDHRLMSAAVKDE	9.17
HLA DRB1*1506	LESDMIIPKSLAGPI	1.26

PROTEÍNA NS3 – PREDIÇÃO DOS ALELOS HLA DE CLASSE II (DRB1) PARA AS SEQUENCIAS PEPTIDICAS MAIS FREQUENTES ENTRE OS ENSAIOS DE ELISPOT PARA OS PEPTIDEOS TESTADOS INDIVIDUALMENTE

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	47.43
HLA DRB1*0102	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	2.8
HLA DRB1*0301	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.14
HLA DRB1*0305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.52
HLA DRB1*0305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.52
HLA DRB1*0307	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.99
			0.99

HLA DRB1*0308	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	
HLA DRB1*0309	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	0.35
HLA DRB1*0311	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	0.99
HLA DRB1*0401	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	20.88
HLA DRB1*0402	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	3.84
HLA DRB1*0404	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	17.75
HLA DRB1*0405	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	29.78
HLA DRB1*0408	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	15
HLA DRB1*0410	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	14
HLA DRB1*0423	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	12
HLA DRB1*0426	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	7.5
HLA DRB1*0701	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	15.32
HLA DRB1*0801	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	8.8
HLA DRB1*0804	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	6.1
HLA DRB1*0806	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	6.26
HLA DRB1*0813	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	7.8
HLA DRB1*0817	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	6.63
HLA DRB1*1101	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	25.79
HLA DRB1*1102	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1104	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1106	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1107	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	0.21
HLA DRB1*1114	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	11
HLA DRB1*1120	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	10
HLA DRB1*1120	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	10
HLA DRB1*1121	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1128	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	4.60
HLA DRB1*1301	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1302	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	15.76
HLA DRB1*1304	1:1-15	KLTVVVVDIIGVLEQ	11

HLA DRB1*1305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	4.60
HLA DRB1*1307	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	9.6
HLA DRB1*1311	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1321	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.8
HLA DRB1*1322	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1323	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	11
HLA DRB1*1327	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1328	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1501	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	32.87
HLA DRB1*1502	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	1.53
HLA DRB1*1506	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.80

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	35.19
HLA DRB1*0102	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	17
HLA DRB1*0301	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	7.55
HLA DRB1*0305	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.18
HLA DRB1*0306	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0307	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0308	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0309	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	8.50
HLA DRB1*0311	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0401	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	8.63
HLA DRB1*0402	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	2.81
HLA DRB1*0404	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	9.52
HLA DRB1*0405	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	40.81
HLA DRB1*0408	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	2.56

HLA DRB1*0410	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.36
HLA DRB1*0423	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	1.56
HLA DRB1*0426	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	1.64
HLA DRB1*0701	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	14.99
HLA DRB1*0703	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	9.29
HLA DRB1*0801	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	7.3
HLA DRB1*0802	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	14.62
HLA DRB1*0804	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.3
HLA DRB1*0806	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.04
HLA DRB1*0813	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.96
HLA DRB1*0817	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	7.45
HLA DRB1*1101	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	7.59
HLA DRB1*1102	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1104	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.54
HLA DRB1*1107	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	3.13
HLA DRB1*1114	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	8.3
HLA DRB1*1120	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	13
HLA DRB1*1121	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1128	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	11
HLA DRB1*1301	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	9.09
HLA DRB1*1302	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	38.67
HLA DRB1*1304	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	7.76
HLA DRB1*1305	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	11
HLA DRB1*1307	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	4.4
HLA DRB1*1311	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	5.54
HLA DRB1*1321	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	16
HLA DRB1*1322	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1323	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	8.3
HLA DRB1*1327	1:1-15	SLRTTTTVSGKLIHEW	9.09
			9.09

HLA DRB1*1328	1:1-15	SLRTTTVSGKLIHEW	
HLA DRB1*1501	1:1-15	SLRTTTVSGKLIHEW	33.12
HLA DRB1*1502	1:1-15	SLRTTTVSGKLIHEW	23
HLA DRB1*1506	1:1-15	SLRTTTVSGKLIHEW	19

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	0.6
HLA DRB1*0102	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.03
HLA DRB1*0301	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	13.04
HLA DRB1*0305	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	6.6
HLA DRB1*0306	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0307	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0308	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0309	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	5.84
HLA DRB1*0311	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0401	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.98
HLA DRB1*0402	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*0404	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	7.11
HLA DRB1*0405	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	21.88
HLA DRB1*0701	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	3.52
HLA DRB1*0703	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.25
HLA DRB1*0801	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	13
HLA DRB1*0802	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10.40
HLA DRB1*0804	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*0806	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	20
HLA DRB1*0813	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	4.94
HLA DRB1*0817	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*1101	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	5.67
HLA DRB1*1102	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1104	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1106	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1107	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1114	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10
HLA DRB1*1120	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	9.4
HLA DRB1*1121	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1128	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1301	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*1302	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	9.41
HLA DRB1*1304	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	21
HLA DRB1*1305	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1307	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1311	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1322	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1323	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10
HLA DRB1*1327	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*1328	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*1501	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	20.93
HLA DRB1*1502	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	3.60
HLA DRB1*1506	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	7.02
DQB1*0501	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	33.46
DQB1*0602	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	13.26
DQB1*0302	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	26.18
DQB1*0402	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	34.43
DQB1*0201	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	47.83
DQB1*0301	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	31.61
DPB1*0401	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	31.43
DPB1*0201	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	12.00
DPB1*0101	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	4.09
DPB1*0501	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15.76
DPB1*0402	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	0.47

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	51.09
HLA DRB1*0102	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0301	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	44.29
HLA DRB1*0305	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0306	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0307	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0308	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0309	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0311	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0401	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	30.82
HLA DRB1*0402	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0404	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	34.99
HLA DRB1*0405	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	45.05
HLA DRB1*0408	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0410	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0423	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0426	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0701	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	63.43
HLA DRB1*0703	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0801	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0802	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	34.99
HLA DRB1*0804	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0806	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0813	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0817	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1101	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	32.84
HLA DRB1*1102	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1104	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1106	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1107	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1114	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1120	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1121	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1128	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1301	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1302	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	76.32
HLA DRB1*1304	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1305	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1307	1:1-16	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1311	1:1-17	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1321	1:1-18	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1322	1:1-19	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1323	1:1-20	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1327	1:1-21	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1328	1:1-22	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1501	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	50.70
HLA DRB1*1502	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1506	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
DQB1*0501	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	85.14
DQB1*0602	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	62.62
DQB1*0302	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	92.76
DQB1*0402	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	91.02
DQB1*0201	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	94.04
DQB1*0301	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35.54
DPB1*0401	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	79.81
DPB1*0201	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	91.79
DPB1*0101	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	96.11
DPB1*0501	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	90.46

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	35.19
HLA DRB1*0102	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	17
HLA DRB1*0301	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	7.55
HLA DRB1*0305	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.18
HLA DRB1*0306	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0307	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0308	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0309	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	8.50
HLA DRB1*0311	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.41
HLA DRB1*0401	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	8.63
HLA DRB1*0402	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	2.81
HLA DRB1*0404	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	9.52
HLA DRB1*0405	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	40.81
HLA DRB1*0408	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	2.56
HLA DRB1*0410	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.36
HLA DRB1*0423	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	1.56
HLA DRB1*0426	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	1.64
HLA DRB1*0701	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	14.99
HLA DRB1*0703	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	9.29
HLA DRB1*0801	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	7.3
HLA DRB1*0802	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	14.62
HLA DRB1*0804	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.3
HLA DRB1*0806	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.04
HLA DRB1*0813	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.96
HLA DRB1*0817	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	7.45
HLA DRB1*1101	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	7.59
HLA DRB1*1102	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1104	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.54
HLA DRB1*1107	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	3.13
HLA DRB1*1114	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	8.3
HLA DRB1*1120	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	13
HLA DRB1*1121	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1128	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	11
HLA DRB1*1301	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	9.09
HLA DRB1*1302	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	38.67
HLA DRB1*1304	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	7.76
HLA DRB1*1305	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	11
HLA DRB1*1307	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	4.4
HLA DRB1*1311	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	5.54
HLA DRB1*1321	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	16
HLA DRB1*1322	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	6.02
HLA DRB1*1323	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	8.3
HLA DRB1*1327	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	9.09
HLA DRB1*1328	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	9.09
HLA DRB1*1501	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	33.12
HLA DRB1*1502	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	23
HLA DRB1*1506	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	19
DQB1*0501	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	66.59
DQB1*0602	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	31.53
DQB1*0302	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	77.02
DQB1*0402	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	54.10
DQB1*0201	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	54.48
DQB1*0301	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	37.82
DPB1*0401	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	58.33
DPB1*0201	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	40.88
DPB1*0101	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	53.65
DPB1*0501	1:1-15	SLRITTTVSGKLIHEW	48.75

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	47.43
HLA DRB1*0102	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	2.8
HLA DRB1*0301	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.14
HLA DRB1*0305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.52
HLA DRB1*0305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.52
HLA DRB1*0307	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.99
HLA DRB1*0308	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.99
HLA DRB1*0309	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.35
HLA DRB1*0311	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.99
HLA DRB1*0401	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	20.88
HLA DRB1*0402	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	3.84
HLA DRB1*0404	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	17.75
HLA DRB1*0405	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	29.78
HLA DRB1*0408	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	15
HLA DRB1*0410	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	14
HLA DRB1*0423	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	12
HLA DRB1*0426	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.5
HLA DRB1*0701	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	15.32
HLA DRB1*0801	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.8
HLA DRB1*0804	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.1
HLA DRB1*0806	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.26
HLA DRB1*0813	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.8
HLA DRB1*0817	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.63
HLA DRB1*1101	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	25.79
HLA DRB1*1102	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1104	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1106	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1107	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.21
HLA DRB1*1114	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	11
HLA DRB1*1120	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	10
HLA DRB1*1120	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	10
HLA DRB1*1121	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1128	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	4.60
HLA DRB1*1301	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1302	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	15.76
HLA DRB1*1304	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	11
HLA DRB1*1305	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	4.60
HLA DRB1*1307	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	9.6
HLA DRB1*1311	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	3.58
HLA DRB1*1321	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.8
HLA DRB1*1322	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.1
HLA DRB1*1323	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	11
HLA DRB1*1327	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1328	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	6.91
HLA DRB1*1501	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	32.87
HLA DRB1*1502	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	1.53
HLA DRB1*1506	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	0.80
DQB1*0501	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	11.85
DQB1*0602	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	61
DQB1*0302	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.5
DQB1*0402	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	8.95
DQB1*0201	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	7.7
DQB1*0301	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	19
DPB1*0401	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	43.24
DPB1*0201	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	22.54
DPB1*0101	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	22.32
DPB1*0501	1:1-15	KLTVVVGDIIGVLEQ	54.50

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	51.09
HLA DRB1*0102	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0301	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	44.29
HLA DRB1*0305	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0306	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0307	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0308	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0309	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0311	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0401	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	30.82
HLA DRB1*0402	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0404	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	34.99
HLA DRB1*0405	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	45.05
HLA DRB1*0408	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0410	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0423	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0426	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0701	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	63.43
HLA DRB1*0703	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0801	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0802	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	34.99
HLA DRB1*0804	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0806	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0813	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*0817	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1101	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	32.84
HLA DRB1*1102	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1104	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1106	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1107	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1114	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35

HLA DRB1*1120	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1121	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1128	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1301	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1302	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	76.32
HLA DRB1*1304	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1305	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1307	1:1-16	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1311	1:1-17	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1321	1:1-18	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1322	1:1-19	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1323	1:1-20	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1327	1:1-21	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1328	1:1-22	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1501	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	50.70
HLA DRB1*1502	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35
HLA DRB1*1506	1:1-15	ENCGTRGPSLRRTTV	35

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	0.6
HLA DRB1*0102	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.03
HLA DRB1*0301	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	13.04
HLA DRB1*0305	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	6.6
HLA DRB1*0306	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0307	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0308	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0309	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	5.84
HLA DRB1*0311	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*0401	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.98
HLA DRB1*0402	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*0404	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	7.11

HLA DRB1*0405	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	21.88
HLA DRB1*0701	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	3.52
HLA DRB1*0703	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	2.25
HLA DRB1*0801	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	13
HLA DRB1*0802	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10.40
HLA DRB1*0804	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*0806	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	20
HLA DRB1*0813	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	4.94
HLA DRB1*0817	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	17
HLA DRB1*1101	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	5.67
HLA DRB1*1102	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1104	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1106	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1107	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1114	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10
HLA DRB1*1120	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	9.4
HLA DRB1*1121	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1128	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1301	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*1302	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	9.41
HLA DRB1*1304	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	21
HLA DRB1*1305	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1307	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	11
HLA DRB1*1311	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	8.8
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1321	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	15
HLA DRB1*1322	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	18
HLA DRB1*1323	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	10
HLA DRB1*1327	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16

HLA DRB1*1328	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	16
HLA DRB1*1501	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	20.93
HLA DRB1*1502	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	3.60
HLA DRB1*1506	1:1-15	SWKLEKASLIEVKTC	7.02

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	73.63
HLA DRB1*0101	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	35.44
HLA DRB1*0101	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	62.18
HLA DRB1*0101	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	84.14
HLA DRB1*0101	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	78.21
HLA DRB1*0101	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	41.00
HLA DRB1*0101	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	82.77
HLA DRB1*0101	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	58.64
HLA DRB1*0101	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	67.64
HLA DRB1*0101	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	13
HLA DRB1*0101	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	53.20
HLA DRB1*0101	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	46.14
HLA DRB1*0101	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	65.94

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0101	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	43.20
HLA DRB1*0102	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	15
HLA DRB1*0102	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	14
HLA DRB1*0102	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	11
HLA DRB1*0102	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	30
HLA DRB1*0102	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0102	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	25
HLA DRB1*0102	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	30
HLA DRB1*0102	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	14
HLA DRB1*0102	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	17
HLA DRB1*0102	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.3
HLA DRB1*0102	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	17
HLA DRB1*0102	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.3
HLA DRB1*0102	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	7.5
HLA DRB1*0102	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	8.3

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0301	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	10.92
HLA DRB1*0301	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	18.08
HLA DRB1*0301	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	2.93
HLA DRB1*0301	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	29.99
HLA DRB1*0301	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	34.99
HLA DRB1*0301	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	33.52
HLA DRB1*0301	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	29.99
HLA DRB1*0301	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	20.47
HLA DRB1*0301	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	3.32
HLA DRB1*0301	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.24
HLA DRB1*0301	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	65.32
HLA DRB1*0301	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	11.41
HLA DRB1*0301	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	55.78
HLA DRB1*0301	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.09
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank

HLA DRB1*0305	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	22
HLA DRB1*0305	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	13
HLA DRB1*0305	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.7
HLA DRB1*0305	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	16
HLA DRB1*0305	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0305	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	25
HLA DRB1*0305	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	16
HLA DRB1*0305	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	24
HLA DRB1*0305	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	1.21
HLA DRB1*0305	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.8
HLA DRB1*0305	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29
HLA DRB1*0305	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	19
HLA DRB1*0305	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	5.16
HLA DRB1*0305	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	4.10
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0306	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	13

HLA DRB1*0306	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	16
HLA DRB1*0306	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.22
HLA DRB1*0306	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	20
HLA DRB1*0306	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0306	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*0306	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	20
HLA DRB1*0306	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLT	16
HLA DRB1*0306	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.18
HLA DRB1*0306	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.22
HLA DRB1*0306	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0306	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.8
HLA DRB1*0306	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	1.73
HLA DRB1*0306	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.13
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0307	1:1-15	RLKGESRKTfVELMR	13
HLA DRB1*0307	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	16

HLA DRB1*0307	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.22
HLA DRB1*0307	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	20
HLA DRB1*0307	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0307	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*0307	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	20
HLA DRB1*0307	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	16
HLA DRB1*0307	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.18
HLA DRB1*0307	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.22
HLA DRB1*0307	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0307	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.8
HLA DRB1*0307	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	1.73
HLA DRB1*0307	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.13
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0308	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	13
HLA DRB1*0308	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	16
HLA DRB1*0308	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.22

HLA DRB1*0308	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	20
HLA DRB1*0308	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0308	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*0308	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	20
HLA DRB1*0308	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	16
HLA DRB1*0308	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.18
HLA DRB1*0308	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.22
HLA DRB1*0308	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0308	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.8
HLA DRB1*0308	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	1.73
HLA DRB1*0308	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.13
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0309	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	15
HLA DRB1*0309	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	8.06
HLA DRB1*0309	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	4.96
HLA DRB1*0309	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	22

HLA DRB1*0309	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0309	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	29
HLA DRB1*0309	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	22
HLA DRB1*0309	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	24
HLA DRB1*0309	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.90
HLA DRB1*0309	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.06
HLA DRB1*0309	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	28
HLA DRB1*0309	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	15
HLA DRB1*0309	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	2.86
HLA DRB1*0309	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.93
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0311	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	13
HLA DRB1*0311	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	16
HLA DRB1*0311	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.22
HLA DRB1*0311	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	20
HLA DRB1*0311	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35

HLA DRB1*0311	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*0311	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	20
HLA DRB1*0311	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	16
HLA DRB1*0311	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.18
HLA DRB1*0311	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.22
HLA DRB1*0311	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0311	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.8
HLA DRB1*0311	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	1.73
HLA DRB1*0311	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.13
			Consensus Percentile Rank
Allele	Position	Sequence	
HLA DRB1*0401	1:1-15	RLKGESRKTVELMR	19.73
HLA DRB1*0401	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	8.32
HLA DRB1*0401	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	3.79
HLA DRB1*0401	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	15.56
HLA DRB1*0401	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	52.74
HLA DRB1*0401	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	8.36

HLA DRB1*0401	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	18.40
HLA DRB1*0401	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	11.08
HLA DRB1*0401	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	3.26
HLA DRB1*0401	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	16.03
HLA DRB1*0401	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31.72
HLA DRB1*0401	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	13.12
HLA DRB1*0401	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	23.08
HLA DRB1*0401	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	17.03
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0402	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	32
HLA DRB1*0402	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	1.06
HLA DRB1*0402	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	6.8
HLA DRB1*0402	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	21
HLA DRB1*0402	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0402	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	22
HLA DRB1*0402	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	21

HLA DRB1*0402	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	1.06
HLA DRB1*0402	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	15
HLA DRB1*0402	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	9.5
HLA DRB1*0402	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	26
HLA DRB1*0402	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	7.7
HLA DRB1*0402	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.1
HLA DRB1*0402	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	26
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0404	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	31.48
HLA DRB1*0404	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	7.65
HLA DRB1*0404	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	4.20
HLA DRB1*0404	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	31.44
HLA DRB1*0404	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	68.04
HLA DRB1*0404	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	23.56
HLA DRB1*0404	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	38.60
HLA DRB1*0404	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	43.44

HLA DRB1*0404	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	1.68
HLA DRB1*0404	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	25.18
HLA DRB1*0404	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27.02
HLA DRB1*0404	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	5.84
HLA DRB1*0404	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	6.35
HLA DRB1*0404	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	12.22
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0405	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	32.62
HLA DRB1*0405	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	12.05
HLA DRB1*0405	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	10.33
HLA DRB1*0405	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	15.92
HLA DRB1*0405	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	64.60
HLA DRB1*0405	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	51.09
HLA DRB1*0405	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	16.73
HLA DRB1*0405	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTII	38.05
HLA DRB1*0405	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	9.89

HLA DRB1*0405	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	28.60
HLA DRB1*0405	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	30.76
HLA DRB1*0405	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	19.91
HLA DRB1*0405	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	29.52
HLA DRB1*0405	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	13.76
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0408	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	33
HLA DRB1*0408	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	8.7
HLA DRB1*0408	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	6.2
HLA DRB1*0408	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	12
HLA DRB1*0408	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0408	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	15
HLA DRB1*0408	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	12
HLA DRB1*0408	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	8.7
HLA DRB1*0408	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11
HLA DRB1*0408	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	28

HLA DRB1*0408	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29
HLA DRB1*0408	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.2
HLA DRB1*0408	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	3.5
HLA DRB1*0408	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	24
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0410	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	31
HLA DRB1*0410	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	9.2
HLA DRB1*0410	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	3.49
HLA DRB1*0410	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	21
HLA DRB1*0410	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0410	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	28
HLA DRB1*0410	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	21
HLA DRB1*0410	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	9.2
HLA DRB1*0410	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	4.37
HLA DRB1*0410	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	26
HLA DRB1*0410	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29

HLA DRB1*0410	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.32
HLA DRB1*0410	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	1.46
HLA DRB1*0410	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	11
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0423	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	31
HLA DRB1*0423	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	6.3
HLA DRB1*0423	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	4.20
HLA DRB1*0423	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	21
HLA DRB1*0423	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0423	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	24
HLA DRB1*0423	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	21
HLA DRB1*0423	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.3
HLA DRB1*0423	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	8
HLA DRB1*0423	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	25
HLA DRB1*0423	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0423	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	5.8

HLA DRB1*0423	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	2.24
HLA DRB1*0423	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	21
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0426	1:1-15	RLKGESRKFVVELMR	20
HLA DRB1*0426	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	10
HLA DRB1*0426	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	4.47
HLA DRB1*0426	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	7.4
HLA DRB1*0426	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0426	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	20
HLA DRB1*0426	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	7.4
HLA DRB1*0426	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	10
HLA DRB1*0426	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	3.26
HLA DRB1*0426	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	30
HLA DRB1*0426	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	32
HLA DRB1*0426	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	13
HLA DRB1*0426	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	3.05

HLA DRB1*0426	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	22
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0701	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	31.86
HLA DRB1*0701	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	27.08
HLA DRB1*0701	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	29.66
HLA DRB1*0701	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	30.16
HLA DRB1*0701	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	62.94
HLA DRB1*0701	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	22.91
HLA DRB1*0701	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	30.30
HLA DRB1*0701	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	30.24
HLA DRB1*0701	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	45.83
HLA DRB1*0701	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	3.1
HLA DRB1*0701	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	62.95
HLA DRB1*0701	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	55.24
HLA DRB1*0701	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	67.88
HLA DRB1*0701	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	35.52

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0703	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	18
HLA DRB1*0703	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	4.25
HLA DRB1*0703	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	2.40
HLA DRB1*0703	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	3.55
HLA DRB1*0703	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0703	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	16
HLA DRB1*0703	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	3.55
HLA DRB1*0703	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	4.25
HLA DRB1*0703	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	21
HLA DRB1*0703	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.62
HLA DRB1*0703	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	21
HLA DRB1*0703	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	22
HLA DRB1*0703	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.44
HLA DRB1*0703	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	12.44
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank

HLA DRB1*0801	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	15
HLA DRB1*0801	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	3.31
HLA DRB1*0801	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	11
HLA DRB1*0801	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	19
HLA DRB1*0801	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0801	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*0801	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	19
HLA DRB1*0801	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.39
HLA DRB1*0801	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	21
HLA DRB1*0801	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	4.47
HLA DRB1*0801	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31
HLA DRB1*0801	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.47
HLA DRB1*0801	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	11
HLA DRB1*0801	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	6.9
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0802	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	23.98

HLA DRB1*0802	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	4.10
HLA DRB1*0802	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	15.83
HLA DRB1*0802	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	27.54
HLA DRB1*0802	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	48.14
HLA DRB1*0802	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	26.07
HLA DRB1*0802	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	24.53
HLA DRB1*0802	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLT	12.85
HLA DRB1*0802	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11.65
HLA DRB1*0802	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	0.25
HLA DRB1*0802	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29.79
HLA DRB1*0802	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	11.12
HLA DRB1*0802	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	13.85
HLA DRB1*0802	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	7.32
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0804	1:1-15	RLKGESRKTfVELMR	12
HLA DRB1*0804	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	2.57

HLA DRB1*0804	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	9.3
HLA DRB1*0804	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	27
HLA DRB1*0804	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0804	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*0804	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	27
HLA DRB1*0804	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	2.57
HLA DRB1*0804	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	15
HLA DRB1*0804	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.46
HLA DRB1*0804	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0804	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.21
HLA DRB1*0804	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	11
HLA DRB1*0804	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	5.3
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0806	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	12
HLA DRB1*0806	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	4.31
HLA DRB1*0806	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.62

HLA DRB1*0806	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	27
HLA DRB1*0806	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0806	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	34
HLA DRB1*0806	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	27
HLA DRB1*0806	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	4.31
HLA DRB1*0806	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	18
HLA DRB1*0806	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	2.84
HLA DRB1*0806	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29
HLA DRB1*0806	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	2.84
HLA DRB1*0806	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.13
HLA DRB1*0806	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	5.04
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0813	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	24
HLA DRB1*0813	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	0.57
HLA DRB1*0813	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	6.5
HLA DRB1*0813	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	11

HLA DRB1*0813	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*0813	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	26
HLA DRB1*0813	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	11
HLA DRB1*0813	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	4.55
HLA DRB1*0813	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11
HLA DRB1*0813	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	0.27
HLA DRB1*0813	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	30
HLA DRB1*0813	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	7.4
HLA DRB1*0813	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.4
HLA DRB1*0813	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	10
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*0817	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	16
HLA DRB1*0817	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	2.56
HLA DRB1*0817	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.38
HLA DRB1*0817	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	20
HLA DRB1*0817	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35

HLA DRB1*0817	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	25
HLA DRB1*0817	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	20
HLA DRB1*0817	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	3.00
HLA DRB1*0817	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	19
HLA DRB1*0817	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	3.52
HLA DRB1*0817	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	27
HLA DRB1*0817	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.75
HLA DRB1*0817	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.84
HLA DRB1*0817	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	7.48
			Consensus Percentile Rank
Allele	Position	Sequence	
HLA DRB1*1101	1:1-15	RLKGESRKTVELMR	3.97
HLA DRB1*1101	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	3.49
HLA DRB1*1101	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	21.91
HLA DRB1*1101	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	10.37
HLA DRB1*1101	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	41.62
HLA DRB1*1101	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	31.76

HLA DRB1*1101	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	10.39
HLA DRB1*1101	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	8.65
HLA DRB1*1101	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	21.76
HLA DRB1*1101	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	0.15
HLA DRB1*1101	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	38.38
HLA DRB1*1101	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	6.23
HLA DRB1*1101	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	22.36
HLA DRB1*1101	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	0.02
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1102	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	11
HLA DRB1*1102	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	6.02
HLA DRB1*1102	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	9.8
HLA DRB1*1102	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	22
HLA DRB1*1102	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1102	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	33
HLA DRB1*1102	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	22

HLA DRB1*1102	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.02
HLA DRB1*1102	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11
HLA DRB1*1102	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.48
HLA DRB1*1102	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31
HLA DRB1*1102	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	3.37
HLA DRB1*1102	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	10
HLA DRB1*1102	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	4.04
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1104	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	15
HLA DRB1*1104	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	6.4
HLA DRB1*1104	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.3
HLA DRB1*1104	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	24
HLA DRB1*1104	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1104	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*1104	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	24
HLA DRB1*1104	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.4

HLA DRB1*1104	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	12
HLA DRB1*1104	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	6.4
HLA DRB1*1104	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	24
HLA DRB1*1104	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.18
HLA DRB1*1104	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	4.18
HLA DRB1*1104	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.74
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1106	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	15
HLA DRB1*1106	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	6.4
HLA DRB1*1106	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.3
HLA DRB1*1106	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	24
HLA DRB1*1106	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1106	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*1106	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	24
HLA DRB1*1106	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTII	6.4
HLA DRB1*1106	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	12

HLA DRB1*1106	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	6.4
HLA DRB1*1106	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	24
HLA DRB1*1106	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.18
HLA DRB1*1106	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	4.18
HLA DRB1*1106	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.74
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1107	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	19
HLA DRB1*1107	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	21
HLA DRB1*1107	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.78
HLA DRB1*1107	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	26
HLA DRB1*1107	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1107	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*1107	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	26
HLA DRB1*1107	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	21
HLA DRB1*1107	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	0.58
HLA DRB1*1107	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	5.84

HLA DRB1*1107	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	26
HLA DRB1*1107	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	16
HLA DRB1*1107	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	2.89
HLA DRB1*1107	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.39
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1114	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	14
HLA DRB1*1114	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	8.3
HLA DRB1*1114	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	13
HLA DRB1*1114	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	13
HLA DRB1*1114	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1114	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*1114	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	13
HLA DRB1*1114	8:1-15	PELEEEEMFKRNLT	8.3
HLA DRB1*1114	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	15
HLA DRB1*1114	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	2.72
HLA DRB1*1114	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	32

HLA DRB1*1114	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	5
HLA DRB1*1114	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	14
HLA DRB1*1114	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	6.3
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1120	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	7.19
HLA DRB1*1120	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	4.51
HLA DRB1*1120	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.2
HLA DRB1*1120	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	19
HLA DRB1*1120	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1120	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	32
HLA DRB1*1120	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	19
HLA DRB1*1120	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	7.7
HLA DRB1*1120	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	13
HLA DRB1*1120	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	2.27
HLA DRB1*1120	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	32
HLA DRB1*1120	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	2.80

HLA DRB1*1120	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	10
HLA DRB1*1120	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.29
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1121	1:1-15	RLKGESRKTfVELMR	11
HLA DRB1*1121	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	6.02
HLA DRB1*1121	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	9.8
HLA DRB1*1121	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	22
HLA DRB1*1121	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1121	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	33
HLA DRB1*1121	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	22
HLA DRB1*1121	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.02
HLA DRB1*1121	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11
HLA DRB1*1121	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.48
HLA DRB1*1121	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31
HLA DRB1*1121	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	3.37
HLA DRB1*1121	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	10

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1121	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	4.04
HLA DRB1*1128	1:1-15	RLKGESRKTFVELMR	11
HLA DRB1*1128	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	8.5
HLA DRB1*1128	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.47
HLA DRB1*1128	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	21
HLA DRB1*1128	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1128	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	27
HLA DRB1*1128	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	21
HLA DRB1*1128	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	8.5
HLA DRB1*1128	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	12
HLA DRB1*1128	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.4
HLA DRB1*1128	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	26
HLA DRB1*1128	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	3.87
HLA DRB1*1128	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	3.87
HLA DRB1*1128	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.51

Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1301	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	4.62
HLA DRB1*1301	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	5.02
HLA DRB1*1301	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.45
HLA DRB1*1301	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	27
HLA DRB1*1301	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1301	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	34
HLA DRB1*1301	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	27
HLA DRB1*1301	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	5.02
HLA DRB1*1301	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	9.71
HLA DRB1*1301	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.19
HLA DRB1*1301	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	30
HLA DRB1*1301	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	1.71
HLA DRB1*1301	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	6.86
HLA DRB1*1301	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.20
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank

HLA DRB1*1302	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	60.72
HLA DRB1*1302	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	5.27
HLA DRB1*1302	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	32.79
HLA DRB1*1302	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	30.49
HLA DRB1*1302	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	73.70
HLA DRB1*1302	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	25.22
HLA DRB1*1302	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	70.75
HLA DRB1*1302	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	7.70
HLA DRB1*1302	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	3.47
HLA DRB1*1302	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	34.17
HLA DRB1*1302	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	12.45
HLA DRB1*1302	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	42.96
HLA DRB1*1302	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	39.92
HLA DRB1*1302	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	26.42
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1304	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	10.60

HLA DRB1*1304	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	9.41
HLA DRB1*1304	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.76
HLA DRB1*1304	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	23
HLA DRB1*1304	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1304	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	34
HLA DRB1*1304	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	23
HLA DRB1*1304	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	9.41
HLA DRB1*1304	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	14
HLA DRB1*1304	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.21
HLA DRB1*1304	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	32
HLA DRB1*1304	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	2.11
HLA DRB1*1304	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	7.76
HLA DRB1*1304	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.11
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1305	1:1-15	RLKGESRKTVELMR	11
HLA DRB1*1305	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	8.5

HLA DRB1*1305	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.47
HLA DRB1*1305	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	21
HLA DRB1*1305	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1305	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	27
HLA DRB1*1305	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	21
HLA DRB1*1305	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	8.5
HLA DRB1*1305	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	12
HLA DRB1*1305	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.4
HLA DRB1*1305	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	26
HLA DRB1*1305	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	3.87
HLA DRB1*1305	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	3.87
HLA DRB1*1305	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.51
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1307	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	18
HLA DRB1*1307	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	16
HLA DRB1*1307	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.5

HLA DRB1*1307	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	13
HLA DRB1*1307	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1307	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	28
HLA DRB1*1307	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	13
HLA DRB1*1307	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	16
HLA DRB1*1307	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	19
HLA DRB1*1307	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	6.5
HLA DRB1*1307	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31
HLA DRB1*1307	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	6.5
HLA DRB1*1307	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	8.5
HLA DRB1*1307	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	3.7
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1311	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	15
HLA DRB1*1311	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	6.4
HLA DRB1*1311	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	8.3
HLA DRB1*1311	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	24

HLA DRB1*1311	5:1-15	EREKSAIDGGEYRLK	35
HLA DRB1*1311	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*1311	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	24
HLA DRB1*1311	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.4
HLA DRB1*1311	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	12
HLA DRB1*1311	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	6.4
HLA DRB1*1311	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	24
HLA DRB1*1311	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.18
HLA DRB1*1311	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	4.18
HLA DRB1*1311	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	2.74
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1321	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	18
HLA DRB1*1321	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	13
HLA DRB1*1321	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	4.86
HLA DRB1*1321	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	15
HLA DRB1*1321	5:1-15	EREKSAIDGGEYRLK	35

HLA DRB1*1321	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	27
HLA DRB1*1321	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	15
HLA DRB1*1321	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTI	13
HLA DRB1*1321	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	13
HLA DRB1*1321	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	8.3
HLA DRB1*1321	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	29
HLA DRB1*1321	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	4.50
HLA DRB1*1321	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	4.84
HLA DRB1*1321	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	4.12
			Consensus Percentile Rank
Allele	Position	Sequence	
HLA DRB1*1322	1:1-15	RLKGESRKTfVELMR	11
HLA DRB1*1322	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	6.02
HLA DRB1*1322	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	9.8
HLA DRB1*1322	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	22
HLA DRB1*1322	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1322	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	33

HLA DRB1*1322	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	22
HLA DRB1*1322	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	6.02
HLA DRB1*1322	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	11
HLA DRB1*1322	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.48
HLA DRB1*1322	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	31
HLA DRB1*1322	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	3.37
HLA DRB1*1322	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	10
HLA DRB1*1322	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	4.04
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1323	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	14
HLA DRB1*1323	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	8.3
HLA DRB1*1323	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	13
HLA DRB1*1323	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	13
HLA DRB1*1323	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1323	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	30
HLA DRB1*1323	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	13

HLA DRB1*1323	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	8.3
HLA DRB1*1323	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	15
HLA DRB1*1323	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	2.72
HLA DRB1*1323	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	32
HLA DRB1*1323	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	5
HLA DRB1*1323	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	14
HLA DRB1*1323	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	6
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1327	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	4.62
HLA DRB1*1327	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	5.02
HLA DRB1*1327	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.45
HLA DRB1*1327	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	27
HLA DRB1*1327	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1327	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	34
HLA DRB1*1327	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	27
HLA DRB1*1327	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	5.02

HLA DRB1*1327	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	9.71
HLA DRB1*1327	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.19
HLA DRB1*1327	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	30
HLA DRB1*1327	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	1.71
HLA DRB1*1327	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	6.86
HLA DRB1*1327	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.20
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1328	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	4.62
HLA DRB1*1328	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	5.02
HLA DRB1*1328	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	5.45
HLA DRB1*1328	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	27
HLA DRB1*1328	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1328	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	34
HLA DRB1*1328	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	27
HLA DRB1*1328	8:1-15	PELEEEEMFKRNLTII	5.02
HLA DRB1*1328	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	9.71

HLA DRB1*1328	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.19
HLA DRB1*1328	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	30
HLA DRB1*1328	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	1.71
HLA DRB1*1328	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	6.86
HLA DRB1*1328	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	1.20
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1501	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	46.64
HLA DRB1*1501	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	22.25
HLA DRB1*1501	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	18.00
HLA DRB1*1501	4:1-15	TEYQTKLNDWDFVV	55.08
HLA DRB1*1501	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	48.97
HLA DRB1*1501	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	61.77
HLA DRB1*1501	7:1-15	KTFDTEYQTKLNDW	47.34
HLA DRB1*1501	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	17.81
HLA DRB1*1501	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	42.89
HLA DRB1*1501	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	4.33

HLA DRB1*1501	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	44.52
HLA DRB1*1501	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	28.16
HLA DRB1*1501	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	52.17
HLA DRB1*1501	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	8.01
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1502	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	17
HLA DRB1*1502	2:1-15	EEMFKRNLTIMDLH	3.92
HLA DRB1*1502	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	7.73
HLA DRB1*1502	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	15
HLA DRB1*1502	5:1-15	EREKSAAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1502	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	14
HLA DRB1*1502	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	15
HLA DRB1*1502	8:1-15	PELEEEEMFKRNLT	3.92
HLA DRB1*1502	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	15
HLA DRB1*1502	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	2.48
HLA DRB1*1502	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	15

HLA DRB1*1502	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	8.20
HLA DRB1*1502	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	12
HLA DRB1*1502	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	11
Allele	Position	Sequence	Consensus Percentile Rank
HLA DRB1*1506	1:1-15	RLKGESRKTFFVELMR	14
HLA DRB1*1506	2:1-15	EEMFKKRNLTIMDLH	2.37
HLA DRB1*1506	3:1-15	FVVTTDISEMGANFK	6.54
HLA DRB1*1506	4:1-15	TEYQKTKLNDWDFVV	25
HLA DRB1*1506	5:1-15	EREKSAIDGEYRLK	35
HLA DRB1*1506	6:1-15	DEAHFTDPASIAARG	24
HLA DRB1*1506	7:1-15	KTFDTEYQKTKLNDW	25
HLA DRB1*1506	8:1-15	PELEEEEMFKKRNLTI	2.37
HLA DRB1*1506	9:1-15	KMLLDNINTPEGIIP	10.98
HLA DRB1*1506	10:1-15	VREAIKRRLRTLILA	1.40
HLA DRB1*1506	11:1-15	DNINTPEGIIPALFE	10.98
HLA DRB1*1506	12:1-15	KKRNLTIMDLHPGSG	5.18

HLA DRB1*1506	13:1-15	WQKGEEVQVIAVEPG	18
HLA DRB1*1506	14:1-15	KKVIQLSRKTFDTEY	8.01

APÊNDICE D – Produções acadêmicas obtidas durante o curso de doutorado

Durante o período do doutorado, estivemos participando de várias atividades acadêmicas e científicas que geraram publicações, que embora não fizessem parte de nosso produto de tese, contribuíram para nossa formação e produções bibliográficas do período. Dentre estas podemos destacar:

MARQUES, C. D. L. ; Lorena, VB ; DUARTE, Angela Luzia Branco Pinto ; SOUZA, J. R. ; SOUZA, W. ; GOMES, Yara de Miranda ; FREESE, Eduardo . Resposta atenuada ao PPD no diagnóstico de infecção tuberculosa latente em pacientes com Artrite Reumatóide. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 49, p. 119-128, 2009.

MARQUES, C. D. L. ; DUARTE, Angela Luzia Branco Pinto ; Lorena, VB ; SOUZA, J. R. ; SOUZA, W. ; GOMES, Yara de Miranda ; FREESE, Eduardo . Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis. Rheumatology International (Berlin), v. apr 11, p. 19363612, 2009.

MARQUES, C. D. L. ; Lorena, VB ; SOUZA, J. R. ; DUARTE, Angela ; GOMES, Yara de Miranda ; FREESE, Eduardo . Evaluation of the T-SPOT.TB in the diagnosis of latent tuberculosis in rheumatoid arthritis. In: EULAR - EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY, 2008, PARIS. Annals of Rheumatic Disease. Oxford : BMJ Journals, 2008. v. 67. p. 305-305.

Van-Lume DS ; SOUZA, J. R. ; MELO, W. G. ; MELO, V. L. ; CABRAL, M. M. L. ; REGO, J. C. ; SHINDLER, H. C. ; ABATH, F. G. C. ; MONTENEGRO, S. M. L. . Preliminary results in the immunodiagnosis of tuberculosis in children based on T cell responses to ESAT-6 and PPD antigens. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online), v. 103, p. 401-404, 2008.

Beck L ; Van-Lume DS ; SOUZA, J. R. ; DOMINGUES, A. L. C. ; Favre T ; ABATH, F. G. C. ; MONTENEGRO, S. M. L. . Discriminating acute from chronic human schistosomiasis mansoni. Acta Tropica, v. 108, p. 229-233, 2008.

MORAIS, C. N. L. ; SOUZA, J. R. ; MELO, W. G. ; AROUCHA, M. L. ; MIRANDA, P. ; DOMINGUES, A. L. C. ; ABATH, F. G. C. ; MONTENEGRO, S. M. L. . Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online), v. 103, p. 561-568, 2008.

SOUZA, J. R. ; MORAIS, C. N. L. ; AROUCHA, M. L. ; MIRANDA, P. ; Barbosa CS ; Carvalho Junior, L. B. ; ABATH, F. G. C. ; MONTENEGRO, S. M. L. . Treatment of human acute schistosomiasis with oxamniquine induces an increase in interferon-gama response to Schistosoma mansoni antigens. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Online), v. 102, p. 225-228, 2007.

Convém mencionar ainda, que entre os resultados obtidos como produto de tese destacamos a produção científica nos seguintes eventos:

SOUZA, J. R., Nascimento, E.J.M., Silva, V.G., Cordeiro, M.T, Magalhaes, M.C.F., Gil, L.H.V.G., MONTENEGRO, S. M. L., Marques, ET. Preliminary Results of T-Cell Epitope Mapping on NS1 and NS3 Proteins of Dengue Virus Type 3 Using IFN-g ELISPOT Assay. Virus Reviews & Research. Rio de Janeiro, p.103 - 103, 2008. – First Pan American Dengue Research Network Meeting, Recife – Brazil, 22- 25 July 2008.

SOUZA, J. R., Nascimento, E.J.M., Silva, V.G., Cordeiro, M.T, Magalhaes, M.C.F., Gil, L.H.V.G., MONTENEGRO, S. M. L., Marques, ET. T-Cell Epitope Mapping on NS1 and NS3 Proteins of Dengue Virus Type 3 Using ELISPOT Assay. Sociedade Brasileira de Virologia – Brazil, 2008.

SOUZA, J. R., Nascimento, E.J.M., Silva, V.G., Cordeiro, M.T, Magalhaes, M.C.F., Gil, L.H.V.G., Marques, ET, MONTENEGRO, S. M. L. Mapeamento de Epítomos reativos para células T das proteínas não-estruturais NS1 e NS3 do Vírus Dengue 3 utilizando de ELISPOT. X Jornada da Pós-Graduação da FIOCRUZ, 2007.

Reference List

- GIUSEPPINA LI PIRA et al. High Throughput T Epitope Mapping and Vaccine Development. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010, p. 1-12, 2010.**
- JENKINS, G. M. et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. J. Mol. Evol. v.54, p. 156-165, 2002.**