



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la respuesta inmune estimulada por péptidos de alta capacidad de unión a moléculas H2-IE^d, en modelo murino.

Evaluation of the immune response stimulated by peptides with high binding capacity to H2-IE^d molecules in a murine model.

Kewin J. Rodríguez Obediente

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades en Ciencias-Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2023

Evaluación de la respuesta inmune estimulada por péptidos de alta capacidad de unión a moléculas H2-IE^d, en modelo murino.

Kewin J. Rodriguez Obediente

Trabajo de grado presentado como requisito para optar a título de:

Magister en Ciencias – Microbiología

Director:

Diana Díaz Arévalo PhD.

Codirector:

Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez M.D., Dr.Sc.

Línea de Investigación:

Inmunología celular y molecular

Grupo de Investigación:

Biología Molecular e Inmunología-FIDIC

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades en Ciencias-Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2023

A mi abuela Olga María Suarez Bernier, coautora de
toda esta aventura. Quien partió hace muchos años,
pero su recuerdo me motiva a lograr estas metas
Ella siempre fue, es y será la razón,
de este camino tan inspirador, llamado ciencia.

Agradecimientos

A Dios por darme la salud, mi familia y por enseñarme el camino a seguir.

Agradezco enormemente a Diana Díaz Arévalo por el apoyo, paciencia y dedicación para enseñarme la labor de ser investigador.

Infinitas gracias a mi jefe y tutor Manuel Alfonso Patarroyo, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, dedicación y confianza.

Agradezco a Manuel Elkin Patarroyo, Carlos Suarez, Cesar Reyes, Laura Cuy y Jeimy Beltrán por acompañarme en todo este camino.

A Yoelis Yepes Pérez, este trabajo es de los dos. Es mi familia, y su mano ha sido un apoyo durante toda esta aventura.

A Yineth Carrillo y Daniele Riboli, porque a pesar de la distancia, siempre me apoyaron y recordaron que nada es imposible, que el cielo es el límite.

A todos mis compañeros de grupo, por su apoyo constante, muchas gracias.

A mi familia, eternamente agradecido.

Resumen

La complejidad biológica de *Plasmodium vivax* ha restringido el desarrollo del cultivo *in vitro* para la caracterización de antígenos involucrados en la invasión a eritrocitos y su relevancia inmunológica. El modelo murino se propone como una alternativa en la búsqueda de candidatos terapéuticos, ya que, *Plasmodium yoelii* utiliza proteínas homólogas para los mecanismos de invasión. La proteína AMA-1 es vital para el proceso de invasión del parásito al eritrocito, considerándose una importante diana para el control de la infección. El presente estudio, como prueba de concepto, se centró en la caracterización de la respuesta inmune estimulada por constructos peptídicos compuestos por epítomos B de la proteína PyAMA-1 y epítomos T optimizados *in silico* para el anclaje a moléculas H2-IE^d, probados en ratones BALB/c. Para la selección de epítomos B antimaláricos, se realizó un análisis de restricción funcional por fuerzas evolutivas *in silico*. Encontramos que *pyama1* presenta dos regiones altamente conservadas entre las especies (>70%) bajo selección negativa. Se evaluaron catorce péptidos sintéticos que cubrían el total de ambas regiones conservadas, identificando 5 péptidos de PyAMA-1 con alta unión específica (HABP, del inglés *High Activity Binding Peptide*) a eritrocitos murinos. Mediante ensayos *in vitro* se evaluó el perfil funcional de los HABPs, sugiriendo que los péptidos 42681 y 42904 fueron capaces de inhibir la invasión y restringir el desarrollo intraeritrocítico de *P. yoelii* y, además, mostraron capacidad antigénica frente a sueros obtenidos de ratones infectados experimentalmente. Mediante un análisis bioinformático robusto, se realizó el diseño y optimización de los epítomos B seleccionados, a través de la articulación de un epítomo T completamente artificial y se evaluó su unión *in vitro* a moléculas H2-IE^d. Los epítomos quiméricos B-T 43643 y 43644 presentaron perfiles de unión superiores a 50% a moléculas de MHC murino. Además, nuestros constructos potenciaron la respuesta humoral en ratones BALB/c, comparados con los péptidos nativos, y a su vez, mostraron anticuerpos IgG1 e IgG2 en sueros. Estas quimeras peptídicas fueron capaces de inducir una respuesta proliferativa y la diferenciación de células T de memoria CD4⁺ CD44⁺ CD62L⁺, generando una producción coordinada de TNF α , como mediador de la eliminación del parásito durante la infección temprana de *P. yoelii*. Este trabajo propone la quimerización de epítomos B y epítomos T como una estrategia para el diseño de candidatos peptídicos inmunogénicos para el desarrollo de una vacuna sintética multiepítomo – multiestadio contra la malaria.

Palabras claves: Selección natural, HABPs, epítomos T, epítomos B, péptidos quiméricos, inmunogenicidad, *Plasmodium yoelii*.

Abstract

The biological complexity of *Plasmodium vivax* has limited developing an *in vitro* culture for the characterization of antigens involved in erythrocyte invasion and their immunological relevance. The murine model is proposed as an alternative in the search for therapeutic candidates since *Plasmodium yoelii* uses homologous proteins for invasion. The AMA-1 protein is vital for the parasite invasion of the erythrocyte and is considered an important target for malaria control. The present study, as a proof of concept, focused on the characterization of the immune response stimulated by peptide constructs made of B epitopes of the PyAMA-1 protein and T epitopes optimized *in silico* for anchoring to H2-IE^d molecules, tested in BALB/c mice. For the selection of antimalarial B epitopes, an *in silico* evolutionary force functional constraint analysis was performed. We found that *pyama1* exhibits two highly conserved regions among species (>70%) under negative selection. Fourteen synthetic peptides covering both conserved regions were evaluated, identifying 5 PyAMA-1 peptides displaying high specific binding (High Activity Binding Peptides or HABPs) to murine erythrocytes. *In vitro* assays evaluated the functional profile of the HABPs, suggesting that peptides 42681 and 42904 were able to inhibit invasion and restrict intraerythrocytic development of *P. yoelii* and, in addition, showed antigenic capacity when tested with sera obtained from experimentally infected mice. By means of a robust bioinformatics analysis, the design and optimization of the selected B epitopes was achieved by linking them to a completely artificial T epitope and assessing their *in vitro* binding to H2-IE^d molecules. The chimeric B-T epitopes 43643 and 43644 showed binding profiles higher than 50% to murine MHC molecules. Furthermore, our constructs enhanced the humoral response in BALB/c mice compared to native peptides, and increased IgG1 and IgG2a antibodies in sera. These peptide chimeras were able to induce a proliferative response and differentiation of CD4⁺ CD44⁺ CD62L⁺ memory T cells, generating a coordinated production of TNF α , as a mediator of parasite clearance during early *P. yoelii* infection. This work proposes the chimerization of B epitopes and T epitopes as a strategy for designing immunogenic peptide candidates for the development of a synthetic multi-epitope - multi-stage malaria vaccine.

Key words: Natural selection, HABPs, T epitopes, B epitopes, chimeric peptides, immunogenicity, *Plasmodium yoelii*.

Tabla de Contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Lista de figuras | 12 |
| Lista de Tablas..... | 13 |
| INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 1. Hipótesis | 19 |
| 2. Objetivos..... | 20 |
| 2.1 Objetivo general..... | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos | 20 |
| 3. Marco teórico..... | 21 |
| 3.1. Epidemiología..... | 21 |
| 3.2. <i>Plasmodium yoelii</i> | 22 |
| 3.3. Presentación antigénica..... | 24 |
| 3.3.1 MHC clase I..... | 25 |
| 3.3.2 MHC clase II | 25 |
| 3.4 Patofisiología y mecanismo inmune..... | 26 |
| 4. Metodología..... | 28 |
| 4.1. Cultivo de <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL | 28 |
| 4.2. Mantenimiento del biomodelo | 28 |
| 4.3. Análisis de polimorfismo y divergencia | 29 |
| 4.4. Síntesis de péptidos..... | 31 |
| 4.5. Actividad citotóxica..... | 31 |
| 4.6. Perfil de unión a glóbulos rojos murinos..... | 31 |
| 4.7. Inhibición de invasión <i>in vitro</i> | 32 |
| 4.8. Inhibición del desarrollo intraeritrocítico..... | 32 |
| 4.9. Análisis de estructura de PyAMA-1 | 33 |
| 4.10. Diseño y optimización de péptidos quiméricos para anclaje a moléculas H2-IE ^d | 33 |

| | |
|---|----|
| 4.11. Purificación de moléculas H2-IE^d y anticuerpos Anti-HLA-DR. | 34 |
| 4.12 Perfil de unión de péptidos a moléculas H2-IE ^d | 35 |
| 4.13 Respuesta humoral estimulada por péptido quiméricos en modelo murino | 35 |
| 4.15 Proliferación de Linfocitos T CD4 ⁺ | 37 |
| 4.15 Evaluación de citoquinas en sobrenadante | 37 |
| 4.16 Análisis estadístico | 38 |
| 5. Resultados | 39 |
| 5.1. Péptidos antimaláricos derivados de regiones bajo selección negativa de PyAMA-1, son antigénicos | 39 |
| 5.1.1. Diversidad genética limitada en los dominios I y II de PyAMA-1 | 39 |
| 5.1.2. Péptidos conservados de la proteína PyAMA1 interactúan específicamente con la membrana de eritrocitos murinos | 41 |
| 5.1.3. Péptidos conservados por dinámicas de selección purificante presentan actividad antimalárica en el modelo murino | 42 |
| 5.1.4. Los péptidos 42681 y 42903 son buenos candidatos vacúnales antimaláricos | 44 |
| 5.2. Optimización de péptidos para la unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en modelo murino (H2-IE ^d) | 45 |
| 5.2.1. Optimización de péptidos quiméricos para la unión a moléculas H2-IE ^d | 45 |
| 5.2.2. Los péptidos quiméricos 43643 y 43644 derivados del HABP 42681 poseen alta capacidad de unión a moléculas H2-IE ^d | 50 |
| 5.3. Respuesta inmune estimulada por los péptidos quiméricos en modelo murino | 51 |
| 5.3.1. Los péptidos quiméricos potencian la respuesta de anticuerpos en el modelo murino | 51 |
| 5.3.2. Los anticuerpos generados por la inmunización con péptidos quiméricos presentan reactividad contra <i>P. yoelii</i> 171XNL | 52 |
| 5.3.3. IgG1 e IgG2a son las subclases predominantes contra los péptidos quiméricos | 53 |
| 5.3.4. Los péptidos quiméricos estimulan la proliferación de una subpoblación de linfocitos CD4 ⁺ de memoria (CD44 ⁺ CD62L ⁺) | 54 |
| 5.3.5. La inmunización con los péptidos quiméricos de la proteína PyAMA-1, en ratones BALB/c inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias | 57 |
| 6. Discusión | 59 |
| 7. Conclusiones | 68 |
| 8. Perspectivas | 70 |

| | |
|---|----|
| 9. Aspectos éticos | 72 |
| 10. Anexos | 73 |
| Anexo 1. Aval del Comité de Ética | 73 |
| Anexo 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína AMA-1 de <i>Plasmodium yoelii</i> y <i>Plasmodium vivax</i> | 74 |
| Anexo 3. Morfología y desarrollo intracelular del parásito evaluado mediante tinción con naranja de acridina. Microscopía de fluorescencia (100X). Ventana de tiempo de 2 horas. | 75 |
| Anexo 4. Antigenicidad de péptidos nativos enfrentados a sueros de ratones infectados experimentalmente. | 76 |
| Bibliografía..... | 79 |

Lista de figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Reporte mundial de casos estimados de malaria por cada 1000 habitantes de riesgo, periodo 2000 – 2020. | 21 |
| Figura 2 | Casos notificados de malaria según especie parasitaria. | 22 |
| Figura 3 | Ciclo de vida de <i>Plasmodium yoelii</i> | 23 |
| Figura 4 | Vía de presentación antigénica mediante moléculas MHC clase II. | 26 |
| Figura 5 | Selección de péptidos de la proteína PyAMA-1. | 39 |
| Figura 6 | Perfil de unión de péptidos conservados derivados de la proteína PyAMA-1 a eritrocitos murinos. | 41 |
| Figura 7 | Perfil funcional de los HABPs. | 42 |
| Figura 8 | Efecto inhibitorio del desarrollo y crecimiento de 17XNL en eritrocitos murino | 43 |
| Figura 9 | Análisis estructural y predicción de epítomos de células B para AMA-1 de <i>P. yoelii</i> | 45 |
| Figura 10 | Criterios de selección de péptidos quiméricos. | 47 |
| Figura 11 | Perfil de unión in vitro a moléculas H2-IEd. | 50 |
| Figura 12 | Producción de anticuerpos IgG antígeno-específico. | 52 |
| Figura 13 | Reactividad de los anticuerpos contra proteínas del parasito Py17XNL y el péptido nativo. | 53 |
| Figura 14 | Perfil de isotipos de IgG en sueros de ratones inmunizados con péptidos quiméricos. | 54 |
| Figura 15 | Proliferación de linfocitos T CD4+ de memoria estimulados con los constructos quiméricos de PyAMA-1. | 55 |
| Figura 16 | Producción de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos de ratones inmunizados. | 57 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Diferencias entre las diferentes especies que causan malaria murina. | 23 |
| Tabla 2 Plasmodium spp. utilizados en análisis de fuerzas evolutiva y diversidad genética. | 30 |
| Tabla 3 Distribución de grupos y tratamientos utilizados en el esquema de inmunización. | 36 |
| Tabla 4 Péptidos derivados de regiones conservadas sometidas a selección purificante. | 40 |
| Tabla 5 Péptidos quiméricos..... | 46 |
| Tabla 6 Características evaluadas para la selección de péptidos quiméricos | 48 |
| Tabla 7 Características de los péptidos quiméricos seleccionados..... | 49 |
| Tabla 8 Nomenclatura de péptidos diseñados in silico | 49 |

INTRODUCCIÓN

La malaria, una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* spp. continúa siendo un problema importante de salud pública y su erradicación se ha convertido en un reto a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, durante el 2020, se presentaron 241 millones de casos de malaria, lo que sugiere un incremento en la incidencia de casos reportados para esta enfermedad (1). La tasa de mortalidad supera las 620.000 personas/año, principalmente en el continente africano. Además, el informe también revela que las estrategias de acceso - uso de herramientas e intervenciones contra la malaria, se restringió y fue insuficiente durante la pandemia COVID-19 (1, 2).

La aparición de parásitos del género *Plasmodium* farmacorresistentes ha comprometido los métodos de tratamiento profiláctico para el control de la malaria, lo que se traduce en una necesidad crítica de diseñar, desarrollar e implementar una vacuna efectiva (3). Ahora bien, los estudios dirigidos al desarrollo de una vacuna antimalárica, se han orientado en la optimización de las bases de datos disponibles relacionadas con mapeo de epítomos como una nueva estrategia que podría dar respuestas a interrogantes sobre la interacción patógeno – hospedero en un contexto inmunológico (4).

En general, las vacunas disponibles se encuentran categorizadas en microorganismos atenuados y/o muertos, proteínas recombinantes, ADN articulado a partículas virales, subunidades peptídicas o vacunas conjugadas (5, 6). Muchos de los candidatos a vacunas contra la malaria están en diferentes fases de desarrollo clínico. Entre ellos, Mosquirix™ (RTS, S/AS01), esta vacuna que se basa en la proteína de circumsporozoíto, la cual es crucial para la invasión a células hepáticas; dicha vacuna fue reconocida por la OMS y recibió una subvención para incluirla en programas de inmunización masiva (7). No obstante, se ha observado una variación significativa en las respuestas de los sujetos inmunizados, con una eficacia de protección modesta y una baja probabilidad de cumplir con el objetivo de erradicación completa de la malaria (8, 9). Por otro lado, la vacuna R21/Matrix-M™ también se encuentra en ensayos clínicos y ha mostrado una eficacia del 77% evaluada en población juvenil de África occidental (10). En cuanto a una vacuna contra *P. vivax*, ninguna se encuentra en ensayos clínicos tan avanzados como Mosquirix™ o R21/Matrix-M™ (10, 11).

Ahora bien, es de gran interés científico comprender qué factores pueden contribuir a la heterogeneidad en la respuesta inmune generada para mejorar las estrategias de vacunación antimaláricas. Teniendo en cuenta lo anterior, se sabe que factores genéticos del individuo, como por ejemplo, el haplotipo del MHC, pueden desempeñar un papel clave y modular la respuesta inmune (12). La variabilidad genética que presentan las moléculas del MHC a nivel poblacional es muy alta e influyen en la respuesta frente a un patógeno o antígeno (vacuna), ya que la especificidad de los bolsillos de unión de cada molécula del MHC restringe los péptidos que pueden procesarse y presentarse a las células T. Adicionalmente, en estudios anteriores se han demostrado asociaciones entre moléculas del MHC y la inmunogenicidad para varias vacunas, que incluyen hepatitis B, influenza, ántrax, sarampión, rubéola y meningococo C (12-16).

La polarización de la respuesta está mediada por el tiempo de permanencia de unión del complejo TCR-p:MHCII o la cantidad de p:MHCII presente en las células presentadoras. Por lo tanto, la producción consistente de subconjuntos de células efectoras por una población policlonal de células vírgenes resulta de promediar los diversos comportamientos de los clones individuales (17). La estabilidad de esta unión es mediada por los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9 de la molécula del MHC-II, por la secuencia de los aminoácidos del péptido y el tiempo que el antígeno permanece anclado dentro de la molécula (18, 19).

Los péptidos sintéticos representan un enfoque prometedor para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades (20, 21), proporcionando una alternativa segura y económica a las plataformas de vacunas convencionales. Este enfoque puede ser aún más efectivo al apuntar a los epítomos de células B y T que se sabe que están involucrados en la eficacia protectora, con el objetivo de inducir una respuesta inmune equilibrada (22-24). Sin embargo, las construcciones que contienen epítomos lineales de células B derivados de antígenos de *Plasmodium* no siempre presentan el éxito esperado (25). Los mecanismos de inmunidad protectora dependientes o independientes de linfocitos T están articulados a la respuesta mediada por anticuerpos en diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (26, 27), de allí que pueda considerarse que una vacuna ideal debe incluir epítomos identificados como fuertes inductores de una respuesta inmune celular y humoral esterilizante.

La simplicidad de los procedimientos modernos para sintetizar construcciones de péptidos quiméricos, los convierte en un medio atractivo para crear inmunógenos de múltiples epítomos (18, 28). Desafortunadamente, estudios previos reportan que los péptidos sintéticos solos son pobremente inmunogénicos (29). Debido a esto, se han utilizado varios enfoques alternativos, que incluyen el uso de partículas virales y/o la conjugación de epítomos lineales de células B con epítomos de células T o restos de lípidos (30).

Otros estudios, sugieren que la inmunización usando constructos que incorporan el epítomo B PvMSP-9_(E795-A808) solo o conjugado con epítomos de células T CD4⁺ caracterizados, como el toxoide tetánico_(Q830-E843), incrementan la respuesta inmune celular y humoral en el modelo murino (31). En este mismo sentido, se evaluó la capacidad de péptidos derivados de proteínas de *Cryptosporidium parvum* para inducir una respuesta inmune de seroconversión, utilizando como coestimulante un péptido inmunomodulador corto llamado FIS_(F106-R118) (FISEIAIIHVLHSR) nativo de la proteína *mioglobina de esperma de ballena* y que a su vez es reconocido por las células T ayudadoras (32, 33); la caracterización de la respuesta inmune provocada por la inmunización con estos antígenos evidencia la capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes favorecida por la presencia de FIS en los tratamientos (33).

El Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA1), es una proteína presente en los micronemas del parásito, esencial durante la invasión a las células hospederas. Estudios previos muestran que es una proteína presente en el merozoíto cuya función puede ser bloqueada por anticuerpos que inhiben en condiciones *in vitro* el desarrollo de formas asexuales del parásito (34, 35). Debido a que los órganos apicales están alineados con la membrana de los eritrocitos, se relaciona al antígeno AMA1 con la reorientación del merozoíto como mecanismo de invasión (36), no obstante, estudios realizados con *P. falciparum* sugieren también un papel en la invasión de células hepáticas (37). En la malaria murina, los dominios I / II de AMA1 de *Plasmodium yoelii* (PyAMA-1), se han implicado en la unión a eritrocitos utilizando la proteína recombinante expresada en la superficie de células COS-7 (38).

El presente estudio, como prueba de concepto, se centró en la caracterización de la respuesta inmune estimulada por constructos peptídicos compuestos por epítomos B de la proteína PyAMA-1 y epítomos T optimizados *in silico* para el anclaje a moléculas H2-IE^d, probados

en ratones BALB/c. Encontramos que *pyama1* presenta dos regiones altamente conservadas entre diferentes especies de parásito (>70%), que están bajo presión selectiva negativa. En este trabajo, se evaluaron catorce péptidos sintéticos que cubrían el total de ambas regiones conservadas, identificando 5 péptidos de PyAMA-1 con alta unión específica (HABPs) a eritrocitos murinos. Los péptidos 42681 y 42904 fueron capaces de inhibir la invasión y restringir el desarrollo intraeritrocítico de *P. yoelii* y, además, mostraron ser antigénicos al enfrentarlos a sueros obtenidos de ratones infectados experimentalmente. Los epítomos quiméricos B-T 43643 y 43644 presentaron perfiles de unión superiores a 50% a moléculas de MHC murino. Además, nuestros constructos potenciaron la respuesta humoral en ratones BALB/c, comparados con los péptidos nativos, y a su vez, mostraron incremento en los anticuerpos IgG1 e IgG2a en sueros. Estas quimeras peptídicas fueron capaces de inducir una respuesta proliferativa y la diferenciación de células T de memoria CD4⁺ CD44⁺ CD62L⁺. Este trabajo propone la quimerización de epítomos B y epítomos T como una estrategia para el diseño de candidatos peptídicos inmunogénicos para el desarrollo de una vacuna sintética multiepítomo – multiestadio contra la malaria.

1. Hipótesis

Los péptidos quiméricos optimizados para el anclaje al MHCII murino (H2-IE^d) son capaces de generar una respuesta inmune más potente y de memoria, al compararla con aquella inducida por los péptidos nativos en el modelo murino.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune frente a péptidos con alta capacidad de unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, utilizando modelo de malaria murina producida por *Plasmodium yoelii*.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Identificar y determinar el perfil funcional de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *Plasmodium yoelii*.
- 2.2.2** Seleccionar péptidos derivados de regiones conservadas de PyAMA-1 de acuerdo con su perfil de unión *in vitro* a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (H2-IE^d) de ratón.
- 2.2.3** Caracterizar la respuesta inmune generada tras la inmunización con los péptidos de alta capacidad de unión a moléculas H2-IE^d en el modelo murino.

3. Marco teórico

3.1. Epidemiología

En la actualidad, la malaria se considera uno de los principales problemas de salud pública y su erradicación completa continúa siendo un reto a nivel mundial, habiendo causado 627,000 muertes durante el año 2020. Adicionalmente, la organización mundial de la salud (OMS) reportó que ocurrieron 241 millones de casos de malaria en todo el mundo, estableciendo una tendencia de aumento respecto al 2019, de 14 millones de casos. Se estima que el aumento de casos de malaria se debe a la interrupción en el diagnóstico y trazabilidad clínica de los pacientes durante la pandemia por COVID-19 (1).

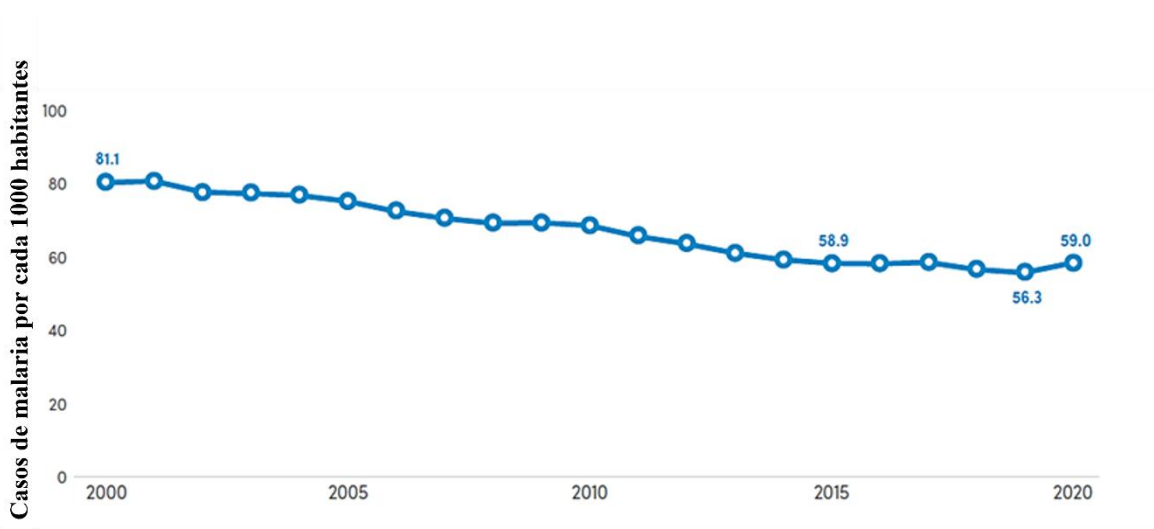


Figura 1 Reporte mundial de casos estimados de malaria por cada 1000 habitantes de riesgo, periodo 2000 – 2020 (1).

La ausencia de un tratamiento inmunoproláctico completamente efectivo, la propagación de cepas de parásitos resistentes a múltiples fármacos y la resistencia a insecticidas por parte del vector, han resaltado la necesidad de desarrollar nuevas medidas de intervención (39).

El Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública –SIVIGILA en Colombia reportó que a la semana 40 del año 2022 se notificaron 56,627 casos de malaria en el territorio, de los que el 59.8 % correspondió a *P. vivax*, 39.2% a *P. falciparum* y el 1% a infecciones mixtas (Figura 2) (40).

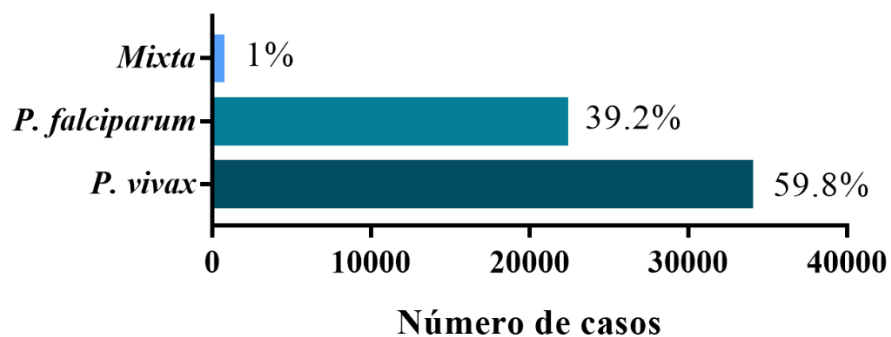


Figura 2 Casos notificados de malaria en Colombia hasta la semana 40 de 2022, según la especie parasitaria (40).

3.2. *Plasmodium yoelii*

P. yoelii se considera como una especie politípica de las tierras bajas del bosque de la Baja Guinea. Tres poblaciones parasitarias, localizadas en regiones geográficas diferentes, son generalmente reconocidas como subespecies (*yoelii*, *killicki* y *nigeriensis*). Las etapas sanguíneas de las tres son similares a las de *P. berghei* que, a excepción del patrón electroforético de enzimas endógenas, no muestra características diferenciales significativas (41, 42). El ciclo de vida y las diferentes etapas de desarrollo de todos los parásitos que producen malaria en mamíferos son muy similares. Los parásitos del género *Plasmodium* spp. comparten las siguientes características: sólo infectan mosquitos del género *Anopheles* spp., los esporozoítos haploides invaden y se desarrollan sólo en hepatocitos; después de la multiplicación en células hepáticas, los merozoítos invaden y se multiplican en los glóbulos rojos; en la sangre, un porcentaje relativamente pequeño de parásitos se convierte en gametocitos, las células precursoras de los gametos haploides; la fertilización y el desarrollo del cigoto diploide en ooquistos ocurre en el intestino medio del mosquito; los ooquistos maduros penetran en las células de la pared del intestino medio y se convierten en ooquistes en el exterior del intestino medio, migrando luego a las glándulas salivales en forma de esporozoítos y mediante una picadura del mosquito al hospedero vertebrado, se perpetúa el ciclo (42, 43).

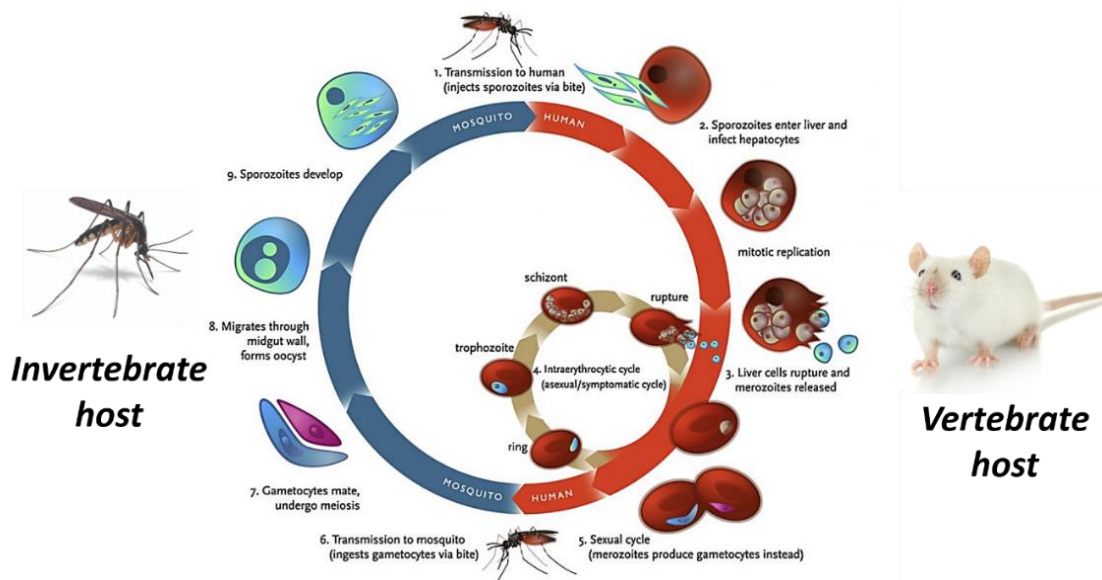


Figura 3 Ciclo de vida de *Plasmodium yoelii*. Modificado de (43)

Ahora bien, existen diferencias significativas en el tiempo de desarrollo y el tamaño de las diferentes formas cruciales para la patogenia de la malaria murina; estas formas, esquizontes y ooquistes maduros de los diferentes parásitos de la malaria, pueden diferir en tamaño y pueden contener diferentes cantidades de células progenitoras como se observa en la Tabla 1 (42) (44).

Tabla 1 Diferencias entre las especies que causan malaria murina.

| | <i>P. berghei</i> | <i>P. yoelii</i> | <i>P. chabaudi</i> | <i>P. vinckei</i> |
|--|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| <i>Merozoitos/Esquizontes</i> | 12-18 | 12-18 | 6-8 | 6-12 |
| <i>Tropismo por reticulocitos</i> | Si | Si | No | No |
| <i>Sincronía en infección sanguínea</i> | No | No | Si | Si |
| <i>Temperatura óptima – transmisión mosquito</i> | 19-21 | 23-26 | 24-26 | 24-26 |
| <i>Tamaño Ooquiste (µm)</i> | <45 | 60-75 | 50 | 45-54 |
| <i>Esporozoítos en glándulas (días post-infección)</i> | 13-14 | 9-11 | 11-13 | 10-13 |
| <i>Diámetro de esquizonte pre-eritrocítico (µm)</i> | 27 | 35-50 | 38-45 | 35 |

| | | | | |
|--|-------|-------|--------|--------|
| <i>Ciclo pre-eritrocítico (horas)</i> | 48-52 | 43-48 | 50-58 | 60-72 |
| <i>Estadio sanguíneo (horas)</i> | 22-24 | 18 | 24 | 24 |
| <i>Desarrollo de gametocitos (horas)</i> | 26-30 | 27 | 36? | 27 |
| <i>Desarrollo de Ooquinetos (horas)</i> | 18-24 | 18-24 | 18-24? | 18-24? |
| <i>Microgametos (tamaño en μm)</i> | 15 | 16 | - | - |
| <i>Esporozoítos (tamaño en μm)</i> | 11-12 | 14-16 | 10-15 | 11-21 |
| <i>Ooquinetos (tamaño en μm)</i> | 10-12 | 11 | - | 8-10 |

A partir de investigaciones sobre la naturaleza genética, se estableció un perfil de conservación en una serie de proteínas localizadas en la superficie del microorganismo; esto se observó tanto a nivel estructural como funcional entre los diferentes agentes etiológicos que producen malaria en roedores y humanos (CS, TRAP, P45 / 48, CTRP, P25, P28, AMA-1, MSP-1) (45, 46).

3.3. Presentación antigénica

La presentación antigénica es crucial en la maduración de células del sistema inmune y el desarrollo de una respuesta óptima y eficiente contra agentes extraños. En este proceso, se presentan una variedad de eventos celulares que involucran endocitosis, tráfico vesicular y autofagia, que pueden modular la exposición de moléculas a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) o clase II (MHC-II).

Las moléculas MHC clase I y clase II tienen una función similar: presentan péptidos en la superficie celular a linfocitos T CD8^+ y CD4^+ , respectivamente. Estos péptidos pueden tener origen intracelular para moléculas MHC clase I o exógeno para MHC clase II (47). Existe un fenómeno denominado presentación cruzada, en el cual antígenos exógenos pueden ser presentados por moléculas MHC clase I (48). Además, las moléculas de MHC clase II pueden presentar proteínas endógenas cuando el proceso de proteólisis es a través de la autofagia u otras vías (49).

3.3.1 MHC clase I

Las moléculas del MHC de clase I presentan antígenos que han sido generados por la degradación de proteínas, generalmente de origen viral o tumoral, mediada por proteasomas. La vida media de una proteína varía mucho, desde minutos a días, de allí, que se considere que el tiempo entre la síntesis de un polipéptido y la presentación de sus péptidos por moléculas MHC de clase I sea similar a la vida media de la proteína, sin embargo, la presentación de péptidos virales es mucho más rápida, considerando la vida media funcional.

3.3.2 MHC clase II

Mientras que las moléculas del MHC de clase I se expresan en todas las células nucleadas, las moléculas del MHC de clase II se expresan principalmente en células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas, macrófagos y células B. Estudios previos han establecido que las cadenas transmembrana α y β del MHC clase II se ensamblan y se asocian con la cadena invariante (Ii). El complejo Ii-MHC clase II se transporta a un compartimento endosómico tardío; y allí, Ii se digiere, dejando un péptido Ii residual asociado a clase II (llamado CLIP) en el surco de unión del heterodímero de MHC clase II. En el compartimento endosómico, las moléculas MHC clase II requieren HLA-DM (H2-DM en ratones) para facilitar el intercambio de CLIP por el péptido específico derivado del antígeno. Luego, las moléculas del MHC son redirigidas a la membrana plasmática para promover la sinapsis inmunológica (Figura 5). En las células B, se expresa un modificador del HLA-DM llamado HLA-DO (H2-O en ratones), y esta proteína se asocia con HLA-DM, restringiendo su actividad a compartimentos más ácidos, modulando así la unión del péptido al MHC-II (50).

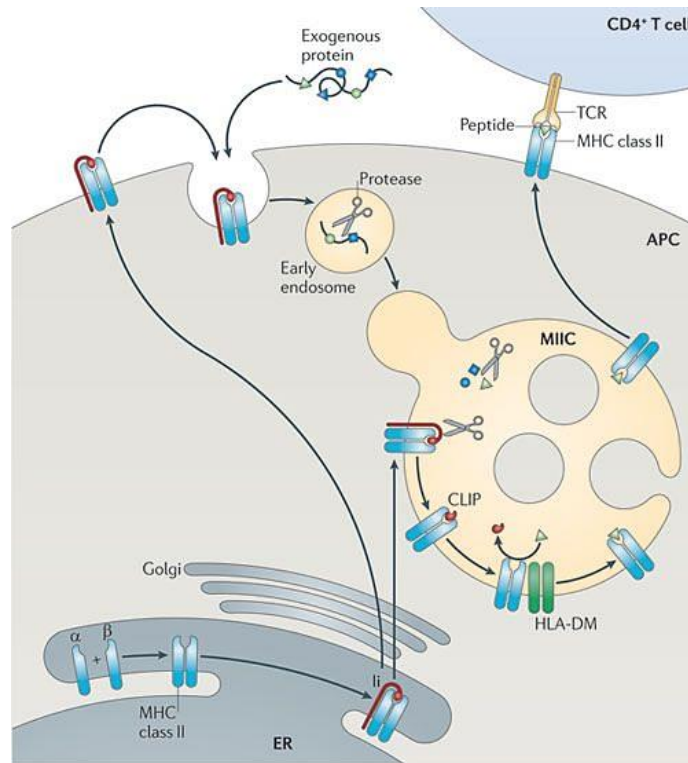


Figura 4 Vía de presentación antigénica mediante moléculas MHC de clase II (51)

3.4 Fisiopatología y mecanismo inmune.

Los humanos son susceptibles a la malaria, aún si ellos han estado en contacto con el parásito en repetidas ocasiones, no obstante, en áreas altamente endémicas con episodios de malaria recurrentes, los niños y los adultos desarrollan cierto grado de protección contra las formas mortales de esta enfermedad. Se ha propuesto que este fenómeno refleja la inmunidad clínica que es denominada como una inmunidad naturalmente adquirida, como sucede en la infección por *Plasmodium vivax*. El ciclo en humanos presenta formas infecciosas distintas durante la migración del parásito a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, los anticuerpos pueden bloquear la migración del parásito (en forma de esporozoíto) y la invasión al hepatocito bloqueando la progresión del ciclo de vida (52).

En el estadio hepático, la célula infectada es potencialmente atacada por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺; estas respuestas además pueden ser potenciadas por las células NK (Natural Killer) y las células Tγδ, quienes pueden estimular otras poblaciones celulares secretoras de citoquinas o atacar directamente las células infectadas a nivel hepático (53). Después del inicio de la

liberación desde el merozoma, los merozoítos libres también son susceptibles de la respuesta inmune del hospedero. Estos merozoítos pueden ser el blanco de anticuerpos opsonizantes que previenen la invasión del parásito (54) o de células fagocíticas que los procesen y presenten a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Considerando que el MHC clase I y II está ausente en la superficie de los eritrocitos, la respuesta inmune en contra de las formas intra-eritrocíticas del parásito está mediada principalmente por anticuerpos. Durante la fase eritrocítica, los anticuerpos pueden bloquear los merozoítos previniendo su liberación y diseminación en el torrente sanguíneo (55). Así mismo, la acción integrada de la respuesta inmune innata juega un papel importante involucrando monocitos, neutrófilos y células NKT (55). Adicionalmente, se considera que la respuesta inmune celular citotóxica tiene un papel más importante en el control de las formas hepáticas del parásito, mientras que la respuesta humoral y las células T CD4⁺ están principalmente implicadas en el control de los estadios eritrocíticos del parásito.

La especificidad y la memoria son las características más importantes asociadas a la respuesta inmune adaptativa. Los determinantes antigénicos (epítomos) representan la parte específica del antígeno que es reconocida, ya sea por los receptores de las células T o B, y median el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Los epítomos de las células T son péptidos cortos lineales los cuales son expuestos mediante la sinapsis inmunológica. Los dos tipos principales de células T son los linfocitos citotóxicos (CD8⁺) y los linfocitos T helper (CD4⁺) (56). La principal función de los linfocitos T citotóxicos es la actividad citolítica, mientras que la función de la célula T helper es producir citoquinas que modulan la respuesta inmune celular y humoral. En este sentido, los anticuerpos neutralizantes no pueden ser eficientemente producidos sin la ayuda de las células T helper, puesto que éstas juegan un papel importante en la expansión y diferenciación de las células B, incluyendo el intercambio de clase (*switching*) y la maduración de la afinidad (57).

4. Metodología

4.1. Cultivo de *Plasmodium yoelii* 17XNL

Plasmodium yoelii, cepa no letal 17XNL (Py17XNL), fue utilizada en los experimentos de interacción hospedero – patógeno. Los parásitos fueron descongelados e inoculados intraperitonealmente en ratones hembra BALB/c sin tratamiento, para mantener el parásito *in vivo*. La parasitemia se controló mediante examen microscópico de extendidos de sangre periférica teñidos con Giemsa; una vez los individuos alcanzaron una parasitemia del 40% aproximadamente, los ratones fueron anestesiados con ketamina (80 – 120 mg/kg) - xilacina (5-16 mg/kg) y la sangre fue colectada mediante punción cardíaca en jeringas tratadas con citrato de sodio. Los GR fueron lavados con RPMI 1640 (Gibco) suplementado con Hipoxantina (SIGMA) y Glucosa 4%, posteriormente, los glóbulos rojos parasitados (GRp) fueron purificados por gradiente de densidad – Percoll. Finalmente, fueron preservados en medio de congelación (Glicerol, Sorbitol, NaCl) para uso en ensayos posteriores.

Para mantener un cultivo *in vitro* de *Py 17XNL*, se utilizaron crioviales de GRp. Brevemente, los GRp fueron tratados con 200µL de NaCl 12% gota a gota mezclando ligeramente, esta mezcla fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), luego se agregaron 10 volúmenes de NaCl 1.6%, y se centrifugó a 500xg a 20°C durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado. Se realizaron 3 lavados con 10 volúmenes del medio RPMI 1640 suplementado con 1% de hipoxantina (RPMI+H), manteniendo las condiciones de centrifugación. El cultivo se mantuvo en cajas de 25 cm² utilizando 5 mL de medio RPMI+H, suplementado con suero fetal bovino (SFB-Hyclone) 20%, hematocrito de 4% (glóbulos rojos de ratón BALB/c) y se incubó a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂. Posterior a la estabilización del cultivo, se realizó un seguimiento del crecimiento intraeritrocítico del parásito para establecer tiempos de desarrollo para los ensayos *in vitro* (anexo 3), finalmente los GRp fueron cosechados y preservados.

4.2. Mantenimiento del biomodelo

Ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad, con un peso aproximado de 18 – 25 gramos del Bioterio - Instituto Nacional de Salud, fueron alimentados según condiciones experimentales con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, una temperatura de 22-24°C y una

humedad de $50 \pm 5\%$. Los animales fueron tratados de acuerdo con la norma colombiana establecida en la resolución del Ministerio de Salud No. 8430 de 1993, además de la Ley 84 de 1989 sobre “*El uso de animales vivos en experimentos e investigación*”. El Comité de Manejo Bioético en Experimentación y Práctica con Animales, de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales de Colombia, aprobó los protocolos de uso de animales de laboratorio de este proyecto (anexo 1).

4.3. Análisis de polimorfismo y divergencia

Con el objetivo de determinar regiones conservadas intra e interespecie del gen *ama1* que están bajo dinámicas de selección natural purificante, se realizó un análisis de restricción funcional *in silico*. Brevemente, en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se realizó una búsqueda de las secuencias de referencia de ADN del gen *ama1* de *P. yoelii* y de especies relacionadas filogenéticamente. Las secuencias fueron alineadas utilizando el servidor web TranslatorX (58) manteniendo el marco de lectura abierto que codifica la proteína de interés, basado en el algoritmo MUSCLE (59).

Para evaluar la diversidad genética y las fuerzas evolutivas, se utilizó el software DnaSP6 (60). Brevemente, la diversidad de nucleótidos por sitio (π) se estimó a partir de las secuencias de *P. yoelii* y, el método modificado de Nei-Gojobori (61) se utilizó para evaluar las señales de selección natural calculando la diferencia entre las tasas de sustitución no sinónima y sinónima ($d_N - d_S$). La selección natural se evaluó estimando la diferencia entre las tasas de divergencia no sinónimas y sinónimas ($K_N - K_S$) mediante el método modificado de Nei-Gojobori y la corrección de Jukes-Cantor (62). Se realizó el análisis de recombinación por el método GARD (63) y, posteriormente en el servidor web *Datamonkey* (64), se identificó los codones que se encontraban bajo selección natural entre especies utilizando enfoques bayesianos o de máxima verosimilitud con los modelos SLAC, FEL, REL (65), MEME (66) y FUBAR (67).

El algoritmo REL se usó para identificar linajes bajo selección positiva episódica (selección que ocasionalmente tiene períodos transitorios de evolución adaptativa enmascarados por selección negativa o evolución neutral). Se considera evolución negativa cuando la tasa de evolución (ω) sea menor de 1 (68).

A partir de las regiones conservadas identificadas por análisis *in silico*, se diseñaron péptidos (20-mer) solapados 5 residuos, y se realizó una predicción de regiones determinantes antigénicas para linfocitos B utilizando la herramienta Bepipred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) (69).

Tabla 2 *Plasmodium spp.* utilizados en análisis de fuerzas evolutiva y diversidad genética.

| Hospedero | Especie | Subespecie | Cepa | Región | Cromosoma | Código de acceso |
|-----------------|-----------------------------|---------------------|----------------|------------------|-----------|------------------|
| Roedores | <i>Plasmodium yoelii</i> | <i>yoelii</i> | <i>17XNL</i> | 770343..772016 | 9 | CP086276 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>17X</i> | 766486..768159 | 9 | LM993663 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>YM</i> | 1..1674 | 9 | U45970 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>1.1</i> | 615328..617001 | 9 | LR129778 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>1AR</i> | 661019..662692 | 9 | LR129792 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>3AE</i> | 658208..659881 | 9 | LR129834 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>33X</i> | 623235..624908 | 9 | LR129820 |
| | | <i>yoelii</i> | <i>2CL</i> | 645680..647353 | 9 | LR129806 |
| | | <i>killicki</i> | <i>193L</i> | 663278..664951 | 9 | LR129764 |
| | | <i>killicki</i> | <i>194ZZ</i> | 609882..611558 | 9 | LR129750 |
| | <i>Plasmodium berghei</i> | <i>N/A</i> | <i>ANKA</i> | 573540..575210 | 9 | LK023124 |
| | <i>Plasmodium vinckei</i> | <i>vinckei</i> | <i>V52</i> | 1248628..1250304 | 9 | LR129722 |
| | | <i>petteri</i> | <i>CR</i> | 1115454..1117130 | 9 | LR865414 |
| | | <i>brucechwatti</i> | <i>1-69</i> | 594954..596630 | 9 | LR129736 |
| | <i>Plasmodium chabaudii</i> | <i>chabaudii</i> | <i>AS</i> | 1120979..1122655 | 9 | LK022886 |
| Humanos | <i>Plasmodium vivax</i> | <i>N/A</i> | <i>sal-1</i> | 1..1687 | 9 | AF063138 |
| | <i>Plasmodium fragile</i> | <i>N/A</i> | <i>nilgiri</i> | 1..1689 | 9 | XM_012477722 |
| Primates | <i>Plasmodium cynomolgi</i> | <i>N/A</i> | <i>B</i> | 1562874..1564562 | 9 | XM_004222507 |
| | | <i>N/A</i> | <i>M</i> | 1..1689 | 9 | LT841387 |

4.4. Síntesis de péptidos

Catorce péptidos derivados de las regiones conservadas de la proteína PyAMA-1 fueron sintetizados en el Grupo Funcional de Síntesis Química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), mediante la estrategia t-Boc (Bachem) y resina p-metilbenzhdrilamina (MBHA) (0.5 meq/g), siguiendo la metodología de síntesis múltiple de péptidos en fase sólida (70). Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) y la masa molecular fue determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*) usando ácido α -ciano-4-hidroxicinámico como matriz. Para facilitar el radiomarcaje, un residuo de tirosina fue adicionado al extremo carboxilo terminal en aquellos péptidos que no tenían este residuo en su secuencia.

4.5. Actividad citotóxica.

El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones reportadas por Rabelo *et al.* (71). Los péptidos se evaluaron a diferentes concentraciones cada uno (50, 100 y 200 μ M, respectivamente). Brevemente, una suspensión de GR al 4% de hematocrito fue expuesta a los diferentes tratamientos durante 1 hora en placas de 96 pozos. Las placas fueron centrifugadas a 250 rpm durante 5 minutos y se recuperó 100 μ L de sobrenadante para analizar la liberación de hemo por espectrofotometría a una longitud de onda de 405 nm. Se establecieron referencias de hemólisis con una solución al 1% de Tritón X-100 que corresponde a 100% de actividad hemolítica, y 0,9% de solución salina para un 0%.

4.6. Perfil de unión a glóbulos rojos murinos.

Cada uno de los péptidos sintéticos de la proteína PyAMA1 fue sometido a un proceso de radiomarcaje con Na^{125}I . Brevemente, 12 μ L de péptido (1mg/mL) fue incubado con 15 μ L de Cloramina T (2,75mg/mL) como agente oxidante y 3 μ L de Na^{125}I (100mCi/mL) durante 20min a temperatura ambiente. La reacción fue detenida por la adición de 15 μ L de metabisulfito de sodio (2,3 mg/mL) como agente reductor. Los péptidos radiomarcados fueron purificados mediante cromatografía por exclusión de tamaño en una columna de Sephadex

G10. Cada fracción eluída fue analizada en un contador gamma (Auto Gamma Cobra II Packard).

Sangre total de ratones de la cepa BALB/c fue obtenida de acuerdo con las guías establecidas por el Ministerio de Salud de Colombia para el manejo de animales vivos con fines de investigación o experimentación. Se realizaron 3 lavados con 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid buffered saline (HBS) (pH 7,2). 1×10^8 GR fueron incubados con cantidades crecientes de péptido radiomarcado (300nM a 1200nM) en ausencia (unión total) o presencia (unión inespecífica) de péptido no radiomarcado (20 μ M) durante 90 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue lavada dos veces con buffer HBS y la radioactividad asociada a las células fue cuantificada mediante un contador gamma (Auto Gamma Cobra II Packard).

4.7. Inhibición de invasión *in vitro*.

Para determinar el perfil funcional de los péptidos, se evaluó su capacidad para inhibir la invasión del parásito a GR murinos; para ello, esquizontes de *P. yoelii* 17XNL fueron purificados mediante gradiente usando Percoll (72), la fracción de interés fue colectada en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, Hipoxantina (SIGMA), Glucosa 4%, solución de antibiótico-antimicótico 1X (SIGMA), y fueron cultivados en cajas de 96 pozos a un volumen final de 60 μ L por pozo. El hematocrito y la parasitemia inicial se ajustaron a 4% y 0,7%, respectivamente. Los GR fueron tratados con los péptidos a tres concentraciones diferentes 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M por duplicado. Se establecieron pozos control tratados con EGTA 25 μ M y sin tratamiento, para validar la invasión normal del parásito. Brevemente, se incubó por 8 h a 37°C en una atmósfera de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂, hasta encontrar parásito en etapa de anillos recién invadido (anillos de 2h). Se realizó marcaje de los GRp con SYBR green. Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

4.8. Inhibición del desarrollo intraeritrocítico.

Para evaluar la capacidad de los péptidos para inhibir *in vitro* el crecimiento intraeritrocitario del parásito Py17XNL, se realizó cultivo de GRp en RPMI 1640 (Gibco) suplementado SFB 10%, Hipoxantina (SIGMA), Glucosa 4% y solución de antibiótico-antimicótico 1X

(SIGMA). Brevemente, el cultivo fue sincronizado mediante tratamiento con sorbitol 5% para obtener formas en estadio de anillos. Posteriormente, se preparó solución de trabajo con RPMI-SFB 10%, GR no infectados y GRp; luego se agregaron los péptidos a concentraciones de 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M y se incubó durante 18 horas en una atmósfera de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂. Como controles, se utilizó GR:GRp sin tratamiento y las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences).

4.9. Análisis de estructura de PyAMA-1

La predicción estructural de la proteína AMA-1 se realizó a partir de la secuencia de la cepa 17XNL obtenida en la plataforma PlasmoDB (ID: PY01581), y una modelación por homología mediante la herramienta bioinformática SWISSMODEL en el portal Expasy (73) utilizando como molde la estructura de PvAMA-1 SAL-1 registrada en el banco de datos de proteínas (PDB ID: 5NQG (74)). Las 5 estructuras más probables fueron evaluadas individualmente con la herramienta QMEAN en el portal Expasy (73). Se seleccionó la mejor estructura por Ramachandran Plot y QMEAN; ésta se refinó con el programa AMBER (75, 76), realizando una minimización de 500.000 y 1 millón de pasos, bajo el algoritmo de descenso más pronunciado y gradiente conjugado, respectivamente. Luego, se realizó un equilibrio y simulación de dinámica molecular bajo una configuración implícita de disolventes con un tiempo total de 1ns. Finalmente, la calidad de la estructura final fue evaluada por QMEAN y Ramachandran Plot.

4.10. Diseño y optimización de péptidos quiméricos para anclaje a moléculas H2-IE^d.

Se realizó el diseño y optimización de péptidos quiméricos para el anclaje a moléculas H2-IE^d de ratón. Para esto, se realizó una predicción *in silico* de epítomos T utilizando las herramientas bioinformáticas NetMHCIIpan 3.2 (77) y NetMHCIIpan 4.0 (78). Aquellos que presentaron un porcentaje %Rank de <2 fueron considerados péptidos de alta unión a H2-IE^d, y los que presentaron %Rank 2>X≤5 péptidos con unión débil (77, 78). Adicionalmente, se realizó una predicción de epítomos B con una longitud de 13 residuos, sobre péptidos derivados de regiones bajo fuerzas evolutivas purificantes con perfil funcional experimental, para

articularlos hacia el extremo -COOH y/o NH₂ del epítipo T artificial diseñado *in silico*; se incluyeron 3 residuos de contexto que favorecen el anclaje a moléculas MHC. Se realizó una predicción de proteólisis mediada por catepsinas sobre los constructos quiméricos Epítipo B – Epítipo T utilizando la herramienta MHC-NP (79), finalmente, se predijo la estructura secundaria del constructo utilizando la herramienta PEP-FOLD (80).

4.11. Purificación de moléculas H2-IE^d y anticuerpos Anti-HLA-DR.

Para la obtención de la molécula H2-IE^d, la línea de células linfoblastoides inmortalizadas de ratón, PAI, fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 2 g/L (SIGMA), piruvato sódico 1 mM (GIBCO), SFB (Hyclone) 10-20% y solución antimicótico-antibiótico 1X (SIGMA). El cultivo fue mantenido a 37°C, en 5% de una atmósfera de CO₂. Las células fueron colectadas por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, luego criopreservadas a -80°C hasta obtener alrededor de 5 x 10⁹ células, y finalmente purificadas mediante cromatografía de afinidad. Adicionalmente, se llevó a cabo el cultivo del hibridoma ATCC HB-55 bajo las mismas condiciones expuestas anteriormente. Puntualmente, se colectó y almacenó el sobrenadante en NaN₃ 0,02% para la purificación del anticuerpo monoclonal dirigido contra moléculas HLA-DR.

Para purificar el anticuerpo monoclonal anti-DR recuperado en el sobrenadante del cultivo de las células ATCC HB55, las proteínas fueron precipitadas mediante saturación (45%) del sobrenadante con (NH₄)₂SO₄, este proceso se realizó a 4°C, luego se incubó durante toda la noche. El sobrenadante fue centrifugado durante 30 minutos a 10000 rpm, el pellet obtenido fue resuspendido en PBS 1X y fue dializado para eliminar los restos de sales. La muestra dializada fue concentrada por deshidratación con PEG, y acoplada a Proteína A Sefarosa CL-4B (GE Healthcare) mediante agitación elíptica a 4°C durante 18 horas. Se realizó una prueba de reactividad cruzada para determinar el porcentaje de reconocimiento del anticuerpo monoclonal Anti-DR contra células PAI. Las muestras fueron procesadas en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas en el programa FlowJo.

Para la purificación de la molécula MHC murina se realizó la suspensión de las células en buffer de lisis (PBS 0,05M, NaCl 0,15M, NP-40 1%, PMSF 1mM, Iodoacetamida 25mM, Ácido caprílico 5 mM, inhibidores de proteasas 10µg/mL) a 4°C durante una hora, este lisado se centrifugó a 27.000 x g durante 15 minutos, se recolectó el sobrenadante y fue tratado con

desoxicolato de sodio DOC al 5% durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 100.000x g durante 20 minutos.

El producto de lisado se acopló a la resina (Proteína A Sefarosa CL-4B) Anti – DR mediante entrecruzamiento con DMP (Dimethyl pimelidate). Brevemente, se realizaron varios lavados con 3 buffers diferentes para eliminar contaminantes por interacción inespecífica. Luego se realizó la elución de la molécula H2-IE^d y recuperación de las fracciones en un buffer neutralizante (pH 6,8) para estabilizar el polipéptido (81). La presencia de la molécula fue verificada mediante Dot-blot y la calidad e integridad por SDS-PAGE. Las fracciones reactivas fueron concentradas por deshidratación con PEG y cuantificadas con MicroBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

4.12 Perfil de unión de péptidos a moléculas H2-IE^d

Para evaluar la capacidad de unión de los péptidos quiméricos derivados de regiones conservadas de *P. yoelii* a moléculas H2-IE^d purificadas, se realizó un ELISA convencional. Brevemente, moléculas H2-IE^d [0,1 µM] fueron incubadas con un péptido control marcado con biotina [5 µM], los péptidos derivados del antígeno AMA-1 se evaluaron en exceso de 50 veces respecto al control [250 µM] e incubados por 24 horas a TA. Inmunomódulos NUNC (Thermo-Fisher Scientific®) cubiertos con anti-H2-IE^d [10 µg/mL] y tratados con BSA 3% en PBS 1X, fueron expuestos al complejo MHC-péptido por 2 horas a TA. Luego, el ensayo fue incubado con Estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina en dilución 1:500 por una hora a TA y posteriormente se incubó por 30 minutos con solución reveladora pNPP (SIGMA). La reacción colorimétrica fue leída a 405 nm en un espectrofotómetro MultiSkan GO (Thermo Fisher Scientific®). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado (81).

4.13. Respuesta humoral estimulada por péptido quiméricos en modelo murino.

Para evaluar la respuesta inmune humoral estimulada por péptidos quiméricos *in vivo*, se utilizaron 50 ratones hembra y 30 machos de la raza BALB/c entre 6-8 semanas de edad. 10 grupos de 8 ratones cada uno (ver tabla 3) fueron inmunizados con 30 µg del péptido quimérico acoplado a KLH (del inglés, *Keyhole Limpet Hemocyanin*) en 100 µL de PBS 1X

más adyuvante de Sigma® en una relación 1:1. Cada ratón fue inmunizado dos veces vía subcutánea con un intervalo de 14 días. Se realizó extracción de sangre a través de una punción en el seno venoso sub-mandibular pre-inmunización, 15 días después de la primera dosis, 15 y 30 días post-segunda inmunización.

Para analizar la respuesta de las células B mediante ensayos de ELISA, se evaluó la producción de IgG total y de las subclases post-inmunización. Brevemente, en una placa de 96 pozos se realizó el acople de 1 µg de cada péptido/pozo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, esto se realizó por triplicado. Posteriormente, las cajas fueron tratadas con solución de bloqueo (leche descremada en solución de lavado PBS 1X + Tween 20 al 0,005%) durante 1 hora. Luego el antígeno fue expuesto a los sueros obtenidos de ratones inmunizados; como control positivo se utilizó suero hiperinmune y suero de ratones sanos como control negativo (suero preinmune) durante dos horas a TA en dilución 1:200, luego se utilizó Anti-Mouse Biolegend® acoplado a peroxidasa como anticuerpo secundario y se reveló con Thermo-Scientific Pierce TMB-Blotting 1-Step Solution®, incubando durante 15 – 30 minutos en oscuridad, la reacción se detuvo con H₃PO₄ 1M. Se determinó la reactividad mediante espectrofotometría utilizando una longitud de onda única de 450nm. En cada tratamiento se realizó 3 lavados con PBS 1X + Tween 20.

Tabla 3 Distribución de grupos y tratamientos utilizados en el esquema de inmunización

| Grupo | Tratamiento (30 µg de péptido + KLH) |
|--------------|---|
| 1 | 43643 |
| 2 | 43644 |
| 3 | 43645 |
| 4 | 43645 |
| 5 | 43646 |
| 6 | 43647 |
| 7 | 42681 |
| 8 | 42903 |
| 9 | 42904 |

4.15 Proliferación de Linfocitos T CD4+

Para evaluar la respuesta de células T *in vitro*, 45 días después de la segunda inmunización, cuatro ratones por grupo fueron sacrificados para extraer esplenocitos mediante perfusión del bazo con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2 g/L de NaHCO₃ (SIGMA), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO), y antibiótico – antimicótico 1X; luego las células mononucleares (CM) esplénicas fueron purificadas mediante gradiente Ficoll®-Paque PLUS. En placas de 96 pozos fondo redondo fueron sembradas 2x10⁵ CM por pozo en 200 µL de medio RPMI 1640 suplementado, y estimuladas con 10 µg/mL de cada péptido quimérico. Las células fueron incubadas a 37°C y una atmosfera de CO₂ al 5%. Como controles se utilizaron péptidos nativos (42681, 42903 y 42904), PMA (100 ng/mL) – Ionomicina (400 ng/mL) y 5 µg/mL de lisado de Py17XNL; adicionalmente, como control del experimento se mantuvieron CM sin estímulo.

Cinco días post-tratamiento se recuperaron las células y el sobrenadante fue almacenado a -80°C para evaluar la producción de citoquinas. Las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD4-FITC, anti-CD45RO-APC (presenta reactividad cruzada con CD44 en ratones), anti-CD62L-PerCP-Cy5 y/o anti-CD62L-PE contra ratón, y fueron leídas en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo v7.6.5 (FlowJo, LLC).

4.15 Evaluación de citoquinas en sobrenadante.

La producción de citoquinas IL-4, IL-2, IL-10, IFN-γ, IL-6 y TNF-α fue cuantificada en el sobrenadante del cultivo mediante el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 CBA Kit (BD Biosciences), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences) y analizadas con el software FCAP Array v3.0.1. La producción de citoquinas fue evaluada teniendo en cuenta la dinámica encontrada en CM sin estímulo y tomando como referencia una curva estándar expresada en valores de pg/mL.

4.16 Análisis estadístico

Para graficar y analizar los datos de los ensayos fue empleado el software GraphPad v5.01 software (GraphPad Software, Inc.). Se empleó test Shapiro-Wilk como prueba de normalidad para los ensayos de ELISA, linfoproliferación y producción de citoquinas. El test de Kruskal Wallis y Dunn fue utilizado para comparar los resultados entre los diferentes tratamientos para variables no paramétricas, mientras que para datos con distribución normal, se utilizó un ANOVA y prueba de Tukey. Los datos fueron analizados con un intervalo de confianza del 95% y valores $<0,05$ fueron considerados significantes.

5. Resultados

5.1. Péptidos derivados de regiones bajo selección negativa de *PyAMA-1*, son antigénicos.

5.1.1. Diversidad genética limitada en los dominios I y II de *PyAMA-1*.

Se analizaron diez secuencias génicas completas de diferentes cepas de *P. yoelii*, tres especies relacionadas filogenéticamente (*P. berghei*, *P. vinckei* y *P. chabaudi*) y tres que poseen un tropismo de infección similar (*P. vivax*, *P. fragile* y *P. cynomolgi*); en total, se evaluaron 16 haplotipos (Tabla 3). Los análisis de divergencia y fuerzas evolutivas mostraron que dos regiones altamente conservadas (RC1: 43–108 aa; RC2: 191–325aa) podrían estar bajo procesos de selección purificante ($\omega < 0,8$). Se observaron 342 codones bajo selección negativa entre las especies, y aproximadamente el 60% se localizaron en los dominios I y II, que previamente han sido caracterizados como regiones clave para el proceso de invasión del parásito.

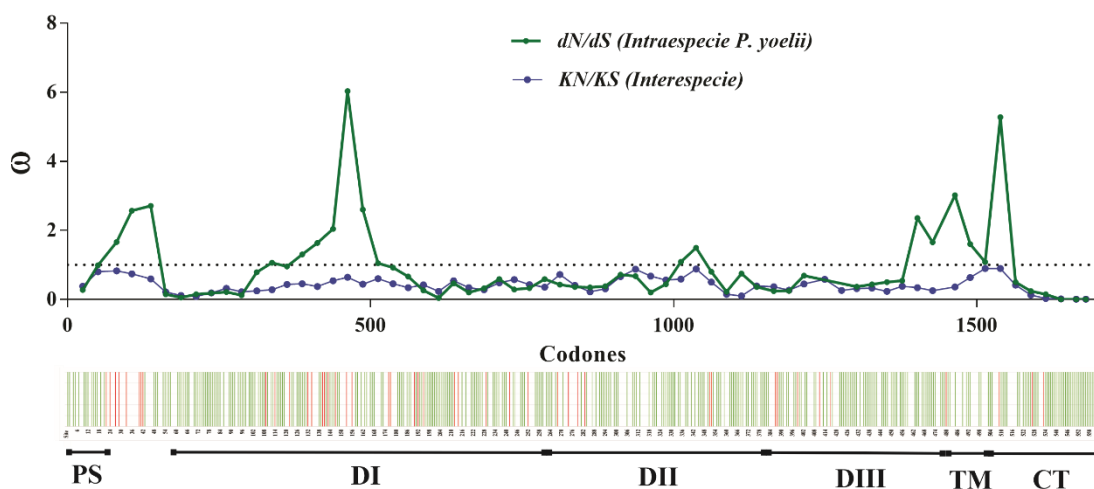


Figura 5 Selección de péptidos de la proteína *PyAMA-1*. La ventana deslizante muestra la tasa ω (eje y) y la posición del nucleótido (eje x) ($\omega < 1$ = restricción funcional). Debajo de la ventana deslizante se puede observar un diagrama genético que indica las regiones codificantes de *AMA-1* de *P. yoelii* para el péptido señal (PS), la región transmembrana (TM), región citoplasmática (CT), Dominio I (DI), Dominio II (DII) y Dominio III (DIII). Los codones seleccionados negativamente se muestran en verde y los seleccionados positivamente en rojo.

En la Fig. 5, se observa que el dominio II posee codones que están bajo procesos de selección diversificante episódica. Además, se evidenció que los sitios bajo selección diversificante se

encontraron en el dominio III de la proteína (dominio no funcional), estableciendo una disyuntiva entre regiones funcionales y polimórficas. Como se observa en la Tabla 3, a partir de estas regiones conservadas se sintetizaron catorce péptidos solapados 5 residuos para realizar un mapeo más reducido de regiones mínimas funcionales.

Tabla 4 Péptidos derivados de regiones conservadas sometidas a selección purificante.

| | Péptido | Secuencia |
|------------|----------------|---|
| RC1 | 42681 | <u>ENTERSIKLINPW</u> <u>DKYMEKY</u> |
| | 42898 | <u>YMEKYDIEKVH</u> <u>GSGIRVDLG</u> |
| | 42899 | <u>RVDLGEDARVEN</u> <u>RDYRIPSG</u> |
| | 42900 | <u>RIPSGKSPVIGK</u> <u>GITIQNSEY</u> |
| | 42901 | <u>IPSGKSPVIGK</u> <u>GITIQNSEVY</u> |
| RC2 | 42902 | <u>TSYMLYVAAQEN</u> <u>MGP</u> <u>RYSSN</u> |
| | 42903 | <u>RYSSNDANNEN</u> <u>QPF</u> <u>FTPEK</u> |
| | 42904 | <u>FTPEKIENYKDL</u> <u>SYLTKNLR</u> |
| | 42905 | <u>TKNLRDDWETSS</u> <u>PNKSIKNAY</u> |
| | 42906 | <u>SIKNAKFGIWVD</u> <u>GYSTDYQK</u> |
| | 42907 | <u>TDYQKHVVHDS</u> <u>DLLKSNQI</u> |
| | 42908 | <u>KSNQIIFNESAS</u> <u>DQPKQYER</u> |
| | 42909 | <u>KQYERHLEDAT</u> <u>KIRQGIVER</u> |
| | 42910 | <u>TKIRQGIVERNG</u> <u>KLIGEALLY</u> |

5.1.2. Péptidos conservados de la proteína *PyAMA1* interactúan específicamente con la membrana de eritrocitos murinos.

Un ensayo de unión fue llevado a cabo para determinar qué regiones conservadas de 20 residuos de longitud de la proteína *PyAMA1* interactúan específicamente con la membrana de eritrocitos murinos. Para esto, cada uno de los péptidos se incubaron en ausencia (unión total) o presencia de altas concentraciones del mismo péptido no-radiomarcado (unión no específica). Una curva de unión total y una curva no específica fueron obtenidas. La diferencia entre estas dos curvas dio como resultado una curva de unión específica que corresponde al péptido unido específicamente a la membrana de eritrocitos murinos. Péptidos con pendientes mayores o iguales a 0,01pmol péptido unido/pmol añadido ($\geq 1\%$) en la curva de unión específica fueron considerados como *High Activity Binding Peptides* (HABPs) de acuerdo con trabajos previos (82, 83). A partir de estos análisis, se encontraron cinco péptidos (42681, 42898, 42903, 42904 y 42910) con pendientes mayores al 1%. De estos HABPs, los primeros cuatro hacen parte del dominio I de la proteína *PyAMA1* mientras que el HABP 42910 hace parte del dominio II (Fig. 6).

| Código del péptido | Secuencia | | | Actividad de unión específica (%) | |
|--------------------|----------------------|-----|-----------------------|-----------------------------------|---|
| | | | | 1 | 2 |
| 42681 | Región Conservada I | 43 | ENTERSIKLINPWDKYMEKY | 62 | |
| 42898 | | 58 | YMEKYDIEKVHGSGIRVDLG | 77 | |
| 42899 | | 73 | RVDLGEDARVENRDYRIPSG | 92 | |
| 42900 | | 88 | RIPSGKSPVIGKGITIQNSEY | 107 | |
| 42901 | | 89 | IPSGKSPVIGKGITIQNSEVY | 108 | |
| 42902 | Región Conservada II | 191 | TSYMLYVAAQENMGPRYSSN | 210 | |
| 42903 | | 206 | RYSSNDANNENQPFSFTPEK | 225 | |
| 42904 | | 221 | FTPEKIENYKDLSYLTKNLR | 240 | |
| 42905 | | 236 | TKNLRDDWETSSPNKSIKNAY | 255 | |
| 42906 | | 251 | SIKNAKFGIWVDGYSTDYQK | 270 | |
| 42907 | | 266 | TDYQKHVVHSDSLLKSNQI | 285 | |
| 42908 | | 281 | KSNQIIFNESASDQPKQYER | 300 | |
| 42909 | | 296 | KQYERHLEDATKIRQGIVER | 315 | |
| 42910 | | 306 | TKIRQGIVERNGKLIGEALLY | 325 | |

Figura 6 Perfil de unión de péptidos conservados derivados de la proteína *PyAMA-1* a eritrocitos murinos. Las barras negras representan los porcentajes de unión específica obtenidos de la pendiente de la curva definidos como la cantidad de péptido que se une específicamente por cantidad de péptido adicionado. Péptidos con porcentajes ≥ 1 fueron considerados como HABPs de acuerdo con criterios establecidos previamente en otros parásitos como *P. falciparum* (82), *P. vivax* (84) y *Babesia bovis* (83).

5.1.3. Péptidos conservados por dinámicas de selección purificante presentan actividad antimalárica en el modelo murino.

Para determinar el perfil funcional de los HABPs derivados de regiones conservadas de la proteína PyAMA-1, sometidas a fuerzas evolutivas de presión purificante, se evaluó la capacidad de inhibición de la invasión de merozoitos de la cepa 17XNL a eritrocitos murinos. Nuestros resultados evidencian porcentajes de invasión *in vitro* a RBCs murinos de aproximadamente 5,48% (Fig. 7A).

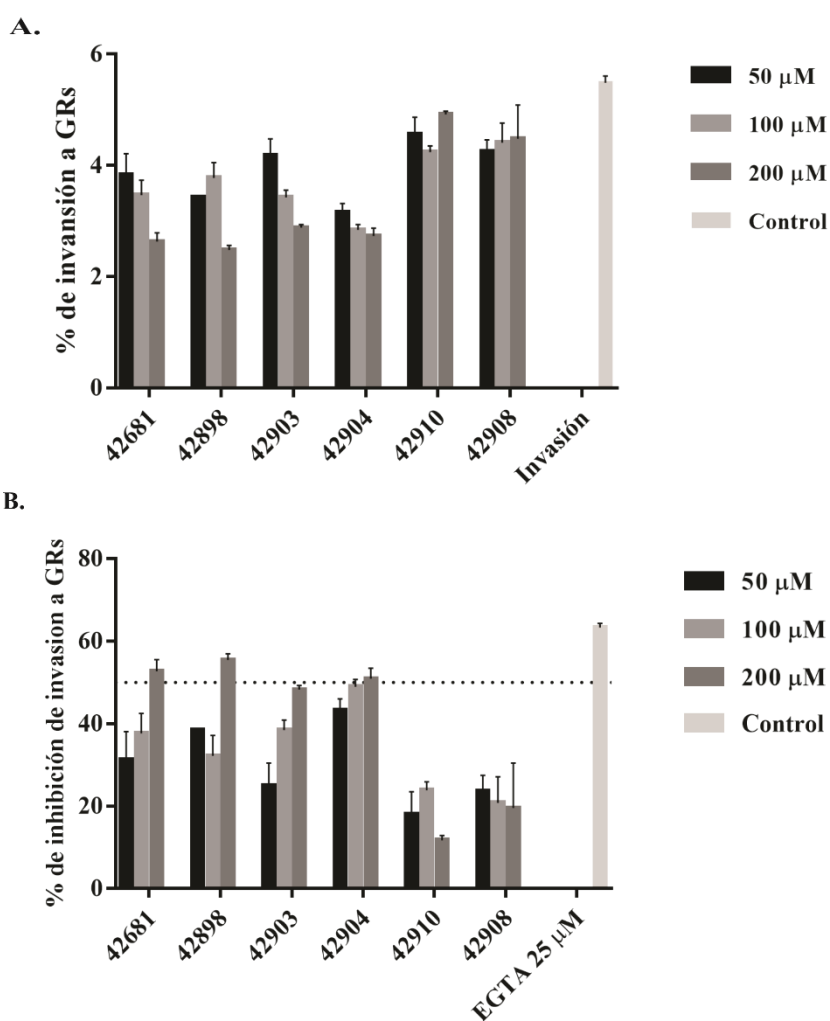


Figura 7 Perfil funcional de los HABPs. A) Ensayo de invasión *in vitro* de 17XNL a eritrocitos murinos tratados con diferentes concentraciones de los HABPs: 50 μ M (Barras negras), 100 μ M (Barras gris claro) y 200 μ M (Barras gris oscuro); control de inhibición de la invasión (EGTA) y control de RBCs sin tratamiento (Control +). (B) Capacidad de inhibición de invasión. Curvas de los porcentajes del bloqueo de la invasión del parásito a RBCs tratados con los diferentes péptidos a las mismas concentraciones.

Nuestros datos muestran que todos los HABPs identificados 42681, 42898, y 42904 presentaron porcentajes de inhibición de la invasión del parásito >50%, mientras que el control EGTA [25µM (85)] mostró 63,34%. No obstante, como se observa en la Fig. 7A, los péptidos 42681 (200 µM: 52,78 ± 2,79; 100 µM: 37,70 ± 4,82; 50 µM: 31,24 ± 6,85), 42903 (200 µM: 48,29 ± 1,01; 100 µM: 38,51 ± 2,41; 50 µM: 25,04 ± 5,45) y 42904 (200 µM: 50,99 ± 2,53; 100 µM: 49,01 ± 1,77; 50 µM: 43,27 ± 2,79) fueron los únicos con la capacidad de bloquear el proceso de invasión dependiente de las concentraciones evaluadas.

Adicionalmente, se evaluaron estos HABPs para determinar su capacidad de inhibir el desarrollo y crecimiento intraeritrocítico de *Plasmodium yoelii*. El cultivo sincronizado (estadio: anillo de dos horas) de la cepa 17XNL fue expuesto a diferentes concentraciones de los péptidos de alta unión específica (50, 100 y 200 µM), y las formas de desarrollo intraeritrocítico se analizaron mediante citometría de flujo, 18 horas postratamiento. Como se observa en la Fig. 8, todos los HABPs afectaron el desarrollo del parásito en glóbulos rojos murinos, sin embargo, solo los péptidos 42681 y 42904 presentaron un porcentaje de inhibición de desarrollo de esquizontes superior al 60% a 200 µM de tratamiento. En los parásitos tratados con los péptidos 42681 (200 µM: 63,6 ± 1,51; 100 µM: 54,3 ± 7,52; 50 µM: 51,3 ± 1,12) y 42904 (200 µM: 62,6 ± 0,08; 100 µM: 57,4 ± 3,10; 50 µM: 53,3 ± 1,74) se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, y a su vez, una acumulación de formas parasitarias en etapa de anillo que no se desarrollaron a trofozoítos, lo que sugiere una actividad antimalárica potencial conferida por estos HABPs.

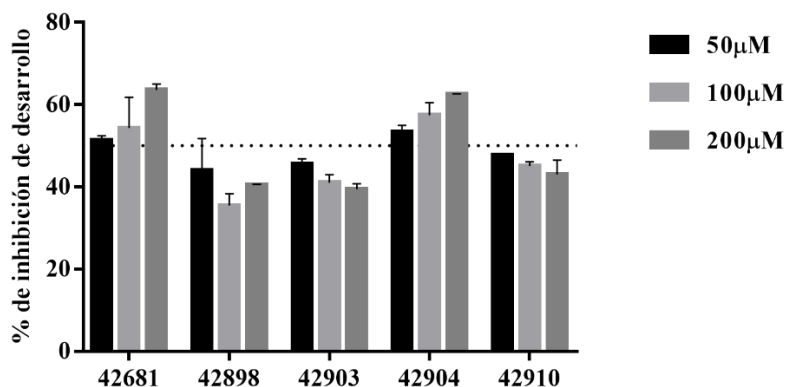


Figura 8 Efecto inhibitorio del desarrollo y crecimiento de 17XNL en eritrocitos murinos tratados con diferentes concentraciones de los HABPs 50µM (Barras negras), 100 µM (Barras gris claro) y 200 µM (Barras gris oscuro). Todos aquellos péptidos que superen el 50% (línea punteada), se consideran antimaláricos.

5.1.4. Los péptidos 42681 y 42903 son buenos candidatos vacúnales antimaláricos

Como se ve en la Fig. 8A, el modelo estructural de la proteína *PyAMA-1* se obtuvo con éxito con un 94,66% de residuos favorecidos en el Ramachandran Plot y un valor de -3,14 QMEAN que valida la calidad de la modelación *in silico*. Se definieron claramente los tres dominios descritos anteriormente (AMA-DI, DII y DIII), así como el surco estructural donde se espera que se produzca la interacción con la proteína *PyRON2*, y las regiones conservadas sometidas a dinámicas de presión purificante. Además, la Fig. 9A describe la posición de los péptidos seleccionados dentro de la estructura, y accesibilidad a solvente, donde se evidencia que los péptidos 42903 (HABP homólogo al Loop Ie en *PfAMA-1*) y 42910, se encuentran en el surco de interacción para el complejo AMA-RON2. La Fig. 9B representa la estructura de cada péptido, donde se muestra que estas regiones de unión poseen estructura extendida, lo que sugiere la presencia de posibles epítomos lineales. Finalmente, como se observa en la Fig 9C, se encontró que los HABPs poseen regiones predichas como potenciales epítomos de células B; esto sugiere que los péptidos podrían inducir una respuesta inmune humoral contra el parásito. Por otro lado, sumado a la capacidad de los péptidos 42681 y 42904 de inhibir tanto la invasión como el desarrollo intraeritrocítico de *P. yoelii*, estos HABPs también poseen una región determinante antigénica para células B; esto es importante, considerando que el control de la malaria en el estadio sanguíneo está mediado por una respuesta humoral fuerte, como se reporta en estudios previos (86-88). En conjunto, estos resultados sugieren que los péptidos 42681 y 42903 son buenos candidatos para el desarrollo de un tratamiento antimalárico.

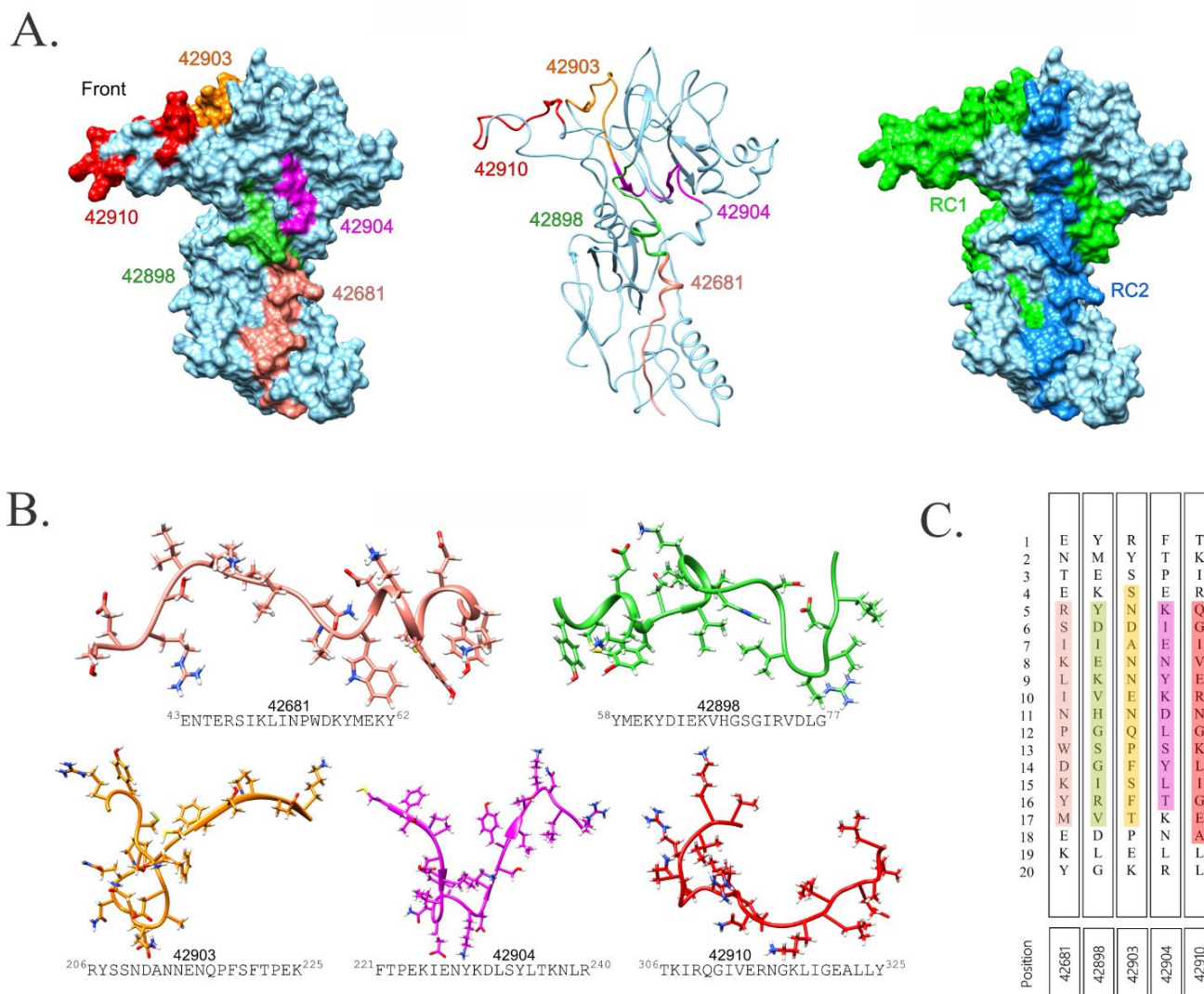


Figura 9 Análisis estructural y predicción de epítomos de células B para AMA-1 de *P. yoelii*. (A) Localización en la vista de superficie de HAMP 42681 (rosa), 42898 (verde), 42903 (naranja), 42904 (morado) y 42910 (rojo). Representación de la estructura secundaria de la proteína resaltando cada uno de los péptidos. Localización de las regiones conservadas identificadas en los análisis de restricción funcional (RC1: región conservada 1 - verde / RC2: Región conservada 2 - azul). (B) Secuencia y estructura predicha para cada uno de los HAMPs identificados en este estudio. (C) Predicción de epítomos B sobre los HAMPs (puntaje >0,45). Las regiones que contienen epítomos de células B están resaltadas con barras con el color correspondiente a cada péptido.

5.2. Optimización de péptidos para la unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en modelo murino (H2-IE^d).

5.2.1. Optimización de péptidos quiméricos para la unión a moléculas H2-IE^d

Los péptidos derivados de regiones bajo restricción funcional de la proteína *PyAMA-1* fueron optimizados mediante herramientas bioinformáticas para promover su anclaje a moléculas

H2-IE^d. La estrategia utilizada para la optimización fue quimerizar epítomos B derivados de los HABPs 42681, 42903 y 42904, con una longitud de 11 residuos, y epítomos T artificiales (9 residuos) con un diseño computacional que promoviese su anclaje a moléculas MHC de clase II, además, se evaluó la disposición de estos epítomos T en el extremo NH₂ o COOH del constructo flanqueados por tres residuos de contexto que promueven el anclaje del epítomo al bolsillo de unión (89), para una longitud final del péptido quimérico de 23 aminoácidos. Brevemente, se realizaron 252'714.910 de cálculos utilizando la plataforma NetMHCIIpan 4.0, identificando 1'128.600 péptidos con unión a MHC-II. Se encontraron 3381 péptidos viables al restringir el análisis *in silico* a MHC murino, de los cuales 546 tienen un %Rank <2 para el anclaje a moléculas H2-IE^d. El %Rank fue determinado utilizando el algoritmo de índice de elución (IE) y afinidad de unión (BA). Como se observa en la Tabla 5, el número de péptidos candidatos es mayor cuando el epítomo T se encuentra en el extremo NH₂ del constructo (93,58 %), en comparación con el extremo COOH (6,42%).

Tabla 5 Péptidos quiméricos

| | No. PÉPTIDOS CALCULADOS |
|-----------------------|------------------------------------|
| 42681-COOH | 5 |
| 42681-NH ₂ | 262 |
| 42903-COOH | 15 |
| 42903-NH ₂ | 68 |
| 42904-COOH | 15 |
| 42904-NH ₂ | 181 |

Para la selección de los mejores candidatos quiméricos con buen perfil de unión a moléculas H2-IE^d, se realizó un análisis *in silico* sobre características fisicoquímicas y estructurales de los constructos, por ejemplo: proteólisis, hidrofobicidad, punto isoeléctrico (pI), síntesis química, purificación, compatibilidad para espectrometría de masas, peso molecular, estructura secundaria y porcentaje de componentes estructurales (hélice, hojas plegadas y conformación extendida).

Nuestros resultados muestran que de 546 péptidos quiméricos con un %Rank <2, sólo el 20,87% presentó sitios predichos de hidrólisis en su secuencia; el 61,91% corresponden a constructos con buenas condiciones de síntesis y purificación; y a su vez, el 82% es compatible con SRM/MRM en espectrometría de masas. Además, los datos obtenidos evidencian que el

puntaje promedio de hidrofobicidad fue de $30,64 \pm 7,97$, el punto isoeléctrico predicho de $9,44 \pm 1,23$ y la media del peso molecular fue $2921,96 \text{ Da} \pm 125,75$.

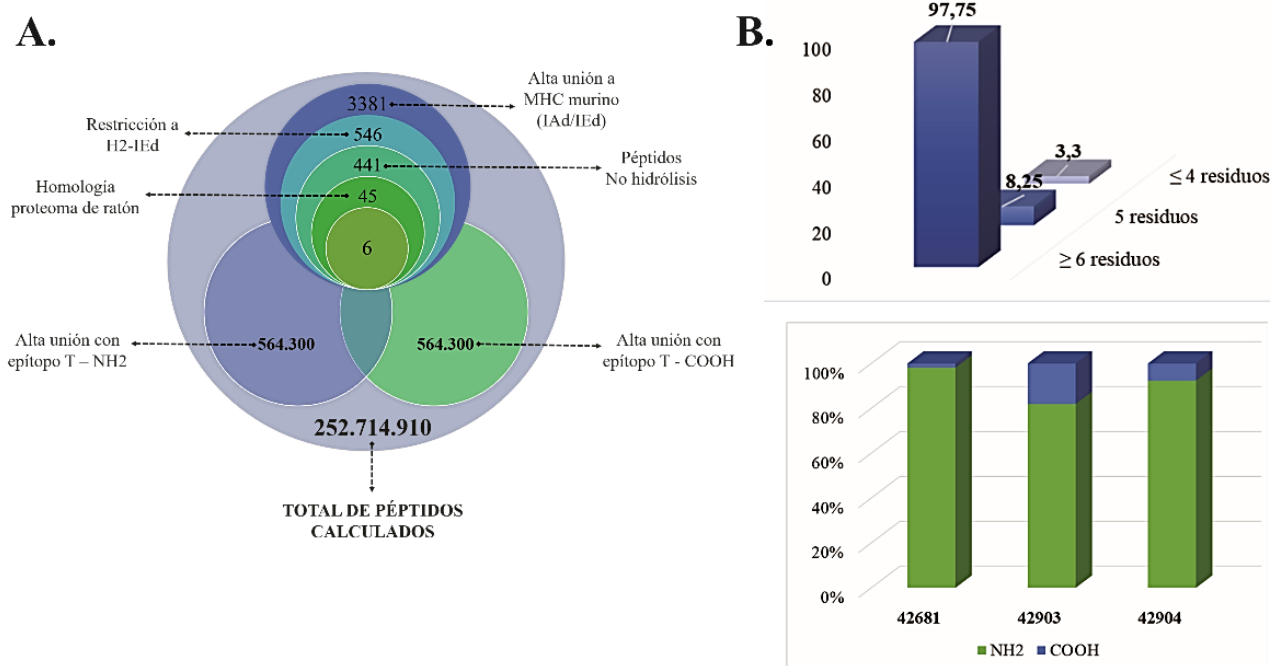


Figura 10 Criterios de selección de péptidos quiméricos. (A) Representación del número total de péptidos calculados y seleccionados mediante herramientas bioinformáticas. (B) Distribución de los péptidos con alta afinidad a moléculas H2-IE^d en función de la homología con el proteoma de ratón (grafico superior), y disposición del epítipo T amino o carboxi (gráfico inferior).

Considerando que las regiones determinantes antigénicas para linfocitos B tienen una extensión de 4-6 residuos, y con el objetivo de garantizar que la inmunogenicidad de los péptidos quiméricos no se viese afectada por alta similitud con proteínas del biomodelo, se realizó un pBLAST contra el proteoma de *Mus musculus*, con un límite de identidad permitida de hasta 4 residuos consecutivos. Encontramos que el 91,75% de los péptidos quiméricos presentaban identidad en más de 5 aa consecutivos con proteínas de ratón, y sólo el 3,3% fueron aquellos con identidad ≤ 4 residuos. Aplicando estos criterios de selección, el número de péptidos candidatos se redujo a 45 (Tabla 6), sin embargo, en los constructos que incluyen al HABP 42903 no fue posible encontrar péptidos con las características establecidas, por lo que fue necesario seleccionar aquellos que presentaron identidad de hasta 5 aa consecutivos (Fig. 10).

Tabla 6 Características evaluadas para la selección de péptidos quiméricos

| Péptido quimérico | Secuencia | Proteólisis NP+NN | Síntesis/Purificación | SRM/MRM Compatibilidad | Hidrofobicidad | PM Promedio | pl teórico | Estructura secundaria | Hélice (%) | Hoja plegada (%) | Extendida (%) | IE-Rank NORIED | BA-Rank NORIED | IE-Rank CTXIED | BA-Rank CTXIED | Homología Ratón (aa) |
|-------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------|-------------|------------|-----------------------|------------|------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|
| 1 42681_c77462 | DNGYRYQHNNHHRINPWDKYMEKY | NO | A | 3 | 28.21 | 3065,37 | 9.30 | CCCCEEEEHCCCCCCHCC | 8,70 | 21,74 | 69,57 | 0,41 | 4,10 | 0,62 | 2,58 | ≤ 5 |
| 2 42681_c83F07 | DKSYRVNKSNNHAINPWDKYMEKY | NO | A | 3 | 29.38 | 2887,25 | 9.70 | CCCEHECCHCCCECCCHCC | 17,39 | 13,04 | 69,57 | 0,32 | 1,23 | 0,19 | 0,22 | ≤ 5 |
| 3 42681_n0A581 | INPWDKYMEKYWSDKPHRRNKQ | NO | A | 3 | 27.65 | 3048,51 | 10.30 | CCCCCCHHHHEHCCCCCCCC | 17,39 | 4,35 | 78,26 | 0,84 | 4,86 | 0,30 | 2,34 | ≤ 5 |
| 4 42681_n0A6BB | INPWDKYMEKYRYYDSHHKNTN | NO | A | 3 | 30.71 | 3108,47 | 9.60 | CCCCCCHHHHEEBEECC | 13,04 | 26,09 | 60,87 | 0,92 | 2,51 | 0,28 | 1,43 | ≤ 5 |
| 5 42681_n0E978 | INPWDKYMEKYFHRHESKLKPKDK | NO | A | 3 | 32.27 | 2990,46 | 9.80 | CCCCCCHHHHEECCCHCC | 26,09 | 8,70 | 65,22 | 0,40 | 1,25 | 0,46 | 1,91 | ≤ 5 |
| 6 42681_n0EC02 | INPWDKYMEKYRYSNRRKNGG | NO | A | 3 | 28.26 | 2936,33 | 10.20 | CCCCCCHHCHCECCCHCC | 13,04 | 8,70 | 78,26 | 0,14 | 0,17 | 0,12 | 0,40 | ≤ 5 |
| 7 42681_n11B1B | INPWDKYMEKYFYSKHDAQRQR | NO | A | 3 | 32.25 | 3019,42 | 10.10 | CCCCCCHHNEECCCHHCC | 30,43 | 8,70 | 60,87 | 0,57 | 1,73 | 0,26 | 0,81 | ≤ 4 |
| 8 42681_n122AD | INPWDKYMEKYFNSKHRRNER | NO | A | 3 | 30.29 | 2979,36 | 9.90 | CCCCCCHHNEECCCHHCC | 26,09 | 8,70 | 65,22 | 0,58 | 0,95 | 0,25 | 0,68 | ≤ 4 |
| 9 42681_n13CE0 | INPWDKYMEKYRKTIGYRGQK | NO | A | 3 | 31.06 | 2966,49 | 10.30 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 17,39 | 17,39 | 65,22 | 0,52 | 0,57 | 0,39 | 0,70 | ≤ 5 |
| 10 42681_n15EE9 | INPWDKYMEKYHMKNTKAKA | NO | A | 3 | 32.14 | 2886,37 | 9.70 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 21,74 | 17,39 | 60,87 | 0,05 | 1,03 | 0,04 | 1,39 | ≤ 5 |
| 11 42681_n2093E | INPWDKYMEKYQYKRSTGRQQT | NO | A | 3 | 29.32 | 2984,37 | 9.90 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 17,39 | 21,74 | 60,87 | 0,58 | 1,68 | 0,42 | 2,08 | ≤ 5 |
| 12 42681_n26CE2 | INPWDKYMEKYKHGVEQKHPG | NO | A | 3 | 28.85 | 2885,28 | 9.30 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 13,04 | 17,39 | 69,57 | 0,45 | 3,39 | 0,06 | 1,36 | ≤ 5 |
| 13 42681_n28A17 | INPWDKYMEKYHYNIQKQDKK | NO | A | 3 | 32.50 | 3061,50 | 9.60 | CCCCCCHCEEECCCHHCC | 21,74 | 17,39 | 60,87 | 0,90 | 3,44 | 0,02 | 0,52 | ≤ 5 |
| 14 42681_n29A4B | INPWDKYMEKYFREKGVHRKPAH | NO | A | 3 | 31.84 | 2930,41 | 10.10 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 26,09 | 4,35 | 69,57 | 0,26 | 0,65 | 0,37 | 0,92 | ≤ 5 |
| 15 42681_n26E9C | INPWDKYMEKYHYRTHQVKNK | NO | A | 3 | 31.84 | 3071,50 | 9.60 | CCCCCCHCEHEECCCHCC | 17,39 | 21,74 | 60,87 | 0,64 | 3,26 | 0,07 | 0,68 | ≤ 5 |
| 16 42681_n3489A | INPWDKYMEKYRQRVRRRQGG | NO | A | 3 | 31.74 | 3053,58 | 10.90 | CCCCCCHHCHHNEECC | 30,43 | 4,35 | 65,22 | 0,12 | 0,09 | 0,16 | 0,16 | ≤ 5 |
| 17 42681_n45065 | INPWDKYMEKYRPRQINRKNYA | NO | A | 3 | 32.38 | 3047,52 | 10.20 | CCCCCCHHCHHNEECC | 30,43 | 0,00 | 69,57 | 0,93 | 0,84 | 0,77 | 1,16 | ≤ 4 |
| 18 42681_n4E10C | INPWDKYMEKYWDHKTMRRRQO | NO | A | 3 | 32.32 | 3111,59 | 10.20 | CCCCCCHCEHEECCCHCC | 17,39 | 21,74 | 60,87 | 0,92 | 2,25 | 0,54 | 2,32 | ≤ 4 |
| 19 42681_n53641 | INPWDKYMEKYWHMKGTRRRPPS | NO | A | 3 | 33.38 | 2949,48 | 10.40 | CCCCCCHHCHHNEECC | 13,04 | 8,70 | 78,26 | 0,37 | 0,89 | 0,25 | 0,74 | ≤ 4 |
| 20 42681_n5D620 | INPWDKYMEKYIPIPTKGGHNT | NO | A | 3 | 32.31 | 2889,32 | 9.80 | CCCCCCHHCEECCCHCC | 8,70 | 8,70 | 82,61 | 0,68 | 4,85 | 0,08 | 1,30 | ≤ 4 |
| 21 42681_n5E409 | INPWDKYMEKYHFPEYIKDKH | NO | B | 3 | 37.69 | 3082,52 | 7.80 | CCCCCCHCEEECCCHHCC | 13,04 | 13,04 | 73,91 | 0,99 | 2,31 | 0,84 | 2,47 | ≤ 5 |
| 22 42681_n6119A | INPWDKYMEKYKPHPTHKKTEN | NO | A | 3 | 26.23 | 2948,38 | 9.70 | CCCCCCHHCCCECCCHCC | 8,70 | 0,00 | 91,30 | 0,13 | 3,80 | 0,11 | 3,40 | ≤ 4 |
| 23 42681_n645E7 | INPWDKYMEKYVYENPGRKGE | NO | A | 3 | 32.27 | 2936,33 | 9.30 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 13,04 | 13,04 | 73,91 | 0,88 | 4,05 | 0,62 | 2,93 | ≤ 4 |
| 24 42681_n666D7 | INPWDKYMEKYIMTGEKRRKQ | NO | A | 3 | 32.76 | 2964,49 | 10.00 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 17,39 | 17,39 | 65,22 | 0,34 | 0,32 | 0,13 | 0,19 | ≤ 5 |
| 25 42681_n69A74 | INPWDKYMEKYIYAKRNGDGTQ | NO | A | 3 | 33.37 | 2925,30 | 9.30 | CCCCCCHHCEEECCCHCC | 17,39 | 17,39 | 65,22 | 0,98 | 1,87 | 0,01 | 0,87 | ≤ 4 |
| 26 42681_n72EA2 | INPWDKYMEKYWRPHPTNRREB | NO | A | 3 | 31.83 | 3030,45 | 10.40 | CCCCCCHHCCCECCCHCC | 8,70 | 0,00 | 91,30 | 0,64 | 2,84 | 0,23 | 1,38 | ≤ 4 |
| 27 42681_n74291 | INPWDKYMEKYKFRNKKQHDR | NO | A | 3 | 30.63 | 3071,50 | 10.00 | CCCCCCHHCCCECCCHCC | 13,04 | 4,35 | 82,61 | 0,38 | 2,54 | 0,04 | 0,93 | ≤ 4 |
| 28 42681_n746E2 | INPWDKYMEKYRYKDPHSQYKR | NO | A | 3 | 32.53 | 3109,55 | 9.80 | CCCCCCHHCEEECCCHCC | 13,04 | 13,04 | 73,91 | 0,50 | 4,92 | 0,04 | 1,07 | ≤ 4 |
| 29 42681_n77462 | INPWDKYMEKYRQHNNHRDYK | NO | A | 3 | 29.40 | 3185,56 | 9.60 | CCCCCCHHCHHEECCCHCC | 21,74 | 17,39 | 60,87 | 0,04 | 0,76 | 0,02 | 0,22 | ≤ 5 |
| 30 42681_n7CFEB | INPWDKYMEKYNNMGEQKRRKG | NO | A | 3 | 27.69 | 2963,46 | 10.20 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 21,74 | 17,39 | 60,87 | 0,62 | 3,79 | 0,44 | 1,72 | ≤ 5 |
| 31 42681_n80D45 | INPWDKYMEKYVRHTPTQTRHJK | NO | A | 3 | 28.74 | 3019,47 | 10.10 | CCCCCCHHCEEECCCHCC | 8,70 | 17,39 | 73,91 | 0,25 | 0,44 | 0,08 | 0,29 | ≤ 4 |
| 32 42681_n865AD | INPWDKYMEKYQSKYPHQRNKY | NO | A | 3 | 31.09 | 3080,50 | 9.80 | CCCCCCHHNEECCCHCC | 17,39 | 13,04 | 69,57 | 0,87 | 3,93 | 0,91 | 1,72 | ≤ 5 |
| 33 42903_n089BC | YSSNDANNENQYLYLPRNKKKPS | NO | A | 3 | 18.82 | 2794,02 | 9.70 | CCCCCHHCHHCECCCHCC | 26,09 | 4,35 | 69,57 | 0,93 | 2,43 | 0,99 | 0,56 | ≤ 5 |
| 34 42903_n303D4 | YSSNDANNENQYFIYAKPESNRN | NO | A | 3 | 19.76 | 2703,85 | 7.00 | CCCCCHHCHHCHHCC | 34,78 | 0,00 | 65,22 | 0,49 | 2,39 | 0,49 | 0,21 | ≤ 5 |
| 35 42903_n76653 | YSSNDANNENQYKFKIPAKDKH | NO | A | 3 | 17.44 | 2748,97 | 9.40 | CCCCCHHCHHCHHCC | 34,78 | 4,35 | 60,87 | 0,02 | 0,33 | 0,39 | 0,22 | ≤ 5 |
| 36 42904_c34385 | NPYIMNHPNKRTPKEIENYKDL | NO | A | 3 | 29.13 | 2829,21 | 9.50 | CCCEECCCCCCHHCHHCC | 26,09 | 8,70 | 65,22 | 0,71 | 2,06 | 0,26 | 0,93 | ≤ 4 |
| 37 42904_n0EC02 | TPEKIENYKDLRYSPNRRKNGG | NO | A | 3 | 22.93 | 2799,12 | 10.10 | CCCCCHHCHHCHHCC | 34,78 | 0,00 | 65,22 | 0,32 | 0,28 | 0,17 | 1,23 | ≤ 5 |
| 38 42904_n2D432 | TPEKIENYKDLFRKQVNPNRGHR | NO | A | 3 | 26.54 | 2821,18 | 10.10 | CCCCCHHCHHCHHCC | 39,13 | 0,00 | 60,87 | 0,62 | 1,16 | 0,06 | 0,37 | ≤ 5 |
| 39 42904_n34F8D | TPEKIENYKDLFRHPTKKGGRQ | NO | A | 3 | 21.98 | 2870,34 | 10.80 | CCCCCHHCHHCHHCC | 30,43 | 0,00 | 69,57 | 0,38 | 0,73 | 0,11 | 0,60 | ≤ 5 |
| 40 42904_n3C69A | TPEKIENYKDLFRPKPIKKGNH | NO | A | 3 | 33.17 | 2742,22 | 9.90 | CCCCCHHCHHCHHCC | 21,74 | 4,35 | 73,91 | 0,72 | 2,20 | 0,29 | 2,60 | ≤ 5 |
| 41 42904_n473DC | TPEKIENYKDLFRKYPKPRKDPN | NO | A | 3 | 26.47 | 2839,27 | 10.00 | CCCCCHHCHHCHHCC | 39,13 | 0,00 | 60,87 | 0,81 | 1,26 | 0,68 | 2,96 | ≤ 5 |
| 42 42904_n59357 | TPEKIENYKDLFRKKTTPRKPQM | NO | A | 3 | 33.94 | 2895,45 | 10.50 | CCCCCHHCHHCHHCC | 39,13 | 0,00 | 60,87 | 0,34 | 0,37 | 0,64 | 2,56 | ≤ 5 |
| 43 42904_n722A7 | TPEKIENYKDLFRKKTTPNRRRSV | NO | A | 3 | 29.95 | 2949,35 | 10.90 | CCCCCHHCHHCHHCC | 34,78 | 0,00 | 65,22 | 0,45 | 0,36 | 0,36 | 0,57 | ≤ 4 |
| 44 42904_n72EA2 | TPEKIENYKDLFRHPTNRREB | NO | A | 3 | 27.30 | 2893,24 | 10.20 | CCCCCHHCHHCHHCC | 26,09 | 0,00 | 73,91 | 0,80 | 3,57 | 0,20 | 3,05 | ≤ 4 |
| 45 42904_n74291 | TPEKIENYKDLYKPRNKKQHDR | NO | A | 3 | 26.12 | 2934,29 | 9.80 | CCCCCHHCHHCHHCC | 30,43 | 4,35 | 65,22 | 0,49 | 3,84 | 0,02 | 1,45 | ≤ 5 |

Estudios previos reportan que la estructura helicoidal (corta, compacta y rígida) no favorece a la interacción p:MHC, mientras que la estructura extendida se ha relacionado con el anclaje del péptido (90); por lo tanto, la estructura del péptido juega un papel crucial en el anclaje exitoso a la molécula del MHC. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una predicción de la estructura secundaria de cada péptido quimérico, tomando como criterio de exclusión aquellos que presentaron altos porcentajes de estructura helicoidal, y como criterio de selección aquellos con mayor composición de estructura extendida. En paralelo, estos análisis se contrastaron con los %Rank (IE y BA) predichos y los datos de identidad obtenidos contra el proteoma de ratón. A partir de los análisis bioinformáticos, se seleccionaron y sintetizaron 6 péptidos quiméricos (Tabla 7); estos constructos cumplen con cada uno de los criterios previamente descritos.

Tabla 7 Características de los péptidos quiméricos seleccionados

| Código | PM | SECUENCIA | Estructura secundaria | Hélice (%) | Hoja plegada (%) | Extendida (%) | IE-Rank | BA-Rank | Homología Ratón (aa) |
|--------|---------|---|-----------------------|------------|------------------|---------------|---------|---------|----------------------|
| 43643 | 2948.41 | <u>INPW</u> DKYMEKY <u>WHMKGTRRKPPS</u> | CCCCCCHCHHECCCCCCCCC | 13,04 | 8,70 | 78,26 | 0,37 | 0,89 | ≤ 4 |
| 43644 | 2948.41 | <u>WHMKGTRRKPPS</u> INPWDKYMEKY | CCCCCCCCCCCCCHHHHC | 21,73 | 0,00 | 78,27 | 0,25 | 0,74 | ≤ 4 |
| 43645 | 2747.91 | YSSNDANNENQY <u>KFHKIPAKDKH</u> | CCCCHHHCHHHHECCCCCCC | 34,78 | 4,35 | 60,87 | 0,02 | 0,33 | ≤ 5 |
| 43646 | 2747.91 | <u>YKFHKIPAKDKH</u> YSSNDANNENQ | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,39 | 0,22 | ≤ 5 |
| 43647 | 2948.28 | TPEKIENYKDL <u>FRNKTPNRRRSW</u> | CCCCHHHHHHHHCCCCCCCC | 34,78 | 0,00 | 65,22 | 0,45 | 0,36 | ≤ 4 |
| 43648 | 2948.28 | <u>FRNKTPNRRRSW</u> TPEKIENYKDL | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | 0,00 | 0,00 | 100,00 | 0,36 | 0,57 | ≤ 4 |

Adicionalmente, se diseñaron y sintetizaron péptidos desordenados (*scrambled*) como constructos control, a partir de un set de 50000 péptidos no idénticos por cada HABP, todos sin perfil de unión a moléculas H2-IE^d y H2-IA^d, determinado a través de la plataforma NetMHCIIpan 4.0.

Tabla 8 Nomenclatura de péptidos diseñados *in silico*

| | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Nativo | 42681 | 42903 | 42904 |
| Quimera-COOH | 43643 | 43645 | 43647 |
| Quimera-NH ₂ | 43644 | 43646 | 43648 |
| Scrambled-COOH | 43649 | 43651 | 43653 |
| Scrambled-NH ₂ | 43650 | 43652 | 43654 |

5.2.2. Los péptidos quiméricos 43643 y 43644 derivados del HABP 42681 poseen alta capacidad de unión a moléculas H2-IE^d

Con la finalidad de establecer el perfil de unión experimental de los péptidos quiméricos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de ratón, se purificaron moléculas H2-IE^d de la línea celular PAI mediante cromatografía de afinidad a anticuerpos monoclonales anti-DR. Considerando que el anticuerpo monoclonal anti-HLA es específico para MHC humano, se realizó una prueba de reactividad cruzada para determinar la capacidad de reconocimiento del anti-HLA dirigido contra moléculas H2-IE^d de ratón. Los resultados muestran que el anticuerpo anti-HLA de humano es capaz de reconocer un 92,8% de las moléculas MHC-II de ratón (H2-IE^d) (anexo 5).

Ahora bien, la capacidad de unión *in vitro* de los constructos quiméricos fue evaluada mediante una ELISA competitiva. Los valores son presentados en la Fig.11 y descritos a continuación.

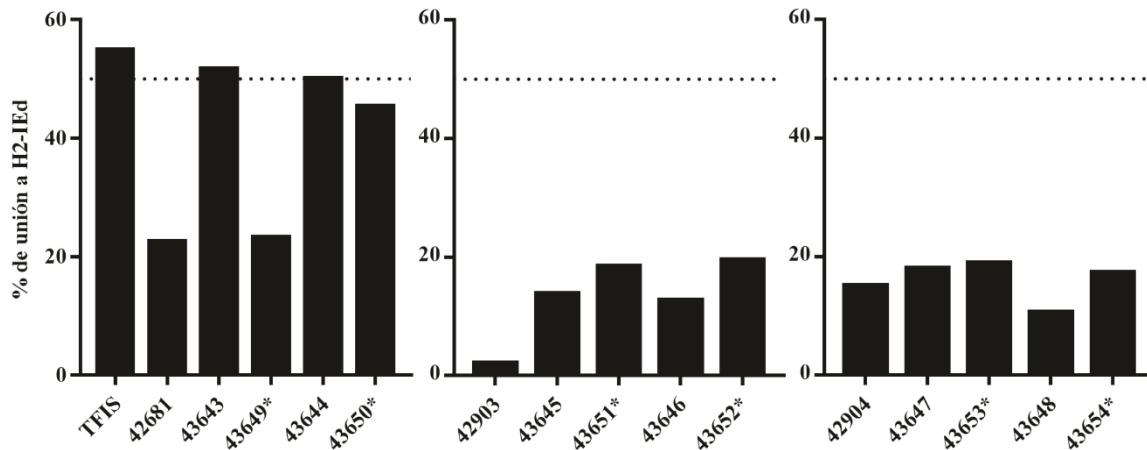


Figura 11 Perfil de unión *in vitro* a moléculas H2-IE^d. La línea de corte (50%) determina péptidos con alta capacidad de unión. Se muestra el porcentaje de unión para cada uno de los péptidos nativos (42681, 42903 y 42904), quiméricos (43643 – 43648); *scrambled* (43649*-43654*). Se incluyen datos del péptido TFIS como control.

De los péptidos quiméricos evaluados con moléculas H2-IE^d, sólo dos fueron capaces de desplazar la unión en más de un 50% al péptido control TFIS. Los valores de unión observados para los constructos 43643 y 43644 derivados del HABP 42681, fueron de 51,65% y 50,07%, respectivamente. En contraste, los péptidos *scrambled* 43649 y 43650 presentaron un perfil de unión de 23,24% y 45,38%, respectivamente; esta afinidad experimental observada podría sugerir la generación de neoepítotos en la quimera que estarían involucrados en la interacción *in vitro* p:MHCII, dado que el péptido nativo (42681) mantiene su secuencia en el *scrambled*, y que, a su vez, este mostró una unión de 22,55%.

Respecto a los péptidos quiméricos de los HABPs 42903 y 42904, ninguno presentó una afinidad de unión superior al 25%, excepto el *scrambled* 43650, el cual se unió en un 45,38% a moléculas H2-IE^d. En general, de los 6 constructos quiméricos optimizados para el anclaje a MHC murino, al menos 2 se unieron con alta afinidad a moléculas H2-IE^d. Los valores experimentales de unión encontrados en este estudio coincidieron en un 33,3% con los perfiles de alta y baja afinidad de unión predichos por la herramienta NetMHCIIpan 4.0.

5.3. Respuesta inmune estimulada por los péptidos quiméricos en el modelo murino.

5.3.1. Los péptidos quiméricos potencian la respuesta de anticuerpos en el modelo murino.

Para evaluar la respuesta de anticuerpos IgG en sueros, estimulada por péptidos quiméricos 43643-43648 (como controles se utilizaron péptidos nativos), se recogió sangre de ratones de cada grupo evaluado 15-30 días post-inmunización de cebado y refuerzo. En primer lugar, confirmamos que los constructos B-T eran inmunogénicos en ratones BALB/c. Como se muestra en la Fig. 12 A-C, los ratones inmunizados con los constructos quiméricos mostraron niveles más altos de anticuerpos IgG antígeno-específicos, en comparación con aquellos expuestos a los péptidos nativos, este comportamiento se observó en todos los puntos de tiempo post-inmunización evaluados. Los resultados de producción de anticuerpos determinados pre y post 30 días de inmunización, muestran diferencias estadísticamente significativas para todos los péptidos ($p < 0,05$). Los valores obtenidos post 30 días de inmunización fueron comparados entre tratamientos evidenciando que la estimulación de la respuesta inmune humoral se potenció al utilizar como inmunógeno los péptidos 43643

($p=0,0046$), 43644 ($p=0,0029$), 43645 ($p=0,0050$), 43646 ($p=0,0012$), 43647 ($p<0,0001$) y 43648 ($p<0,0001$), en comparación con su respectivo péptido nativo.

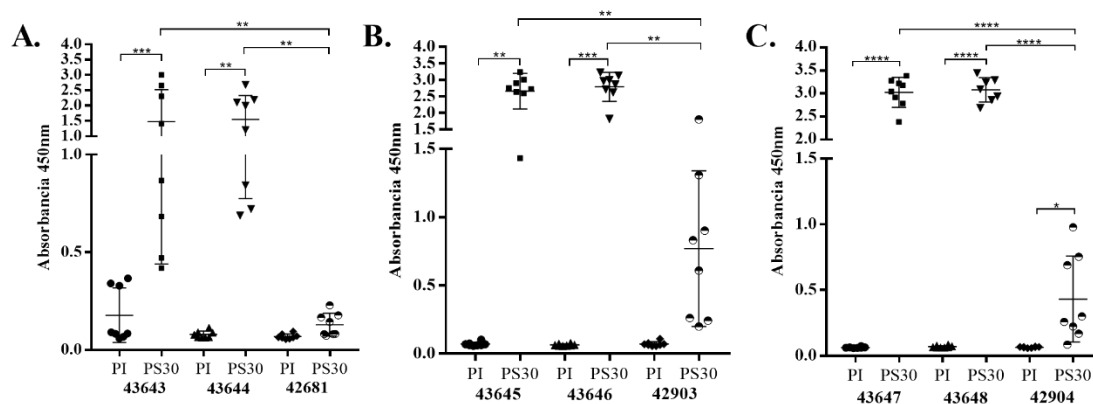


Figura 12 Producción de anticuerpos IgG antígeno-específico. Suero pre-inmunización (PI); suero obtenido 30 días post-segunda inmunización (PS30). Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis con post-test de Dunn o ANOVA con post-test de Tukey, dependiendo del comportamiento paramétrico de los datos. (* $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$; **** $p\leq 0,0001$).

5.3.2. Los anticuerpos generados por la inmunización con péptidos quiméricos presentan reactividad contra *P. yoelii* 17XNL.

Para determinar si los anticuerpos obtenidos en BALB/c tras la inmunización con epítodos quiméricos B-T presentaban reactividad contra *P. yoelii*, se realizó una ELISA utilizando como antígenos péptidos nativos (42681, 42903 y 42904) y lisado de Py17XNL. Como se observa en la Fig. 13A, los ratones inmunizados con los péptidos 43643 y 43644 presentaron anticuerpos capaces de reconocer el péptido nativo y proteínas del lisado del parásito, aunque, sólo los anti-43643 mostraron una mayor reactividad con el lisado en comparación con el antígeno nativo ($p=0,0095$).

Respecto a los anticuerpos contra 43645, se observó un reconocimiento moderado, sin embargo, aquellos generados contra el constructo 43646 no mostraron reactividad dirigida al péptido nativo, ni al lisado (Fig. 13B). Para las IgG anti-43647 y anti-43648 (Fig. 13C), los resultados muestran un comportamiento similar, no obstante, los anticuerpos de ratones inmunizados contra el quimérico 43648 reaccionaron moderadamente contra el péptido 42904

en comparación con el lisado. En conjunto, estos resultados sugieren que los péptidos quiméricos con alta capacidad de unión a moléculas H2-IE^d, estimulan la producción de anticuerpos en ratones BALB/c, capaces de reconocer proteínas de Py17XNL.

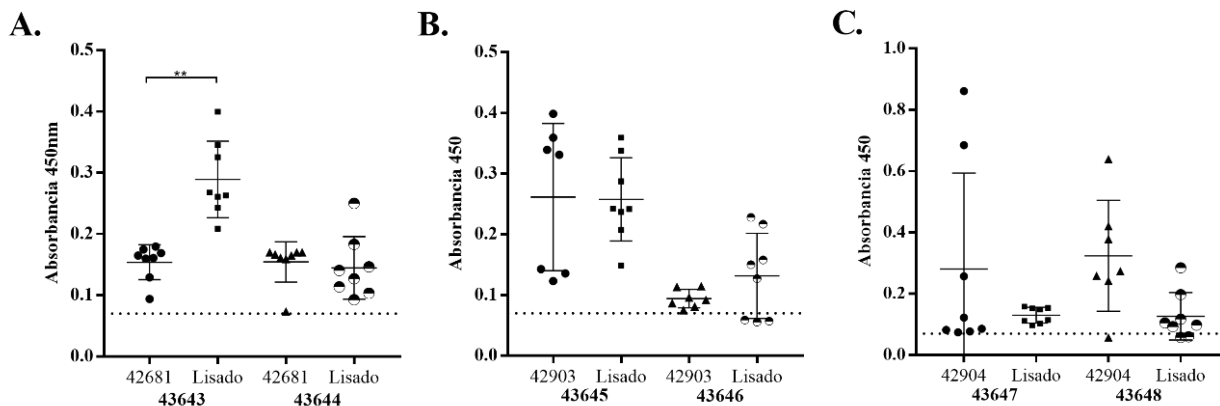


Figura 13 Reactividad de los anticuerpos contra proteínas del parásito Py17XNL. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis con post-test de Dunn o ANOVA con post-test de Tukey, dependiendo del comportamiento paramétrico de los datos. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p < 0.0001$).

5.3.3. IgG1 e IgG2a son las subclases predominantes contra los péptidos quiméricos.

Para evaluar el perfil de las subclases de IgG en ratones inmunizados con los constructos quiméricos B-T, se realizó una ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en sueros recolectados 30 días post-segunda inmunización. Como se observa en la Fig. 14, en todos los grupos se encontró un perfil de subclase similar, con predominancia IgG1 e IgG2a, excepto en los ratones inmunizados con el péptido 43645, donde no se logró detectar significativamente algún isotipo en las muestras (Fig. 14C).

Particularmente, en los sueros de ratones inmunizados con los epítomos quiméricos 43647 (Fig. 14E) y 43648 (Fig. 14F) se encontraron anticuerpos citofílicos tipo IgG2b, a diferencia de los otros grupos evaluados. Además, la ausencia de niveles detectables de IgG3 fue común para todos los grupos. Nuestros resultados evidencian cambios estadísticamente significativos en los patrones de subclases de IgG dependiendo del inmunógeno utilizado en el biomodelo.

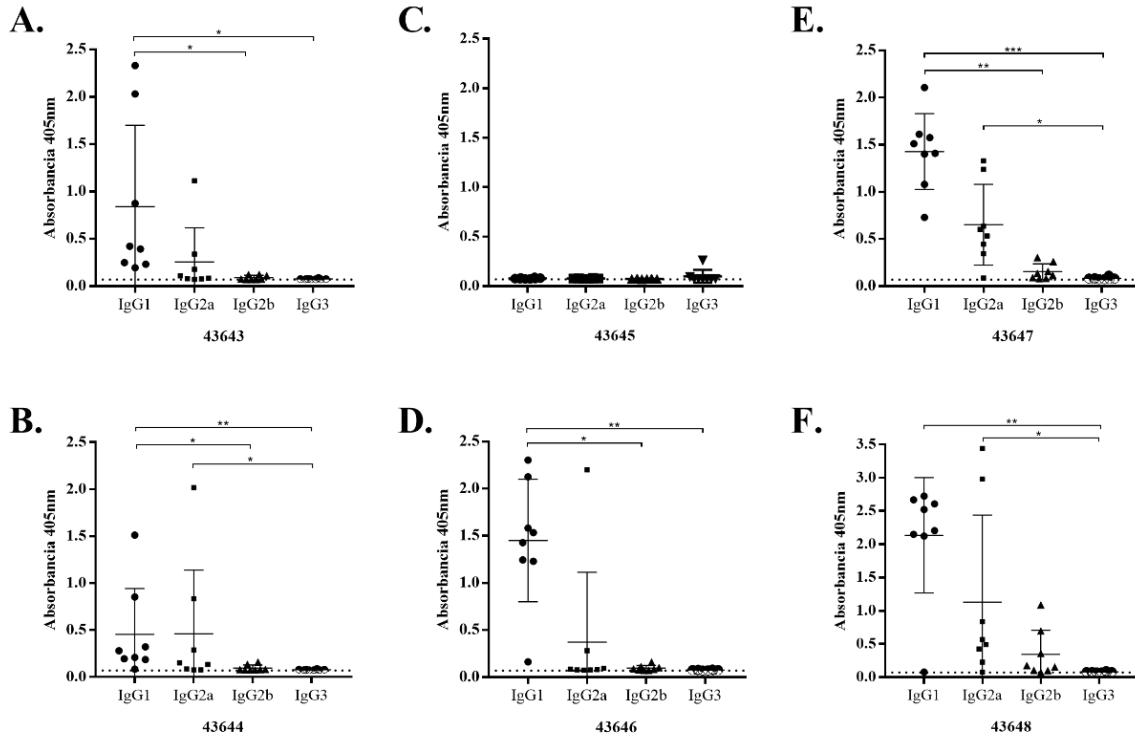


Figura 14 Perfil de isotipos de IgG en sueros de ratones inmunizados con péptidos quiméricos. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis con post-test de Dunn o ANOVA con post-test de Tukey, dependiendo del comportamiento paramétrico de los datos. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.3.4. Los péptidos quiméricos estimulan la proliferación de una subpoblación de linfocitos $CD4^+$ de memoria ($CD44^+$ o $CD62L^+$).

Para evaluar la proliferación de células $CD4^+$ en los ratones inmunizados con los constructos quiméricos y péptidos nativos de Py17XNL, se utilizó células de bazo de 4 individuos por grupo, 45 días post-segunda inmunización. Los esplenocitos fueron estimulados con los péptidos seleccionados (quiméricos y nativos), lisado de Py17XNL y PMA-Ionomicina como controles positivos, y células no estimuladas como control del ensayo.

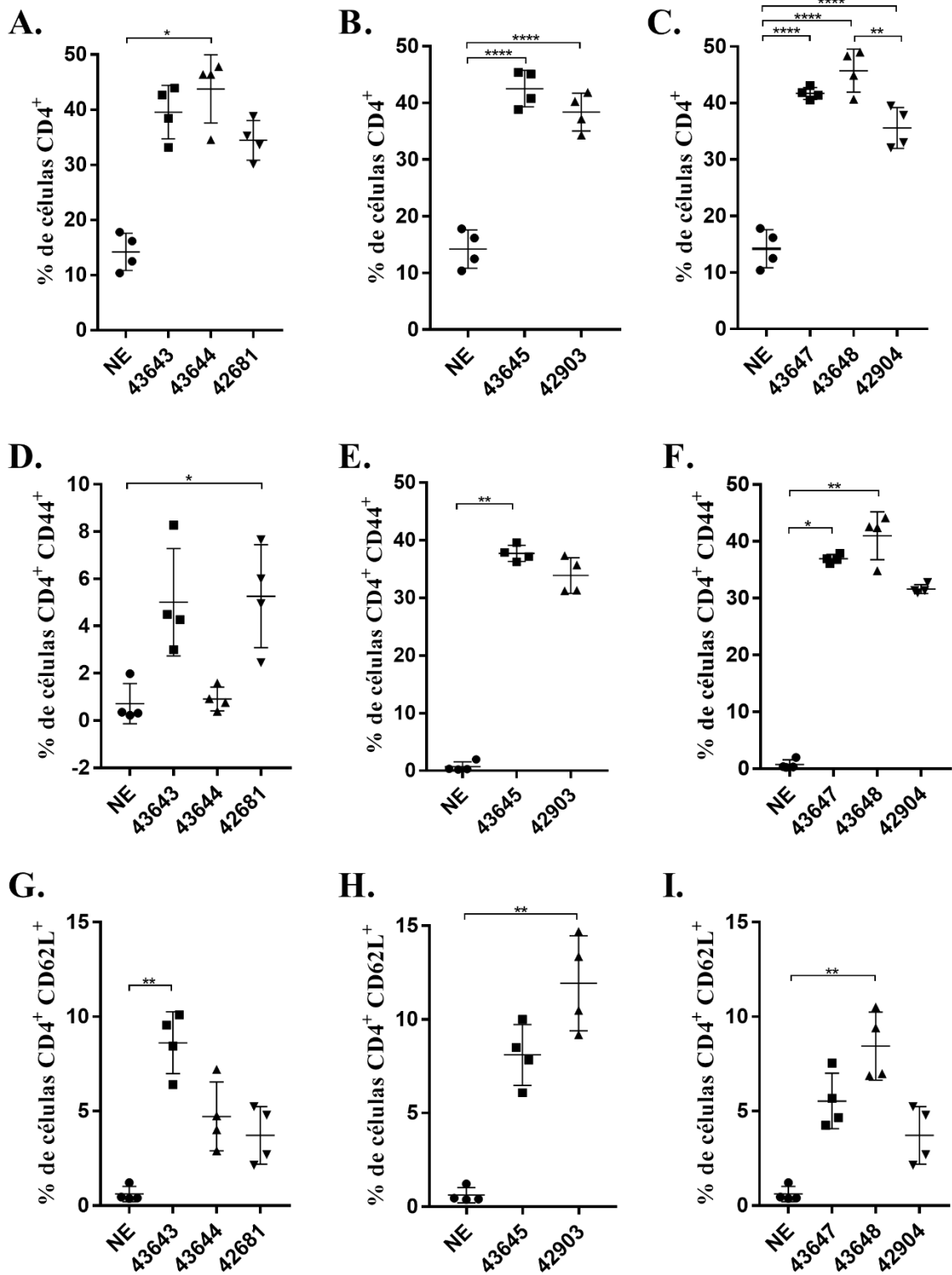


Figura 15 Proliferación de linfocitos T CD4⁺ de memoria estimulados con los constructos quiméricos de PyAMA-1. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis con post-test de

Dunn o ANOVA con post-test de Tukey, dependiendo del comportamiento paramétrico de los datos. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Luego de 120 horas de incubación fueron evaluados y analizados los resultados, arrojando los siguientes datos: como se observa en las Fig. 15A-C, todos los péptidos quiméricos estimularon la proliferación de células T CD4⁺ presentando valores superiores al 30% en comparación con la media del grupo control, 14,22% (células sin estímulo). No obstante, ninguno de los grupos inmunizados con los constructos quiméricos presentó diferencias estadísticamente significativas con los ratones inmunizados con el péptido nativo (13,73 ± 2,48%), excepto, el péptido 43648 ($p=0,0034$). Respecto a los individuos inmunizados con el péptido 43646, seis de los ratones murieron, de allí que no se reporte ningún dato de este grupo.

El lisado de Py17XNL utilizado estimuló la proliferación de linfocitos CD4⁺ en todos los grupos, aunque, en los ratones inmunizados con los quiméricos que presentaron unión *in vitro* a moléculas H2-IE^d, la población de CD4⁺ fue mayor al 35% en comparación con los otros grupos donde la media fue 20,32 ± 5,27%.

Estudios previos han reportado que las células T CD4⁺ efectoras de memoria productoras de interferón están relacionadas con la protección parcial en la infección con *Plasmodium* en modelo murino (91). En este trabajo, evaluamos si la inmunización con los péptidos quiméricos podría activar la diferenciación de una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ de memoria en ratones.

Como se observa en la Fig. 15 D-F, todos los péptidos quiméricos inducen la proliferación y diferenciación de células T CD4⁺ CD44⁺, mostrando valores superiores al 30% en los ratones inmunizados con los constructos 43645, 43647 y 43648, en comparación con la media del grupo control (0,71%). Aunque, los péptidos 43643 y 43644 estimulan la proliferación de células CD4⁺ de memoria, la población observada en estos individuos fue menor al 10%. Un comportamiento similar se observó al evaluar proliferación y diferenciación de linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺ (Fig. 15 G-I).

5.3.5. La inmunización con los péptidos quiméricos de la proteína PyAMA-1, en ratones BALB/c inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias.

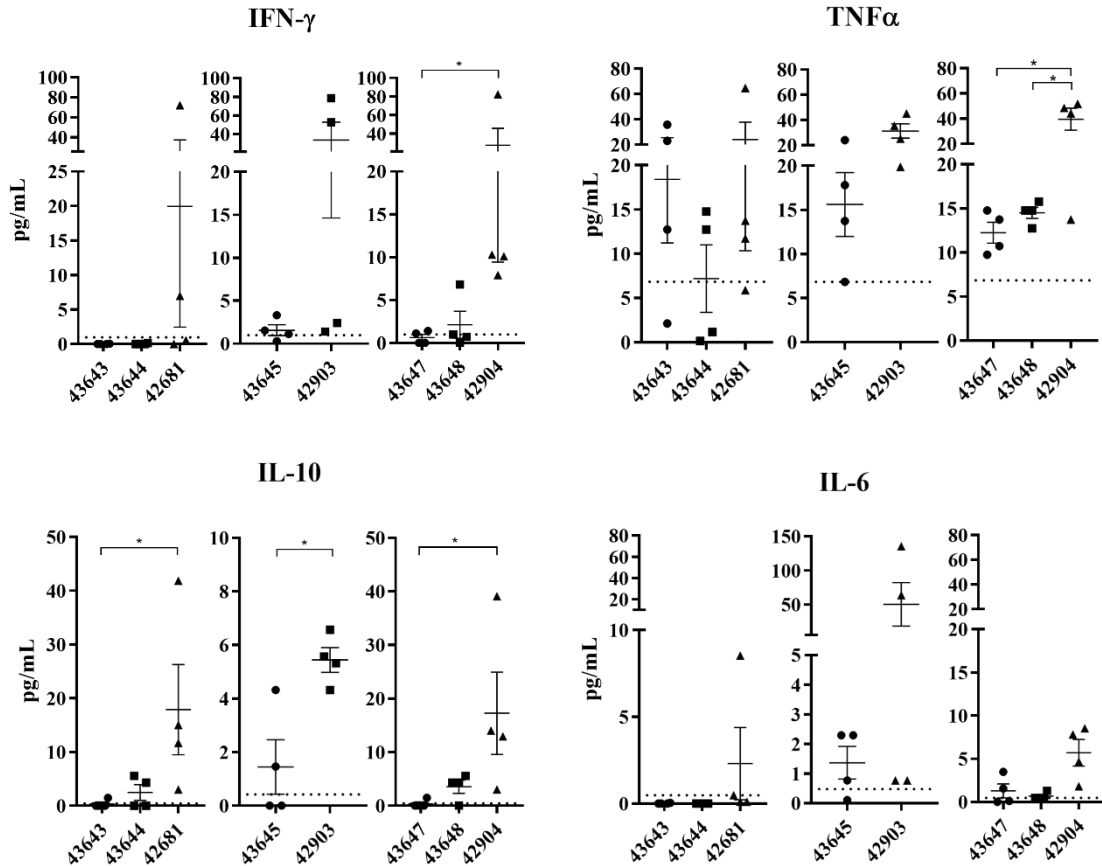


Figura 16 Producción de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos de ratones inmunizados. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis con post-test de Dunn o ANOVA con post-test de Tukey, dependiendo del comportamiento paramétrico de los datos. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p < 0,0001$).

La producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo células de bazo de ratones inmunizados con los péptidos quiméricos y nativos de la proteína AMA-1 de Py17XNL, fue cuantificada y comparada con los valores basales observados para cada individuo. Los grupos inmunizados con los constructos quiméricos presentaron un aumento en la producción de TNF- α en comparación con las células sin estimular; no obstante, no mostraron diferencias significativas con los grupos expuestos a los péptidos nativos.

Como se observa en la Fig. 16, la producción de todas las citoquinas evaluadas (IL-10, IFN- γ , IL-6 y TNF- α) mostró un incremento en el cultivo de células de ratones inmunizados con los péptidos nativos. Sin embargo, al exponer los esplenocitos al lisado de proteínas de Py17XNL, no se generaron cambios significativos en la respuesta.

6. Discusión

El desarrollo de vacunas contra la malaria ha sido lento puesto que los parásitos cambian la expresión de proteínas, dependiendo de la fase del ciclo, ya sea pre-eritrocítica, eritrocitaria o fase sexual (92). Además, se ha encontrado que este parásito esconde los aminoácidos de los dominios conservados de las proteínas involucradas en la invasión, mostrando al sistema inmune sólo los antígenos inmunodominantes y polimórficos; de allí que la variación antigénica sea uno de los principales problemas para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la malaria (93). Además, se sabe que factores genéticos del individuo, como por ejemplo, el haplotipo del MHC, pueden desempeñar un papel clave y modular la respuesta inmune (12). La variabilidad genética que presentan las moléculas del MHC a nivel poblacional es muy alta e influye en la respuesta frente a un patógeno o antígeno (vacuna), ya que la especificidad de los bolsillos de unión de cada molécula de MHC restringe los péptidos que pueden procesarse y presentarse a las células T (12-16).

Las vacunas peptídicas permiten la conjugación de múltiples epítomos en una sola construcción, lo que representa un enfoque prometedor contra las variantes genéticas de los candidatos que participan en los mecanismos de evasión del parásito (18, 28) y una buena estrategia para desarrollar vacunas de múltiples etapas o múltiples especificidades, con péptidos modificados para diferentes alelos del MHC-II. Un buen ajuste del péptido al MHC-II estimulará una respuesta inmune protectora (18, 56). En este estudio, proponemos una metodología robusta para la optimización de péptidos derivados de regiones bajo restricción funcional evolutiva de la proteína AMA-1 de *P. yoelii*, para promover su anclaje a moléculas MHC-II e inmunogenicidad en el modelo de malaria murino, a través de constructos quiméricos de epítomos de células B y T.

En primer lugar, identificamos regiones mínimas funcionales derivadas de la proteína PyAMA-1 mediante análisis de fuerzas evolutivas y diversidad genética. Estudios previos han hecho énfasis en la identificación y caracterización molecular de regiones proteicas sometidas a fuerzas evolutivas de presión purificante, debido a que las regiones funcionales y/o estructuralmente importantes de los antígenos presentan perfiles de conservación mediante estas dinámicas evolutivas (68, 94-96).

Si bien es cierto que existe una restricción en la eficacia de vacunas basadas en la proteína AMA-1, al analizar los resultados de estudios moleculares e inmunológicos, varios investigadores sugieren que la inmunización con este antígeno podría conferir protección parcial cepa-específica en ratones y primates tras ser retados con glóbulos rojos parasitados; no obstante, cuando se evalúa en humanos la respuesta inmune inducida, es ineficiente. Lo anterior, podría atribuirse a patrones variables de diversidad presentes en AMA-1, por ejemplo, la prevalencia de sitios polimórficos se concentra en el dominio I de *P. vivax* y *P. falciparum* (97); además, se ha reportado que rastros de procesos de selección diversificante presentan mayor frecuencia en el dominio II para *P. vivax* (98).

Ahora bien, el análisis de la identificación de señales de selección para especies de *Plasmodium* del clado murino (*P. berghei*, *P. vinckei* y *P. chabaudi*) y especies con tropismo de infección similar a *P. yoelii* (*P. vivax*, *P. fragile* y *P. cynomolgi*), reveló segmentos con alta diversidad genética en los dominios I y II de la proteína AMA-1, previamente reportados como regiones involucradas en el proceso de interacción con glóbulos rojos murinos. Sin embargo, en la zona de intersección de estos dominios, encontramos sitios con selección positiva episódica (determinados por el método filogenético MEME) y baja diversidad genética que sugieren dinámicas de adaptación que afectan sólo a un subconjunto de linajes, que podrían estar relacionados con el conjunto de secuencias de especies de *Plasmodium* spp. con tropismo de infección a eritrocitos, utilizados en los análisis de restricción funcional. Nuestros resultados muestran la presencia de un número importante de codones bajo selección purificante en la extensión del polipéptido, evidenciando una línea de evolución para el antígeno AMA-1. Esta aproximación metodológica permitió identificar dos segmentos proteicos altamente conservados entre las especies, con una tasa evolutiva (ω) <0,8 (Fig. 1); y a su vez, ayudaría a determinar regiones mínimas funcionales presentes en PyAMA-1 DI-II previamente caracterizados (99).

Por lo tanto, se sintetizaron catorce péptidos de 20 residuos solapados cinco aminoácidos, derivados de regiones altamente conservadas sometidas a presión selectiva purificante con el objetivo de identificar cuáles estaban involucradas en la unión a la RBCs murinos. A partir de los ensayos de unión, logramos identificar cuatro péptidos presentes en AMA-DI (42681, 42898, 42903 y 42904) con perfil de unión específica a eritrocitos murinos, y uno en el DII

(42910). Particularmente, los HABPs 42681:42898 y 42903:42904 están solapados 5 residuos, lo que sugiere que los segmentos ⁵⁸YMEKY⁶² y ²²¹FTPEK²²⁵ podrían estar involucrados en la interacción receptor-ligando. En la malaria murina, los dominios I / II de AMA1 de *Plasmodium yoelii*, se han implicado en la unión a eritrocitos utilizando la proteína recombinante expresada en la superficie de células COS-7 (99). Anticuerpos capaces de inhibir la invasión del agente etiológico, también participan en la eliminación del parásito, lo cual establece una actividad citofílica de los anticuerpos anti-AMA1 (100). En ese orden de ideas, Srinivasan *et al.*, demostraron que la inmunización con el complejo AMA-RON2 recombinante induce una protección mediada por anticuerpos contra *P. yoelii* YM, y que a su vez, estos anticuerpos estaban dirigidos contra el loop Ie de la proteína AMA-1 presente en el sitio de unión a RON2L que podrían interferir en la formación del complejo necesario para la invasión del parásito; además, al realizar un alineamiento de las secuencias de PvAMA1 vs. PyAMA1 encontramos que este loop Ie es homólogo al HBP 42903 (88). Previamente se han identificado HABPs en otras especies de *Plasmodium* spp., por ejemplo, los péptidos 21268 (⁴¹KGPTVERSTRMSNPWKAFME⁶²Y) de PvAMA-1 (anexo 2) y 4325 (³⁷⁴MIKSAFLPTGAFKADRYKSH³⁹³) de PfAMA-1 presentan similitud con los HABPs 42681 (66,6% de similitud) y 42910 (65% de similitud), respectivamente (101, 102). Estos datos sugieren patrones de conservación interespecie que refuerzan la hipótesis de la relevancia biológica de las regiones mínimas funcionales en la interacción hospedero-patógeno (como las identificadas en este estudio), siendo ésta, una característica principal de los buenos candidatos vacunales.

Teniendo en cuenta lo anterior, para comprender el papel funcional de los HABPs derivados de regiones conservadas bajo fuerzas evolutivas purificantes, evaluamos la capacidad de estos péptidos para inhibir la invasión y desarrollo del parásito en el modelo murino. Particularmente, se encontró que los péptidos capaces de inhibir la invasión (>50%) y desarrollo (>60%) se localizaron en AMA-DI; esto sugiere una participación de este dominio en la interacción merozoito-RBC. Por otro lado, existen péptidos con la capacidad de traslocación al citoplasma sin traumatismos en la membrana celular, que reciben el nombre de CPPs (del inglés, *Cell Penetrating Peptides*); muchas de estas moléculas poseen actividad antimicrobiana. Estudios previos han reportado CPPs funcionales contra *P. falciparum*, por ejemplo, Transportan-10, Fosmidomicinas, y algunos péptidos derivados de PfSERA5, los

cuales, no sólo inhiben el desarrollo del parásito, sino también bloquean la actividad enzimática del polipéptido (103). Ahora bien, nuestros resultados muestran que los péptidos 42903, 42681 y 42904 presentan actividad antimalárica, sin embargo, los dos últimos pueden inhibir tanto la entrada como el crecimiento del parásito en eritrocitos murinos y, además, no posee actividad hemolítica, lo que podría sugerir una capacidad de traslocación al interior de la célula diana como una molécula CPP. No obstante, los datos no son claros en los mecanismos por los cuales estos HABPs inhiben el desarrollo intraeritrocítico, por lo que son necesarios estudios adicionales para demostrar si los péptidos interfieren en interacciones proteína-proteína (sobre el parásito intracelular), en la permeabilidad de la membrana en eritrocitos infectados, en la vacuola parasitófora o en la membrana del parásito. Los análisis estructurales mostraron que la localización de la región de unión comprendida por los péptidos 42681-42898 sugieren que esta zona podría estar involucrada en procesos de interacción proteína-proteína importantes para la internalización del parásito al eritrocito murino (Fig. 9B), y a su vez, esto explicaría la capacidad de estos péptidos de inhibir la invasión por parte del parásito. Además, muestra que estas regiones de unión poseen estructura extendida, lo que sugiere la presencia de posibles epítomos lineales. Esta hipótesis fue validada experimentalmente, encontrando que nuestros HABPs presentan capacidad antigénica frente a sueros obtenidos de ratones infectados experimentalmente (anexo 4).

Los péptidos sintéticos representan una alternativa prometedora para el desarrollo de vacunas constituidas por epítomos de células B y T que están involucrados en la eficacia protectora, puesto que, podrían estimular una respuesta inmune equilibrada (31). Considerando lo anterior, los péptidos 42681, 42903 y 42904 destacan como candidatos potenciales para la construcción de quimeras peptídicas compuestas por epítomos de células B y T, debido a que presentan características funcionalmente relevantes como: conservación interespecie, perfil de unión específica a eritrocitos, capacidad de inhibición de invasión y desarrollo del parásito, además, de que las regiones predichas como epítomos B mostraron capacidad antigénica frente a sueros obtenidos de ratones infectados experimentalmente.

Por consiguiente, epítomos de células B derivados de HABPs de la proteína *PyAMA-1* fueron articulados a epítomos de células T completamente artificiales predichos con la herramienta NetMHCIIpan 4.0 para optimizar el anclaje a moléculas H2-IE^d. En total fueron

caracterizados computacionalmente 3381 péptidos, pero sólo 45 cumplieron con los criterios de selección (1,3%), y fueron sintetizados 6 constructos quiméricos B-T. La validación experimental del perfil de unión predicho a moléculas H2-IE^d reveló una concordancia de 33,3% entre la afinidad *in silico* e *in vitro*; no obstante, otros estudios han reportado una concordancia mayor al 70% (81). Durante el diseño y optimización *in silico* de los constructos quiméricos, nos encontramos con un cuello de botella que restringió la selección de los mejores candidatos, dado que, la identificación de péptidos que no presentaran identidad de más de 4 residuos consecutivos con proteínas de ratón fue el filtro más restrictivo durante el análisis, y que podría estar relacionado con la baja concordancia de la afinidad a moléculas MHC-II entre la valoración bioinformática y experimental.

Por otro lado, estudios previos sugieren que la variabilidad en los porcentajes de unión p:MHCII pueden estar relacionados con la disposición geométrica de la estructura bidimensional de los péptidos (104). Dicho esto, para evitar un perfil de baja unión a MHC-II, se realizó la predicción de estructura secundaria y terciaria de los constructos quiméricos, puesto que las estructuras favorecidas para la unión a moléculas H2-IE^d son de tipo desordenado, y las menos favorecidas son las helicoidales (90). Nuestros datos evidencian que los constructos 43643 (epítipo T-NH2) y 43644 (epítipo T-COOH) fueron capaces de desplazar la unión *in vitro* del péptido inmunomodulador FIS (33), por encima de un 50%, lo que sugiere que no hay diferencias en el anclaje a moléculas H2-IE^d relacionadas con la localización del epítipo T en el constructo. Además, la articulación de un epítipo T auxiliar a una secuencia peptídica establecida no afecta la afinidad, aunque el estímulo post-interacción p:MHC puede verse restringido por la presencia de neoepítopos en el péptido (105).

Así mismo, se ha descrito previamente que estos constructos B-T potencian la respuesta inmune, por ejemplo, la inmunización de ratones usando constructos que incorporan el epítipo B PvMSP-9_(E795-A808) conjugado con epítopos de células T CD4⁺ caracterizados, como toxoide tetánico_(Q830-E843), incrementan la respuesta inmune celular y humoral, comparado con péptidos quiméricos que integran epítopos de células B y T nativos del patógeno (31). En este sentido, se evaluó la capacidad de péptidos derivados de proteínas de *Cryptosporidium parvum* para inducir una respuesta inmune de seroconversión, utilizando como coestimulante

un péptido inmunomodulador corto llamado FIS_(F106-R118) (FISEIAIIHVLHSR), nativo de la proteína *mioglobina de esperma de ballena* y que a su vez es reconocido por las células T ayudadoras (32, 33); la caracterización de la respuesta inmune provocada por la inmunización con estos inmunógenos evidencia la capacidad de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes favorecida por la presencia de FIS en los tratamientos (33).

Aquí demostramos que la estrategia propuesta para el diseño y optimización de constructos quiméricos que integran epítomos T completamente artificiales, genera péptidos inmunogénicos, y que los ratones inmunizados muestran respuestas de anticuerpos mejoradas en comparación con el grupo de ratones expuesto a los péptidos nativos. Los quiméricos que presentaron buen perfil de unión *in vitro* a moléculas H2-IE^d (43643 y 43644), indujeron anticuerpos específicos contra el péptido nativo 42681 y proteínas del lisado de Py17XNL; sin embargo, el mayor nivel de anticuerpos se observó en ratones inmunizados con los demás constructos quiméricos (43645, 43646, 43647 y 43648). Nuestros resultados, concuerdan con estudios previos (31, 106, 107), que demuestran cómo la inserción de un epítomo de células T auxiliar en un constructo B, mejora la respuesta inmune específica y promueve una alta producción de anticuerpos desde la inmunización de cebado. Esta estrategia no sólo ha sido propuesta como alternativa para el control de enfermedades infecciosas, sino también, como tratamiento oncológico, emulando un proceso presente en células B llamado “*peptide splicing*” (108, 109).

Si bien, encontramos niveles diferenciales de IgG total entre los grupos inmunizados, se obtuvieron perfiles de subclases de IgG similares, con una predominancia de IgG1 e IgG2a. Este patrón de respuesta se ha observado en individuos inmunizados con antígenos recombinantes formuladas con adyuvantes, lo que podría explicarse gracias a los atributos del adyuvante utilizado, dado que, éstos favorecen la respuesta inmune contra los antígenos coadministrados y modulan los cambios de subclases de IgG (110). Además, White *et al.*, reportaron en 1991 que la subclase IgG2a es la mejor confiriendo protección pasiva en ratones infectados con *P. yoelii* (111), esto concuerda con experimentos de transferencia pasiva en infecciones murinas, donde se establece que los isotipos IgG2a e IgG2b son activadores potentes del complemento y están relacionado con un perfil de actividad citofílica durante la infección temprana (112), a diferencia de los anticuerpos IgG1 neutralizantes que están

relacionados a un tipo de respuesta Th2 y predominan en la fase de infección tardía (112). Nuestros resultados sugieren que la inmunización con las quimeras peptídicas estimula una respuesta de anticuerpos homogénea (Th1/Th2).

Las células T CD4⁺ desempeñan un papel crucial en la inmunidad humoral al asistir a linfocitos B, esto permite un cambio de clase de anticuerpos IgG y una maduración de la afinidad. La falta de epítomos de MHC clase II eficientes en algunas vacunas, puede generar la activación y memoria de células T auxiliares ineficiente, así como una respuesta humoral deficiente. Al realizar los ensayos de inmunogenicidad con esplenocitos de ratones inmunizados con los péptidos quiméricos y nativos de la proteína PyAMA-1, demostramos su capacidad de inducir proliferación de linfocitos T de memoria CD4⁺ CD44⁺ / CD4⁺ CD62L⁺, y reconocer proteínas de lisado de PyAMA-1 (anexo 6). Estos resultados contrastan con lo reportado en estudios previos donde describieron la cinética de células T CD4⁺ de memoria en el modelo de malaria murina. Los autores reportan que las células de memoria se generan en un periodo de 2 meses en ratones infectados experimentalmente; sin embargo, en individuos expuestos a los constructos quiméricos, nuestros resultados muestran la presencia de linfocitos CD4⁺ CD44⁺ / CD4⁺ CD62L⁺, 30 días después de la segunda inmunización. Además, se ha demostrado que esta subpoblación de linfocitos CD4⁺ están presentes en roedores (113) y humanos (114) con inmunidad protectora por exposición a esporozoitos de *P. berghei* y *P. falciparum*, respectivamente.

Estos resultados revelan la importancia funcional e inmunogénica de los constructos evaluados, que a pesar de representar una región mínima de la proteína PyAMA, no sólo son buenos péptidos de unión, sino que también son capaces de activar células de memoria en poco tiempo. Esta respuesta proliferativa en los quiméricos 43643, 43644 y 43648 fue significativamente mayor con respecto al grupo control, presentando valores superiores al 30% de linfocitos CD4⁺.

Adicionalmente, se cuantificaron las citoquinas que estarían involucradas en la respuesta mediadora de la inmunidad celular en ratones inmunizados. Para esto, en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos, se determinó la concentración de cuatro citoquinas importantes en la respuesta inmune tipo Th1/Th2 reportadas para malaria. Todos los péptidos nativos (42681, 42903 y 42904) mostraron una respuesta significativa de IFN- γ , TNF- α e IL-10. Aunque todos

los péptidos quiméricos fueron capaces de inducir proliferación celular significativamente mayor a la del grupo control, solo generaron TNF- α . Esto concuerda con estudios previos donde se ha demostrado el rol de las citoquinas pro-inflamatorias en orquestar una respuesta inmune capaz de controlar la infección (115). El TNF- α e IFN- γ actúan en conjunto para promover la producción de óxido nítrico, importante para la eliminación del parásito en el modelo murino (116); no obstante, la producción de TNF- α e IFN- γ en ratones infectados con *Plasmodium yoelii* N67C, induce muerte celular esplénica, incidiendo directamente sobre la hiperparasitemia y muerte de los individuos al 7 día post-infección (117).

Por otro lado, los altos niveles de TNF- α se han asociado con mejoras en la actividad fagocítica, y este perfil en la respuesta inmune innata está relacionado con el control de la parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium yoelii* N67 (118). Es importante resaltar que de acuerdo resultados previos, la administración de TNF- α recombinante redujo la carga parasítica causada por *P. chabaudi* y, posiblemente, estas acciones ocurran debido a las actividades pleiotrópicas del TNF- α sobre diferentes células del sistema inmune (115).

En perspectiva, la construcción de péptidos quiméricos que integran epítomos T conocidos (promiscuos o universales), que se unen a varias moléculas MHC-II, como inmunógenos para potenciar la producción de anticuerpos de alta afinidad capaces de reconocer antígenos del patógeno, ha sido implementada en el desarrollo de tratamientos contra enfermedades infecciosas, antitumorales, y para diagnóstico (31, 119-122). No obstante, el sesgo en la presentación de péptidos sintéticos a las moléculas MHC clase II en humanos y modelos animales limita su aplicación. Por ejemplo, el epítomo T PADRE se une a varias moléculas HLA-DR con alta afinidad, pero en ratones, sólo se observa unión fuerte a moléculas H2-IA^b (123, 124), un comportamiento similar se ha reportado en los epítomos TT (125), HA(126), HEL (127) y OVA (128).

Es importante resaltar que este es el primer estudio con un enfoque diferencial para el diseño de constructos B-T; sabemos que la estabilidad y afinidad de la unión p:MHC-II es mediada por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que componen al epítomo de células T y esto, a su vez, promueve la interacción molecular con los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9 de la molécula del MHC-II (18, 19). A partir de esta información, se diseñaron epítomos T completamente artificiales para articularlos a epítomos B derivados de antígenos nativos del

patógeno. Nuestros resultados evidencian que esta estrategia logra potenciar la respuesta inmune antígeno-específica de memoria en el modelo de malaria murina de *Plasmodium yoelii*. Lo más prometedor de los resultados obtenidos, es el haber logrado una respuesta inmune más fuerte con los inmunógenos quiméricos, que aquella obtenida con los péptidos nativos; esto apunta de manera concluyente a que los constructos artificiales, como los epítomos T aquí diseñados, pueden llegar a ser mejores antígenos que los nativos.

7. Conclusiones

Los péptidos 42681, 42903 y 42904 destacan como candidatos potenciales para el desarrollo de una vacuna sintética contra malaria, debido a que presentan características funcionalmente relevantes como: conservación interespecie, perfil de unión específica a eritrocitos, capacidad de inhibición de invasión y desarrollo del parásito, además que las regiones predichas como epítomos B mostraron capacidad antigénica frente a sueros obtenidos de ratones infectados experimentalmente.

El diseño y optimización de péptidos mediante la estrategia de hibridación de epítomos B derivados de antígenos funcionalmente relevantes y epítomos T completamente artificiales establece una alternativa para mejorar el anclaje de péptidos a moléculas MHC-II. El cuello de botella más significativo que se encontró durante los análisis bioinformáticos de diseño de los constructos B-T fue la alta identidad con el proteoma de ratón. De allí, que los resultados de predicción *in silico* concordaran en sólo un 33,3% con los resultados experimentales.

Los constructos quiméricos fueron inmunogénicos en el biomodelo y potenciaron la respuesta de anticuerpos en comparación con los ratones inmunizados con los péptidos nativos. Por otro lado, los anticuerpos anti-43643 y anti-43644 fueron capaces de reconocer proteínas del lisado de Py17XNL. Además, estos constructos fueron capaces de inducir la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2 que están relacionados con la protección en malaria murina.

Nuestros constructos B-T son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de memoria (CD4⁺ CD44⁺ / CD4⁺ CD62L⁺) que reconocen proteínas de Py17XNL, y en paralelo, inducir una respuesta coordinada de mediadores celulares como el TNF- α , importantes en procesos de proliferación, diferenciación e inmunomodulación capaz de controlar la infección por *Plasmodium*.

Estos resultados nos permiten concluir que la propuesta metodológica novedosa para la optimización de subunidades peptídicas mediante la estrategia de hibridación de epítomos B derivados de antígenos funcionalmente relevantes y epítomos T completamente artificiales, establece una alternativa para mejorar el anclaje de péptidos a moléculas MHC-II, potenciando la respuesta inmune celular y humoral de memoria, capaz de controlar la infección por

Plasmodium, y a su vez, esta metodología robusta podrá extrapolarse a otros agentes etiológicos con un enfoque en vacunología.

8. Perspectivas

Con el objetivo de validar esta prueba de concepto para el diseño y optimización de péptidos derivados de antígenos relevantes en la interacción hospedero – patógeno, y así mejorar el anclaje a moléculas MHC-II e inmunogenicidad, es necesario:

- Evaluar la capacidad protectora de la respuesta inmune de ratones inmunizados con los constructos quiméricos, mediante reto homólogo y/o heterólogo.
- Afinar el análisis *in silico* para aumentar el número de péptidos quiméricos candidatos sin la restricción de identidad con proteínas nativas del hospedero.
- Evaluar el perfil funcional de los anticuerpos obtenidos en los ratones inmunizados, mediante ensayos *in vitro* de inhibición de invasión del parásito mediada por anticuerpos.
- Determinar el perfil de citoquinas presentes en sueros de ratones inmunizados con los péptidos quiméricos, con el fin de poder establecer la cinética de estos mediadores de la respuesta inmune.
- Implementar esta metodología robusta en un modelo de malaria humana, como *P. vivax* o *P. falciparum*, para la identificación de candidatos peptídicos que puedan ser incluidos en una formulación de una vacuna sintética multiepítipo – multiestadio contra la malaria.
- Por otra parte, considerando los resultados obtenidos a través de la caracterización funcional de péptidos nativos de la proteína PyAMA-1, se propone evaluar la actividad antimicrobiana de los HABPs 42681 y 42904 derivados de regiones bajo selección evolutiva purificante, caracterizados en este estudio.

9. Aspectos éticos

Los animales fueron tratados bajo la norma colombiana establecida en la Resolución del Ministerio de Salud No. 8430 del año 1993, además de las disposiciones de la Ley 84 de 1989 sobre “*el uso de animales vivos en experimentos e investigación*”. Este proyecto contó con el aval del comité de bioética de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A (Anexo 1).

10. Anexos

Anexo 1. Aval del Comité de Ética



Bogotá, marzo 4 de 2021

Investigadores:

*Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez
Carlos Fernando Suárez Martínez
Laura Nathalia Niño Camacho
Diana Díaz Arévalo
Kewin Rodríguez Obediente
Jeimy Yurani Beltrán Castañeda
Carmen Teresa Celis Giraldo
Manuel Elkin Patarroyo Murillo*

Asunto: *Aval – Comité de manejo bioético en experimentación y práctica con animales*

Respetados investigadores.

Con toda atención, me permito informar que el proyecto de investigación: "Optimización de péptidos para la presentación por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad con miras al desarrollo de candidatos vacunales para el control de Malaria". Cuenta con el aval del Comité de manejo bioético en experimentación y práctica con animales.

Lo anterior, teniendo en cuenta los documentos presentados ante el comité en sesión del 3 de marzo de 2022. (ficha técnica de presentación de propuesta y anexos).

Cordialmente,


TERESA CARVAJAL SALCEDO
*Decana
Facultad de Ciencias Agropecuarias – U.D.C.A*

Miembros: VIRTUALEDUCA - ASCUN - UDUAL - AVAALCPI - OUI - ARIUSA - ALUM - Canal ZOOM - RENATA - Comités Bogotá Región - SAC - BOGA

Calle 222
Calle 222 # 50-37
PBX (57 1) 6584700
Bogotá, Colombia

Avenida Boyacá
Avenida Boyacá # 65A-61
PBX (57 1) 6584700 Ext. 501
Bogotá, Colombia

Cartagena
Calle 31 # 180-17 (Avenida Pie del Cerro)
Teléfono: (57-5) 6588562
Cartagena, Colombia

www.udca.edu.co
NIT: 860-403-721-2
Bogotá D.C. - Colombia

Anexo 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína AMA-1 de *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium vivax*.

```

                *          20          *          40          *          60          *          80          *
Pv_AMA1 : MNKIYYIIFLSAQCLVHIGKGRNQKPSRLTRSANNVLE--KGP TVERSTRMSNPWKAFMEKYDIERTHSSGVRVDLGEDAIVENAKYR : 88
Py_AMA1 : MKEIYYIFILCSIYLINLSYSEGPNQV--ISEDGNINYESIPKENTERSIKLINPWDKYMEKYDIEKRVHSGSIRVDLGEDARVENRDYR : 88

                *          100          *          120          *          140          *          160          *          180
Pv_AMA1 : IPAGRCPVFGKGI VIENS DVSFLRPVATGDQKLKDGGF AFPNANDHISEMTLANLKERYKDNVEMMKLNDIALCRTHAASFVMAGDQNSS : 178
Py_AMA1 : IPSGKCPVIGKGI TIONSEVSFLKPVATGDKPVRSGGLA FPE T DVHISPITITNLKTMYKDHQDIVNLNDMSLCAKHTSLYVPGKDATSA : 178

                *          200          *          220          *          240          *          260          *
Pv_AMA1 : YRHPAVYDEKEKTC HMLYLSAQENMGPRY CSPDAQNRDAVFCFKPDKNESFENLVYLSKNVRNDWDKCP RKNLGNAKFGLWVDGNC EEI : 268
Py_AMA1 : YRHPVVYDKSNSTCYMLYVAAQENMGPRYCSNDANNENQPF CFTPEKIENYKDLSYLTKNLRDDWETS CPNKSIAKNAKFGIWDVGYCTDY : 268

                *          280          *          300          *          320          *          340          *          360
Pv_AMA1 : PYVKEVEAEDLRE CNRIVFGASASDQPTQYEEEMTDYQKIQQGFRONNREMIKSAFLPVGAFNSDNFKSKGRGFNWNANFDSVKKKCYIFN : 358
Py_AMA1 : QKHVVDSDSLKCNQIIFNESASDQPKQYERHLEDA TKIROGIVERNGLIGEA LLPIGSYKSGQIKSHGKGYNWGNYSKNNKCYIFE : 358

                *          380          *          400          *          420          *          440          *
Pv_AMA1 : TKPTCLINDKNFIATTALSHPQEVDFEFPCSIYKDEIEREIKKQSRNMNLYSVDGERIVLPRIFISNDKESIKCPCEPERISNSTCNFYV : 448
Py_AMA1 : TKPTCLINDKNFIATTALSSTEEFEENFPCEIYKNKIAEEIKVNLNLQNT-SNGNNSIKFPRIFISTDKNSLNCPCDPTKLTSTCEFYV : 447

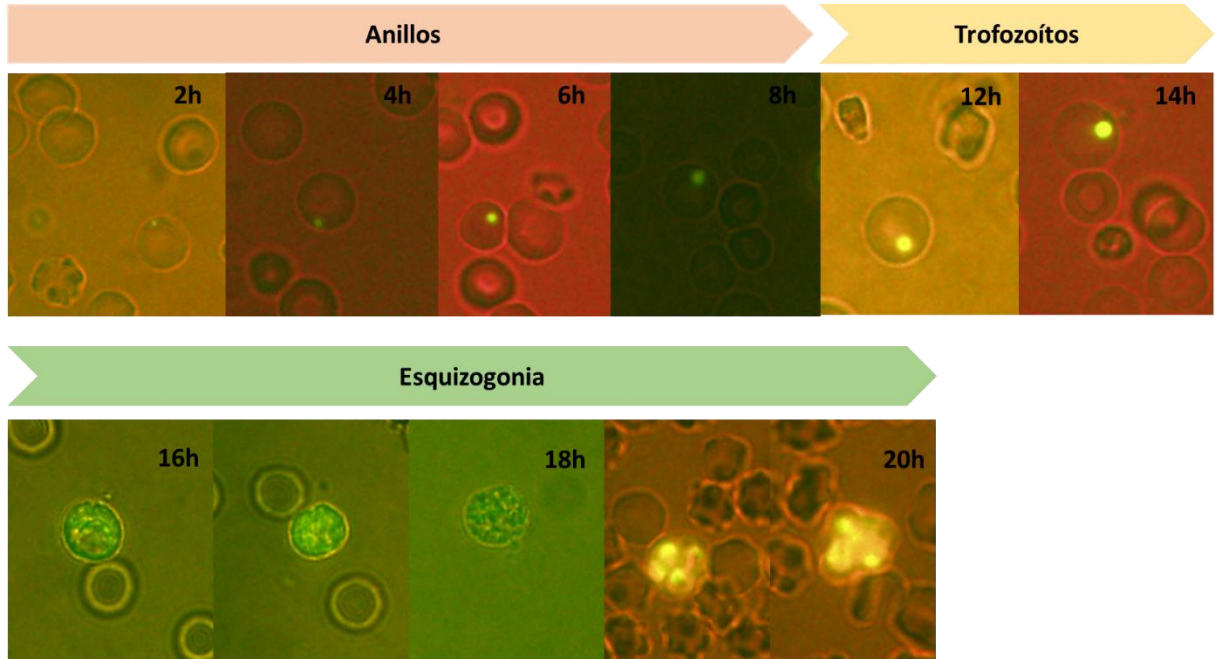
                *          460          *          480          *          500          *          520          *          540
Pv_AMA1 : CNCVEKRAEIKENNVVIKEEFRDYENGEEKSNKQMLLIIIGITGGVCVVALASMA YFRKKANNKYDKMDQAEGYGKPTTRKDEMLDP : 538
Py_AMA1 : CSCVEQRQYIAENNDVVIKEEFIGDYENPKQK----LLIIIVLIGVGIIIVILLVAYYFKSGKKGENYDRMGQADDYGKSKSRKDEMLDP : 533

                *          560
Pv_AMA1 : EASFWGEDKRASH TTPVLMKPY Y : 562
Py_AMA1 : EVSFWGEDKRASH TTPVLMKPY Y : 557

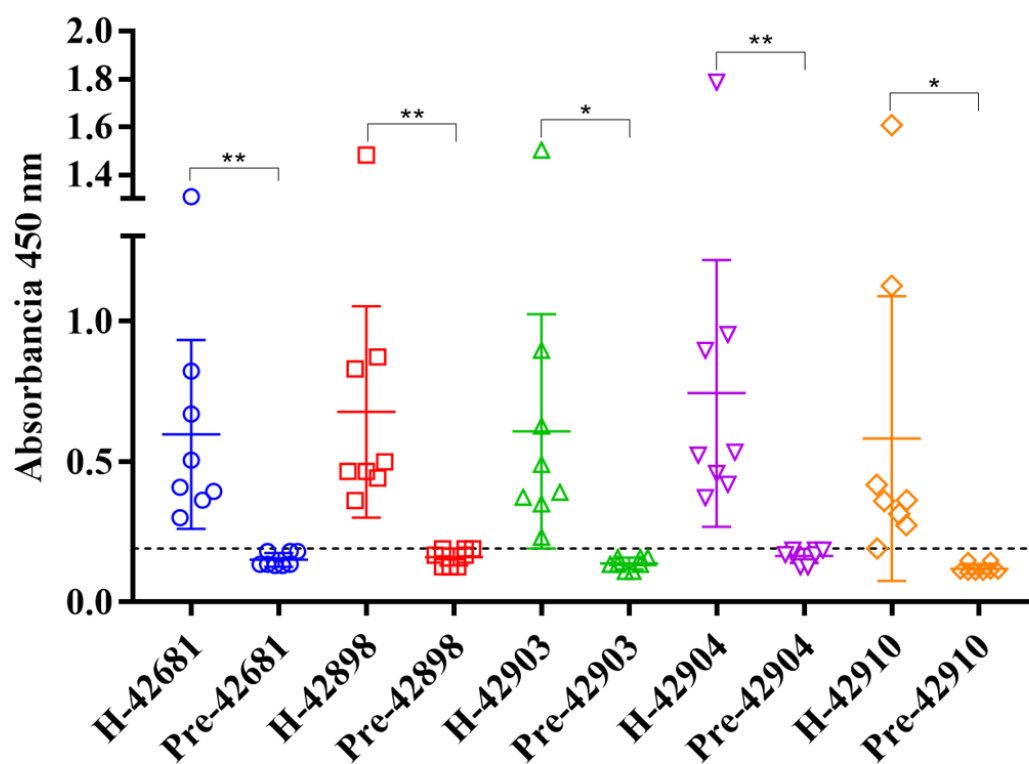
```

Alineamiento múltiple de las secuencias de AMA-1 de *P. yoelii* (*PyAMA-1*) y *P. vivax* (*PvAMA-1*). Residuos resaltados en color azul claro (similitud). Residuos resaltados en color azul oscuro corresponden a cisteínas que participan en el plegamiento de la proteína. Regiones mínimas de unión resaltadas en color gris oscuro. Barras azules demarcan los segmentos predichos como epítomos B (puntaje >0,45) con la herramienta Bepipred 2.0. Para este alineamiento, se utilizó el software GeneDoc 2.7.

Anexo 3. Morfología y desarrollo intracelular del parásito evaluado mediante tinción con naranja de acridina. Microscopía de fluorescencia (100X). Ventana de tiempo de 2 horas.

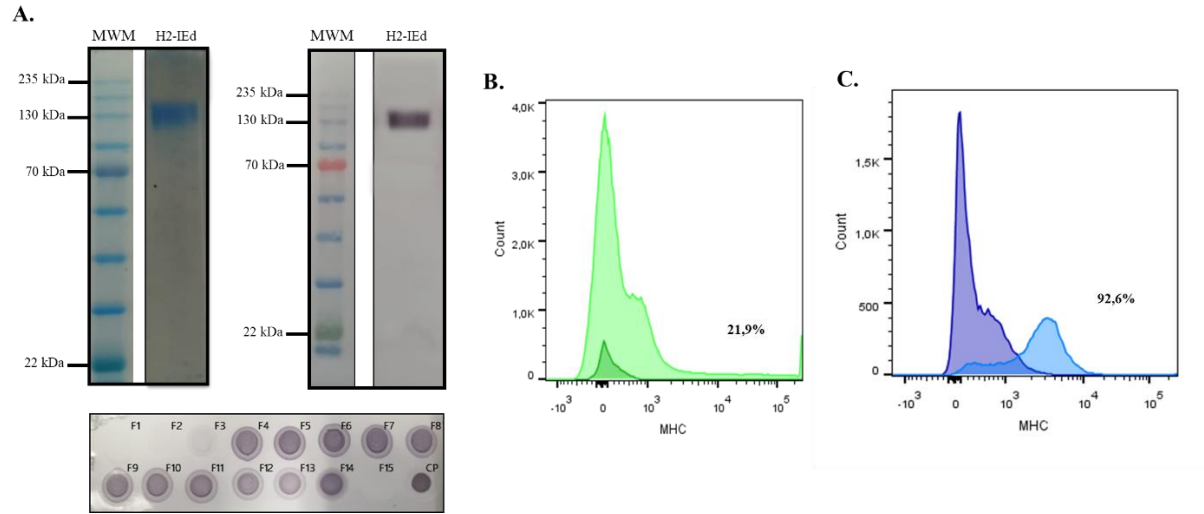


Anexo 4. Antigenicidad de péptidos nativos enfrentados a sueros de ratones infectados experimentalmente.



Capacidad antigénica de los HABPs enfrentados a sueros obtenidos de ratones BALB/c infectados experimentalmente. (H) Suero hiperinmune; (Pre) Suero preinmune. Línea de corte 0,0895 (línea punteada). Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando test de Mann-Whitney U comparando los resultados entre grupos expuestos y no expuestos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p = 0,0005$).

Anexo 5. Calidad e integridad de moléculas H2-IE^d.



Obtención de moléculas H2-IE^d. (A) Calidad e Integridad de la molécula H2-IE^d obtenida de células PAI. (B) Reconocimiento de moléculas MHC utilizando anti-HLA dirigido contra células de humano. (C) Reconocimiento de moléculas MHC utilizando anti-HLA dirigido contra células de ratón.

Anexo 6. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ de memoria (CD44⁺ CD62L⁺) estimuladas con proteínas de lisado de *Plasmodium yoelii* 17XNL.

| Porcentaje de linfocitos T | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|--------------|---------------|-------------|--------------|---------------|
| 43643 | | | 43644 | | | 42681 | | | |
| Individuo | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ |
| R01 | 41,1 | 0,19 | 8,605 | 46,4 | 1,58 | 2,905 | 45,25 | 38,95 | 7,675 |
| R02 | 63,2 | 0,25 | 17,45 | 34,55 | 0,92 | 7,2 | 40,15 | 36 | 6,15 |
| R03 | 25,61 | 0,37 | 5,39 | 47,8 | 0,765 | 4,02 | 43,65 | 37,65 | 10,95 |
| R04 | 20,9 | 0,245 | 17 | 46,4 | 0,395 | 4,755 | 38,8 | 34,45 | 15,45 |
| 43645 | | | 43646 | | | 42903 | | | |
| Individuo | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ |
| R01 | 21 | 10,26 | 13,93 | | | | 13,16 | 9,025 | 13,25 |
| R02 | 34,51 | 7,36 | 16,15 | | | | 12,53 | 2,44 | 10,85 |
| R03 | 21,34 | 2,665 | 3,475 | | | | 11,975 | 3,275 | 12,9 |
| R04 | 29,365 | 9,855 | 10,33 | | | | 21,24 | 2,895 | 8,745 |
| 43647 | | | 43648 | | | 42904 | | | |
| Individuo | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ | CD4+ | CD44+ | CD62L+ |
| R01 | 23,185 | 12,9 | 17,25 | 20,605 | 1,865 | 4,21 | 13,9 | 10,75 | 1,79 |
| R02 | 26,405 | 6,375 | 9,585 | 20,98 | 0,865 | 6,74 | 12,185 | 5,9 | 14,5 |
| R03 | 23,995 | 7,195 | 11,5 | 23,07 | 3,07 | 10,13 | 17,19 | 5,615 | 12,35 |
| R04 | 24,045 | 6,09 | 9,17 | 12,84 | 5,69 | 14,2 | 11,675 | 2,22 | 7,9 |

Bibliografía

1. WHO. World malaria report 2021. World Health Organization; 2021.
2. Dutta S, Tewari A, Balaji C, Verma R, Moitra A, Yadav M, et al. Strain-transcending neutralization of malaria parasite by antibodies against Plasmodium falciparum enolase. *J Malaria journal*. 2018;17(1):304.
3. WHO. World malaria report 2018. World Health Organization; 2018.
4. De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *J Drug discovery today*. 2006;11(5-6):203-9.
5. Hill AV. Vaccines against malaria. *J Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;366(1579):2806-14.
6. Mahmoudi S, Keshavarz H. Malaria Vaccine Development: The Need for Novel Approaches: A Review Article. *J Iranian journal of parasitology*. 2018;13(1):1.
7. Casares S, Brumeanu T-D, Richie TL. The RTS, S malaria vaccine. *J The Lancet*. 2010;28(31):4880-94.
8. Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, et al. Efficacy of RTS, S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *J New England Journal of Medicine*. 2008;359(24):2521-32.
9. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Awuondo KO, Leach A, et al. Four-year efficacy of RTS, S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *J New England Journal of Medicine*. 2013;368(12):1111-20.
10. Dattoo MS, Natama MH, Somé A, Traoré O, Rouamba T, Bellamy D, et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2021;397(10287):1809-18.
11. Mueller I, Shakri AR, Chitnis CE. Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. *J Vaccine*. 2015;33(52):7489-95.
12. Posteraro B, Pastorino R, Di Giannantonio P, Ianuale C, Amore R, Ricciardi W, et al. The link between genetic variation and variability in vaccine responses: systematic review and meta-analyses. *J Vaccine*. 2014;32(15):1661-9.
13. Li Z-K, Nie J-J, Li J, Zhuang H. The effect of HLA on immunological response to hepatitis B vaccine in healthy people: a meta-analysis. *J Vaccine*. 2013;31(40):4355-61.
14. Ovsyannikova IG, Pankratz VS, Vierkant RA, Pajewski NM, Quinn CP, Kaslow RA, et al. Human leukocyte antigens and cellular immune responses to anthrax vaccine adsorbed. *J Infection immunity*. 2013;81(7):2584-91.
15. Moss AJ, Gaughran FP, Karasu A, Gilbert AS, Mann AJ, Gelder CM, et al. Correlation between human leukocyte antigen class II alleles and HAI titers detected post-influenza vaccination. *J PLoS One*. 2013;8(8):e71376.
16. Nielsen C, Vekemans J, Lievens M, Kester K, Regules J, Ockenhouse C. RTS, S malaria vaccine efficacy and immunogenicity during Plasmodium falciparum challenge is associated with HLA genotype. *J Vaccine*. 2018;36(12):1637-42.

17. Tubo NJ, Pagán AJ, Taylor JJ, Nelson RW, Linehan JL, Ertelt JM, et al. Single naive CD4⁺ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell*. 2013;153(4):785-96.
18. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *J Accounts of chemical research*. 2008;41(3):377-86.
19. Patarroyo ME, Bermúdez A, Alba MP, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche LA, et al. IMPIPS: the immune protection-inducing protein structure concept in the search for steric-electron and topochemical principles for complete fully-protective chemically synthesised vaccine development. *J PLoS One*. 2015;10(4):e0123249.
20. Céspedes N, Arévalo-Herrera M, Felger I, Reed S, Kajava AV, Corradin G, et al. Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. *J Vaccine*. 2013;31(42):4923-30.
21. Silva-Flannery LM, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. Recombinant peptide replicates immunogenicity of synthetic linear peptide chimera for use as pre-erythrocytic stage malaria vaccine. *J Microbes infection*. 2009;11(1):83-91.
22. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, Nussenzweig RS. The use of multiple antigen peptides in the analysis and induction of protective immune responses against infectious diseases. *Advances in immunology*. 60: Elsevier; 1995. p. 105-49.
23. Nardelli B, Tam JP. The MAP system. *Vaccine Design*: Springer; 1995. p. 803-19.
24. Marussig M, Rénia L, Motard A, Miltgen F, Pétour P, Chauhan V, et al. Linear and multiple antigen peptides containing defined T and B epitopes of the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein: antibody-mediated protection and boosting by sporozoite infection. *J International immunology*. 1997;9(12):1817-24.
25. Herrington DA, Clyde DF, Lososky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Nature*. 1987;328(6127):257.
26. Tetteh KK, Polley SD. Progress and challenges towards the development of malaria vaccines. *J BioDrugs*. 2007;21(6):357-73.
27. Malkin E, Dubovsky F, Moree M. Progress towards the development of malaria vaccines. *J Trends in parasitology*. 2006;22(7):292-5.
28. Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, Aidoo M, et al. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism. *J Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1998;279(5354):1173-7.
29. Sabet LP, Taheri T, Memarnejadian A, Azad TM, Asgari F, Rahimnia R, et al. Immunogenicity of multi-epitope DNA and peptide vaccine candidates based on core, E2, NS3 and NS5B HCV epitopes in BALB/c mice. 2014;14(10).
30. Jackson D, Purcell A, Fitzmaurice C, Zeng W, Hart DJCdt. The central role played by peptides in the immune response and the design of peptide-based vaccines against infectious diseases and cancer. 2002;3(2):175-96.
31. Rodrigues-da-Silva RN, Correa-Moreira D, Soares IF, de-Luca PM, Totino PRR, Morgado FN, et al. Immunogenicity of synthetic peptide constructs based on PvMSP9E795-A808, a linear B-cell epitope of the *P. vivax* Merozoite Surface Protein-9. 2019;37(2):306-13.
32. Cease KB, Berkower I, York-Jolley J, Berzofsky JJJoEM. T cell clones specific for an amphipathic alpha-helical region of sperm whale myoglobin show differing fine

specificities for synthetic peptides. A multiview/single structure interpretation of immunodominance. 1986;164(5):1779-84.

33. Avendaño C, Jenkins M, Méndez-Callejas G, Oviedo J, Guzmán F, Patarroyo MA, et al. Cryptosporidium spp. CP15 and CSL protein-derived synthetic peptides' immunogenicity and in vitro seroneutralisation capability. 2018;36(45):6703-10.

34. Deans JA, Alderson T, Thomas A, Mitchell G, Lennox E, Cohen S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of Plasmodium knowlesi. J Clinical experimental immunology. 1982;49(2):297.

35. Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit Plasmodium knowlesi invasion of erythrocytes. J Molecular biochemical parasitology. 1984;13(2):187-99.

36. Mitchell G, Thomas A, Margos G, Dluzewski A, Bannister L. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. J Infection immunity. 2004;72(1):154-8.

37. Silvie O, Franetich J-F, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites. J Journal of Biological Chemistry. 2004;279(10):9490-6.

38. Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, VanBuskirk KM, Adams JH. Erythrocyte-binding activity of Plasmodium yoelii apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. J Molecular biochemical parasitology. 2001;117(1):49-59.

39. Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. J Nature. 2011;473(7348):463.

40. SIVIGILA. Boletín Epidemiológico Semanal (SEMANA 40). INSTITUTO NACIONAL DE SALUD - COLOMBIA 2022.

41. Killick-Kendrick R. Parasitic protozoa of the blood of rodents: I: The life-cycle and zoogeography of Plasmodium berghei nigeriensis subsp. nov. J Annals of Tropical Medicine Parasitology 1973;67(3):261-77.

42. Landau I, Michel J, Adam J-P, Boulard Y. The life cycle of Plasmodium vinckei lentum subsp. nov. in the laboratory; comments on the nomenclature of the murine malaria parasites. J Annals of Tropical Medicine Parasitology. 1970;64(3):315-23.

43. Klein E. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. J International journal of antimicrobial agents. 2013;41(4):311-7.

44. Killick-Kendrick R. Parasitic protozoa of the blood of rodents: a revision of Plasmodium berghei. J Parasitology. 1974;69(2):225-37.

45. Beale G, Carter R, Walliker D, Killick-Kendrick R, Peters W. Rodent malaria. Genetics: Academic Press London; 1978. p. 213-45.

46. Otto TD, Böhme U, Jackson AP, Hunt M, Franke-Fayard B, Hoeijmakers WA, et al. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. J BMC biology. 2014;12(1):86.

47. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. J Nature Reviews Immunology. 2008;8(8):607.

48. Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. J Nature Reviews Immunology. 2010;10(6):403.

49. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. J Immunology. 2010;131(1):9-17.

50. Denzin LK, Fallas JL, Prendes M, Yi W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *J Immunological reviews*. 2005;207(1):279-92.
51. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *J Nature Reviews Immunology*. 2011;11(12):823.
52. Nardin E, Zavala F, Nussenzweig V, Nussenzweig R. Pre-erythrocytic malaria vaccine: mechanisms of protective immunity and human vaccine trials. *Parasitologia*. 1999;41(1-3):397-402.
53. Chia WN, Goh YS, Rénia L. Novel approaches to identify protective malaria vaccine candidates. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:586.
54. Consortium MS. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999;401:921-3.
55. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Advances in parasitology*. 81: Elsevier; 2013. p. 77-131.
56. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *J Nature immunology*. 2008;9(7):725.
57. Singh SP, Mishra BN. Major histocompatibility complex linked databases and prediction tools for designing vaccines. *Human immunology*. 2016;77(3):295-306.
58. Abascal F, Zardoya R, Telford MJ. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic acids research*. 2010;38(suppl_2):W7-W13.
59. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *J Nucleic acids research*. 2004;32(5):1792-7.
60. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *J Molecular biology evolution* 2017;34(12):3299-302.
61. Zhang J, Rosenberg HF, Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *J Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(7):3708-13.
62. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. *J Mammalian protein metabolism*. 1969;3(21):132.
63. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *J Molecular biology evolution*. 2006;23(10):1891-901.
64. Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *J Bioinformatics*. 2010;26(19):2455-7.
65. Kosakovsky Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *J Molecular biology evolution*. 2005;22(5):1208-22.
66. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Pond SLK. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *J PLoS genetics*. 2012;8(7):e1002764.
67. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, et al. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *J Molecular biology evolution*. 2013;30(5):1196-205.

68. Garzón-Ospina D, Forero-Rodríguez J, Patarroyo MA. Inferring natural selection signals in *Plasmodium vivax*-encoded proteins having a potential role in merozoite invasion. *J Infection, Genetics Evolution* 2015;33:182-8.
69. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*. 2017;45(W1):W24-W9.
70. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of American Chemical Society*. 1963;85:2149 - 54.
71. Rabelo L, Monteiro N, Serquiz R, Santos P, Oliveira R, Oliveira A, et al. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. *Marine drugs*. 2012;10(4):727-43.
72. Nillni EA, Londner MV, Spira DT. A simple method for separation of uninfected erythrocytes from those infected with *Plasmodium berghei* and for isolation of artificially released parasites. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1981;64(3):279-84.
73. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W296-W303.
74. Vulliez-Le Normand B, Saul FA, Hoos S, Faber BW, Bentley GA. Cross-reactivity between apical membrane antigen 1 and rhoptry neck protein 2 in *P. vivax* and *P. falciparum*: A structural and binding study. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183198.
75. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2013;3(2):198-210.
76. Case DA, Cheatham III TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz Jr KM, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry*. 2005;26(16):1668-88.
77. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018;154(3):394-406.
78. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *Journal of proteome research Immunology*. 2020;19(6):2304-15.
79. Giguère S, Drouin A, Lacoste A, Marchand M, Corbeil J, Laviolette F. MHC-NP: predicting peptides naturally processed by the MHC. *Journal of immunological methods*. 2013;400:30-6.
80. Shen Y, Maupetit J, Derreumaux P, Tufféry P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *Journal of chemical theory computation*. 2014;10(10):4745-58.
81. Yepes-Pérez Y, López C, Suárez CF, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax* Pv 12 B-cell epitopes and HLA-DRβ1*-dependent T-cell epitopes in vitro antigenicity. *PloS one*. 2018;13(9):e0203715.
82. Rodríguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate molecular interactions of *P. falciparum* merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. *Chem Rev*. 2008;108(9):3656-705.

83. Cuy-Chaparro L, Bohorquez MD, Arevalo-Pinzon G, Castaneda-Ramirez JJ, Suarez CF, Pabon L, et al. Babesia Bovis Ligand-Receptor Interaction: AMA-1 Contains Small Regions Governing Bovine Erythrocyte Binding. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
84. Arevalo-Pinzon G, Bermudez M, Hernandez D, Curtidor H, Patarroyo MA. Plasmodium vivax ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain I contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Sci Rep.* 2017;7(1):9616.
85. Curtidor H, Patiño LC, Arévalo-Pinzón G, Vanegas M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Plasmodium falciparum rhoptry neck protein 5 peptides bind to human red blood cells and inhibit parasite invasion. *Peptides.* 2014;53:210-7.
86. Gonzales SJ, Reyes RA, Braddom AE, Batugedara G, Bol S, Bunnik EM. Naturally acquired humoral immunity against Plasmodium falciparum malaria. *Frontiers in immunology.* 2020;11:594653.
87. Rogers KJ, Vijay R, Butler NS. Anti-malarial humoral immunity: the long and short of it. *Microbes Infection immunity.* 2021;23(4-5):104807.
88. Srinivasan P, Ekanem E, Diouf A, Tonkin ML, Miura K, Boulanger MJ, et al. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(28):10311-6.
89. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *Journal of proteome research.* 2020;19(6):2304-15.
90. Patarroyo ME, Bermúdez A, Alba MP, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche LA, et al. IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electronic and Topochemical Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. *PloS one.* 2015;10(4):e0123249.
91. Stephens R, Langhorne J. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS pathogens.* 2010;6(11):e1001208.
92. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature.* 2002;419(6906).
93. Patarroyo ME, Alba MP, Reyes C, Rojas-Luna R, Patarroyo MA. The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures. *Curr Issues Mol Biol.* 2015;18:11-20.
94. Baquero LA, Moreno-Pérez DA, Garzón-Ospina D, Forero-Rodríguez J, Ortiz-Suárez HD, Patarroyo MA. PvGAMA reticulocyte binding activity: predicting conserved functional regions by natural selection analysis. *Parasites & vectors.* 2017;10(1):1-11.
95. Camargo-Ayala PA, Garzón-Ospina D, Moreno-Pérez DA, Ricaurte-Contreras LA, Noya O, Patarroyo MA. On the evolution and function of Plasmodium vivax reticulocyte binding surface antigen (pvrbsa). *Frontiers in genetics.* 2018;9:372.
96. Ricaurte-Contreras LA, Lovera A, Moreno-Pérez DA, Bohórquez MD, Suárez CF, Gutiérrez-Vásquez E, et al. Two 20-Residue-Long Peptides Derived from Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 10 EGF-Like Domains Are Involved in Binding to Human Reticulocytes. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(4):1609.
97. Chua CY, Lee PC, Lau TY. Analysis of polymorphisms and selective pressures on ama1 gene in Plasmodium knowlesi isolates from Sabah, Malaysia. *Journal of genetics.* 2017;96(4):653-63.

98. Dias S, Somarathna M, Manamperi A, Escalante AA, Gunasekera AM, Udagama PV. Evaluation of the genetic diversity of domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine*. 2011;29(43):7491-504.
99. Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, VanBuskirk KM, Adams JH. Erythrocyte-binding activity of Plasmodium yoelii apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;117(1):49-59.
100. Dutta S, Haynes JD, Barbosa A, Ware LA, Snavely JD, Moch JK, et al. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of Plasmodium falciparum. *J Infection immunity*. 2005;73(4):2116-22.
101. Arévalo-Pinzón G, Bermúdez M, Hernández D, Curtidor H, Patarroyo MA. Plasmodium vivax ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain I contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-13.
102. Urquiza M, Suarez JE, Cardenas C, Lopez R, Puentes A, Chavez F, et al. Plasmodium falciparum AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. *Vaccine*. 2000;19(4-5):508-13.
103. Chaianantakul N, Sungkapong T, Supatip J, Kingsang P, Kamlaithong S, Suwanakitti N. Antimalarial effect of cell penetrating peptides derived from the junctional region of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Peptides*. 2020;131:170372.
104. Rodríguez J, Bernal P, Prieto S, Correa C. Teoría de péptidos de alta unión de malaria al glóbulo rojo: predicciones teóricas de nuevos péptidos de unión y mutaciones teóricas predictivas de aminoácidos críticos. *Inmunología*. 2010;29(1):7-19.
105. Willimsky G, Beier C, Immisch L, Papafotiou G, Scheuplein V, Goede A, et al. In vitro proteasome processing of neo-splicetopes does not predict their presentation in vivo. *Elife*. 2021;10:e62019.
106. Caro-Aguilar I, Lapp S, Pohl J, Galinski MR, Moreno A. Chimeric epitopes delivered by polymeric synthetic linear peptides induce protective immunity to malaria. *Microbes infection*. 2005;7(13):1324-37.
107. Caro-Aguilar I, Rodríguez A, Calvo-Calle JM, Guzmán F, De la Vega P, Patarroyo ME, et al. Plasmodium vivax promiscuous T-helper epitopes defined and evaluated as linear peptide chimera immunogens. *Infection immunity*. 2002;70(7):3479-92.
108. Lin S-I, Huang M-H, Chang Y-W, Chen I-H, Roffler S, Chen B-M, et al. Chimeric peptide containing both B and T cells epitope of tumor-associated antigen L6 enhances anti-tumor effects in HLA-A2 transgenic mice. *Cancer Letters*. 2016;377(2):126-33.
109. Vigneron N, Ferrari V, Stroobant V, Abi Habib J, Van den Eynde BJ. Peptide splicing by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(51):21170-9.
110. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*. 2015;3(2):320-43.
111. White W, Evans C, Taylor D. Antimalarial antibodies of the immunoglobulin G2a isotype modulate parasitemias in mice infected with Plasmodium yoelii. *Infection immunity*. 1991;59(10):3547-54.
112. Grey HM, Hirst JW, Cohn M. A new mouse immunoglobulin: IgG3. *The Journal of experimental medicine*. 1971;133(2):289-304.
113. Berenzon D, Schwenk RJ, Letellier L, Guebre-Xabier M, Williams J, Krzych U. Protracted protection to Plasmodium berghei malaria is linked to functionally and

phenotypically heterogeneous liver memory CD8⁺ T cells. *The Journal of Immunology*. 2003;171(4):2024-34.

114. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, van Gemert GJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(5):468-77.

115. Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical Vaccine Immunology*. 2002;9(6):1145-52.

116. Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infection Immunity* 1996;64(1):44-9.

117. Lacerda-Queiroz N, Riteau N, Eastman RT, Bock KW, Orandle MS, Moore IN, et al. Mechanism of splenic cell death and host mortality in a *Plasmodium yoelii* malaria model. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.

118. Wu J, Tian L, Yu X, Pattaradilokrat S, Li J, Wang M, et al. Strain-specific innate immune signaling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(4):E511-E20.

119. Kaumaya PT, Foy KC. Peptide vaccines and peptidomimetics targeting HER and VEGF proteins may offer a potentially new paradigm in cancer immunotherapy. *Future oncology*. 2012;8(8):961-87.

120. Kaumaya PT, Kobs-Conrad S, Seo YH, Lee H, Vanbuskirk AM, Feng N, et al. Peptide vaccines incorporating a 'promiscuous' T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity. *Journal of Molecular Recognition*. 1993;6(2):81-94.

121. Lu Y, Li Z, Teng H, Xu H, Qi S, He Ja, et al. Chimeric peptide constructs comprising linear B-cell epitopes: application to the serodiagnosis of infectious diseases. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-11.

122. Khan MT, Islam MJ, Parihar A, Islam R, Jerin TJ, Dhote R, et al. Immunoinformatics and molecular modeling approach to design universal multi-epitope vaccine for SARS-CoV-2. *Informatics in medicine unlocked*. 2021;24:100578.

123. Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi-Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4⁺ T help in BALB/c mice. *PloS one*. 2015;10(11):e0142563.

124. Alexander J, Fikes J, Hoffman S, Franke E, Sacci J, Appella E, et al. The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. *Immunologic research*. 1998;18(2):79-92.

125. Ahlborg N, Ling IT, Holder AA, Riley EMJI. Linkage of exogenous T-cell epitopes to the 19-kilodalton region of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 (MSP119) can enhance protective immunity against malaria and modulate the immunoglobulin subclass response to MSP119. *Infection immunity*. 2000;68(4):2102-9.

126. Graham CM, Barnett BC, Hartlmayr I, Burt DS, Faulkes R, Skehel JJ, et al. The structural requirements for class II (I-Ad)-restricted T cell recognition of influenza hemagglutinin: B cell epitopes define T cell epitopes. *European journal of immunology*. 1989;19(3):523-8.

127. Jang Y-S, Mikszta JA, Kim BS. T cell epitope recognition involved in the low-responsiveness to a region of hen egg lysozyme (46–61) in C57BL/6 mice. *Molecular immunology*. 1994;31(11):803-12.

128. Buus S, Colon S, Smith C, Freed JH, Miles C, Grey HM. Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986;83(11):3968-71.