

Mapeo computacional de epítomos de células B presentes en el virus del dengue

B-cell epitopes mapping of dengue virus

RAÚL ISEA*

RESUMEN

Dengue es una infección viral de importancia en salud pública. El desarrollo de una vacuna va a depender del conocimiento de aquellos epítomos que neutralicen la infección y por ello, se generaron e identificaron computacionalmente aquellos epítomos lineales consenso de células B presentes en el virus del dengue, a partir de los datos depositados en la base de datos *Immune Epitope Database* (IEDB). Posteriormente, se agruparon en bloques de ocho aminoácidos por cada serotipo mediante el programa Nomad, y cada uno de ellos fue reevaluado con el programa BepiPred para determinar su antigenicidad. Se lograron postular 172 de los 1.239 obtenidos en la IEDB.

Palabras clave: Biología computacional, epítomos, vacuna, dengue, ExPASy.

ABSTRACT:

Dengue virus has emerged as a major public health problem. An epitope-based approach to the development of vaccines, and for this reason, based on *Immune Epitope Database* (IEDB), linear consensus B-cell epitopes were computationally generated and identified from dengue virus. Then, amino acids were grouped into blocks of eight amino acids per serotype through Nomad program. Each block was evaluated using BepiPred for determining antigenic prediction. 172 out of 1239 were obtained from IEDB.

Key words: Computational Biology, epitope, vaccine, dengue, ExPASy

INTRODUCCIÓN

Se estima que entre 2.500 y 3.000 millones de personas están en riesgo de contraer dengue⁽¹⁾, lo cual representa el 35% de la población mundial. Se trata de una enfermedad infecciosa emergente que, desde 1998, es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la décima causa de muerte entre las enfermedades infecciosas predominantes en el mundo⁽²⁾.

El virus del dengue es transmitido por la picadura del mosquito del género *Aedes*. Perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Desde el punto de vista inmunológico, el virus del Dengue posee cuatro serotipos antígenicos relacionados, pero distintos serológicamente entre sí, denotados como dengue 1 (DENV-1), dengue 2 (DENV-2), dengue 3 (DENV-3) y dengue 4 (DENV-4).

Hace apenas doscientos años se registraron los primeros casos reconocidos como dengue en la historia; fueron localizados en Australia. En 1954, surgió un brote epidémico significativo en Filipinas que se extendió a Vietnam, Tailandia y demás países asiáticos⁽³⁾. En América, en cambio, fue en Cuba, en 1981, cuando se reportó una epidemia con más de trescientos mil casos, asociados con una cepa asiática del serotipo DENV-2⁽⁴⁾.

Debido a la carencia de drogas antivirales efectivas contra el dengue, los programas de control de esta enfermedad son muy costosos y han demostrado su baja eficacia por el elevado incremento de casos. Por ese motivo, las esperanzas se han centrado en el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, hasta el presente ha sido imposible obtenerla a pesar de haber empleado virus

* Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Valle de Sartenejas, Hoyo de la Puerta, Baruta. Venezuela.
Dirección de Correspondencia: Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Valle de Sartenejas, Hoyo de la Puerta, Baruta. Venezuela.
Email: raul.isea@gmail.com; risea@idea.gob.ve

inactivados y virus vivos atenuados desde 1927, o haber fabricado en 1928 vacunas inactivadas con una suspensión salina de mosquitos *Aedes aegypti* infectados y tratados con formalina y calor. Incluso después de la Segunda Guerra Mundial, se ensayó una vacuna viva y atenuada contra el DENV-1, pero tampoco se lograron resultados satisfactorios⁽⁵⁾.

Recordemos también el ensayo de una vacuna monovalente realizado por Sabin y Schlesinger usando virus vivos atenuados⁽⁶⁾. No obstante, la utilización de virus vivos atenuados conlleva el riesgo de una reinfección aún más grave, o incluso letal. Lo que se debe procurar es una vacuna capaz de producir anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos, como fue la presentada por Nath Bhamarapravati⁽⁷⁾.

Simultáneamente, existe un alto número de estudios experimentales en la literatura científica que resultarían difíciles de citar en un solo trabajo (8-10, por citar aleatoriamente algunos de ellos). Empero, gracias al auge de las nuevas tecnologías de la información, la mayoría de esos estudios están disponibles en una base de datos dedicada especialmente a registrarlos llamada IEDB, cuyas siglas en inglés corresponden a *Immune Epitope Database*, con la principal ventaja de que la información ha sido curada manualmente y alcanza más de 87.000 epítomos péptidos hasta junio de 2012, correspondientes a enfermedades parasitarias y de otra índole⁽¹¹⁾.

Por otra parte, se mostró el resultado de la predicción de epítomos a partir de la predicción computacional en todo un genoma, y se comparo dichas predicciones con los derivados de ensayos experimentales disponibles en la literatura científica, sin encontrar similitudes entre los mismos⁽¹²⁾.

Si bien es cierto que existen diversos estudios computacionales para determinar los epítomos en el virus del dengue⁽¹³⁻¹⁵⁾, el objetivo del presente artículo es desarrollar una metodología computacional capaz de identificar posibles epítomos lineales consenso de células B a partir de datos disponibles en una base de datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon todos los epítomos peptídicos ensayados contra el dengue que existen en la base de datos IEDB (<http://www.iedb.org>), y se agruparon por seroti-

pos. Seguidamente, se realizó un multialineamiento con ayuda del programa Nomad (<http://expasy.org/tools/nomad.html>), sin permitir *gap* y local⁽¹⁶⁾, el cual se evaluó iterativamente a partir de una función entrópica como se explicó en el trabajo de Hernández y colaboradores⁽¹⁷⁾. Por último, los bloques obtenidos fueron reevaluados con ayuda del programa BepiPred, que permite realizar la predicción de epítomos B lineales basándose en modelos de cadenas de Markov que emplean como único dato la secuencia aminoacídica de dicho epítopo⁽⁶⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la base de datos IEDB se obtuvieron 225, 679, 270 y 65 epítomos peptídicos (suman 1.239), tanto del tipo B como del T, con una longitud aminoacídica igual o superior a ocho, que corresponden con los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente. En este sentido, se descartaron aquellos cuya longitud era igual o inferior a siete aminoácidos, al centrar el presente estudio a bloques igual o superior a ocho aminoácidos. Del total de secuencias analizadas, 593 epítomos no cumplían esa condición en el DENV-2 (IVTEKD, RGEARK y WFKKGS, entre otros muchos).

En las tablas 1 a 4, se muestran los resultados conseguidos una vez que fueron agrupados con el programa Nomad con los datos disponibles hasta junio de 2012, y se estableció que eran antigénicos de acuerdo al programa BepiPred: 47, 37, 73 y 15 (en total 172), corresponden con los serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente.

Para visualizar el comentario anterior, se muestra cómo se determinó un epítopo consenso a partir del análisis de tres epítomos conseguidos en IEDB, siendo los mismos: EHTGREIVDLMCHAT, KSEHTGREIVDLMCH, y TGREIVDLMCHATFT (cuyos identificadores en el IEDB son 12372⁽¹⁸⁾, 33299⁽¹⁹⁾, y 63946⁽¹⁹⁾, respectivamente). De manera que el programa Nomad alinea y obtiene el consenso a ocho aminoácidos como se muestra a continuación:

> 12372	EHTGREIVDLMCHAT
> 33299	KSEHTGREIVDLMCH
> 63946	TGREIVDLMCHATFT
Consenso	TGREIVDL

resaltado en negrita el consenso de los tres epítomos para su rápida identificación (se indicó en gris claro, aquellos aminoácidos que omite el programa Nomad, para efectos de visualización en el trabajo).

Con una simple consulta de las cuatro tablas, se pueden apreciar los patrones que hay en las secuencias aminoacídicas donde participan dos serotipos: por ejemplo, las secuencias YISTRVGM, KPWDV y VMDIISR están presentes tanto en DENV-1 como en DENV-3; mientras que SGSPIVN, SGSPI y VEDYG las hallamos en DENV-1 y DENV-4. Por otra parte, TGREI y VKKDLIS aparecen en DENV-1 y DENV-2, mientras que TDPASI se identifica en DENV-2 y DENV-3 (en todos los casos, se subrayan en las tablas para su identificación).

Adicionalmente, se encuentra coincidencia de patrones en un mismo serotipo; así, GLYGNG aparece dos veces en DENV-4, mientras que INWKG y EGKIV se presentan en dos oportunidades en DENV-1. Finalmente, se localizan SGSPIVD y EMGRLPT en DENV-2 (en todos los casos, se resalto en negrita en las tablas para su identificación).

CONCLUSIONES

A través del procedimiento computacional mostrado en el presente trabajo, se generaron e identificaron epítomos lineales consenso de células B que podían ser

efectivos contra el dengue, y por ende, sería además posible ampliar este análisis a otras enfermedades, en vista del volumen de información genómica existente en la base de datos IEDB.

El presente estudio incluyó todos los epítomos peptídicos (T y B) presentes en la base de datos IEDB por una razón computacional, en vista que si se hubieran descartado los epítomos T, probablemente se hubiera encontrado los mismos epítomos B presentes en dicha base de datos, sin tener un potencial epítomo B.

Por otra parte, la longitud de los epítomos consenso fue de ocho aminoácidos. Se pudieron haber generado epítomos con mayor o menor longitud, pero desde este punto de vista, hubiera sido imposible conocer su extensión ideal sin haber realizado ensayos *in vitro*. Incluso se encontraron similitudes entre los patrones aminoacídicos en las tablas 1 a 4, pero de igual manera, solo pruebas en el laboratorio permitirían confirmar que son realmente importantes.

Finalmente, se podría pensar que los epítomos consenso obtenidos con el programa Nomad eran antigénicos por defecto, pero al reevaluarlos con el programa BepiPred, se confirmó que esa suposición era incorrecta. De hecho, de los 1.239 empleados en el estudio, únicamente 172 fueron considerados antigénicos. Solo resta realizar los ensayos experimentales para validar la metodología computacional que se propone.

Tabla 1
Epítomos consenso lineal de células B derivados de las secuencias antigénicas del DENV-1, provenientes de la base de datos IEDB (ver texto para detalles)

TACLGKSY	KLEKEVAE	ALKLSWFK	PMKLVMFA	TSGSPIVN
ITGFPGKT	<u>YISTRVGM</u>	LEGKIVQY	TFDTEYQK	TFVELMRR
PLNEGIMA	PSWASVKK	YSDRRWCF	REGKIVGL	SEHTGREI
EMGANFKA	SVKKDLIS	YYCAGLKK	SRNKKPRI	IENTTANI
TLYAVATT	INWKGKEL	TMRLSPV	INWKGREL	SNELNHIL
EENLVKSL	VEDYGFI	KCGSGIFV	AIGKAWEE	VKDKEENL
IVREAIKR	MRRGDLPV	FTNMEAQL	TVWVPSI	RKTFDTEY
SRNSTHEM	TALNDMGK	PLTLTAAV	<u>LLTKPWDV</u>	SIILEFFL
QLAKRFSK	TDISEMGA	TLWEGSPG	<u>VMDIISRR</u>	TSRTTWSI
QHNYRPGY	STGSQALAK			

Tabla 2
Epítomos consenso lineal de células B derivados de las secuencias antigénicas del DENV-2,
provenientes de la base de datos IEDB (ver texto para detalles)

AELTGYGT	ATATPPGS	ILKRWGTI	IIGPGLQA	AKQPATLR
ALHQVFGA	ATLRKYCI	EKRHLVGR	DSGCVVSW	VKKDLISY
AGGRAYNH	DPASIAAR	EALRGLPI	EMGRLPTF	CIKVLNPY
SGGSWVDI	FLNEDHWF	LKLNWFKK	SGSPIIDK	SGSPIVDK
SGSPIVDR	YISTRVEM	TGREIVDL	ICSAVPSH	ITAAAWYL
KAELEDGA	ARDALDNL	ARNTPFNM	KKDQVVVL	KKSKAINV
KMDIGVPL	PEGIIPSM	LEKTKKDL	ENLMWKQI	HFTDPASI
TEMGRLPT	CIEAKLTN			

Tabla 3
Epítomos consenso lineal de células B derivados de las secuencias antigénicas del DENV-3,
provenientes de la base de datos IEDB (ver texto para detalles)

EAMKGLPI	ITLYLGAV	TKEGEKKK	<u>TDPASIAA</u>	MLLDNINT
VOLMCHAT	EREKSAAI	IKAGNVIA	LDFNEMIL	SGSPIINR
<u>YISTRVGM</u>	TPEGIIPA	IRYQTTAT	<u>KPWDVVP</u>	QIANELNY
KTWAYHGS	LLLGLMIL	LHPGSGKT	IQDEERDI	NGKKVIQL
ILAGPMPV	LNKDEDHA	MPVTVASA	ILEENMDV	VGMGEAAA
KKLKPRWL	QLANAIFK	LALKEFKD	VKKDLISY	AARGYIST
KKPEVVVL	TPPGTADA	IVREAIKR	VAAEMEEA	VASAAQRR
<u>TVMDIISR</u>	CLKPVILT	HDWQQVPF	YQMWTLML	LKRRSWPL
ILPEYGTL	TEDGQGKA	IEGKVVQY	ITPQASTT	LKGMSYAM
FGESNIVI	LGDTAWDF	LKINWYKK	IPFSTEDG	VLLTWIGL
IGKMFEAT	LDIELQKT	LKMDKLEL	MKNKAWMV	LPWTSGAT
IEGKITNI	ITANPVVT	CKHTYVDR	FGSAYTAL	MCTNTFVL
TAWDFGSV	LKKEVSET	NRKELLVT	QLATLRKL	LEHGGCVT
VEGLSGAT	VHRQWFFD	VTFKNAHA	TMAKNKPT	FGKGSLLT
VVPMVTQM	VLNPYMPT	LTDGPERV		

Tabla 4
Epítomos consenso lineal de células B derivados de las secuencias antigénicas del DENV-4,
provenientes de la base de datos IEDB (ver texto para detalles)

PLKNDEDH	PMALKDFK	PEREKTQA	GTSGSPII	TTVVVKVY
PARLASAI	LVALLGAM	IVGLYNG	KKKLRPRW	PRWLDARV
VIGLYNG	VVTLIPLC	TTTASGKL	FLEVEDYG	

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro reconocimiento a los árbitros del trabajo, así como al Observatorio Científico Tecnológico en Vacunas, a la Red Latinoamericana de Información Científico Técnica en Vacunas y a la Red Iberoamericana de Tecnologías Convergentes NBIC en Salud por la colaboración que nos dispensaron durante la realización de nuestro trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Kurane I, Takasaki T. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol.* 2001; 11: 301-311.
- (2) Seijo A. El dengue como problema de salud pública. *Arch. Argent Pediatr.* 2001; 99: 510-521.
- (3) Halstead SB. The XXth Century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q* 1992; 45: 292-298.
- (4) Kourí G, Guzmán MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1986; 20: 24-30.
- (5) Sabin AB, Schlesinger W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science* 1945; 101(2364):640-2.
- (6) Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2006; 24: 2.
- (7) Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2000; 18 Suppl 2: 44-47.
- (8) Sánchez-Burgos G, Ramos-Castañeda J, Cedillo-Rivera R, Dumonteil E. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. *Virus Res.* 2010;153(1):113-20.
- (9) Da Silva AN, Nascimento EJ, Cordeiro MT, Gil LH, Abath FG, Montenegro SM, Marques ET. Identification of continuous human B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3 (DENV-3). *PLoS One.* 2009; Oct 13;4(10):e7425.
- (10) Jaiswal S, Pearson T, Friberg H, Shultz LD, Greiner DL, Rothman AL, et al. Dengue virus infection and virus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2rgammanull mice. *PLoS One.* 2009 Oct 5;4(10):e7251.
- (11) Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, et al. The Immune Epitope Database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38 (Database issue): D854-D862.
- (12) Isea R. Identificación de once candidatos vacunales potenciales contra la malaria por medio de la Bioinformática. *Vaccimonitor* 2010; 19(3): 15-9.
- (13) Zhong H, Zhao W, Peng L, Li SF, Cao H. Bioinformatics analysis and characteristics of envelop glycoprotein E epitopes of dengue virus. *J. Biomedical Science and Engineering* 2009; 2: 123-127.
- (14) Sánchez-Burgos G, Ramos-Castañeda J, Cedillo-Rivera R, Dumonteil E. Immunogenicity of novel dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. *Virus Res.* 2010; 153: 113-120.
- (15) Jiang L, Zhou JM, Yin Y, Fang DY, Tang YX, Jiang LF. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2. *Virus Res.* 2010; 150: 49-55.
- (16) Hernández D, Gras R, Appel R. Neighborhood functions and hill-climbing strategies dedicated to the generalized ungapped local multiple alignment. *Eur J Oper Res.* 2006; 185: 1276-1284.
- (17) Hernández D, Gras R, Appel R. Neighborhood functions and hill-climbing strategies dedicated to the generalized ungapped local multiple alignment. *Eur J. Oper Res.* 2006; 185(3):1276-84.
- (18) Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology.* 1997; 230(2):300-8.
- (19) Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 2005; 79:1223.