

Predicción de epítomos T y B de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3

Nevis Amin, Fátima Reyes, Romel Calero, Frank Camacho, Armando Acosta

Instituto Finlay, Centro de Investigación Producción de Vacunas. Ave 27, No 19805, La Lisa, AP 16017 cod 11600. La Habana, Cuba.

email: namin@finlay.edu.cu

El dengue se considera una enfermedad emergente y la principal de las afecciones virales transmitidas por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad. A pesar de los múltiples esfuerzos realizados por la comunidad científica internacional, aún no existe una vacuna licenciada contra esta entidad. La NS4b, una de las más pequeñas proteínas del virus del dengue induce respuesta de anticuerpo y de inmunomediadores en pacientes infectados por este virus. Sin embargo, poco es conocido sobre su estructura antigénica. En el campo de diseño de vacunas es muy útil la aplicación de las técnicas *in silico*, tanto para el descubrimiento y desarrollo de vacunas nuevas como para las existentes. Numerosos epítomos predichos se han verificado experimentalmente, lo que demostró la utilidad de tales predicciones. En este trabajo fueron aplicados los programas de predicción: BcePred, ABCpred, HLApred, ProPred y Proped1, para la búsqueda de nuevos epítomos de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3. Se identificaron 27 epítomos de células B y 126 de la T. La secuencia de aminoácidos del mimotopo de la proteína NS4b (FEKQLGQV) fue predicha como epítomo B por el servidor Bcepred, con la puntuación más alta. El análisis teórico de la potencialidad del epítomo T-FEKQLGQV tuvo una alta cobertura para ser presentado por una muestra de la población cubana. Del total de epítomos T predichos, 13 resultaron promiscuos, que pudieran ser potenciales candidatos vacunales. La importancia de estos resultados radica en sentar las bases moleculares para el desarrollo de una vacuna profiláctica de subunidades.

Palabras clave: dengue, NS4b, epítomo, vacunología inversa, HLA.

Introducción

El dengue es considerada una de las enfermedades virales de mayor importancia dentro de las enfermedades emergentes y reemergentes transmitida por mosquitos. Alrededor de 100 millones de personas son infectadas anualmente, de las cuales alrededor de 250.000 resultan en casos graves de la enfermedad y 10.000 mueren. Los virus del dengue (DEN) pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. El complejo que forman estos virus está constituido por cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, relacionados antigénicamente.

El genoma viral consiste en una simple cadena de ácido ribonucleico positiva (ARN+) que codifica para tres proteínas estructurales: C, PrM/M, E y siete proteínas no estructurales (NS, acrónimo del inglés Non Structural): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (1).

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados por la comunidad científica internacional, aún no existe una vacuna licenciada contra el dengue. Un candidato vacunal debe inducir inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos del virus de forma simultánea (2). Los anticuerpos desarrollados durante la infección primaria pueden reconocer de manera heterotípica al segundo serotipo infectante y formar complejos inmunes que faciliten la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares

para Fc, presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos, dianas de la infección por el virus DEN (1).

Una posible estrategia para reducir el riesgo asociado con una vacuna de dengue es el diseño y desarrollo de una vacuna compuesta por epítomos inmunogénicos de cada serotipo viral.

Los epítomos son regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno y son reconocidos por el correspondiente receptor presente en las células B o T. Los epítomos de células B, cuando la secuencia es contigua se denominan epítomos lineales y cuando se ubican en segmentos distantes y se ponen en proximidad espacial por el plegamiento de la proteína son llamados epítomos conformacionales.

Los epítomos T son lineales y requieren de un procesamiento molecular que los haga accesibles (3).

Un paso en la obtención de un candidato vacunal es la identificación de epítomos que sean reconocidos por el sistema inmune del hospedero y son capaces de inducir una respuesta inmune protectora.

La NS4b es una de las proteínas hidrofóbicas del virus del dengue más pequeñas; comparte desde un 78 a un 85% de identidad en su secuencia aminoacídica (a.a) entre los cuatro

* Dra. en Medicina, Especialista en Segundo Grado de Microbiología, Máster en Virología e Investigador Agregado.

serotipos de los virus del complejo dengue y un 35% de identidad con los otros miembros de la familia *Flaviviridae*. Se sugiere que sea un cofactor del complejo enzimático de replicación viral y se ha demostrado que es la principal responsable de la inducción de inmunomediadores, tales como IL6, IL-8, IP-10, TNF alfa e IFN-gamma (4).

Estudios más recientes la señalan como una diana para inhibir la infección por el virus del dengue (5). A pesar de varios estudios para caracterizarla, la NS4b es una de las proteínas no estructurales del virus dengue menos exploradas.

Los métodos computacionales de predicción de epítomos constituyen una herramienta muy útil en el diseño de vacunas que permite reducir el trabajo experimental. Los programas para la predicción de epítomos B se basan en propiedades físico-químicas de las proteínas y en el uso de redes neuronales. Existen diversos programas para la predicción de epítomos B como ABCpred, BcePred y BEPITOPE (6).

Los epítomos de células T requieren ser procesados y presentados en conjunto con las moléculas de los antígenos de leucocitos humanos (HLA, acrónimo del inglés, *Human Leucocyte Antigen*).

Por tal razón los algoritmos diseñados para estudiar dichos epítomos deberán siempre incluir una célula presentadora de antígenos o una célula diana que exprese dicho péptido junto a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, acrónimo del inglés-*Major Histocompatibility Complex*).

Existen, de igual forma, múltiples servidores y algoritmos para la predicción de epítomos T, tanto para alelos de HLA-I como HLA-II. Entre los servidores utilizados para predecir epítomos que se unen a MHC-I se encuentran: el ProPred1, HLApred, MHCpred, entre otros. Por otro lado, de los servidores existentes para predecir epítomos T de MHC-II podemos citar el ProPred y el MHC2Pred (6).

Estudios que impliquen la combinación de predicción de epítomos B y T brindan la posibilidad de obtener mejores resultados.

En la actualidad se considera de extrema necesidad contar con una vacuna contra el dengue, por lo que diferentes grupos de investigadores se incorporaron al desarrollo de tal objetivo.

Teniendo en cuenta que recientemente se identificó un mimotopo de la proteína NS4b (7), así como la posibilidad de encontrar nuevos epítomos inmunoprotectores de dicha proteína, en el presente trabajo se realizó un análisis de predicción de regiones antigénicas para células B y epítomos de células T de la proteína NS4b del virus DEN-3, usando herramientas bioinformáticas.

Materiales y Métodos

Búsqueda de secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína NS4b del serotipo viral dengue 3

La Base de Datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) (8) se utilizó para obtener la secuencia aminoacídica de la poliproteína del serotipo viral dengue 3 cepa D3 Martinica1243/99 (número de acceso Q6YMS3). La región aminoacídica correspondiente a la proteína NS4b se encontró en la posición 2243-2490 de la poliproteína.

Predicción de epítomos B

La predicción de epítomos B se realizó con una combinación de los servidores BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred>) y ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>) (9). Para el servidor Bcepred se determinó un índice de 2,38%, al considerar que este algoritmo posee diferentes valores de corte para cada una de las propiedades físico-químicas, seleccionadas a partir de las cuales los péptidos predichos son considerados como epítomos, para el servidor de ABCpred se seleccionaron epítomos de células B de 9 aminoácidos de longitud con un índice de 0,5%.

Predicción de epítomos T

La predicción de epítomos T se realizó a través del servidor HLApred (<http://www.imtech.res.in/raghava/hlapred/>) (10), diseñado por el Centro de Bioinformática del Instituto de Tecnología Microbiológica de la India. Además, los epítomos T promiscuos para moléculas HLA clase I, se identificaron con el servidor Propred1 (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>) (11) y para HLA clase II, se utilizó el servidor ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>) (12). Los valores de corte utilizados fueron los predeterminados por ambos servidores.

La predicción de epítomos T se realizó para alelos de moléculas HLA-I y HLA-II, según los reportes de la distribución de estos alelos en una muestra de 129 donantes sanos de la población cubana de La Habana (13).

Estudio de la presentación de un epítomo de células T de la proteína NS4b por una muestra de la población cubana

Para conocer la cobertura poblacional frente al epítomo seleccionado -FEKQLGQV- de la proteína NS4b se utilizó el servidor Population Coverage (http://tools.immuneepitope.org/tools/population/iedb_input).

Se emplearon como referencia estudios de distribución de HLA en muestras de 129 donantes sanos de la población cubana de La Habana, para alelos de HLA clase I (13).

Los resultados se expresaron en el porcentaje de la población estudiada con potencialidad para presentar como el epítipo seleccionado FEKQLGQV, en el contexto de sus moléculas.

El programa de cálculo de cobertura poblacional (14) permitió obtener para este epítipo la predicción teórica de la presentación para alelos clase I de HLA de las poblaciones brasileñas, mexicana y malaya.

Resultados y Discusión

La inmunoinformática consiste en la aplicación de las herramientas computacionales al estudio de las moléculas del sistema inmune y constituye una disciplina emergente, capaz de guiar el diseño de experimentos para responder a importantes interrogantes en la inmunobiología y la vacunología (6).

La predicción de epítipes B podría disminuir en gran medida el trabajo experimental en la búsqueda de candidatos vacunales. Se han identificado epítipes de células B de las proteínas del virus dengue: E, C, NS1, NS4a, prM y NS3 (15).

La proteína NS4 está constituida por dos proteínas: NS4a y NS4b; esta última ha sido poco estudiada y es una de las más pequeñas proteínas hidrofóbicas del virus del dengue. La NS4b sirve como sitio de anclaje para el complejo de replicación viral (4).

La tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de los bacteriófagos se aplica en la selección de determinantes antigénicos. Este trabajo es la continuidad de la identificación previa de un mimotopo de la proteína NS4b del virus dengue serotipo 3, donde se emplean sueros de pacientes que contienen anticuerpos contra el virus dengue (7).

Resulta de interés identificar nuevos epítipes con capacidad de ser reconocidos por células B en la proteína NS4b basado en la posible expresión de este epítipo (FEKQLGQV) durante

el curso de la enfermedad y que fuese capaz de inducir una respuesta inmune humoral.

Existen diversos servidores que permiten identificar la presencia de epítipes B en una proteína.

Uno de los utilizados para el análisis fue el BcePred, el cual predice epítipes lineales de células B basado en las propiedades físico-químicas de la proteína de interés, tales como hidrofiliidad, flexibilidad, accesibilidad, presencia de lazos en la estructura, polaridad, exposición de epítipes en la superficie, propiedades antigénicas o una combinación de alguna de estas propiedades.

La exactitud de la predicción para los modelos basados en estas propiedades varía de 52,7% a 57,53% (9).

A través de dicho servidor se identificaron 27 epítipes de células B para las características físico-químicas seleccionadas, excepto para la correspondiente a la presencia de lazos en la estructura (Tabla 1).

Igualmente fueron predichos 27 epítipes de células B con puntuaciones entre 0,83 y 0,52 para el programa ABCpred (Tabla 2). Este servidor se emplea ampliamente, ya que selecciona epítipes con un elevado porcentaje de seguridad (65,93%).

Entre los epítipes B predichos por la combinación de ambos programas (Tabla 1 y 2), se encuentra el correspondiente al NS4b mimotopo (secuencia 164-171 a.a), descrito previamente por Amin y cols. (7). Este epítipo mimotopo fue capaz de unirse a anticuerpos antidengue, al competir específicamente por la unión al virus.

Otros autores también involucran a la proteína NS4b del virus dengue en la respuesta humoral (16). Los estudios de la respuesta inmunológica humoral y celular de la secuencia

Tabla 1. Epítipes B identificados en la proteína NS4b del virus dengue 3 para cada propiedad físico-química seleccionada por el programa Bcepred.

Propiedades físico-químicas seleccionadas por Bcepred	NEMGLLETTKRDLGMSKEPGVVSPTS YLDVDLHPASAWTLYAVATTVITP MLRHTIENSTANVSLAAIANQAVVLMGLDKGWPIKMDLGVPLLAGCYS QVNPLTLTAAVLLLITHYAIIGPGLQAKATREAAQKRTAAGIMKNPTVDGIMT IDLDSVIFDSKFEKQLGQVMLLVLCVQQLLMRTSWALCEALTLATGPITT LWEGSPGKFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGAGL AFSIMKSVGTGKR
Hidrofiliidad	ENSTANV, QAKATREAAQKRTA, KNPTVDG, DSKFEKQ
Flexibilidad	GLLETTK, KATREAAQ, VIFDSKFE, TLWEGSP, SIMKSVGTGK
Accesibilidad	LLETTKRDLG, LQAKATREAAQKRTAAGIMKNPTVDG, FDSKFEKQLGQ, RHTIENS
Exposición en superficie	LETTKRDL, TREAAQKRT, DSKFEKQL, TGKR
Polaridad	LLETTKRDL, MLRHTIENS, QAKATREAAQKRTA, IFDSKFEKQLG
Antigenicidad	EPGVVSPTS YLDVDLHP, DLGVPLLAGCYSQVNPLTL VLLLITHY, QLQVMLLVLCVQQLLMR, IDLDSVIFD, VVLMGLD

La secuencia del mimotopo NS4b predicha por BcePred se señala en negrita.

Tabla 2. Epítomos B identificados en la proteína NS4b del virus dengue 3 por el programa ABCpred.

Número	Epítomos predichos ABCpred
1	DLDSVIFDSKFE
2	GPGLQAKATREA
3	AVVLMGLDKGWP
4	KFEKQLGQVMLL
5	LLETTKRDLGMS
6	QVNPLTLTAAVL
7	DLGMSKEPGVVS
8	LTAAVLLIITHY
9	LHPASAWTLYAV
10	REAQKRTAAGIM
11	QLGQVMLLVLCA
12	ENSTANVSLAAI
13	TLYAVATTVITP
14	AIANQAVVLMGL
15	VSPTSYLVDVLH
16	VIFDSKFEKQLG
17	LALGCYSQVNPL
18	AKATREAQKRTA
19	KMDLGVPLLALG
20	ITPMLRHTIENS
21	VDGIMTIDLDSV
22	ITHYAIIGPGLQ
23	MGLDKGWPIKSM
24	SYLDVDLHPASA
25	LCAVQLLLMRTS
26	TAAGIMKNPTVD
27	KNPTVDGIMTID

La secuencia del mimotopo NS4b predicha por ABCpred se señala en negrita.

aminoacídica del mimotopo como un péptido sintético están en curso.

Es de señalar, además, que este epítipo está altamente conservado entre los cuatro serotipos, según las comparaciones de la secuencia de a.a, que codifica para esta proteína. La NS4b comparte un 78% a 85% de identidad entre los virus del complejo dengue (4). Van y colaboradores (17)

igualmente identificaron epítomos de células B conservados en la proteína NS4b. El presente estudio permitió describir por primera vez secuencias aminoacídicas de la proteína NS4b del virus dengue implicadas en el reconocimiento de células B.

La respuesta inmune inducida por dengue incluye la humoral, protagonizada por los anticuerpos neutralizantes, así como la respuesta de células T CD4+ tipo auxiliaoras y células T CD8 + tipo citotóxicas. El principal rol de la inmunidad celular es a través de la cooperación de los linfocitos T CD4+ y la lisis eficiente de la células infectadas por las células T citotóxicas (18).

Los linfocitos T son capaces de reconocer péptidos extraños en el contexto de las moléculas del HLA propio. A través de su receptor reconocen el determinante antigénico formado por un péptido asociado a las moléculas del HLA. Los linfocitos T CD4+ reconocen péptidos asociados a la molécula de HLA clase II, mientras que los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos asociados a la molécula de HLA clase I. Este fenómeno se conoce como restricción por el HLA.

La variabilidad de los alelos HLA puede impactar en la respuesta inmune individual durante la vacunación. Numerosos algoritmos se desarrollan para realizar estudios de predicción de la posible afinidad de las secuencias peptídicas a los diferentes alelos HLA clase I y II. Esta puede impactar en la respuesta inmune individual durante la vacunación (3).

Se ha demostrado que el virus del dengue incrementa la expresión de moléculas HLA clase I y II en las células infectadas. En varios trabajos se describen epítomos T a lo largo de toda la poliproteína de los virus del dengue (15, 18) y se encuentran localizados principalmente en la proteína NS3. También se han identificado epítomos T en las proteínas virales siguientes: C, M, NS5, NS4a y E, utilizando tanto métodos

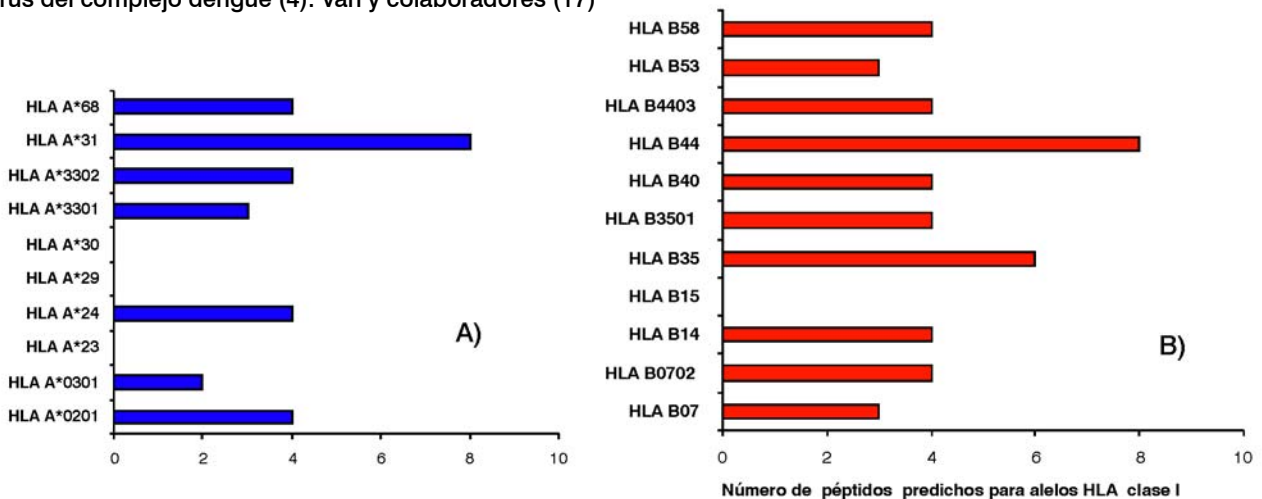


Fig. 1. Epítomos predichos de la proteína NS4b para alelos de clase I. A) Alelos HLA-A B) Alelos HLA-B.

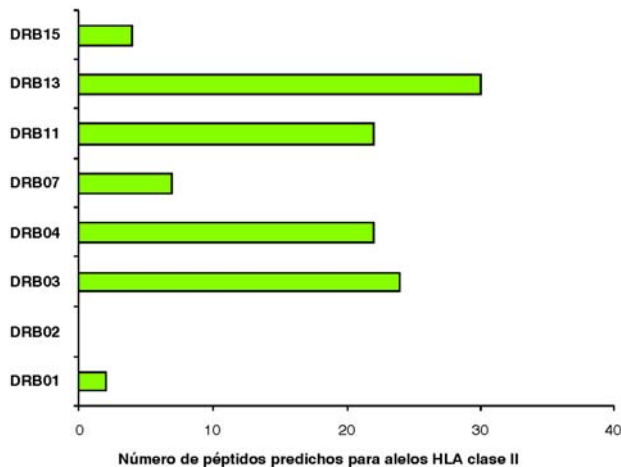


Fig. 2. Epítomos predichos de la proteína NS4b para alelos HLA de clase II.

computacionales como inmunológicos tradicionales (15). Es por esto que en este trabajo nos propusimos realizar una predicción de epítomos T de la proteína NS4b del serotipo viral dengue 3.

En la proteína NS4b se predijeron un total de 126 epítomos T con el servidor HLA Pred; de ellos 101 HLA clase I y 11 clase II, los cuales se seleccionaron con respecto a reportes de la distribución de los mismos en una muestra de la población de La Habana (13).

En las Figuras 1 y 2 se muestran el número de epítomos predichos con cada uno de los alelos incluidos en el análisis, tanto para la mayor cantidad de alelos posibles de los reportados para una muestra de la población cubana (13), así como para los asociados con la protección o susceptibilidad a la infección por virus del dengue (18). Con los servidores Proped y Proped1 se lograron identificar 13 epítomos T promiscuos, los cuales pueden unirse a varios alelos del HLA (Tabla 3).

Estos resultan potenciales candidatos vacunales debido a la posibilidad teórica que tienen de unirse a una gran diversidad del producto de expresión de variantes alélicas de moléculas HLA existentes en las poblaciones (3) y conformar determinantes antigénicos que son reconocidos por los linfocitos T.

De esta manera se amplían las posibilidades de desencadenar respuestas inmunes protectoras en el contexto del desarrollo de vacunas.

El polimorfismo de los genes para los antígenos HLA se relaciona con la protección o la susceptibilidad ante el desarrollo de la enfermedad por dengue. Sierra y cols. (18) demostraron que los alelos clase I HLA A31 y el HLA B15 tienen una frecuencia incrementada en individuos cubanos con historia de infección clínica por virus del dengue. En un

estudio que se realizó en una población vietnamita se encontró una fuerte asociación entre la presencia del alelo HLA A24 con las formas clínicas de la infección por dengue (19). Dicho alelo es uno de los más frecuentes expresados, especialmente en pacientes con fiebre hemorrágica dengue/síndrome de choque dengue (FHD/SCD), cuando se comparó con sujetos controles. Otros alelos clase I HLA A26 y 68 se identificaron y asociaron a posible riesgo en la aparición de formas graves de la enfermedad en una población malaya (20).

En este estudio de predicción de epítomos en la proteína NS4b se presentaron un total de cuatro péptidos capaces de unirse al alelo HLA A24 y A68, así como un total de ocho epítomos para el alelo HLA A31 (Fig. 1).

La presencia de alelos asociados con la susceptibilidad a las formas severas de la enfermedad por dengue induciría una respuesta inmune patológica, por lo cual dichos epítomos deberán ser excluidos de un posible candidato vacunal contra el dengue. En un trabajo previo realizado en la población de La Habana el alelo HLA clase I B15 (Fig. 1), se asocia con la forma grave de la enfermedad (13), mientras que en el presente análisis no fue predicho ningún epítomo para dicho alelo.

La asociación positiva más reportada del polimorfismo de los genes HLA con protección a la infección por virus dengue ha sido la presencia de los alelos protectores DRB107 y DRB104 (15). En este estudio se encontró un número importante de péptidos predichos en la proteína NS4b con capacidad para unirse a estos alelos.

Otra investigación realizada en la población tailandesa demostró una asociación entre el alelo HLA B44 y la protección a padecer las formas graves de la enfermedad (18). Como se muestra en la Figura 1 el alelo HLA B44 fue reportado para ocho péptidos en nuestro estudio.

Aún cuando en este análisis de predicción se encontraron numerosos epítomos que se relacionan con alelos de susceptibilidad a la infección por dengue, se detectaron un número importante de alelos protectores.

En este sentido, la utilización de estos últimos, como parte de una vacuna de subunidades antidengue, permitiría incluir en la formulación final dichos epítomos protectores de cada uno de los serotipos virales. Esto impactaría en el resultado de la respuesta inmune a la vacunación.

Un determinante indispensable de inmunogenicidad para los péptidos es su capacidad de unión a las moléculas HLA. La selección de péptidos con especificidades de unión diferentes al HLA amplía la cobertura poblacional, condición aprovechable en el diseño de vacunas de subunidades.

Tabla 3. Epítomos promiscuos identificados en la proteína NS4b para alelos de HLA.

Secuencia	Alelos HLA tipo I	Alelos HLA tipo II
MGLLETTKR	HLA A*3302, HLA B35 B44	HLA DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0410, DRB1*0421, DRB1*0423, DRB1*0426, DRB5*0101, DRB5*010
MKSVGKGKR	HLA A20	HLA DRB5*0101, DRB5*0105
FRGSLYLAGA	HLA B*2702	HLA DRB1*0305, DRB1*0309, DRB1*1101, DRB1*1307
LLLITHYAI	HLA A11, A3, A31	HLA DRB1*0701, DRB1*0703, DRB1*1501, DRB1*1506, DRB5*0101, DRB5*0105
LLITHYAI	HLA B*5201, B8	HLA DRB1*1501, DRB1*1506
LTLTAAVLL	HLA B7	HLA DRB1*0701, DRB1*0703
FSIMKSVGKT	HLA A*3301	HLA DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0405, DRB1*0408
LLLITHYAI	HLA A11, A3, A31,	HLA DRB1*0701, DRB1*0703, DRB1*1501, DRB1*1506, DRB5*0101, DRB5*0105
LYAVATTVI	HLA A11, A24, B*5201,	HLA DRB1*0404, DRB1*0423
MRTSWALCE	HLA A*2402	HLA DRB1*0817, DRB1*1321
VIFDSKFEK	HLA A*3101	HLA DRB1*0301, DRB1*0305, DRB1*0306, DRB1*0307, DRB1*0308 DRB1*0309, DRB1*0311, DRB1*1107
YAIIGPGLQ	HLA A31, B8	HLA DRB1*0305, DRB1*0309, DRB1*0801, DRB1*0802, DRB1*0817, DRB1*1101, DRB1*1128, DRB1*1305, DRB1*1307, DRB1*1321, DRB5*0101, DRB5*0105
MLRHTIENS	HLA A*0205	HLA DRB1*0301, DRB1*0306, DRB1*0307, DRB1*0308 DRB1*0311, DRB1*0401, DRB1*0426, DRB1*1102, DRB1*1107, DRB1*1114, DRB1*1120, DRB1*1121, DRB1*1301, DRB1*1302, DRB1*1304, DRB1*1322, DRB1*1323, DRB1*1327, DRB1*1328

La cobertura para alelos de HLA clase I resultó para la población cubana europeoide del 59,93% y para la africanoide del 58,8% (Tabla 4).

Teóricamente, la inclusión de este epítipo pudiera producir una adecuada estimulación de la respuesta inmune específica en la población utilizada como referencia, aunque debe tomarse en consideración que estos resultados no son extrapolables al conjunto de la población cubana debido al tamaño de la muestra analizada y a la no representación de las poblaciones de distintas regiones del país.

Existen pocos trabajos en la literatura que identifican epítomos de células específicas del virus dengue protectores en diversas poblaciones del mundo, con la aplicación de métodos computacionales (19-22).

El uso de estos sistemas de estimación teórica de cobertura vacunal para poblaciones específicas, pudiera ser de gran utilidad para el desarrollo de vacunas, teniendo en cuenta la composición genética de poblaciones determinadas.

En la Tabla 4 se presentan los porcentajes de cobertura en tres poblaciones diferentes tomadas como modelos:

Tabla 4. Cobertura poblacional del epítipo mimotopo-FEKQLGQV- de la proteína NS4b para los alelos HLA clase I.

Población	HLA Clase I	Muestra poblacional (Donantes sanos)
Cubanos europeos, Cuba	59,93%	129 (18)
Cubanos mestizos, Cuba	58,18%	129 (18)
Brasileños, Brasil	62,87%	101 (22)
Brasileños mestizos, Brasil	54,26%	101 (22)
Mexicanos, México	60,29%	90 (21)
Malayos, Malasia	24,20%	95 (20)

mexicanos, brasileños y malayos, los cuales difieren en su constitución genética, localización geográfica e incidencia de dengue.

La cobertura de los alelos HLA clase I correspondientes al epítipo en estudio fue similar al de las poblaciones de la región de las Américas. La población malaya mostró un valor relativamente más bajo en comparación con las restantes analizadas (Tabla 4). Dicha población se conforma por diferentes grupos étnicos: malayo, indio y chino, con una diversidad genética que revela la frecuencia de las variantes alélicas HLA diferentes (20).

El análisis de la cobertura poblacional se realizó a la población correspondiente al grupo étnico malayo, lo cual explica la diferencia encontrada con las restantes poblaciones que se estudiaron. A pesar de que el epítipo bajo estudio no se presentó con igual cobertura para las diferentes poblaciones estudiadas sí presentó buenos porcentajes, lo cual evidencia que si se usara como parte de candidatos vacunales basados en epítipos se obtendría una adecuada respuesta protectora.

La respuesta inmune contra el dengue incluye ambos alelos: HLA clase I y HLA clase II, por lo cual es importante considerar que se realice en el futuro un estudio relacionado con la presentación del epítipo de células T-FEKQLGQV- de la proteína NS4b para los alelos HLA clase II.

El estudio de predicción realizado en este trabajo permitió predecir nuevos epítipos de células B y T de la proteína NS4b del virus dengue 3, que pudieran estar implicados en la respuesta inmune al virus. La secuencia del mimotopo de la proteína NS4b fue predicha como un epítipo de células B y mostró elevada probabilidad de ser presentado por una proporción de individuos de la población cubana y de otras zonas geográficas. El empleo de las herramientas bioinformáticas tiene el potencial de acelerar investigaciones, entre las que se encuentran el desarrollo de vacunas, lo cual en combinación con ensayos *in vitro* son una excelente estrategia para la identificación de péptidos inmunogénicos.

Referencias

- Guzmán MG, Hermida L, Bernardo L, Ramírez R, Guillén G. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(1):87-97.

- Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Pública* 2007;21(4): 254-60.
- Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5 th ed. Madrid, España: Elsevier Science, Grafos SA; 2004.
- Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology* 2011;418(1):27-39.
- Xie X, Wang QY, Xu HY, Qing M, Kramer L, Yuan Z, et al. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. *J Virol* 2011;85(21):11183-95.
- Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology* 2010; 131(2):153-68.
- Amin N, Aguilar A, Chamacho F, Vázquez Y, Pupo M, Ramírez JC, et al. Identification of Dengue-specific B-Cell Epitopes by Phage-display Random Peptide Library. *Malays J Med Sci* 2009;16(4):4-14.
- Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, et al. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:136. Disponible en: doi:10.1186/1471-2105-10-136.
- Saha S, Raghava GPS. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. In: Nicosia G, Cutello V, Bentley, PJ, Timis J, eds. *Artificial Immune Systems, Third International Conference*. Catania, Sicily, Italy: ICARIS; 2004. p. 197-204.
- Bhasin M, Raghava GPS. A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes. *J Biosci* 2006;32:31-42.
- Singh H, Raghava GPS. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 2001;17:1236-7.
- Singh H, Raghava GPS. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 2003;19:1009-14.
- Paradoa ML, Middleton D, Acosta A, Sarmiento ME, Leyva J. Genes HLA en una muestra de la población cubana. *VacchiMonitor* 2000;9(3):1-5.
- Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics* 2006;7:153.
- Vaughan K, Greenbourn J, Blythe M, Peters B, Sette A. 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 Immunol* 2010;23(3):259-84.
- Olán L, Mellado G, García J, Escobar A, Santos L, Gutiérrez B, et al. Analysis of antibody responses in human dengue patients from the mexican coast using recombinant antigens. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2008;8(1):69-79.
- Van HV, Phuong CTN, Thuoc TL. Establishing a genomic and proteomic database to assist the design of vaccine in silico and the prediction of epitopes towards a multivalent peptide vaccine against dengue virus: proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture, Nong Lam University Ho Chi Minh city; October 20-21, 2006. Viet Nam; 2006: 89-91
- Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, Sturn-Ramírez K, Obasanjo O, 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. *Hum Immunol* 2007; 68(6):531-40.

19. Nguyen TP, Kikuchi M, Vu TQ, Do QH, Tran TT, Vo DT, et al. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2(10):e304. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pntd.0000304.
20. Appanna R, Ponnampalavanar S, Lum Chai See L, Sekaran SD. Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. *PLoS One* 2010;5(9): e13029. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0013029.
21. Falcón-Lezama JA, Ramos C, Zuñiga J, Juárez-Palma L, Rangel-Flores H, García-Trejo AR, et al. HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop* 2009;112(2):193-7.
22. Nigam P, Dellalibera E, Mauricio-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004;64(2):204-9.

T and B epitope prediction of protein NS4b of dengue virus type 3

Abstract

Dengue is considered an emerging infectious disease and the most important arthropod-borne viral disease in terms of morbidity and mortality. Despite the efforts made by the international scientific community, there is still no licensed vaccine against dengue. NS4b, the smallest hydrophobic proteins of dengue virus, has been reported to elicit antibodies and chemokines and cytokines in dengue-infected patients, but not much is known regarding the antigenic structure of this protein. In the field of vaccine design, the application of *in silico* techniques is very useful, for both the discovery and development of new and existing vaccines. Many predicted epitopes have been experimentally verified, demonstrating the usefulness of such predictions. In the present work, prediction programs: BcePred, ABCpred, HLApred, ProPred y Proped 1 were used to find novel epitopes from NS4b dengue virus type 3. 27 B-cell epitopes and 126 T-cell epitopes were identified on NS4b protein. The amino acidic sequence (FEKQLGQV) of NS4b protein was predicted by Bcepred server with a high score. Theoretical analysis of the potential of the T epitope -FEKQLGQV- showed a high coverage to be presented so that a sample of the Cuban population was used. Thirteen epitopes T out of those predicted resulted promiscuous, which can be potential vaccinal candidates. The importance of these epitopes is that they are identified main targets for the development of a subunit vaccine for prevention of dengue disease.

Key words: dengue, NS4b, epitope, reverse vaccinology, HLA.

Recibido: Abril de 2013

Aceptado: Mayo de 2013