



**EVALUACIÓN DE LA UNIÓN DE OCHO PÉPTIDOS DEL VIRUS  
SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO A LOS ALELOS MHC CLASE II:  
HLA -DR1 Y HLA - DR4.**

**Estudiantes:**

**MARITZA HERNANDEZ GONZALEZ  
YURY KATHERINE HERRERA GOMEZ**

**Asesor:**

**LUIS EDUARDO VARGAS DIAZ**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ D.C  
2018**

*A Dios por permitirnos cumplir con este sueño,  
A nuestros padres por su apoyo incondicional y  
A todos aquellos que hicieron de este trabajo realidad*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al Doctor Carlos Alberto Parra director de Posgrados y coordinador del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por abrirnos las puertas de su laboratorio y permitirnos desarrollar la parte experimental de este trabajo.

Al Doctor Miguel Hernando Parra del Departamento de Microbiología de la Universidad de los Andes y a sus estudiantes Alix Natalia Esguerra Rodríguez y María Paula Munévar Villamizar, por facilitarnos los ocho péptidos del virus sincitial respiratorio humano evaluados.

De manera especial, agradecemos al profesor Luis Eduardo Vargas por hacer realidad este trabajo, por su tiempo, dedicación, guía y esfuerzo en todo momento. Por las experiencias vividas, los conocimientos adquiridos y las palabras de ánimo para continuar.

A nuestros padres por su compañía y apoyo para lograr culminar esta parte importante de nuestra carrera profesional.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>23</b>
4.1 Moléculas MHC clase II: Estructura, función y características de la unión HLA/ péptido.....	23
4.2 Virus sincitial respiratorio humano.....	28
4.2.1 Proteínas no estructurales.....	31
4.2.2 Proteína N.....	31
4.2.3 Proteína M.....	32
4.2.4 Proteína F.....	33
4.2.5 Proteína SH (Small Hydrophobic).....	36
4.2.6 Proteína G.....	38
4.2.7 Proteína L.....	40
4.2.8 Proteína P.....	42
4.3 Respuesta inmune frente al Virus Sincitial Respiratorio Humano.....	43
4.4 Manifestaciones clínicas y diagnóstico del VSRh.....	44
4.5 Epidemiología.....	44
4.6 Tratamiento y protección frente al VSRh.....	46
4.7 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).....	48
4.8 Algoritmo predictivo RAGHAVA-PROPRED.....	48
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>50</b>
5.1 Moléculas MHC clase II y HLA-DM.....	50
5.2 Péptido control biotinilado: Hemaglutinina (HA) 306-318.....	50
5.3 Péptidos del virus sincitial respiratorio.....	51
5.4 Determinación del porcentaje de unión empleando el algoritmo PROPRED.....	53

5.5 Ensayo de unión MHC clase II/ Péptidos.....	54
5.6 Ensayo de Unión MHC clase II/ Péptidos / HLA-DM.....	56
5.7 Determinación del porcentaje de unión relativo MHC clase II/péptido.....	56
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
6.1 Determinación del porcentaje de unión de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58 a los alelos HLA-DRB1* 0101 y HLA-DRB1*0401 empleando el algoritmo PROPRED.....	57
6.2 Determinación experimental de los porcentajes de unión relativos de péptidos del VSRh a moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.....	59
6.3 Comparación del porcentaje de unión de cada péptido con HLA-DR1 y HLA- DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.....	63
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de vacunas contra el VSRh en desarrollo.....	47
<b>Tabla 2.</b> Características de los 8 péptidos del Virus Sincitial Respiratorio evaluados.....	52
<b>Tabla 3.</b> Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1* 0101 empleando el algoritmo PROPRED.....	58
<b>Tabla 4.</b> Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1* 0401 empleando el algoritmo PROPRED.....	58
<b>Tabla 5.</b> Porcentajes de unión relativos de péptidos de VSRh a moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de las moléculas MHC clase II.....	24
<b>Figura 2.</b> Estructura tridimensional de las moléculas MHC clase II unidas a un ligando peptídico.....	25
<b>Figura 3.</b> Estructura del virus sincitial respiratorio.....	30
<b>Figura 4.</b> Ubicación y secuencia del péptido de la proteína N.....	32
<b>Figura 5.</b> Ubicación y secuencia del péptido de la proteína M.....	33
<b>Figura 6.</b> Estructura pre y post fusión de la proteína F.....	35
<b>Figura 7.</b> Ubicación y secuencia del péptido de la proteína de fusión.....	36
<b>Figura 8.</b> Ubicación y secuencia del péptido de la proteína SH.....	38
<b>Figura 9.</b> Ubicación y secuencia del péptido de la proteína G.....	40
<b>Figura 10.</b> Ubicación y secuencia del péptido 1 de la proteína L.....	41
<b>Figura 11.</b> Ubicación y secuencia del péptido 2 de la proteína L.....	41
<b>Figura 12.</b> Ubicación y secuencia del péptido 3 de la proteína L.....	42
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática del ensayo de unión MHC clase II /péptidos.....	55
<b>Figura 14.</b> Determinación del porcentaje de unión relativo HLA-DR1 HLA-DR4 /péptido.....	61
<b>Figura 15.</b> Determinación del porcentaje de unión relativo HLA-DR1 HLA-DR4 /péptido/ HLA-DM.....	62
<b>Figura 16.</b> Comparación del porcentaje de unión de cada péptido con HLA-DR1 y HLA- DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.....	66

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Dilución de los péptidos evaluados.....	90
<b>Anexo 2.</b> Composición del buffer de unión para las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4.....	91
<b>Anexo 3.</b> Protocolo para ensayos de unión.....	92
<b>Anexo 4.</b> Cálculos para obtener el porcentaje de unión de cada uno de los péptidos.....	93
<b>Anexo 5.</b> Desviación estándar del porcentaje de unión de cada péptido a los alelos HLA-DR en presencia y ausencia de DM.....	94
<b>Anexo 6.</b> Protocolo algoritmo PROPRED.....	95



## Lista de abreviaturas

- ARN:** Ácido Ribonucleico
- ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- ARNss-:** Ácido Ribonucleico Single Strand (cadena sencilla) negativo
- CLIP:** Class II-associated invariant chain peptide
- CPA:** Células Presentadoras de Antígeno
- CX3CR1:** Receptor de quimiocina CX3 1
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- EPC:** Enfermedad Pulmonar Crónica
- GAG:** Glicosaminoglicanos
- GSK:** GlaxoSmithKline
- HA:** Hemaglutinina
- HLA:** Human Leukocyte Antigen
- HLA-DR1:** Alelo DRB1\*0101
- HLA-DR4:** Alelo DRB1\* 0401
- HSPG:** Proteoglicanos de heparán sulfato
- ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular 1
- IEDB:** Base de datos de epítopes inmunes
- IEDB:** Base de datos de epítopes inmunes
- Ig:** Inmunoglobulina
- INF:** Interferón
- IRA:** Infección respiratoria aguda
- IRA:** Infecciones Respiratorias Agudas
- MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- RNP:** Ribonucleoproteína
- SH:** Small Hydrophobic
- TCR:** T cell Receptor
- TLR4:** Toll Like Receptor
- TNF:** Factor de Necrosis Tumoral
- VSRh:** Virus Sincitial Respiratorio Humano

## RESUMEN

Desde que el virus sincitial respiratorio humano (VSRh) fue descubierto, no ha sido posible el desarrollo de profilaxis asequibles que permitan el control de la infección y que a su vez disminuyan los efectos sanitarios y el impacto económico generado por el mismo. El desarrollo de la respuesta inmune adaptativa es uno de los campos que se ha venido explorando como alternativa a dicha problemática.

Es así que, la identificación de péptidos antigénicos capaces de formar complejos MHC clase II HLA-DR/péptido resulta de gran importancia como base para la búsqueda de una vacuna segura y eficaz. En este trabajo de investigación se evaluó la capacidad de unión de ocho péptidos provenientes de las proteínas F, L, N, M, G y SH del VSRh para formar complejo HLA-DR/péptido con los alelos HLA-DR1 Y HLA-DR4 del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Para ello se empleó el algoritmo PROPRED y un ensayo de unión competitiva en presencia y ausencia de HLA-DM.

Los resultados demuestran una correlación del 68% entre los datos teóricos y experimentales en ausencia de HLA-DM. Por otro lado, se observa que N-298 y L-962 son los péptidos de mayor afinidad por los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4, indicando que pueden ser inmunógenos capaces de generar una respuesta inmunitaria efectiva contra el VSRh en individuos HLA-DR1 o HLA-DR4. De manera similar, los resultados sugieren que los péptidos SH-50, G1-58 Y L-832 pueden tener un papel similar a HLA-DM en la modulación de la formación del complejo MHC clase II/péptido.

**Palabras clave:** Presentación de antígenos, selección de epítopes, complejo MHC II/péptido, susceptibilidad HLA-DM, algoritmos de unión a moléculas MHC clase II, moléculas HLA-DR1 y DR4.

## INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio humano (VSRh) es una de las principales causas de enfermedad del tracto respiratorio bajo en recién nacidos, niños y adultos mayores, especialmente en aquellos que presentan patologías neuromusculares, cardíacas o pulmonares crónicas de base<sup>1</sup>. La bronquiolitis y neumonía son las complicaciones con mayor número de casos reportados, causando hospitalización o incluso ingreso en unidad de cuidados intensivos<sup>2</sup>.

Este virus hace parte de la familia *Paramyxoviridae* y pertenece al grupo V en la clasificación Baltimore (ARNss-). Estructuralmente cuenta con una nucleocápside que contiene el material genético, y una envoltura de doble capa que adquiere al momento de ser liberado por la célula huésped<sup>3</sup>. El genoma viral codifica 11 proteínas a través de los siguientes genes: NS1-NS2-N-P-M-SH-F-G-M2-L en dirección 3' a 5' respectivamente. Las proteínas G y F son los mayores determinantes antigénicos del virus, por lo tanto son el objetivo principal de futuras vacunas<sup>4,5</sup>.

El desarrollo de nuevos estudios, en relación con el VSRh, no documentan una vacuna segura y eficaz que permita disminuir el impacto del mismo en salud pública, tanto en países en desarrollo como en países desarrollados. No obstante, hoy en día se dispone de un anticuerpo monoclonal (palivizumab) que ha demostrado ser eficaz en el control de la enfermedad, sin embargo, este es administrado en casos especiales y su costo es elevado<sup>5</sup>. De ahí que, alternativas que contribuyan al desarrollo de un tratamiento efectivo contra el virus deben ser exploradas.

Teniendo en cuenta que las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juegan un papel importante en el proceso de respuesta inmune (presentación de antígenos a células T), resulta muy útil determinar la capacidad de unión de péptidos con potencial inmunogénico a

moléculas MHC, para ello se han desarrollado algoritmos de predicción y metodologías in vitro (ensayos de unión) que permiten dilucidar la posible respuesta inmune que se puede generar frente a este tipo de péptidos en modelos in vivo. El uso de algoritmos de predicción, permite restringir el número de péptidos de una proteína de la cual se quiera conocer las fracciones de unión al MHC clase II. Esta metodología ofrece diversas ventajas frente a las técnicas más tradicionales, debido a su fácil manejo y bajo costo, además permiten la predicción mediante un conjunto de datos obtenidos a partir de ensayos experimentales, los cuales se encuentran almacenados en bases de datos. Los ensayos de unión por su parte, ofrecen un acercamiento experimental en la búsqueda de blancos terapéuticos contra diversos patógenos, como el virus sincitial respiratorio, pues es claro que las condiciones en que normalmente se desarrolla este tipo de procesos inmunológicos en un individuo tiene diversas determinantes y variables.

Por consiguiente, en el presente trabajo de investigación se empleó el algoritmo predictivo PROPRED y un ensayo de competencia para evaluar la capacidad de unión de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 del VSRh a los alelos MHC clase II: HLA -DRB1\*0101 Y HLA -DRB1\* 0401 (en este estudio se llamarán HLA-DR1 y HLA-DR4 respectivamente). A su vez, se estimó el efecto que ejerce la molécula HLA-DM en la formación del complejo MHC clase II/péptido. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por el Doctor Carlos Parra López.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la unión de 8 péptidos del Virus sincitial respiratorio Humano a los alelos MHC clase II: HLA -DR1 Y HLA - DR4.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Predecir valores de afinidad de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 por las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4 mediante el empleo del algoritmo PROPRED.

Determinar experimentalmente el porcentaje de unión relativo de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4.

Estimar cualitativamente la influencia de la molécula HLA- DM en la interacción de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El virus sincitial respiratorio es de gran relevancia a nivel de salud pública, ya que es uno de los principales agentes causantes de enfermedades del tracto respiratorio bajo en niños menores de 5 años <sup>6</sup>, ancianos <sup>7</sup>, pacientes inmunocomprometidos y con otras patologías de base, que afectan no solo la salud de la población en países en desarrollo, sino que también, generan un alto impacto a nivel económico en países desarrollados <sup>8</sup>. Según un informe epidemiológico reportado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia, durante el periodo 2012 - 2016 se presentaron un total de 6.826 casos de infección por el VSRh en menores de 5 años, siendo 2015 y 2016 los años con mayor número de casos identificados con 39,6% (2.704) y 31,2% (2.127) de los casos respectivamente <sup>9</sup>. Según el SIVIGILA para la semana epidemiológica número 50 del año 2017 el 37,8 % de muestras analizadas para virus respiratorios correspondió a VSRh<sup>10</sup>, así mismo a la semana epidemiológica 41 del año 2018 el porcentaje fue de 35%<sup>11</sup>, a estas cifras se suma el hecho que actualmente no se cuenta con una vacuna disponible en el mercado.

Diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de la inmunidad antiviral, pues se ha evidenciado que es un campo de investigación prometedor que permitirá en un futuro reducir las cifras de morbilidad y mortalidad a causa de la infección por el virus sincitial respiratorio humano <sup>12</sup>. Según Estupiñan y Trujillo, “la identificación de epítopes que generan activación de la respuesta inmune, es el objetivo principal de los nuevos candidatos a vacunas, dada la simplicidad para su síntesis, bajo costo y su capacidad para generar inmunidad frente a microorganismos complejos” <sup>13</sup>. De esa manera, se ha demostrado que la inmunogenicidad de epítopes, en especial de células T depende de tres pasos básicos: el procesamiento del antígeno, la unión del péptido a moléculas MHC, y el reconocimiento por un TCR afín, sin embargo, de estos tres eventos, la unión MHC-péptido es la más selectiva para determinar epítopes de células T <sup>14</sup>.

En Colombia, DRB1\*0101 y DRB1\*0401 son dos de los alelos del MHC clase II más frecuentes en la población<sup>15,16</sup> que han podido obtenerse de manera recombinante y que son funcionales para el desarrollo de ensayos de unión, otros alelos también se han obtenido por técnicas recombinantes, sin embargo presentan agregación lo que impide su uso en ensayos experimentales. Por tal razón, resulta importante para la identificación de péptidos del VSRh candidatos al desarrollo de respuesta inmune (celular y humoral), evaluar la unión de ocho péptidos de este virus a los alelos HLA-DR1 Y HLA-DR4 del MHC clase II, en presencia y ausencia de HLA-DM teniendo en cuenta que esta molécula juega un papel clave en la interacción MHC clase II/péptido<sup>17</sup>.

### 3. ANTECEDENTES

Uno de los métodos utilizados para evaluar la unión in vitro de moléculas MHC clase II /péptidos, han sido los ensayos de unión, puesto que son más prácticos y precisos que otro tipo de metodologías, un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Vargas y colaboradores, en donde se pudo comprobar la capacidad de unión de la secuencia MSP-1 a varios alelos HLA, cambiando un único aminoácido en la proteína de superficie del estadio merozoito del parásito *Plasmodium falciparum*. En este trabajo se determinó la especificidad de unión que adquirió el péptido 1585 a los alelos DRB1 \* 0101, -0401 y -1101 cuando el aminoácido lisina fue reemplazado por glicina en la posición 17, teniendo en cuenta que el péptido nativo únicamente se une al alelo HLA DRB1 \* 0102<sup>18</sup>.

Otro enfoque en el que se han empleado este tipo de ensayos, es en el aislamiento de células del sistema inmune específicas, entre ellas las células T CD4 de memoria. En un estudio ex vivo de células T CD4 específicas para el virus de la Hepatitis C, se logró el aislamiento de las mismas a partir de complejos de tetrámeros MHC clase II /péptidos. En este estudio, Day C y colaboradores, expresaron moléculas MHC clase II como precursores con un péptido CLIP (Péptido de la cadena invariante unido a MHC clase II) unido covalentemente, que podría intercambiarse de manera eficiente con péptidos virales. Los ensayos de unión se emplearon específicamente para determinar los péptidos del virus de la Hepatitis C más adecuados para la producción del tetrámero, realizando ensayos de competencia entre los péptidos del virus seleccionados (en diferentes concentraciones) y la Hemaglutinina (HA) biotinilada (del cual se tiene una referencia de unión estandarizada), además del aislamiento de células CD4 específicas para el virus de la hepatitis C<sup>19</sup>.

En un contexto más amplio, Yang Yu y colaboradores, emplearon dentro de su metodología, los ensayos de unión para determinar un nuevo antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de granulomas tuberculosos. Como



resultado se logró la identificación de un péptido de 34 aminoácidos llamado PKAp, que es capaz de generar respuesta inmune celular específica de esta bacteria, además de otros hallazgos que indican que PKAp tiene potencial como un nuevo biomarcador de antígeno para el desarrollo de vacunas <sup>20</sup>.

Igualmente, en un trabajo más reciente de Yin y colaboradores (2015), se emplearon ensayos de unión y fluorescencia de polarización (inmunoensayo competitivo que se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución) para evaluar los posibles mecanismos por los que la molécula HLA-DM cataliza la unión de péptidos a moléculas MHC clase II, demostrando que esta función de catalización por parte de HLA-DM es el resultado de la formación de un complejo intermediario con MHC II que une el péptido con una cinética más rápida a la observada en la unión MHC II/péptido en ausencia de HLA-DM<sup>21</sup>.

Por otra parte, en los años 60, en un intento por mejorar las condiciones de salud de la población a causa de la infección por el VSRh, se implementó el uso de una vacuna inactivada con formalina, la cual fue administrada intramuscularmente a un grupo de recién nacidos quienes presentaron una infección más grave cuando se expusieron al virus de forma natural, pues las hospitalizaciones fueron reiteradas en el grupo vacunado en comparación con los controles, además hubo dos muertes atribuidas a la vacuna <sup>12-22</sup>, a pesar que el nivel de anticuerpos neutralizantes séricos fue elevado, estos no fueron suficientes para proteger a los infantes frente a la infección con el virus <sup>23</sup>.

Actualmente el tratamiento frente a esta infección se basa en cuidados de apoyo para mejorar los síntomas, empleando suplementos de oxígeno y ventilación mecánica en los casos más severos de la enfermedad. Además, el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes específico para el sitio antigénico II en la glicoproteína de fusión del VSRh (Palivizumab) , es una medida inmuno-profiláctica utilizada en algunos países, especialmente en recién nacidos y personas con cardiopatías congénitas, sin embargo el costo que representa no está al alcance de toda la población <sup>23-24</sup>.

En cuanto a enfoques recientes para la generación de vacunas se incluyen el uso de virus modificados llamados 'knock-out' los cuales son virus atenuados pero aún inmunogénicos, y para ello se realiza la delección M2-2 mutante que favorece la transcripción proteica sobre la replicación del genoma, llevando a una mayor producción de proteínas, y a una producción limitada de virus. Los virus quiméricos atenuados naturalmente que combinan genes de virus relacionados con VSR como Sendai, virus parainfluenza y VSR bovino también están en desarrollo, sin embargo el desarrollo de vacunas atenuadas en vivo presenta desafíos significativos, particularmente cuando las vacunas se administran por vía respiratoria a recién nacidos. Una preocupación es que los virus con mutaciones pueden asociarse con la reversión a fenotipos patógenos y conducir a frecuencias incrementadas de reacciones adversas *in vivo*. También existe una dificultad relacionada con la fabricación y la distribución, ya que el VSRh es naturalmente sensible a los cambios de temperatura, y las cepas atenuadas por definición son difíciles de propagar a títulos elevados <sup>26</sup>.

Teniendo en cuenta el enfoque de este trabajo de investigación es preciso resaltar los estudios que se han realizado utilizando proteínas del virus y varias formulaciones de péptidos. Las proteínas que se han estudiado con mayor frecuencia son F y G, ya que cada una de ellas aparece en la partícula nativa del VSR y son objetivos importantes para anticuerpos neutralizantes y células T efectoras. De las dos moléculas, F está conservada y quizás sea más adecuada para inducir linfocitos que reaccionan de forma cruzada con antígenos de los grupos A y B del virus sincitial <sup>22</sup>. Este tipo de vacuna se emplearía para proteger a los adultos mayores de enfermedades graves y podría utilizarse a menudo con un coadyuvante el cual puede presentar proteínas virales, péptidos o epítopes neutralizantes con densidad aumentada para mejorar la unión con el receptor de linfocitos B. También se están desarrollando vacunas con proteínas virales (Proteínas F y G) para la inmunización durante el embarazo con el fin de aumentar la inmunidad pre existente y a su vez aumentar la transferencia de anticuerpos específicos vía

transplacentaria <sup>24</sup>. La vacuna PFP-2 (subunidad la proteína F) se ha administrado en ensayos clínicos fase I a 35 mujeres embarazadas, esta fue bien tolerada por las madres y no presento repercusiones contra el feto, sin embargo PFP-2 fue poco inmunógena, con escasa producción de anticuerpos neutralizantes<sup>27</sup>.

De esta manera, según Barbosa y colaboradores “hoy en día están en desarrollo 60 vacunas dirigidas precisamente a estos dos grupos de población y aunque la mayoría están en una fase preclínica, 16 de ellas ya están en la fase clínica. Novavax tiene ocho vacunas entre las fases uno y tres, Medimmune tiene cuatro entre las fases uno y dos b y GSK, cuatro en las fases uno y dos” <sup>12</sup>. Según un informe del Comité Asesor de Desarrollo de Productos para Vacunas de la OMS (PDVAC), en donde se destacó que el VSRh tiene una actividad clínica significativa, la vacuna Novavax que contiene nano partículas recombinantes de la proteína de fusión purificada del virus es la candidata más avanzada con un estudio de fase III en mujeres embarazadas que comenzó a finales del 2015. Immunovax también está desarrollando una vacuna para uso en personas de edad avanzada que contiene la proteína SH del virus<sup>28</sup>.

Finalmente, el desarrollo de métodos disponibles de uso predictivo de gran importancia para evaluar la capacidad de unión MHC/péptido mediante predicción cuantitativa ha crecido progresivamente; entre los cuales se encuentran; ARB, SVRMHC, MHCpred, NetMHCII. Otros métodos como SVMHC y PROPRED son implementaciones del algoritmo TEPITOPE, el cual permite predecir regiones de unión MHC clase II en una secuencia de antígenos usando matrices cuantitativas <sup>29,30</sup>. La base de datos SYFPEITHI de ligandos MHC y epítopes de células T y IEDB (base de datos de epítopes inmunes) son las dos fuentes principales <sup>31</sup>. La utilidad y las limitaciones de los algoritmos actuales disponibles en la web han sido evaluados en trabajos como el de Chaves y colaboradores, mediante la comparación de las

predicciones y los resultados obtenidos utilizando métodos puramente empíricos para el descubrimiento de epítopes <sup>32</sup>.

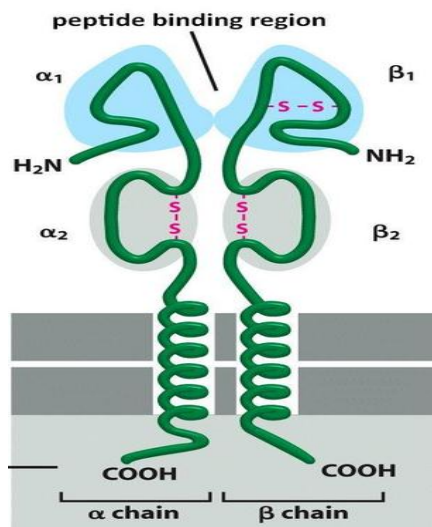
## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Moléculas MHC clase II: Estructura, función y características de la unión HLA/ péptido.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), es una familia de proteínas conocidas también como antígeno leucocitario humano (HLA), de las cuales se conocen 3 clases: MHC de clase I, II y III. Las moléculas MHC clase I poseen genes conservados entre sí, están presentes en células nucleadas y son reconocidos por las células T citotóxicas CD8 <sup>33</sup>. En lo que respecta a las moléculas MHC clase III, estas se encuentran involucradas en la codificación de proteínas del sistema de complemento y moléculas relacionadas con el proceso de inflamación <sup>34</sup>.

Las moléculas MHC clase II por su parte, son glicoproteínas de membrana que se expresan en células presentadoras de antígeno (CPA) tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas <sup>35</sup>, y se encargan de presentar péptidos derivados de antígenos extracelulares (procesamiento antigénico por vía endocítica) a linfocitos T CD4, en general, este tipo de proteínas están implicadas en la señalización celular y el reconocimiento inmunológico.

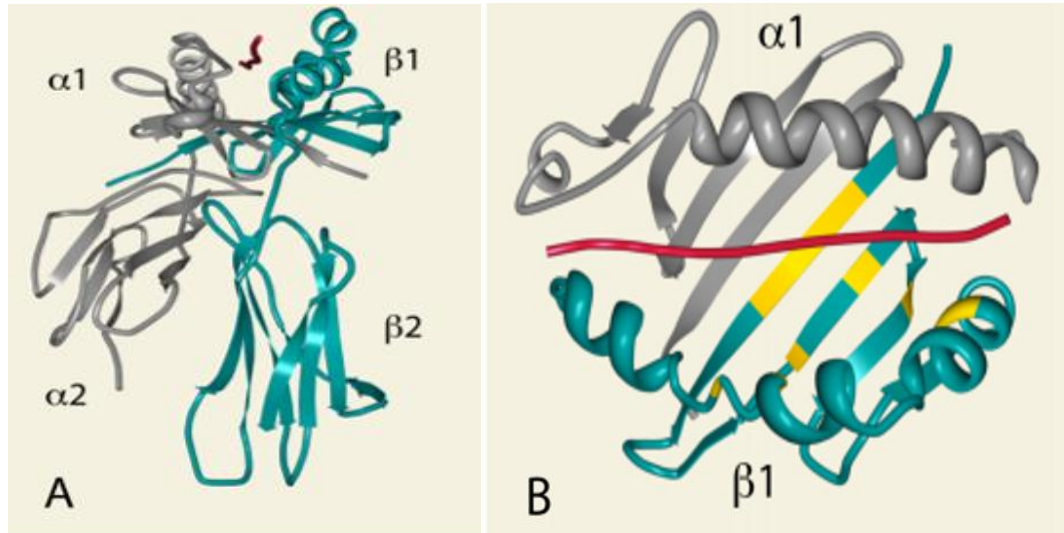
En cuanto a su estructura, las MHC clase II son heterodímeros (60.000 Dalton) constituidos principalmente por dos cadenas alfa y beta <sup>36</sup>, organizadas de tal manera que forman una hoja ligeramente curvada como base (8 hebras anti paralelas) y dos hélices  $\alpha$  en la parte superior, estas se encuentran lo suficientemente separadas para acomodar una cadena peptídica intermedia (Figura 1) <sup>33,29</sup>.



**Figura 1. Estructura de las moléculas MHC clase II.** Dominio globular que forma el surco de unión al péptido se encuentra sombreado de azul (extremo amino terminal), dominio similar a Ig se encuentra sombreado de gris, extremo carboxiterminal insertado en la membrana citoplasmática. Tomado de *Manlik O The University of new south wales 2015*<sup>37</sup>.

La región donde se ubica el péptido es denominado surco de unión, en las MHC clase II este surco se encuentra abierto es sus extremos permitiendo la unión de péptidos entre 8 y 20 aminoácidos, una cantidad mayor en comparación con el MHC clase I (8 y 12 aminoácidos)<sup>29</sup>. Dicha unión se caracteriza por la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos altamente conservados de la molécula MHC clase II y la “columna vertebral” del péptido, proporcionando así un tipo de interacción independiente de la secuencia peptídica<sup>38</sup>. Así mismo, la ubicación de los residuos de anclaje de cada péptido (cadenas laterales) en los bolsillos o “pockets” P1, P4, P6 y P9 (bolsillos principales) del MHC clase II. El tipo de interacción entre las cadenas laterales de los péptidos individuales con el MHC depende de la geometría, la distribución de carga, la depresión y la hidrofobicidad del surco de unión, por lo tanto la unión del péptido depende de la especificidad de cada bolsillo<sup>39</sup> (Figura 2), del mismo modo, el mayor grado de polimorfismo en estas moléculas se encuentra en los bolsillos de unión, lo

que permite que cada una de ellas se una a un repertorio diverso de péptidos  
40.



**Figura 2. Estructura tridimensional de las moléculas MHC clase II unidas a un ligando peptídico.** A) Vista lateral y B) vista superior de HLA-DR1 unida a un péptido de hemaglutinina HA<sub>306-318</sub> del virus Influenza. Cadena alfa (Gris), cadena Beta (Azul), péptido HA (Rojo), residuos altamente polimórficos en HLA-DR proximales al surco de unión del péptido (Amarillo) Tomado de *Blum Js, et al 2013 Annual Review of immunology 31.443.73.*

Las principales dificultades en la unión de péptidos a moléculas MHC clase II son: En primera instancia garantizar el acople de los péptidos al surco de unión de las moléculas MHC clase II, que dependerá entre otros factores de las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido, en este sentido se ha demostrado que el residuo de anclaje en la posición P1 es obligatorio para lograr una unión de alta afinidad. Los aminoácidos Metionina (M), Fenilalanina (F), Isoleucina (I), Leucina (L), Valina (V), Triptófano (W) y Tirosina (Y) son aglutinantes de alta afinidad al bolsillo P1, por lo tanto de acuerdo con Sturniolo y colaboradores solo estos aminoácidos están permitidos en dicha posición. Por otro lado, también es necesario evitar la repulsión eléctrica, dada por las cargas eléctricas iguales, y mantener una estabilidad en el acople del péptido,

para así generar prolongados tiempos en la presentación del antígeno, y a su vez desarrollar una memoria inmunológica adecuada <sup>41</sup>.

Por otro lado, las moléculas HLA-II se clasifican a su vez en DR, DP y DQ y son denominadas comúnmente como moléculas clásicas al expresarse constitutivamente sobre la superficie de CPA. A pesar que la presentación de antígenos puede estar regulada por cualquiera de estos alelos, HLA-DR se expresa en mayor proporción sobre la superficie celular <sup>42,13</sup>.

HLA-DR presenta 4 bolsillos principales (P1, P4, P6, y P9), siendo el bolsillo P1 clave para la unión MHC clase II /péptido. P1 es el bolsillo más prominente y consta de un subsitio hidrofóbico grande ubicado a un extremo del surco de unión, está formado por residuos de la cadena alfa y beta. El mayor polimorfismo de las moléculas DR se encuentran en la cadena beta 1, siendo esta un blanco de investigación, pues el entendimiento de su composición estructural, permite predecir de manera más adecuada la interacción que puede tener con una diversidad de péptidos. Por ejemplo, el alelo HLA-DR, tiene dos clases de especificidades dependiendo de los aminoácidos ubicados en la posición 86 de la cadena Beta. Cada alotipo DR $\beta$ , tiene glicina o valina en la posición 86. Cuando es glicina como en el caso de HLA-DR1, el bolsillo prefiere residuos aromáticos o alifáticos (Y, F, W, L, I, M, V, A). En contraste, cuando el residuo en la posición 86 es valina, al ser un residuo más voluminoso se reduce el tamaño del bolsillo prefiriendo así residuos alifáticos más pequeños<sup>38,43</sup>. Por su parte P4 tiene una preferencia por residuos alifáticos (I,L,V,A), sin embargo no es un requerimiento, mientras que P6 tiene preferencia por residuos pequeños, polares o neutros especialmente alanina o Glicina, en cuanto a P9, el tipo de aminoácido puede variar (L,A,I,V,N,F,Y,M,W)<sup>38,44</sup>

El bolsillo P1 del alelo HLA-DR4 tiene gran afinidad por aminoácidos como fenilalanina, leucina y valina; el bolsillo P6 puede acomodar residuos de



treonina, asparagina o serina <sup>38</sup>, mientras que el bolsillo P9 interactúa mejor con asparagina, glutamina, serina y treonina <sup>33,44,45</sup>.

Estas moléculas se conocieron inicialmente como antígenos capaces de medir la enfermedad injerto contra huésped <sup>46</sup>, debido a su capacidad de generar pérdida del injerto en los primeros seis meses. Además, son consideradas las más polimórficas y predominantes en el ser humano, lo cual representa una de las mayores dificultades para el diseño de péptidos-vacuna con suficiente capacidad de acople <sup>47</sup>. Su importancia radica en la selección de linfocitos T CD4 para la activación del sistema inmune.

Así mismo, el alto nivel de polimorfismo es el responsable de la respuesta inmune que puede desarrollar cada individuo frente a determinado patógeno, además de contribuir a la susceptibilidad a enfermedades y desórdenes autoinmunes. Estas proteínas se han asociado a diferentes manifestaciones clínicas, como por ejemplo, el efecto protector que ejercen las moléculas HLA-DR1 en la aparición de artritis reumatoide, en comparación con las moléculas DR4 que han sido reconocidas como marcador de dicha enfermedad <sup>48, 49</sup>. A su vez, las personas con títulos aumentados de DR4 presentan una mayor probabilidad de padecer enfermedades inmunológicas (Lupus eritematoso sistémico) <sup>50,51</sup>.

Dentro de la familia de proteínas MHC clase II, también se han caracterizado moléculas con funciones relevantes en la presentación antigénica, sin embargo son consideradas moléculas MHC clase II no clásicas, debido a que poseen un nivel bajo de polimorfismo y su estructura no le permite la unión a péptidos (puesto que sus dos puentes disulfuro ocasionan una hendidura cerrada). HLA-DM hace parte de este grupo de proteínas y es la encargada de la catalización del intercambio del fragmento CLIP (péptido que mantiene bloqueado el surco de unión al antígeno y es removido por HLA-DM para permitir la unión de péptidos con altas afinidades), la edición de péptidos y la estabilización de las moléculas MHC clase II. Yin y colaboradores demostraron que el intercambio

de péptidos mediado por HLA-DM desempeña un papel clave en la selección de epítopes al favorecer la presentación de péptidos con mayor estabilidad cinética <sup>21</sup>.

La manera exacta en que actúa HLA-DM aún permanece incierta, sin embargo se ha propuesto que la unión de péptidos con baja afinidad por el extremo N terminal del surco de unión (P1 y P2) provoca un cambio conformacional que puede estar estrechamente relacionado con el giro de DR  $\alpha$ W43 lejos del bolsillo P1, la cadena lateral DR  $\alpha$ W43 volteada se convierte en un residuo de interacción con HLA-DM clave. En el estado unido a HLA-DM, los residuos DR1 DR  $\alpha$ F51,  $\beta$ F89 y  $\alpha$ E55 estabilizan la porción del surco de unión vacío. Los péptidos entrantes se unen con una cinética rápida, pero parte del surco permanece inicialmente inaccesible, lo que impulsa un proceso rápido de intercambio de péptidos, de tal forma que solo los péptidos que compiten con éxito con los residuos de DR para acceder al sitio P2 y al bolsillo P1 están unidos de forma estable. La ocupación total del surco invierte los cambios conformacionales asociados con la unión de DM y da como resultado la disociación de DM <sup>52,53</sup>

La disminución de HLA-DM provoca la acumulación de complejos MHC clase II/CLIP en la superficie de CPA y el intercambio defectuoso de péptidos. A su vez, se ha demostrado que HLA-DM se une al extremo N-terminal de HLA-DR para provocar un cambio conformacional en su estructura y de esta manera inducir o estabilizar la unión del complejo <sup>54</sup>.

#### **4.2 Virus sincitial respiratorio humano**

El virus sincitial respiratorio humano es un virus ARN no segmentado de cadena sencilla negativa (Grupo V clasificación Baltimore), cuenta con una envoltura esférica y un diámetro aproximado de 150 nm; el genoma viral es de aproximadamente 15.2 Kb. Taxonómicamente pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y el género *Pneumovirus* <sup>22</sup>. Hay dos grupos principales del

VSRh, A y B, que generalmente coexisten durante una temporada epidémica, sin embargo, se ha evidenciado que las infecciones con el grupo A son más frecuentes que las del grupo B y que su tasa de transmisibilidad parece ser más alta <sup>55</sup>.

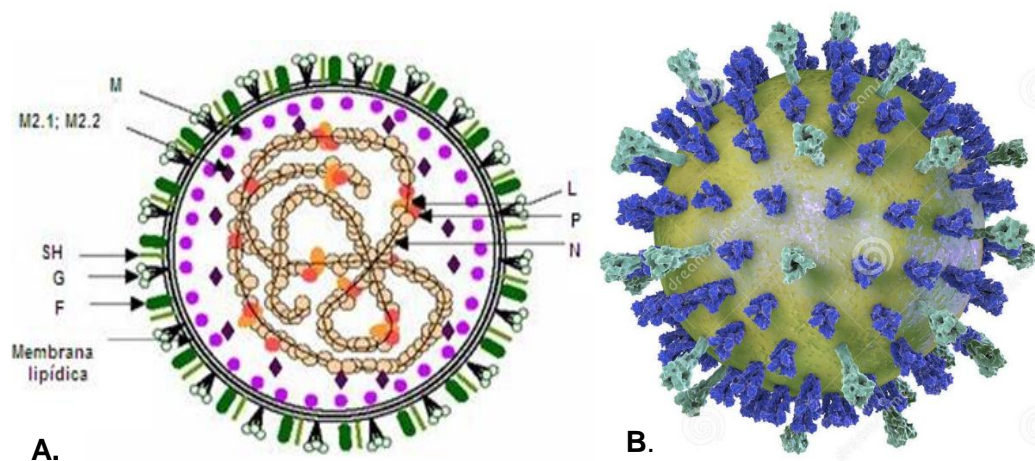
Las variaciones en la glicoproteína G determinan la diversidad antigénica entre los dos grupos (homología del 35% entre la glicoproteína G de las cepas A y B). El análisis molecular de la proteína G ha permitido la identificación de 11 genotipos del VSRh - A y 23 del VSRh -B. Por lo tanto, los anticuerpos contra la proteína F son de reacción cruzada para los grupos A y B, mientras que anticuerpos dirigidos a la proteína G pueden ser específicos de subtipo. Según Vandini y colaboradores “La existencia de dos grupos, A y B, y la incidencia de infecciones alternantes puede desempeñar un papel en la capacidad del VSRh para infectar a individuos previamente expuestos y eludir la respuesta inmune preexistente”. <sup>56</sup>

El VSRh emplea diversos receptores de membrana para ingresar a la célula huésped, entre ellos se encuentran la anexina II, el receptor de quimiocina CX3 1 (CX3CR1)<sup>57</sup>, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), lectinas dependientes de calcio, el TLR4, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la proteína nucleolina y proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). Las glicoproteínas G y F juegan un papel fundamental en este primer momento, donde G es la proteína de unión al receptor celular y F la encargada de fusionar las membranas virales y celulares permitiendo que el material viral sea liberado al citoplasma de la célula <sup>58</sup>.

Una vez dentro, la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus produce ARN de sentido positivo, el cual actúa como un ARNm viral que se traduce en proteínas por los ribosomas de la célula huésped. Las proteínas resultantes se dedican directamente a la producción de los elementos de los nuevos viriones, tales como las proteínas estructurales de la nucleocápside y la ARN replicasa, que se encargará de la producción de nuevas moléculas de ARN de sentido

negativo. Dicho proceso se lleva a cabo en los denominados cuerpos de inclusión que contienen todos los componentes requeridos para la transcripción y replicación viral (proteínas N, -M2, -L y -P y ARN genómico). Por esta razón, se cree que los cuerpos de inclusión son un sitio primario para la síntesis del ARN viral y, como resultado, son importantes para el ciclo de vida del VSRh<sup>59</sup>. Finalmente los nuevos viriones salen de la célula huésped por un proceso de gemación de la nucleocápside a través de la membrana celular de donde obtienen la envoltura viral.

El genoma viral codifica 11 proteínas a través de los siguientes genes: NS1-NS2-N-P-M-SH-F-G-M2-L en dirección 3' a 5' respectivamente (Figura 3)<sup>60</sup>.



**Figura 3. Estructura del virus sincitial respiratorio.** A. Proteínas del virus identificadas por un color diferente, proteína M (púrpura), proteína SH (verde claro), proteína G (blanco) proteína F (verde oscuro) proteína L (rojo), proteína N (rosado). B. Estructura en 3D del virus sincitial respiratorio humano. Tomado de: <http://www.medwave.cl/medios/medwave/octubre2008/reuniones/dos/MessengerFig1.jpg> y <https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-virus-sincitial-respiratorio-image80034370>.

#### **4.2.1 Proteínas no estructurales**

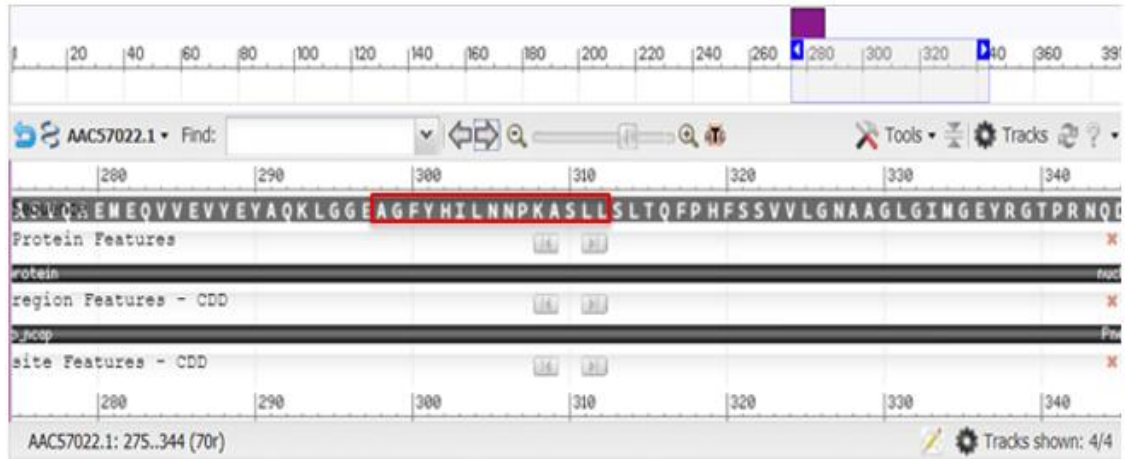
NS1 (139 aminoácidos) y NS2 (124 aminoácidos) son dos proteínas no estructurales expresadas mayormente durante el primer estadio de replicación del virus <sup>61</sup>. Son consideradas como el factor de virulencia más importante ya que actúan como antagonistas del INF tipo I, un tipo de citoquina que aumenta la respuesta inmune contra el virus, activando macrófagos y células natural killer, así como también propiciando el aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, entre otras funciones <sup>62</sup>. Se ha demostrado que la delección de estas proteínas en VSRh recombinantes conllevan a un aumento en la producción de INF tipo I y a una atenuación en la replicación viral in vitro. Sin embargo, en células Vero la misma delección causa disminución en la replicación viral a pesar de que estas células no producen INF tipo I, lo que sugiere que estas proteínas cumplen más funciones independientemente de la respuesta del INF tipo I <sup>63- 64</sup>. Tales funciones incluyen la inhibición temprana de la apoptosis (<18 h) en las células infectadas y la supresión en la maduración de células dendríticas disminuyendo así la respuesta inmune del huésped <sup>65</sup>.

#### **4.2.2 Proteína N**

La proteína N de 391 aminoácidos (también llamada nucleoproteína) se encuentra unida al genoma y al anti genoma (núcleocápsides helicoidales) creando las plantillas para la síntesis de ARN. Cada monómero de N consiste en dominios C-terminales y N-terminales separados por una bisagra <sup>65</sup>.

Estudios recientes evidencian que la proteína N está involucrada parcialmente en la inhibición de la activación de células T durante la infección, pues la expresión de esta proteína en la superficie de células infectadas interfiere negativamente en la sinapsis inmunológica entre el receptor de linfocitos T (TCR) y el complejo p-MHC (Péptido- MHC), alterando así la inmunidad adquirida del huésped y mejorando la susceptibilidad a la reinfección por VSRh<sup>66</sup>.

El péptido de la proteína N que se emplea en este trabajo de investigación se encuentra en la posición 298-312 cerca al extremo C-terminal (Figura 4).



**Figura 4. Ubicación y secuencia del péptido de la proteína N.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Alanina (A), Glicina (G), Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (k), Asparagina (N), Asparagina (N), Prolina (P), Lisina (K), Alanina (A), Serina (S), Leucina (L), Leucina (L). Posición 298-312.

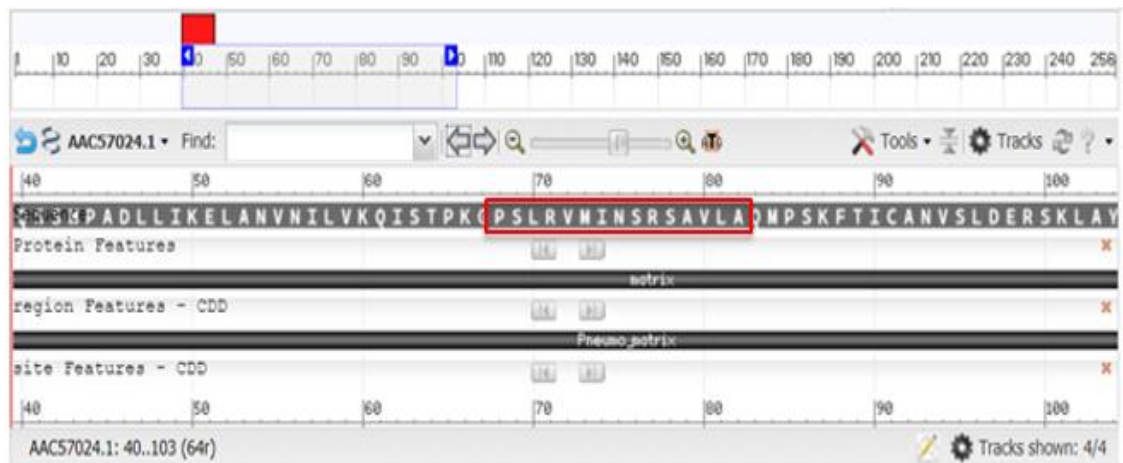
Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57022.1?report=graph>

### 4.2.3 Proteína M

Es una proteína fosforilada no glicosilada compuesta por 256 aminoácidos que hace parte estructural del virión del VSRh<sup>67</sup>, forma una capa de proteína externa alrededor de la nucleocápside, que constituye el puente entre la envoltura viral y la nucleocápside<sup>68</sup>. Durante la infección temprana, esta proteína es detectada en el núcleo y puede ser responsable de la inhibición de la transcripción de la célula huésped, sin embargo después se encuentra asociada con cuerpos de inclusión viral<sup>65</sup>, donde es necesaria para el transporte de la nucleocápside desde los cuerpos de inclusión hasta la membrana citoplasmática<sup>68</sup>. La proteína M cumple además funciones de silenciamiento de la síntesis del material genético viral, presumiblemente en preparación para su empaquetamiento dentro de los viriones<sup>67</sup>.

Por medio de cristalografía se ha observado que la proteína M es un monómero que está organizado dentro un dominio N-terminal y C-terminal compacto unido por un corto puente. El monómero de superficie contiene un área cargada positivamente que se extiende entre los dos dominios y puede mediar la asociación entre la nucleocápside y la membrana plasmática cargada negativamente <sup>65</sup>.

El péptido de la proteína M que se emplea en este trabajo de investigación se encuentra en la posición 68-82 cerca al extremo N-terminal (Figura 5).



**Figura 5. Ubicación y secuencia del péptido de la proteína M.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Prolina (P), Serina (S), Leucina (L), Arginina (R), Valina (V), Metionina (M), Isoleucina (I), Asparagina (N), Serina (S), Arginina (R), Serina(S), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Alanina (A) y está ubicado en la posición 68. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57024.1?report=graph>

#### 4.2.4 Proteína F

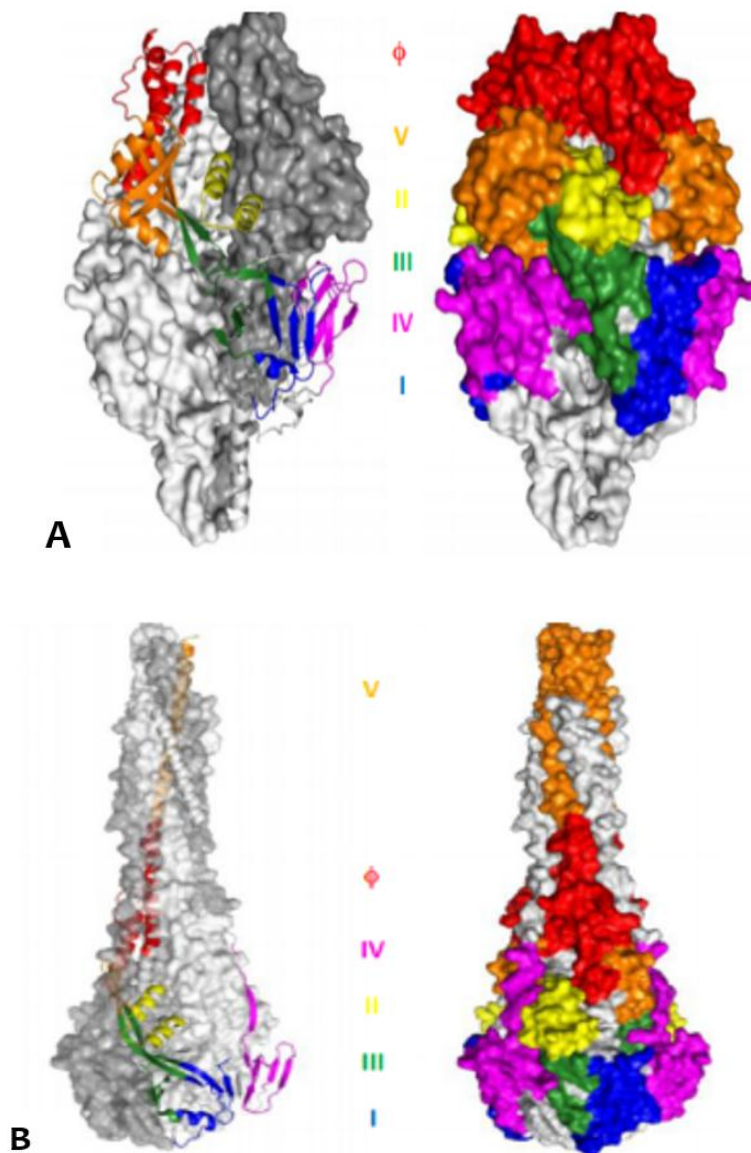
La glicoproteína F al igual que la proteína G, son los mayores antígenos de neutralización viral. Consta de 574 aminoácidos y está involucrada directamente en la penetración viral y la formación de los sincitios <sup>69</sup>. F es una proteína de fusión clase I que se expresa como un precursor de cadena simple

F0. Dicho precursor es inactivo y contiene tres péptidos hidrófobos: (1) el péptido señal N-terminal, que media la translocación del polipéptido naciente en el lumen del retículo endoplásmico; (2) la región transmembrana cerca del extremo C-terminal, que une la proteína F con la membrana de la célula huésped; y (3) el llamado péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular y determina el proceso de fusión <sup>56</sup>.

El precursor F se hace competente gracias a una endoproteasa celular que libera el péptido p27 central que separa la subunidad F2 N-terminal de la subunidad F1 C-terminal. La porción N-terminal recién generada de F1 es hidrofóbica y representa la proteína pre fusional F madura, trimérica y meta estable. Al activarse, la proteína pre F se repliega parcialmente e inserta su péptido hidrofóbico de fusión en la membrana de la célula huésped, finalmente se produce un re plegamiento adicional (una conformación post-fusión estable) que facilita la fusión entre el virus y la célula hospedera <sup>65-70</sup>. Se han descrito varios "sitios antigénicos" en la proteína F del VSRh, variando su número desde 2 a 18 dependiendo del estudio. Sin embargo, cualquier región de la proteína expuesta a la superficie parece ser un blanco potencial para anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos disponibles actualmente tienen la capacidad de unirse tanto a la conformación previa de la proteína F como a la posterior. El palivizumab y el motavizumab, por ejemplo, se unen al sitio II, una región lineal en la proteína F que forma una estructura hélice-bucle-hélice, que es conservada en F antes y después de la fusión, dicha estructura es importante para el reconocimiento de anticuerpos y para la obtención de anticuerpos de tipo palivizumab <sup>70</sup> (Figura 6a y 6b).



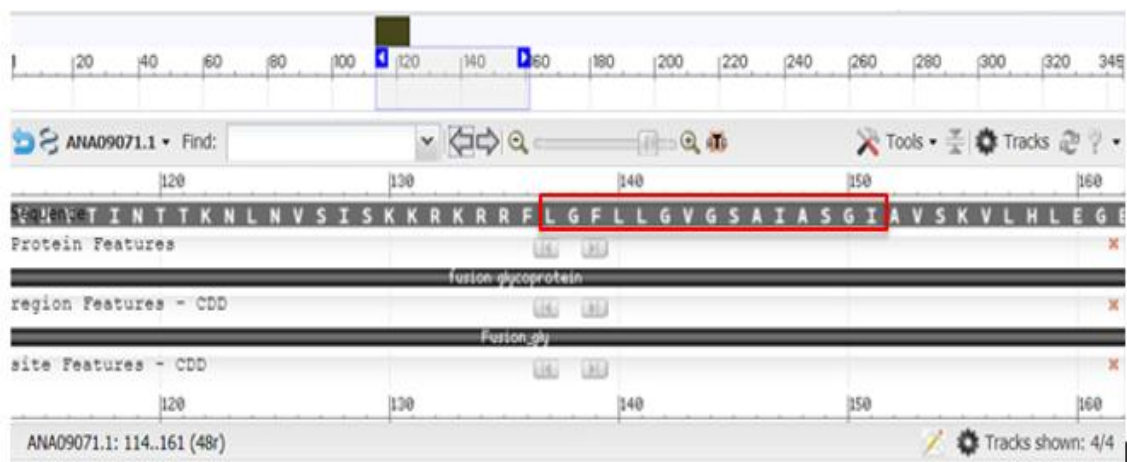


**Figura 6. Estructura pre y post fusión de la proteína F .A)** Estructura de la proteína Prefusion F y **B).** Estructura de la proteína Post fusión F. Sitio antigénico II conservado en los dos estadios de la proteína F, representado de color amarillo. Tomado de: *Rossey et al, Clinical Potential of Prefusion RSV F-specific Antibodies. 2017.*

La proteína F también promueve la fusión de las membranas citoplasmáticas entre células adyacentes, resultando en una célula gigante con más de 3 núcleos, denominado sincitio. Este efecto citopático inducido por el VSRh se considera importante para la propagación del virus a lo largo de las superficies epiteliales, minimizando así la exposición del virus a los componentes

extracelulares de la respuesta inmune. Varios factores celulares y virales participan en la formación de sincitios, como la proteína Rho A, la unión viral (G) y la proteína de envoltura SH, sin embargo la proteína F es la única considerada como esencial para la fusión de membranas<sup>71</sup>.

El péptido de la proteína F que se emplea en este trabajo de investigación se encuentra en la posición 137-151 cerca al extremo N-terminal (Figura 7).



**Figura 7. Ubicación y secuencia del péptido de la proteína de fusión.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Leucina (L), Glicina (G), Fenilalanina (F), Leucina (L), Leucina (L), Glicina (G), Valina (V), Glicina (G), Serina (S), Alanina(A), Isoleucina (I), Alanina (A), Serina(S), Glicina (G), Isoleucina (I), posición 137. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANA09071.1?report=graph>

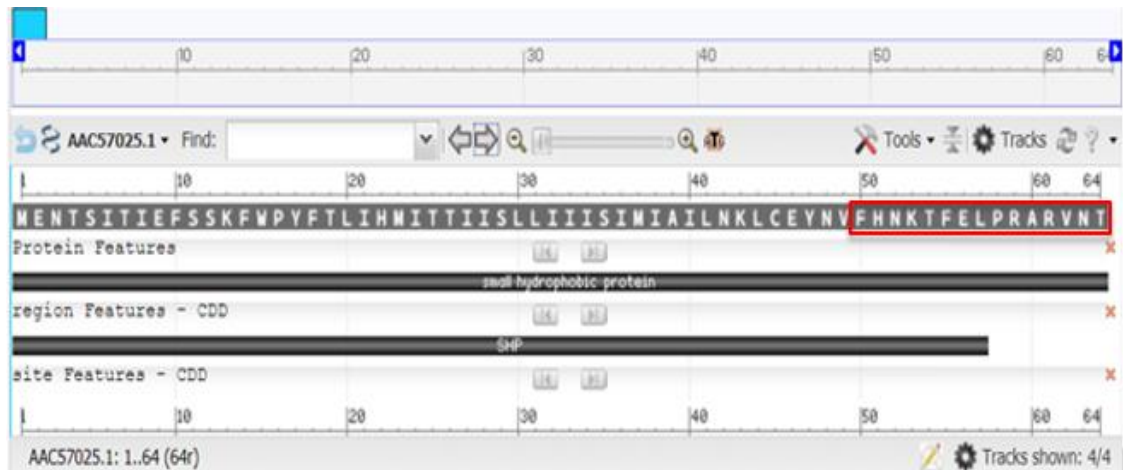
#### 4.2.5 Proteína SH (Small Hydrophobic)

Es una proteína transmembrana compuesta por 64 aminoácidos que presenta la porción C terminal orientada extracelularmente y se encuentra anclada cerca a la porción N-terminal<sup>65</sup>. El papel de la proteína SH en el ciclo de vida del VSRh aún no está claro: no es esencial para la replicación en cultivo celular, sin embargo la supresión de SH disminuye los títulos de replicación viral hasta 10 veces en modelos animales pequeños<sup>72</sup>.

Estudios de modelado molecular revelan que la proteína SH tiene una forma pentamérica y que adopta una estructura circular con un poro central, lo que sugiere que SH actúa como viroporina. Dicha estructura le confiere una actividad de canal selectivo de cationes modificando así la permeabilidad de la membrana <sup>72</sup>. Además, se ha demostrado que SH aparece para inhibir la señalización de TNF- $\alpha$ , una citoquina que provoca la activación de los linfocitos T y B gracias a la activación local del endotelio vascular, la liberación de óxido nítrico con vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento <sup>65-73</sup>

Aunque la mayoría de potenciales vacunas se han enfocado en las glicoproteínas G y F, existen trabajos recientes como el de Schepens et al, en donde se demostró que una vacuna basada en el ectodominio de la proteína SH reduce la replicación viral en ratones de laboratorio. Debido a la poca expresión de la proteína SH sobre la superficie del virus no se produce un título de anticuerpos representativo en una infección natural. Sin embargo, al emplear una cantidad elevada del antígeno SH como vacuna se induce la protección inmune contra el VSRh por un mecanismo que difiere de la respuesta inmune natural y de otras estrategias de vacunación contra el virus exploradas hasta la fecha. Por lo tanto, candidatos a vacunas del virus que pretenden inducir anticuerpos neutralizantes protectores o respuestas de células T podrían complementarse con un antígeno basado en SH para mejorar aún más la protección inmunitaria <sup>74-75</sup>.

El péptido de la proteína SH que se emplea en este trabajo de investigación se encuentra en la posición 50-64 cerca al extremo C-terminal (Figura 8).



**Figura 8. Ubicación y secuencia del péptido de la proteína SH.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Fenilalanina (F), Histidina (H), Asparagina (N), Lisina (K), Treonina (T), Fenilalanina (F), Ácido glutámico (E), Leucina (L), Prolina (P), Arginina (R), Alanina (A), Arginina (R), Valina (V), Asparagina (N), Treonina (T), posición 50. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57025.1?report=graph>

#### 4.2.6 Proteína G

Es una proteína de 298 aminoácidos involucrada en la unión con la célula huésped. La glicoproteína G tiene un anclaje de membrana cerca de su extremo N-terminal, con los dos tercios C-terminales de la molécula expuestos externamente <sup>65</sup>.

El ectodominio de la proteína G consiste en dos grandes dominios "mucinosos" (divergentes) fuertemente glicosilados, ricos en residuos de serina, treonina y prolina (característicos de las mucinas), conectados por una región central corta carente de carbohidratos (Segmento conservado)<sup>76</sup>. Tales dominios tienen una alta frecuencia de diferencias en los aminoácidos que los componen entre las cepas del VSRh, esta divergencia de aminoácidos y la presencia de una envoltura de azúcares específicos provocan una reducción en el reconocimiento inmunitario <sup>65</sup>.

La región central de la proteína G contiene el sitio CX3C (aa 182-186) que puede unirse a CX3CR1 (el receptor específico de la quimioquina fractalquina) y, por lo tanto, inducir quimiotaxis de leucocitos <sup>77-78</sup>. Varios autores han informado de la unión de VSRh a células epiteliales de vías respiratorias humanas (HAE) diferenciadas por la interacción de la proteína G con CX3CR1 en la superficie apical de las células ciliadas. La inhibición de la unión de CX3CR1 reduce pero no suprime por completo la infección en cultivos de HAE, lo que indica que CX3CR1 es un receptor del virus importante pero no el único en estas células. Se ha informado que el VSRh utiliza proteoglicanos de superficie celular para unirse a líneas celulares (Vero, HAE) establecidas principalmente por interacciones de la proteína G con glicosaminoglicanos (GAG) <sup>76</sup>.

Se han identificado tres tipos de epítopes en la proteína G empleando anticuerpos monoclonales murinos, estos son: epítopes conservados que están presentes en todas las cepas virales y que se encuentran dentro del segmento conservado de la región central no glucosilada, epítopes específicos de grupo que se superponen parcialmente con los epítopes conservados, pero que son compartidos sólo por cepas del mismo grupo antigénico y finalmente los epítopes específicos de cepa que están presentes sólo en ciertas cepas del mismo grupo antigénico y que se han mapeado en la región hipervariable C-terminal del ectodominio de la proteína G<sup>76</sup>.

El péptido de la proteína G que se emplea en este trabajo de investigación se encuentra en la posición 58-72 cerca al extremo N-terminal (Figura 9).

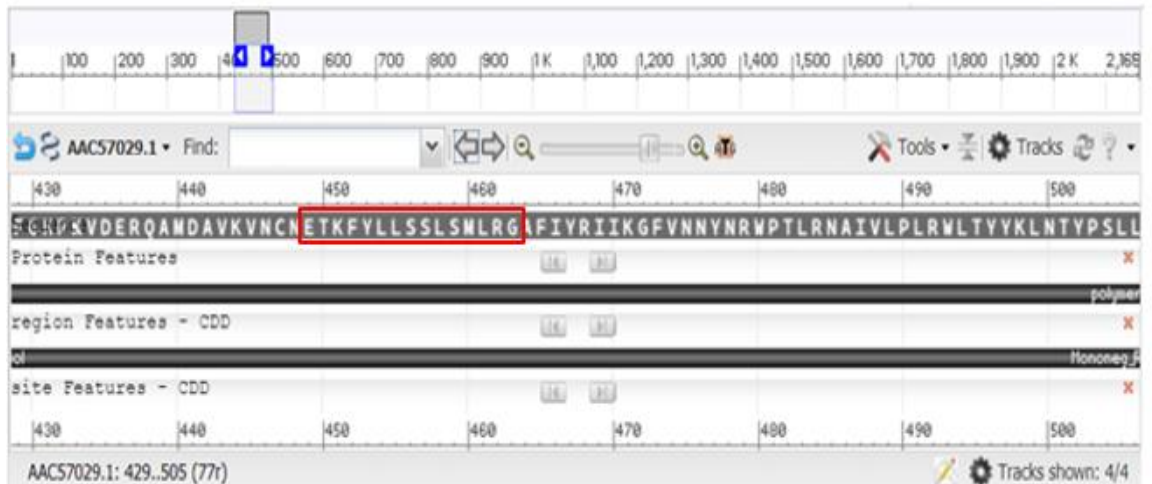


**Figura 9. Ubicación y secuencia del péptido de la proteína G.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Alanina (A), Isoleucina (I), Isoleucina (I), Fenilalanina (F), Isoleucina (I), Alanina (A), Serina (S), Alanina (A), Asparagina (N), Histidina (H), Lisina (K), Valina (V), Treonina (T), Leucina (L), Treonina (T), posición 58. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57026.1?report=graph>

#### 4.2.7 Proteína L

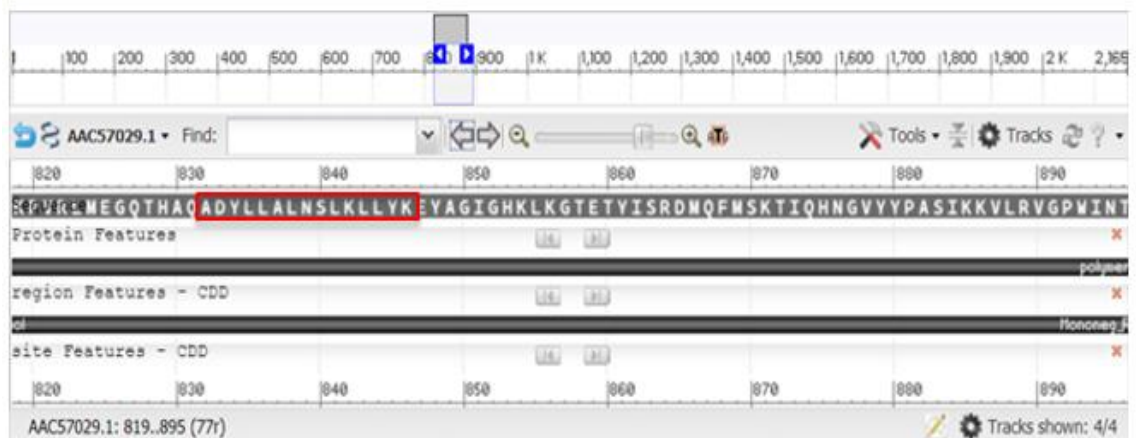
Consta de 2165 aminoácidos y junto con las proteínas P, M y N constituyen la ribonucleoproteína (RNP), que encapsula el ARN viral. La función principal de L es la de regular la replicación y la transcripción del ARN del VSRh<sup>60</sup>. Esta proteína cumple funciones importantes como la síntesis de ARN, encapsulación del material genético, metilación y poliadenilación<sup>79</sup>.

De la proteína L se emplearán 3 péptidos de 15 aminoácidos cada uno, el primero está ubicado en la posición 449-463 (Figura 10).



**Figura 10. Ubicación y secuencia del péptido 1 de la proteína L.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Ácido glutámico (E), Treonina (T), Lisina (K), Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Leucina (L), Leucina (L), Serina (Serina (S), Leucina (L), Serina (S), Metionina (M), Leucina (L), Arginina (R) Glicina (G). Posición 449. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57029.1?report=graph>

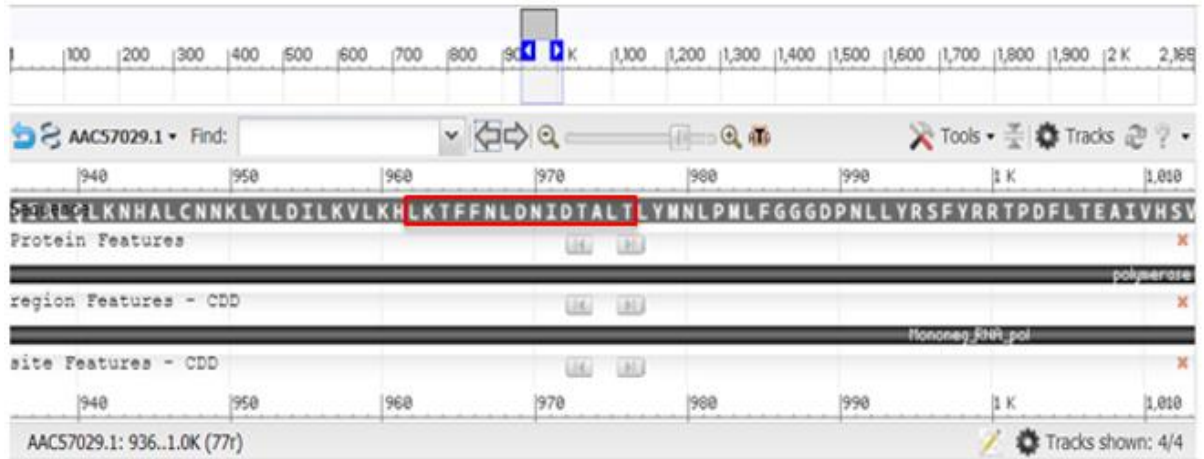
El segundo péptido de la proteína L, está ubicado en la posición 832-846 (Figura 11).



**Figura 11. Ubicación y secuencia del péptido 2 de la proteína L.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Alanina (A), Ácido aspártico (D), Tirosina (Y), Leucina (L), Leucina (L), Alanina (A), Leucina (L), Asparagina (N), Serina (S), Leucina (L), Lisina (K), Leucina (L), Leucina (L), Tirosina (Y), Lisina (K). Posición 832. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57029.1?report=graph>



El tercer péptido de la proteína L, está ubicado en la posición 962-976 (Figura 12).



**Figura 12. Ubicación y secuencia del péptido 3 de la proteína L.** Este péptido está conformado por 15 aminoácidos los cuales son: Leucina (L), Lisina (K), Treonina (T), Fenilalanina (F), Fenilalanina (F), Asparagina (N), Leucina (L), Ácido aspártico (D), Asparagina (N), Isoleucina (I), Ácido aspártico (D), Treonina (T), Alanina (A), Leucina (L), Treonina (T). Posición 962. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC57029.1?report=graph>

#### 4.2.8 Proteína P

La proteína P de 241 aminoácidos es un cofactor esencial de la polimerasa. Interactúa con L, M2-1, N y con síg misma formando homo tetrámeros <sup>80</sup>, funcionando también como un adaptador que se une a dichas proteínas para mediar las interacciones del complejo nucleocápside- polimerasa. Además, Según Collins y colaboradores “P se une a monómeros libres de la proteína N y los entrega a genomas y anti genomas nacientes, evitando así que la nucleoproteína N se auto agregue o se una al ARN no viral. La simple expresión de N y P es suficiente para formar cuerpos de inclusión virales, que son estructuras citoplásmicas grandes en donde se considera que se lleva a cabo la síntesis del ARN viral” <sup>65</sup>.



### **4.3 Respuesta inmune frente al Virus Sincitial Respiratorio Humano**

Cuando el virus llega a las vías aéreas es reconocido por diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como TLR2, TLR3, TLR4 Y TLR7 que desencadenan la respuesta inmune innata. TLR4 por ejemplo, interactúa con la proteína F del virus, lo que lleva a la activación del factor nuclear kB (NF-kB) y la consiguiente secreción de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8 por las células epiteliales<sup>81</sup>. La IL-8 también es producida por macrófagos y juega un papel clave durante la respuesta temprana al VSRh ya que funciona como un quimioatrayente en el reclutamiento de neutrófilos, que infiltran en el sitio de la infección<sup>81,82</sup>. La infiltración de células inmunes produce daño pulmonar e hiperreactividad inflamatoria pulmonar. Dicha inflamación pulmonar se debe a una respuesta inmune sesgada por Th-2, constituida por altos niveles de citoquinas IL-4 e IL-13. Por el contrario, la respuesta de Th1, que produce citoquinas como interferón (IFN) - $\gamma$  e IL-2, se ha asociado con el control de la enfermedad y la eliminación del virus<sup>82</sup>. Las células epiteliales infectadas con VSRh expresan MHC clase II y las moléculas co-estimulantes CD80 y CD86, lo que sugiere que estas células pueden activar directamente células T CD4 + vírgenes durante la infección, promoviendo una diferenciación de células Th2 y Th17<sup>81</sup>

La respuesta humoral también desempeña un papel importante en la infección por VSRh, previniendo la aparición de una nueva infección mediante la neutralización u opsonización de partículas virales extracelulares. De esta manera, las inmunoglobulinas IgA e IgG se secretan durante la infección por el virus y confieren protección en el tracto respiratorio superior e inferior. Sin embargo, el VSRh no induce una respuesta de anticuerpos de larga duración, por lo tanto no hay protección a largo plazo contra el patógeno y se producen reinfecciones durante toda la vida<sup>81</sup>.

Las células epiteliales también participan en la respuesta inmune adaptativa provocada por la infección con VSRh a través de la secreción de linfopoyetina del estroma tímico, una citoquina que promueve la activación de células T a

través de la modulación de células dendríticas ya que provoca una mayor expresión de los marcadores de maduración MHC clase II y CD86<sup>81</sup>.

#### **4.4 Manifestaciones clínicas y diagnóstico del VSRh**

Las manifestaciones clínicas pueden variar en la fase inicial de la enfermedad se puede observar rinorrea, disminución del apetito, tos, fiebre  $\leq 38$  °C y coriza (Inflamación de las fosas nasales). Algunos síntomas que pueden indicar gravedad de la enfermedad son la sibilancia progresiva, disnea e hiperexpansión del tórax; cuando la infección es severa puede generar una hipoxia y posteriormente una falla respiratoria severa<sup>83</sup>. Durante la bronquiolitis por el VSRh, las células epiteliales ciliadas se destruyen y, en casos graves, se observa una necrosis epitelial bronquial extensa<sup>81</sup>.

En cuanto al diagnóstico del VSRh existen cuatro modalidades en uso clínico. El cultivo viral se consideró durante mucho tiempo como la prueba Gold Standar para el diagnóstico de este virus, sin embargo, presenta una gran desventaja al tener un tiempo de respuesta de 3 a 7 días. Las pruebas NAATs (Técnica de amplificación de ácidos nucleicos) que consisten en una PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) tiene un tiempo de respuesta (horas) mucho más corto, pero sus costos son elevados. La prueba de inmunofluorescencia (IF) para la detección de VSRh es más rápida que la RT-PCR, pero es menos sensible y requiere mayor habilidad técnica. Finalmente, una serie de pruebas de detección rápida de antígenos (RADT), son pruebas asequibles, pero su sensibilidad es baja<sup>84</sup>.

#### **4.5 Epidemiología**

En un estudio realizado por Bont y asociados se evidenció que: 1. El VSRh se asocia con el 12-63% de todas las infecciones respiratorias agudas (IRA) y con el 19-81% de todas las IRA virales que causan hospitalizaciones en niños<sup>2</sup>. Las tasas de hospitalización anual por el virus son mayores en los grupos de edad más jóvenes<sup>3</sup>. La duración de la estadía en el hospital varía de 2 a 11

días, con 2-12% de los casos que requieren admisión a unidad de cuidados intensivos, además de una tasa de letalidad del 0.5%<sup>1</sup>.

Los factores de riesgo asociados con VSRh incluyen el sexo, la edad, el hacinamiento entre otros. De esta manera, estudios recientes han relacionado la edad de los pacientes y el estado inmunológico como factor de riesgo, es así que, en un estudio retrospectivo realizado por Pilie y colaboradores se encontró que los adultos hospitalizados con infecciones respiratorias bajas por VSRh tienen un riesgo significativo de mortalidad, y este riesgo puede aumentar en pacientes mayores de 60 años o con linfopenia al ingreso <sup>85</sup>. A su vez, pacientes con enfermedades de base con compromiso del sistema respiratorio y cardiaco se incluyen dentro de la población con alto riesgo de ser infectado por el VSRh <sup>7</sup>.

La tasa de mortalidad varía del 1 al 4% en bebés menores de dos años con condiciones preexistentes, como anomalías cromosómicas, enfermedad neuromuscular, cardíaca o pulmonar crónica (EPC), presentando complicaciones significativas después de la hospitalización. Puede ocurrir reinfección a lo largo de la vida, pero generalmente es menos grave en la infancia después de una primera enfermedad <sup>86</sup>. En comparación con la gripe, análisis retrospectivos muestran que el VSRh causa 16 veces más hospitalizaciones y visitas a urgencias en niños menores de 5 años <sup>87</sup>

Aproximadamente el 40% de todas las infecciones primarias por el virus en la infancia resultan en bronquiolitis y neumonía <sup>60</sup>. Patológicamente, el proceso inflamatorio causa edema de la pared bronquiolar, la obstrucción del moco en las vías aéreas y la necrosis del epitelio respiratorio, que puede tener efectos a corto y largo plazo en la función pulmonar.

#### 4.6 Tratamiento y protección frente al VSRh

Desde que se descubrió el virus hace aproximadamente 50 años, se han venido realizando trabajos de investigación que han contribuido en el conocimiento general de cómo actúa el virus, cuáles son sus características morfológicas, cuál es su relación con la célula huésped, su ciclo de replicación, entre otros conceptos relevantes a la hora de generar una vacuna segura y efectiva contra el VSRh. Como se mencionó anteriormente, hubo un intento fallido en la primera vacuna que se implementó, ya que varios de los recién nacidos vacunados y expuestos posteriormente al virus presentaron complicaciones de salud e incluso la muerte.

Actualmente el tratamiento del VSRh se mantiene centrado en la profilaxis con el anticuerpo monoclonal palivizumab, que ha demostrado ser eficaz para reducir la hospitalización por VSRh en neonatos prematuros (reducción del 72%), niños con displasia broncopulmonar (reducción del 65%) y lactantes con cardiopatía congénita hemodinámicamente significativa (reducción del 53%). El Palivizumab también ha demostrado ser eficaz en la reducción de sibilancias recurrentes después de la infección con el VSRh <sup>85</sup>. De manera similar, se encuentra disponible el anticuerpo humanizado Motavizumab el cual se une a la proteína de fusión después de la unión a la célula huésped y tiene una vida media sérica de aproximadamente 24 días en niños<sup>88</sup>. Este anticuerpo ha demostrado una mejor actividad neutralizante que Palivizumab.

Por otro lado, la Ribavirina fue el primer antiviral aprobado para el tratamiento de la infección por VSRh en humanos, es un medicamento antiviral que interfiere con la replicación de los virus de ADN y ARN. Aunque la Ribavirina es eficaz contra el virus cuando se prueba in vitro y en modelos animales, el uso clínico de esta molécula es actualmente muy limitado debido a su deficiente eficacia y dificultad en la administración (nasal por aerosol), además de un riesgo potencial elevado de toxicidad tisular. Otro tipo de enfoques terapéuticos que se basan en la inhibición de la replicación del virus han sido explorados,

como por ejemplo el fármaco RSV604 el cual disminuye la replicación viral y promueve la selección positiva de variantes del virus con mutaciones genéticas específicamente de la proteína N<sup>81</sup>.

En la siguiente tabla se pueden observar los tipos de vacunas contra el VSRh que están en desarrollo:

**Tabla 1. Tipos de vacunas contra el VSRh en desarrollo.**

Tipo de vacuna	Vacunas en desarrollo
Virus sincitial respiratorio humano vivo-atenuado.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Deleción de M2-2 (Delta M2-2)</li> <li>● Modificación o deleción de NS1 y/o NS2.</li> <li>● Adaptado a frío o mutaciones sensibles a temperatura</li> <li>● Deleción de G (Delta G)</li> </ul>
Vectores vivos quiméricos	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Virus quimérico parainfluenza – expresando F y/o G</li> <li>● Virus Sendai- expresando F.</li> <li>● BCG- expresando N</li> </ul>
Vectores con replicación defectuosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Varios vectores de adenovirus recombinantes expresando F o F/M2-1/N</li> <li>● Vectores de alfa virus recombinantes expresando F</li> <li>● MVA recombinante expresando F y/o G o F/M2-1/N</li> </ul>
Vacunas basadas en partículas	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Membraned virus – like particles (VLP) basada en RSV, virus de la enfermedad de Newcastle o influenza.</li> <li>● Bacterium – like particles exhibiendo RSV F.</li> </ul>

Subunidades de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Trímero estabilizado de la proteína F (pre fusión)</li> <li>● SH liberada como un complejo pentamérico.</li> <li>● Varias versiones de la glicoproteína G.</li> <li>● Varias formulaciones de péptidos</li> </ul>
--------------------------	--

Tabla tomada de:Graham 2016. *Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come*<sup>89</sup>.

#### 4.7 Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

Dentro de los métodos in vitro para la medición de la formación de complejos MHC/péptido, la técnica ELISA ha resultado de gran utilidad, esta se basa en la reacción antígeno/anticuerpo y su alta sensibilidad facilita la detección de concentraciones muy bajas del ligando; a su vez la estabilidad de los conjugados permite un correcto manejo durante la lectura e incluso cuando es almacenado<sup>90</sup>.

La marcación de la reacción resulta una parte fundamental para el monitoreo del complejo, por lo tanto la enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro y tener un substrato cromogénico o fluorogénico, según se desee .Un ejemplo de ello es el complejo biotina/estreptavidina, que al ser la biotina una vitamina de bajo peso molecular actúa como un cofactor enzimático y se une de forma covalente a cadenas laterales amino y carbonilo de péptidos con alta afinidad, lo cual permite una mayor visualización de la unión entre las distintas moléculas.

#### 4.8 Algoritmo predictivo RAGHAVA-PROPRED.

Las técnicas más tradicionales para la determinación de péptidos con capacidad de unión a moléculas del MHC clase II, exploran toda la secuencia del antígeno mediante la síntesis de fragmentos de péptidos solapados y el

análisis de reacciones inmunes. Aunque la técnica es 100% precisa, requiere mayor tiempo y experticia, además de ser costosa <sup>29</sup>. Una alternativa es restringir el número de péptidos a través de métodos teóricos, más específicamente de algoritmos de predicción. Los algoritmos de predicción son de fácil implementación y altamente precisos, se basan en matrices cuantitativas y redes neuronales que emplean expresiones estadísticas y matemáticas.

PROPRED es un algoritmo predictivo disponible en la web de forma gratuita, esta herramienta gráfica tiene como objetivo predecir regiones de unión del MHC clase II en secuencias de proteínas antigénicas. El servidor implementa un algoritmo de predicción basado en una matriz cuantitativa, para ello emplea una tabla en relación al coeficiente aminoácido / posición deducida de la literatura (bibliotecas virtuales), permitiendo una correcta predicción. Las uniones predichas se pueden visualizar como picos en la opción de interfaz gráfica o como residuos coloreados en la interfaz HTML. La importancia de servidores como este radica en la posibilidad de utilizarlos como herramienta para localizar las regiones promiscuas de una proteína específica que pueden unirse a varios alelos HLA-DR <sup>30</sup>.

Como todas las técnicas, los algoritmos de predicción presentan varias desventajas: Por un lado su rendimiento suele ser limitado, puesto que se espera que solo un pequeño porcentaje de péptidos se unan, teniendo en cuenta las restricciones de cada uno de los alelos del MHC clase II. Además, considerando que su objetivo se centra en mediciones de afinidad bioquímica de péptidos sintéticos se deben sintetizar una mayor cantidad de péptidos; por otro lado estos no consideran el procesamiento endógeno y el transporte de los péptidos lo que resulta en la obtención de falsos positivos <sup>91,92</sup>. Por consiguiente, es necesario establecer la fiabilidad de los resultados empleando metodologías experimentales.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO.

En el presente trabajo de investigación se empleó el algoritmo predictivo PROPRED y un ensayo de unión competitivo para evaluar la capacidad de unión de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 del VSRh a los alelos MHC clase II: HLA -DRB1\*0101 Y HLA - DRB1\* 0401. A su vez, se estimó de manera cualitativa el efecto que ejerce la molécula HLA-DM en la formación del complejo HLA-DR/péptido. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, dirigido por el Doctor Carlos Parra López.

### 5.1 Moléculas MHC clase II y HLA-DM.

Las moléculas HLA -DRB1\*0101 y HLA - DRB1\*0401 fueron proporcionadas por el Doctor Carlos Parra. HLA-DR1 y HLA-DR4 se obtuvieron previamente a través de purificación de proteínas recombinantes en células de insecto. Estas se desarrollaron en línea celular de *Drosophila melanogaster*, las cuales fueron transfectadas con dos plásmidos cada uno codificando para las cadenas alfa/beta del alelo HLA-DR1 y HLA-DR4. A su vez, HLA-DM fue previamente facilitada por el Profesor Lawrence Stern del Departamento de Patología de la Universidad de Massachussets. Worcester MA. USA.<sup>80</sup>

### 5.2 Péptido control biotinilado: Hemaglutinina (HA) 306-318

El péptido control de Hemaglutinina HA (306-318) (PKYVKQNTLKLAT) fue proporcionado por el Doctor Carlos Parra. Este péptido de 13 aminoácidos hace parte de la proteína Hemaglutinina del Virus de Influenza A H3N2, se encuentra marcado en el extremo NH<sub>3</sub>-terminal con sulfa-NHS-LC-Biotina, el cual incorpora un espaciador de seis átomos de carbono entre el péptido y la biotina.



### **5.3 Péptidos del virus sincitial respiratorio**

Los ocho péptidos del VSRh fueron suministrados por el Doctor Miguel Hernando Parra del departamento de Microbiología de la universidad de los Andes. Las secuencias se obtuvieron al evaluar un grupo amplio de péptidos del virus empleando tres algoritmos de predicción. De tal grupo se seleccionaron 8 péptidos de 15 aminoácidos cada uno, 7 de ellos determinados como péptidos de alta unión a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4 y un control negativo (Tabla 2).

Cada uno de los péptidos fue disuelto en agua y dimetilsulfóxido (DMSO). Las proporciones empleadas y las concentraciones finales se muestran en el anexo 1.

**Tabla 2. Características de los 8 péptidos del Virus Sincitial Respiratorio evaluados.**

<b>Nombre</b>	<b>Proteína</b>	<b>Localización</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Especificidad de unión</b>
SH-50	SH/Proteína de envoltura	50-64	1830	FHNKTFELPRARVNT	Péptido de baja Unión (Negativo)
F-137	F / Proteína de fusión	137-151	1375	LGFLLGVGSAIASGI	Péptido de alta unión solo a HLA-DR1
L-962	L/ ARN polimerasa	962-976	1726	LKTFNLDNIDTALT	Péptido de alta unión solo a HLA-DR4
N-298	N/Nucleoproteína	298-312	1658	AGFYHILNPNKASLL	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
L-832	L/ARN polimerasa	832-846	1738	ADYLLALNSLKLLYK	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
L-449	L/ARN polimerasa	449-463	1745	ETKFYLLSSLSMLRG	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
M-68	M/Proteína Matriz	68-82	1614	PSLRVMINSRSAVLA	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
G1-58	G1/Glicoproteína	58-72	1641	AIIFIISANHKVTLT	Péptido de alta unión a DR1 y DR4

#### **5.4 Determinación del porcentaje de predicción de afinidad empleando el algoritmo PROPRED**

Con el fin de comparar los resultados de predicción de las metodologías teóricas y metodologías experimentales, se empleó el algoritmo PROPRED para establecer la capacidad de unión de los péptidos seleccionados a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4.

Los resultados se obtuvieron de la siguiente manera:

Inicialmente se completó el formulario de envío de secuencia, en donde se requiere el nombre del antígeno, ingresar la secuencia de aminoácidos en código de una sola letra y seleccionar el formato de entrada (secuencia de aminoácidos de un solo código). Adicionalmente, el algoritmo requiere seleccionar un valor de umbral que tiene un rango de 1 hasta 10%, este parámetro permite seleccionar un nivel de rigor específico para modular los resultados de predicción: un umbral inferior corresponde a una predicción de alta rigurosidad, es decir, una tasa menor de falsos positivos. Por el contrario, un valor umbral más alto (restricción baja) corresponde a una tasa más alta de falsos positivos. Teniendo en cuenta lo anterior y por recomendación del algoritmo (*“Normalmente, al menos para una primera ronda de selección, no son deseables valores de umbral superiores a 3%, ya que la tasa de falsos positivos puede aumentar el tamaño del repertorio predicho hasta una cantidad inaceptable para pruebas experimentales posteriores”*)<sup>60</sup> se seleccionó 1% como el valor de umbral más adecuado.

Finalmente se eligió el formato de visualización: el servidor ofrece diferentes formatos de visualización de resultados, HTML I, HTML II, Vista gráfica, para este trabajo se tuvo en cuenta el formato HTML II, ya que se logran obtener resultados cualitativos al visualizar las regiones de unión predichas como una región de color azul, con el anclaje P1 o el residuo inicial de cada región de color rojo, y de forma cuantitativa el porcentaje de predicción de afinidad.

Además esta pantalla es útil para localizar regiones de unión promiscuas cuando se evalúan diversos alelos al mismo tiempo <sup>30</sup>. Los pasos para hacer uso del algoritmo PROPRED se encuentran de forma detallada en el anexo 6.

### **5.5 Ensayo de unión MHC clase II / Péptidos**

Este consta de un ensayo de unión competitivo empleado para determinar el porcentaje de unión relativo de los péptidos de interés a la molécula MHC clase II en presencia de HA biotinilada (péptido de referencia). Asimismo, observar que tanta afinidad tiene el péptido por los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4, logrando o no desplazar al péptido control de HA. Cada uno de los péptidos se encuentra a una cantidad mayor que el péptido control, 7500 excesos específicamente.

El protocolo para realizar los ensayos de unión se ha implementado en trabajos previos, este fue tomado de la tesis de maestría “*Influencia de HLA-DM en la estabilidad del complejo formado entre la molécula HLA-DR4 y un péptido de la proteína CS de P. falciparum*” <sup>93</sup> realizando algunas adaptaciones.

Para realizar el ensayo, en primer lugar se dispuso a reaccionar las moléculas del MHC clase II con el péptido control y cada uno de los péptidos de interés a una temperatura de 37° C por 72 horas. En un plato de ELISA se fijó un anticuerpo anti DR (LB 3.1) que permite adherir el complejo MHC clase II/péptido. Finalmente mediante la enzima Streptavidin fosfatasa y su correspondiente sustrato (P-nitrofenilfosfato) se leyó la reacción cromogénica desarrollada una hora después a 405 nanómetros.

El protocolo completo se encuentra en el anexo 3 y es válido para los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4, a excepción del buffer de unión, ya que cuenta con una composición y un pH diferente para cada uno (anexo 2). Cada reacción se realizó por duplicado Figura 13.

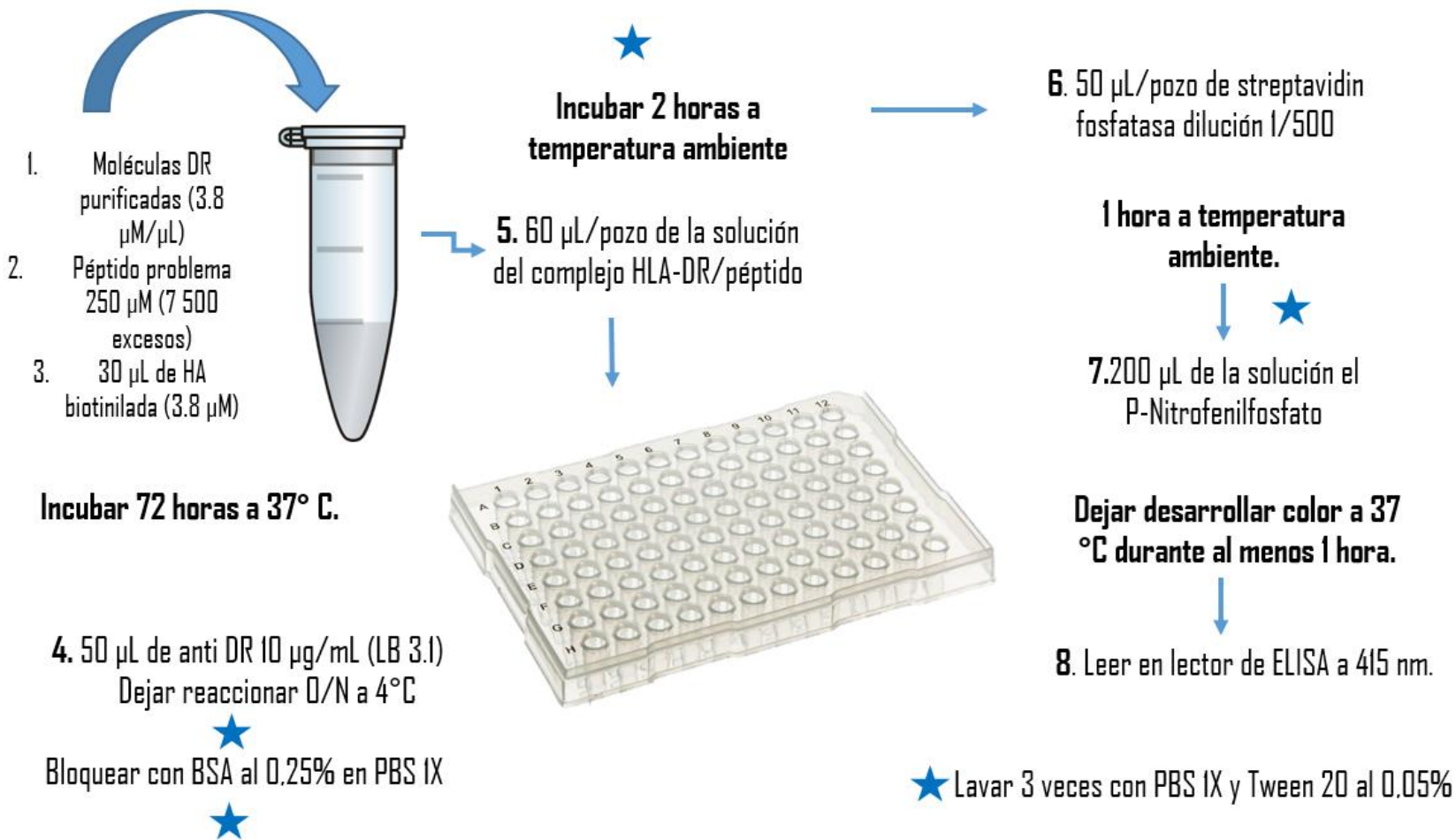


Figura 13. Representación esquemática del ensayo de unión MHC clase II /péptidos

Con el fin de validar los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta tres aspectos: El blanco de reacción que se compone de todos los reactivos mencionados en el protocolo (anexo 3) a excepción del péptido biotinilado y los péptidos evaluados. Un control positivo compuesto de las moléculas MHC y el péptido HA biotinilado (306-318), este valor representa el 100% de unión. Y por último el péptido SH-50 seleccionado como péptido de baja afinidad para HLA-DR1 y HLA-DR4, el cual representa un control negativo.

### **5.6 Ensayo de Unión MHC clase II/ Péptidos/HLA-DM**

Este ensayo se realiza con el fin de comprender y estimar la influencia que ejerce la molécula HLA-DM en la formación del complejo MHC clase II/péptido. Para ello se empleó HLA-DM a una concentración de 1  $\mu$ M sin alterar el volumen final de reacción (150  $\mu$ L), y manteniendo la concentración de HLA-DR. La adición de HLA-DM se realiza en el primer paso de preparación de las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4, es decir se incluye en los 90  $\mu$ L establecidos, el procedimiento siguiente es similar al mencionado en el protocolo de unión (Anexo 3).

### **5.7 Determinación del porcentaje de unión relativo MHC clase II/péptido**

Después de realizar las lecturas a 415 nm y obtener la densidad óptica (OD) de cada una de las reacciones, se aplicaron las fórmulas disponibles en el anexo 4 para obtener el porcentaje de unión relativo de cada uno de los péptidos y se estableció como umbral de unión del péptido a HLA-DR un porcentaje igual o superior al 50%. Así mismo se calculó la desviación estándar del porcentaje de unión de cada péptido en las distintas reacciones (Anexo 5).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación del porcentaje de afinidad de los péptidos SH-50, F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58 a las moléculas HLA-DRB1\* 0101 y HLA-DRB1\*0401 empleando el algoritmo PROPRED.

Teniendo en cuenta que las moléculas MHC clase II tienen 9 bolsillos de anclaje dispuestos en el surco de unión, el primer paso que realiza el algoritmo es crear marcos peptídicos, que corresponden a fragmentos de péptidos de 9 aminoácidos (nanómeros) generados a partir del antígeno ingresado, posteriormente asigna un valor a cada aminoácido y la suma de cada uno de ellos constituye la puntuación del marco peptídico (también llamado "core"). Al tratarse de un modelo de predicción lineal, la puntuación peptídica de cada nanómero en un antígeno se calcula usando matrices cuantitativas. Cuanto mayor es el puntaje de cualquier marco peptídico, mayor es la probabilidad de que se una a la molécula de MHC clase II dada.

Después de ingresar las secuencias de aminoácidos de cada péptido y seleccionar cada uno de los parámetros requeridos por el algoritmo PROPRED (Umbral 1% y tipo de alelo) se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 3 y 4. Allí se muestra la secuencia mínima de interacción o marco peptídico arrojada para cada péptido incluyendo el péptido de referencia y los aminoácidos que probablemente interactúen con los bolsillos de anclaje P1, P4, P6 y P9. Además, se puede observar que los péptidos con mayor porcentaje de afinidad al alelo HLA-DR1 son L-449 (143 %) y N-298 (120 %), sin embargo para el alelo HLA-DR4 son M-68 (98 %), G1-58 (89 %) y L-449 (89 %), es preciso resaltar que tales péptidos cuentan con residuos aromáticos (Tirosina, Fenilalanina) en la posición 1. A su vez, se evidencia la nula capacidad que tiene el péptido SH de unirse a los dos alelos evaluados.

**Tabla 3. Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1\* 0101 empleando el algoritmo PROPPRED**

Péptido	Secuencia "core"	Puntuación marco peptídico	% de puntuación marco peptídico normalizado respecto a HA
HA	<b>Y</b> VK <b>Q</b> NT <b>L</b> KL	1,8	100
SH-50	-	0	0
F-137	<b>F</b> LL <b>G</b> V <b>G</b> SA <b>I</b>	1,5	83
L-962	<b>F</b> FN <b>L</b> D <b>N</b> ID <b>T</b>	1,5	83
N-298	<b>Y</b> H <b>I</b> L <b>N</b> N <b>P</b> KA	2,1	120
L-832	<b>L</b> LA <b>L</b> NS <b>L</b> KL	1,1	61
L-449	<b>F</b> Y <b>L</b> L <b>S</b> S <b>L</b> SM	2,5	143
M-68	<b>L</b> RV <b>M</b> IN <b>S</b> RS	0,9	50
G1-58	<b>F</b> I <b>I</b> SA <b>N</b> HK <b>V</b>	1,2	67

Residuos de anclaje a los bolsillos P1, P4, P6 y P9 resaltados en amarillo.

**Tabla 4. Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1\* 0401 empleando el algoritmo PROPPRED.**

Péptido	Secuencia "core"	Puntuación marco peptídico	% de puntuación marco peptídico normalizado respecto a HA
HA	<b>Y</b> VK <b>Q</b> NT <b>L</b> KL	4,5	100
SH-50	-	0	0
F-137	<b>L</b> GF <b>L</b> L <b>G</b> V <b>G</b> S	0,38	8
L-962	<b>F</b> N <b>L</b> D <b>N</b> ID <b>T</b> A	2,8	62
N-298	<b>Y</b> H <b>I</b> L <b>N</b> N <b>P</b> KA	3,7	82
L-832	<b>Y</b> LL <b>A</b> L <b>N</b> SL <b>K</b>	2,8	62
L-449	<b>F</b> Y <b>L</b> L <b>S</b> S <b>L</b> SM	4	89
M-68	<b>L</b> RV <b>M</b> IN <b>S</b> RS	4,4	98
G1-58	<b>F</b> I <b>I</b> SA <b>N</b> HK <b>V</b>	4	89

Residuos de anclaje a los bolsillos P1, P4, P6, P9 resaltados en amarillo.



## **6.2 Determinación experimental de los porcentajes de unión relativos de péptidos del VSRh a moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM**

Para determinar el porcentaje de unión relativo de cada uno de los péptidos a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4 se realizó un ensayo de unión competitivo, en donde el péptido control biotinilado HA y cada uno de los péptidos (7500 excesos) compitieron por el surco de unión de HLA-DR1 y HLA-DR4 (3.8  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ). La reacción cromogénica desarrollada se leyó a 415 nm, una hora después de agregar el sustrato P-Nitrofenilfosfato, a los resultados obtenidos se les aplicó las fórmulas estipuladas en el anexo 4.

En la tabla 5 se observa que el péptido con mayor porcentaje de unión a HLA-DR1 es N-298 (98%), el cual hace parte de la nucleoproteína viral, sin embargo para HLA-DR4 es el péptido L-962 de la proteína ARN polimerasa (88.7%) Figura 14B. Además, el péptido de la proteína SH-50 presentó el porcentaje de unión más bajo para los dos alelos evaluados pues la densidad óptica obtenida fue mayor que la del control positivo (reacción HLA-DR1/péptido), evidenciando una mayor unión del péptido biotinilado en presencia de SH-50 (Figura 14A).

Por otro lado, con el fin de determinar el efecto que ejerce la molécula HLA-DM en la unión MHC clase II /péptidos, se obtuvo el porcentaje de unión a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4 incluyendo HLA-DM en la reacción de competencia a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Los datos obtenidos se muestran en las tabla 5.

En las figuras 15A y 15B se puede observar que en presencia de HLA-DM los péptidos que presentaron una mayor afinidad por HLA-DR1 y HLA-DR4 fueron N-298 y L-962 respectivamente. Sin embargo, la presencia de HLA-DM en las reacciones HLA-DR4/SH-50, HLA-DR4/L-832, HLA-DR4/G1-58 favoreció más

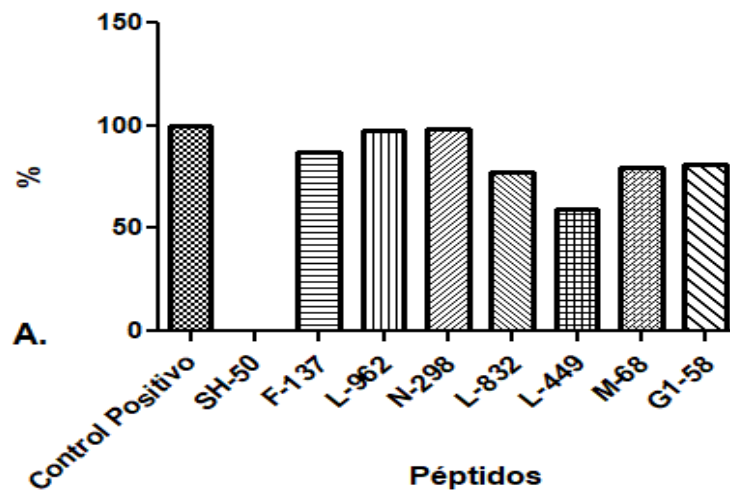
la unión del péptido control HA que la de los tres péptidos del virus obteniendo porcentajes de unión menores a cero (Figura 15B).

**Tabla 5. Porcentajes de unión relativos de péptidos del VSRh a moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM**

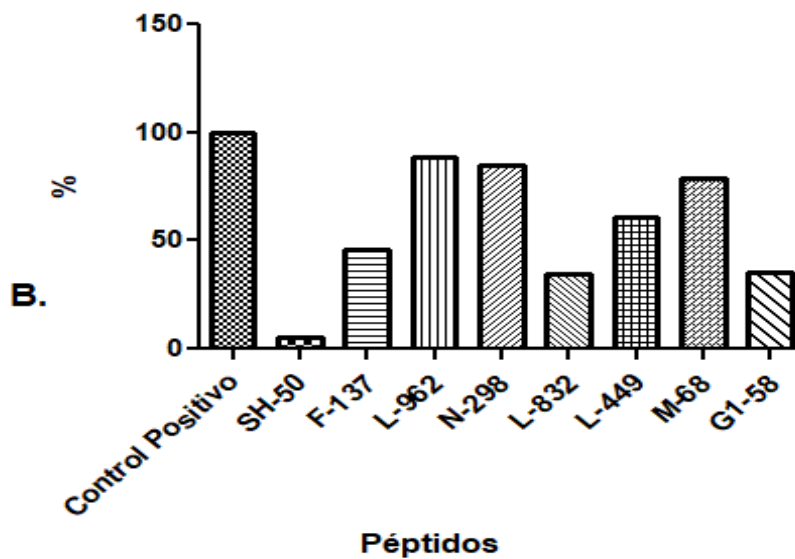
PÉPTIDO	HLA-DR1		HLA-DR4	
	-DM	+DM	-DM	+DM
HA+	97,9	50	92,5	97,4
SH-50+	-15,85*	3,2	5,4	-34,2*
F-137	86,9	4,4	46,1	70
L-962	97,8	44,2	88,7	85,5
N-298	98	59,4	85	99.0
L-832	77,7	5,8	34,5	-52,1*
L-449	59	30,4	61,2	47
M-68	79,4	26	79	74
G1-58	80,9	6,4	35	-7,0 *

+Péptidos controles.

**% de unión relativo: HLA- DR1/Péptidos**

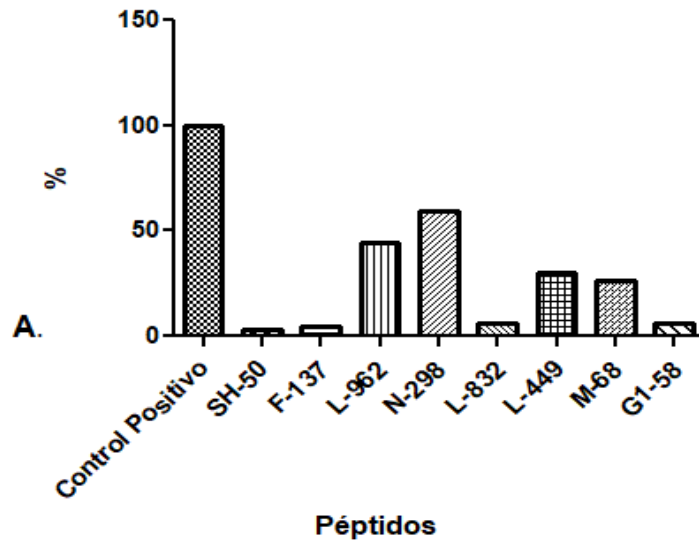


**% de unión relativo: HLA- DR4/Péptidos**

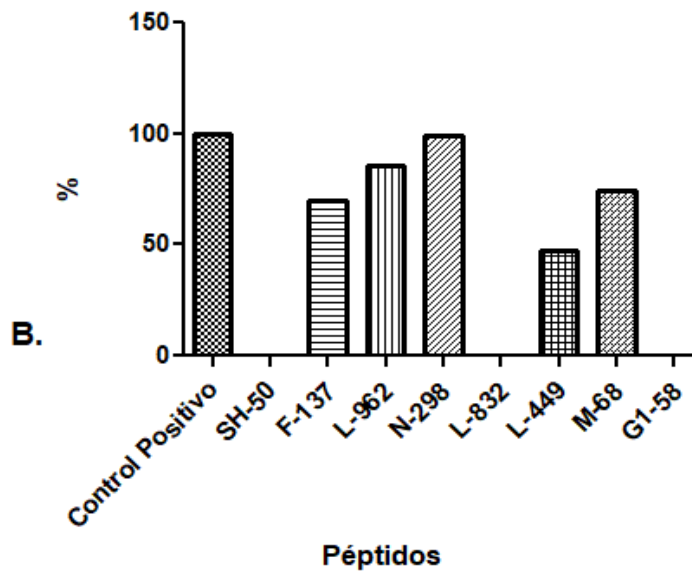


**Figura 14. Determinación del porcentaje de unión relativo HLA-DR1 HLA-DR4 /péptido. A.** Porcentaje de unión relativo HLA-DR1/Péptidos en relación al control positivo (HA biotinilado). Resultado del péptido SH-50 no incluido dentro de la gráfica. Desviación estándar: SH-50 0,251 / F-137 0,390 / L-962 0,574 / N-298 0,366 / L-832 3,379 / L-449 2,18 / M-68 1,11 / G1-58 1,48. **B.** Porcentaje de unión relativo HLA-DR4/Péptidos en relación al control positivo (HA biotinilado). Desviación estándar SH-50 0 / F-137 0,841 / L-962 1,59 / N-298 7,015 / L-832 0,79 /L-449 20,34 / M-68 5,19 / G1-58 3,46.

**% de unión relativo: HLA- DR1/Péptidos/DM**



**% de unión relativo: HLA- DR4/Péptido/DM**



**Figura 15. Determinación del porcentaje de unión relativo HLA DR1- HLA DR4 /péptido/HLA-DM. A** Porcentaje de unión relativo HLA-DR1/Péptidos/HLA-DM. Desviación estándar SH-50 4,76 / F-137 0 / L-962 5,71 / N-298 8,25 / L-832 7,93 /L-449 0,47 / M-68 5,39 / G1-58 0. **B.** Porcentaje de unión relativo HLA-DR4/Péptidos/HLA-DM, porcentajes de SH-50, L-832 y G1-58 no incluidos en la gráfica (valores negativos). Desviación estándar SH-50 9,20 / F-137 4,6 / L-962 15,24 / N-298 0,090 / L-832 10,43 /L-449 4,76 / M-68 1,88 / G1-58 5,38.

### **6.3 Comparación del porcentaje de unión de cada péptido con HLA-DR1 y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.**

Con el fin de evaluar el porcentaje de unión de cada uno de los péptidos a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM, se elaboraron gráficas individuales incluyendo cada una de las reacciones realizadas (HLA-DR1/péptido; HLA-DR1/péptido/HLA-DM; HLA-DR4/péptido; HLA-DR4/péptido/HLA-DM), observando así de manera detallada la unión de cada uno de los péptidos a los distintos alelos HLA.

En general, cada uno de los péptidos tuvo un comportamiento diferente en presencia de HLA-DM, para algunos, la presencia de esta molécula aumento representativamente la unión MHC/ péptido y para otros el porcentaje de unión disminuyó hasta alcanzar valores menores a cero.

En la figura 16 A se puede observar que el péptido SH-50 presentó un porcentaje de unión menor a cero con el alelo HLA-DR1, sin embargo la unión con HLA-DR4 fue del 5,4%. El efecto de la molécula HLA-DM en la formación del complejo MHC clase II/ péptido, fue diverso para las dos alelos, al incrementar en 3.2% la unión del péptido SH-50 al alelo HLA-DR1 y en reducir a 0% la unión con HLA-DR4.

En la figura 16B, se muestra el comportamiento del péptido F-137, el cual presentó un 86.9% de afinidad por el alelo HLA-DR1, este dato concuerda con los resultados obtenidos por el algoritmo predictivo, sin embargo este porcentaje disminuyó en un 82,5 % con la presencia de HLA-DM. En cuanto a HLA-DR4, el péptido tuvo menor afinidad por este alelo (46.1 %) en comparación con HLA-DR1, no obstante la presencia de HLA-DM mejoró la unión en un 23.9 %.

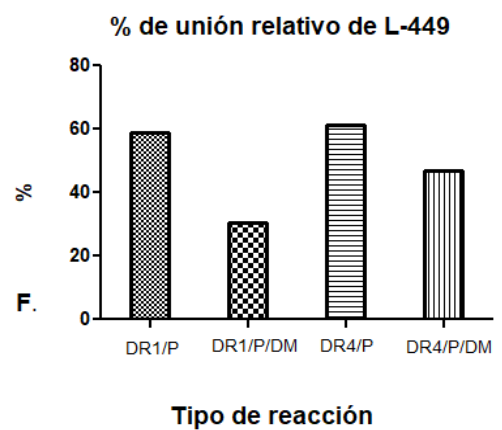
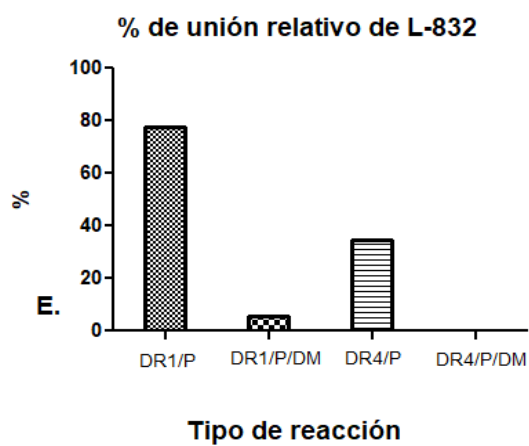
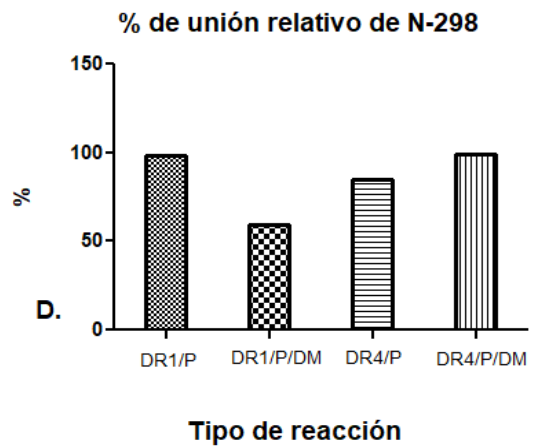
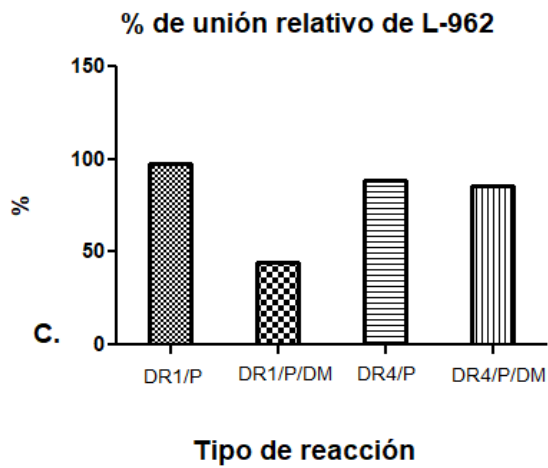
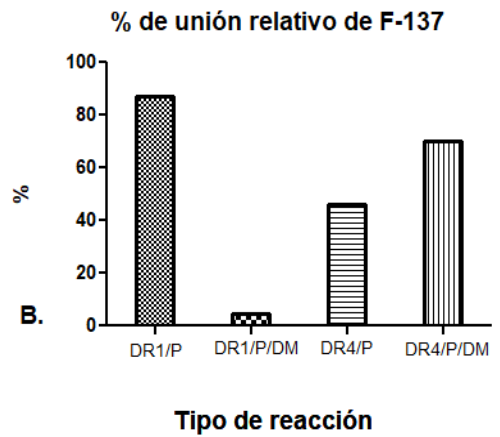
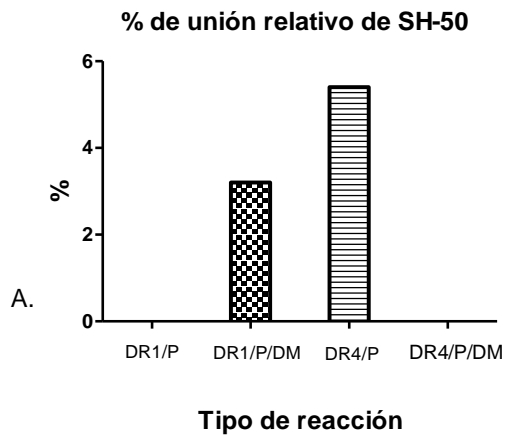
Por su parte, el péptido L-962 presentó una diferencia de 9.1 % en la unión entre los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4 (97.8 y 88.7 % respectivamente)

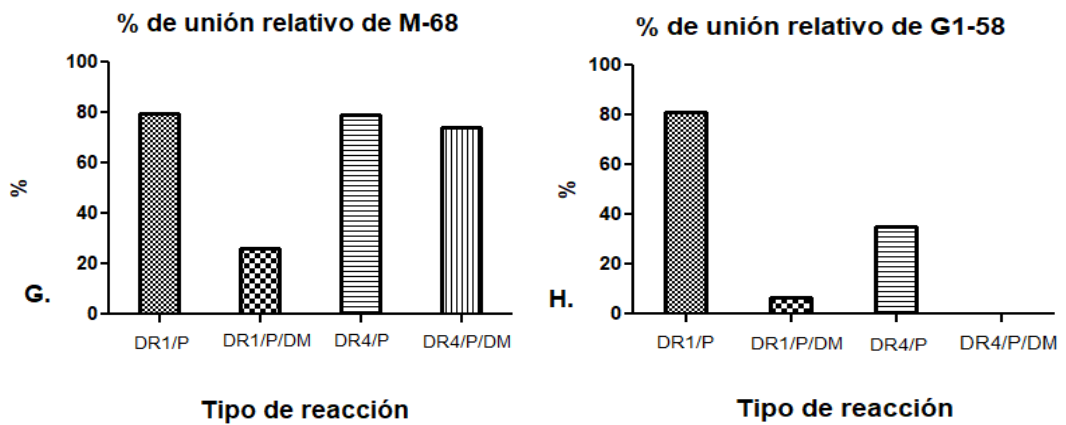
evidenciando una gran afinidad por estos, sin embargo el efecto de HLA-DM mantuvo el porcentaje de unión en la reacción HLA-DR4/P/HLA-DM, sugiriendo una mayor afinidad de L-962 por HLA-DR4 (Figura 16C). De manera similar, el péptido N-298 presentó una alta unión a los dos alelos evaluados, observándose en la figura 15D un 98% de unión con el alelo HLA-DR1 y un 85 % con HLA-DR4, sin embargo, HLA-DM potenció la unión del complejo HLA-DR4/péptido y disminuyó en 38,6 % la unión HLA-DR1/Péptido.

Para el péptido L-832, la presencia de HLA-DM disminuyó la unión de este tanto al alelo HLA-DR1 como a HLA-DR4, sin embargo en ausencia de esta molécula el péptido se unió en mayor proporción a HLA-DR1 (77.7 %) Figura 16E. En la Figura 16F se puede evidenciar que el péptido L-449 tiene un porcentaje de afinidad similar para HLA-DR1 y HLA-DR4 siendo 59% y 61.2 % respectivamente. No obstante, la presencia de HLA-DM disminuyó hasta 5.8% la unión al alelo HLA-DR1 y en un 14,2 % la unión al alelo HLA-DR4.

En la figura 16 G, se muestra una disminución del porcentaje de unión del péptido M-68 con el alelo HLA-DR1 en presencia de HLA-DM, sin embargo el péptido se une de manera similar a los dos alelos evaluados en ausencia del mismo.

Finalmente, el péptido G1-58 presentó un porcentaje de unión mayor al alelo HLA-DR1 en relación a HLA-DR4 siendo 80.9% y 35% respectivamente, no obstante este porcentaje disminuyó significativamente en presencia de HLA-DM (Figura 16H).





**Figura 16. Comparación del porcentaje de unión de cada péptido con HLA-DR1 y HLA- DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM.** A. Porcentaje de unión péptido SH-50 (% de la reacción DR4/P/DM no incluido en la gráfica, valor menor a cero) B. Porcentaje de unión péptido F-137. C. Porcentaje de unión péptido L-962.D. Porcentaje de unión péptido N-298. E. Porcentaje de unión péptido L-832 (% de la reacción DR4/P/DM no incluido en la gráfica, valor menor a cero). F. Porcentaje de unión péptido L-449 .G. Porcentaje de unión péptido M-68 H. Porcentaje de unión péptido G1-58 (% de la reacción DR4/P/DM no incluido en la gráfica, valor menor a cero).



## 7. DISCUSIÓN

Las infecciones respiratorias agudas, son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños de todo el mundo. Dentro de las principales infecciones virales con características respiratorias, ocupa un lugar preponderante las provocadas por el virus sincitial respiratorio humano. Se estima que antes de los dos años de edad, el 95% de los niños se han infectado con el virus y aproximadamente un 50% se ha infectado hasta dos veces <sup>59</sup>. Aunque, aún no ha sido posible el desarrollo de una vacuna capaz de reducir tales cifras, la identificación de epítopes inmunogénicos capaces de activar la respuesta inmune celular ha sido una alternativa ampliamente explorada para superar dicha problemática, pues la inmunidad antiviral es un enfoque que ha demostrado ser eficaz en el control de diversas enfermedades. Por lo tanto en el presente trabajo de investigación se evaluó la unión de 8 péptidos del Virus sincitial respiratorio Humano a los alelos MHC clase II: HLA -DR1 Y HLA -DR4.

En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados de predicción arrojados por el programa PROPRED para la interacción de los péptidos SH-50, F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68 y G1-58 del VSRh con los alelos MHC clase II HLA-DR1 y HLA-DR4. Podemos ver la secuencia mínima de interacción con las moléculas MHC clase II, en donde la cadena lateral del residuo amino terminal de cada una de las secuencias corresponde al residuo de anclaje al bolsillo 1 de las moléculas HLA- DR1 Y HLA-DR4. Se observa que residuos aromáticos voluminosos tales como F o Y, favorecen la interacción del péptido en esta posición, arrojando puntuaciones altas (L-449 y N-298 en el contexto DR1; M-68, L-449 y G1-58 en el contexto DR4) ya que debido a su composición de aminoácidos (Glicina en la posición 86 de la cadena Beta) y al arreglo estructural se genera un bolsillo profundo, predominantemente hidrofóbico que permite una interacción óptima mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos antes nombrados <sup>36,43,44</sup>

Si bien el residuo de anclaje al bolsillo 1 del sitio de unión del péptido de las MHC clase II, parece ser el más relevante en la estabilización de la interacción del complejo péptido-MHC clase II <sup>18,33,36,39,93</sup>, hay otros pequeños bolsillos 4, 6, 7 y 9 dentro del sitio de unión del péptido que juegan un papel importante en la estabilización o desestabilización del complejo, de tal manera que péptidos que presenten residuos de anclaje con afinidad por los aminoácidos que conforman los bolsillos mencionados contribuyen significativamente a estabilizar la interacción péptido-HLA-DR <sup>43,47,59,93</sup>. De hecho, Yin y colaboradores encontraron que la sustitución de un aminoácido por leucina en la posición 9 de un péptido que portaba un aminoácido con unión débil en el bolsillo P1, restauró la afinidad de unión del péptido a HLA-DR, demostrando así que las interacciones más fuertes en el extremo C-terminal del péptido (P9), pueden compensar las interacciones más débiles en el extremo N-terminal del péptido (P1)<sup>94</sup>.

Finalmente, los resultados obtenidos del programa PROPRED para las secuencias de los péptidos incluidos en el estudio, sugieren que el péptido SH-50 no forma complejo con las moléculas DR1 y DR4, razón por la que en este estudio se incluye como control de unión no relevante. Para los demás péptidos exceptuando el péptido F-137 con el alelo DR4 para el que se obtiene un porcentaje de unión del 8%, el algoritmo sugiere que son buenos candidatos para formar complejos estables con los alelos HLA-DR1 Y DR4 de las MHC clase II, y que los péptidos L-449 y N-298 pueden llegar a tener mayor afinidad por la molécula DR1 con respecto al péptido control de HA.

Por otro lado, con el propósito de establecer experimentalmente la afinidad de unión de la población de péptidos del VSRh seleccionados con las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4, se implementó un ensayo de unión competitivo usando HA biotinada como péptido de referencia; todas las reacciones se dejaron 72 horas, tiempo suficiente para la formación del complejo HLA-DR-péptido según lo reportado en la literatura <sup>93,95</sup>. Los resultados experimentales permiten obtener una medida relativa de la capacidad de unión de cada uno de los

péptidos evaluados en el estudio a las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4. La tabla 5 muestra los porcentajes de unión obtenidos para los péptidos SH-50, F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68 y G1-58 del VSRh. Para el péptido SH-50 se observan valores de unión igual o inferiores al 5.4%, resultado que confirma la predicción obtenida del algoritmo PROPRED para este péptido y por consiguiente sugiere que es un péptido adecuado como secuencia no relevante de unión a las moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4.

Para la población de péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68 y G1-58, los resultados muestran que todos se unen a HLA-DR1 con porcentajes superiores al 50%, esto está en completa concordancia con la predicción arrojada por el algoritmo utilizado. En contraposición para esta misma población de péptidos formando complejo con la molécula HLA-DR4 se observa que sólo los péptidos L-962, N-298, L-449 y M-68 superan el umbral del 50%, sugiriendo que son buenos péptidos de unión a HLA-DR4. No ocurrió lo mismo para los péptidos F-137, L-832 y G1-58 para los cuales se obtuvieron porcentajes de unión a HLA-DR4 por debajo del 50%; este resultado diverge de la predicción teórica y por lo tanto justifica la implementación de los ensayos de unión a la hora de seleccionar posibles péptidos antigénicos capaces de modular la respuesta inmune.

Así mismo, se quiso explorar el papel de la molécula HLA-DM en la unión de cada uno de los péptidos incluidos en este estudio, esto teniendo en cuenta que la evidencia experimental sugiere que la función principal de HLA-DM es editar los péptidos que se presentan sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) en el contexto de las moléculas HLA-DR, favoreciendo así la expansión de linfocitos T vírgenes específicos para la epítope presentada, de tal forma que péptidos de alta afinidad por la HLA-DR son protegidos de la remoción por HLA-DM <sup>52,94,95</sup>. En la Tabla 5, para el grupo de péptidos estudiados se muestran los resultados de los porcentajes de unión en presencia de HLA-DM a las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4. Se observa que la unión de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68 y G1-58

a la molécula HLA-DR1 se afectó negativamente en presencia de HLA-DM con respecto a la reacción en ausencia de esta molécula, así mismo se puede ver que en estas condiciones en el contexto de HLA-DR1 el único péptido que superó el umbral de unión establecido fue N-298 con un 59,4%. La modulación negativa de HLA-DM observada sobre la mayoría de los péptidos evaluados incluyendo el control puede estar relacionada con el pH al cual se realizó la reacción (pH 7,7), ya que esta molécula ejerce su actividad funcional a un pH ácido (Vesículas endosomales pH 5.5), es posible que un aumento del mismo haya alterado significativamente su función <sup>96</sup>. Para los péptidos que forman un complejo con la molécula HLA-DR4, se observa que F-137, L-962, N-298 y M-68 ven favorecida su capacidad de unión a este alelo en presencia de HLA-DM con respecto a la reacción en ausencia de HLA-DM (modulación positiva), mientras que los péptidos L-832, L-449 y G1-58 sufren un efecto contrario (modulación negativa), disminuyendo sus porcentajes de unión sin superar el umbral establecido.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que si bien los algoritmos desarrollados para predecir la unión de péptidos a moléculas HLA-DR resultan altamente interesantes, y a pesar de que cada vez se refinan más teniendo en cuenta muchas de las posibles interacciones que pueden influir en la estabilidad de los complejos HLA-DR/péptido <sup>32</sup>, los resultados arrojados por estos programas deben ser tomados con bastante cautela, pues si bien pueden tener una función orientadora, hasta ahora los programas desarrollados no presentan confiabilidad del 100%, no obstante, se demuestra que PROPRED es un buen algoritmo predictor <sup>97</sup>, resultando crítico el valor de umbral escogido, puesto que de ello depende la obtención de verdaderos positivos.

Sin embargo el escenario de la capacidad predictiva de PROPRED cambia drásticamente, cuando en el ensayo de unión se incluye la molécula HLA-DM, lo cual experimentalmente significa una simulación más próxima a lo que ocurre en las vesículas endosomales. Es así que al comparar el resultado de la predicción teórica con el experimental en presencia de HLA-DM, el

porcentaje de coincidencias tiene un descenso significativo del 100% (predicción teórica VS experimental en ausencia de HLA-DM) al 56% arrojando un alto porcentaje de falsos positivos (50%) y un 6% de falsos negativos. Lo anterior sugiere que probablemente el programa PROPRED, si bien tiene en cuenta la interacción fisicoquímica del péptido con la molécula HLA-DR, necesita tener en cuenta el efecto de la molécula HLA-DM en esta interacción. Además, el ensayo de unión *per se* incorporando únicamente la molécula HLA-DR y el péptido en estudio en la formación del complejo HLA-DR/péptido arroja resultados con el sesgo introducido por la falta de la interacción de la molécula HLA-DM, sugiriendo que si se quieren tener resultados más aproximados a la realidad de lo que ocurre en el ambiente del endosoma, se debe incluir en estos ensayos la molécula HLA-DM, esto por la relevancia de su función en la formación del complejo HLA-DR/péptido reportada en la literatura <sup>38,98</sup>

Por otra parte en la tabla 5 , se observa que para el péptido SH-50 con HLA-DR1, y para L-832 , G1-58 y SH-50 con HLA-DR4 en presencia de HLA-DM, se obtienen porcentajes de unión negativos, lo que significa que son péptidos que bajo el escenario descrito no forman complejo con el alelo HLA-DR correspondiente, pero sí que de alguna manera ayudan a que el péptido control biotinado aumente su unión con respecto a la reacción en la que no hay péptido que compita (control positivo). Esta observación permite sugerir que probablemente estos péptidos pueden hacer que la molécula HLA-DR cambie su conformación hacia una forma más receptiva de péptidos de alta afinidad permitiendo que se aumente el porcentaje de unión y por ende asumiendo una función similar a la de la molécula HLA-DM, lo cual resulta posible teniendo en cuenta que hay reportes que sugieren que moléculas pequeñas pueden llegar a modular la formación del complejo HLA-DR/péptido de manera análoga a HLA-DM <sup>99</sup>.

Finalmente se observa que el ensayo de unión en presencia de HLA-DM sugiere la secuencia del péptido N-298 como un buen péptido para formar complejo con la molécula HLA-DR1, mientras que para HLA-DR4 son los

péptidos F-137, L-962, N-298 y M-68; siendo el péptido N-298 el único que forma complejo con las dos moléculas HLA-DR evaluadas, lo cual es bueno porque el resultado sugiere que en el diseño de una vacuna va a cubrir un grupo poblacional más amplio con respecto a las otras secuencias evaluadas. Así mismo, N-298 también resulta un blanco potencial teniendo en cuenta el efecto modulador que ejerce en la respuesta inmune del hospedero, de esta manera estudios han comprobado que la proteína N está involucrada en la inhibición de la activación de células T, pues esta se expresa en la superficie de células infectadas, incluyendo células dendríticas, interfiriendo negativamente entre el receptor de la célula T y el complejo MHC-p<sup>66</sup>. Además la expresión de esta proteína en la superficie celular permite un mejor reconocimiento por parte de anticuerpos neutralizantes.

Así mismo, una vacuna basada en péptidos sintéticos ofrece diversas ventajas como una alta estabilidad y facilidad de almacenaje, pues al ser producidas químicamente, están libres de contaminantes y enzimas proteolíticas, a su vez son seguras, estables y de bajo costo, sin embargo es preciso resaltar que este tipo de vacunas presentan una desventaja importante como lo es una baja inmunogenicidad probablemente debida a la carencia de señales de reconocimiento, esta desventaja puede superarse con la adición de proteínas acarreadoras y/o adyuvantes. Entre los más estudiados se encuentra el muramil dipéptido (adyuvantes inmunomoduladores no particulados) y sus derivados. Estos son potentes inductores de Interleucina-1 (IL-1) que en su forma hidrofílica estimula a las Th2 y en su forma lipofílica estimula a las Th1<sup>100</sup>.

Los péptidos seleccionados como formadores de complejo HLA-DR/péptido en el ensayo de unión en presencia de HLA-DM, probablemente se comporten como péptidos antigénicos capaces de producir la activación de respuesta inmune adaptativa, mediante la expansión clonal. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el diseño de inmunoterapias para el control de la infección con el VSRh.

## 8. CONCLUSIONES

Se determinó la afinidad de unión de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 por las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4 mediante el algoritmo PROPRED, los resultados predictivos indican que los péptidos N-298 y L-449 presentan los mayores porcentajes de afinidad para los dos alelos evaluados.

Se determinó experimentalmente el porcentaje de unión relativo de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4, encontrando que el péptido N-298 de la nucleoproteína viral y L-962 del complejo ARN polimerasa presentan mayor afinidad por los dos alelos evaluados, a su vez, se comprobó la deficiente capacidad de unión que tiene el péptido SH-50 al obtenerse porcentajes de unión menores a 5.4%.

Se estimó cualitativamente la influencia de la molécula HLA- DM en la interacción de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4, de esta manera HLA-DM afectó negativamente la interacción de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68 y G1-58 con la molécula HLA-DR1, sin embargo, el único péptido que superó el umbral de unión establecido fue N-298 con un 59,4%. Con la molécula HLA-DR4, DM módulo de manera positiva la unión de los péptidos F-137, L-962, N-298 y M-68, mientras que los péptidos L-832, L-449 y G1-58 sufren un efecto contrario (modulación negativa), disminuyendo sus porcentajes de unión sin superar el umbral establecido.

Los resultados teóricos y experimentales demuestran que los péptidos N-298 y L-962 presentan el mayor porcentaje de afinidad para los dos alelos evaluados en presencia y ausencia de HLA-DM, esto gracias a sus características fisicoquímicas que les permiten interactuar de manera óptima con el surco de unión de las moléculas HLA-DR. Por lo tanto, de todos los péptidos evaluados, N-298 y L-962 pueden ser un blanco potencial para el control de la infección

por el VSRh y para el desarrollo de una adecuada inmunidad antiviral, de esta manera, el siguiente paso es la evaluación de estudios ex-vivo, la estimulación de linfocitos T, el tipo de respuesta celular y la producción de citoquinas que pueden generar dichos péptidos.

Se determinó que los péptidos SH-50, L-832 y G1-58 potenciaron la unión de HA (péptido control) al alelo HLA-DR4 en presencia de HLA-DM, lo que sugiere que gracias a sus características bioquímicas pueden jugar un papel similar a DM en la modulación del complejo MHC clase II/péptido.

Se estableció que los datos experimentales se correlacionan con los datos teóricos en ausencia de HLA-DM, sin embargo los resultados cambian en presencia de esta molécula, de tal forma que al comparar los resultados predictivos con lo experimental en presencia de HLA-DM, el porcentaje de coincidencias tiene un descenso significativo del 100% al 56% arrojando un alto porcentaje de falsos positivos (50%) y un 6% de falsos negativos.

Los ensayos de unión HLA-DR/péptido permitieron comprobar que PROPRED es un método con un alto nivel de precisión, demostrando que la interacción que ejerce cada aminoácido del péptido con los bolsillos de unión de HLA-DR es una de las variables clave que se deben tener en cuenta para el desarrollo de un algoritmo efectivo, así mismo la obtención de un número mayor de verdaderos positivos se logra con el empleo de un porcentaje de umbral bajo. Sin embargo, el hecho que no se incluyan variables como el efecto modulador que ejerce HLA-DM sobre el complejo MHC clase II/péptido genera un sesgo significativo entre los datos experimentales y teóricos obteniendo así un número elevado de falsos positivos.

A pesar de los beneficios que representa el uso de algoritmos predictivos en la identificación de epítopes de células T, los resultados experimentales obtenidos justifican el uso de los ensayos de unión a la hora de seleccionar posibles péptidos antigénicos capaces de modular la respuesta inmune.



La implementación de algoritmos predictivos como herramientas para el pronóstico de unión de péptidos a moléculas HLA clase II, resulta de gran utilidad ya que permiten restringir el número de péptidos de una proteína que pueden unirse a moléculas del MHC clase II, reducir el costo que implica comprobar de manera experimental la capacidad de unión de los mismos, y determinar de manera más acertada potenciales epítopes de células T CD4.

## RECOMENDACIONES

Con el fin de obtener resultados de una manera más específica, es necesario evaluar la unión de los péptidos teniendo en cuenta valores de IC50, este valor representa la concentración a la cual el péptido en estudio es capaz de desplazar el 50% del péptido de referencia, sin embargo varios algoritmos disponibles actualmente ya proporcionan de manera muy acertada estos valores.

A su vez, a pesar de que algoritmos como PROPRED, tienen un nivel de predicción favorable, aun se hace necesario implementar métodos predictivos que incluyan el procesamiento antigénico de las moléculas MHC clase II (antigenicidad del péptido, susceptibilidad a la acción proteolítica en el endosoma, efecto catalítico de HLA-DM), pues a pesar que la unión MHC clase II/ péptido es fundamental para el desarrollo de respuesta inmune, una unión adecuada no garantiza que el péptido sea reconocido como epítipo por las células T <sup>24</sup>. Por ello, Nielsen y colaboradores afirman que “la capacidad predictiva de los actuales algoritmos puede mejorarse al incluir valores de la estabilidad de unión del complejo MHC/Péptido, pues la mayoría de los datos vinculantes que describen la especificidad de las moléculas MHC son valores de afinidad de unión en equilibrio, es así que la estabilidad podría ser igualmente relevante a la afinidad porque la avidéz del complejo MHC/péptido para unir células T depende claramente tanto de la constante de unión en equilibrio como de la estabilidad del complejo” <sup>24</sup>

De manera similar, es necesario explorar experimentalmente la estabilidad cinética de cada uno de los péptidos del VSRh que presentaron resultados relevantes, determinando la tasa de disociación y la vida media de unión con los alelos HLA-DR, pues estos son factores que influyen considerablemente en el procesamiento y presentación antigénica <sup>82</sup>.

## REFERENCIAS

1. Simões, Eric A. F., Louis Bont, Paolo Manzoni, Brigitte Fauroux, Bosco Paes, Josep Figueras-Aloy, Paul A. Checchia, and Xavier Carbonell-Estrany. 2018. "Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children." *Infectious Diseases and Therapy* 7 (1): 87–120. doi:10.1007/s40121-018-0188-z.
2. Singh, Harpreet, and G. P.S. Raghava. 2002. "ProPred: Prediction of HLA-DR Binding Sites." *Bioinformatics* 17 (12): 1236–37. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1236.
3. Collins, Peter L., Rachel Fearn, and Barney S. Graham. 2013. "Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 372: 3–38. doi:10.1007/978-3-642-38919-1-1.
4. Liang, Bo, Sonja Surman, Emerito Amaro-Carambot, Barbora Kabatova, Natalie Mackow, Matthias Lingemann, Lijuan Yang, et al. 2015. "Enhanced Neutralizing Antibody Response Induced by Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Expressed by a Vaccine Candidate." Edited by T. S. Dermody. *Journal of Virology* 89 (18): 9499–9510. doi:10.1128/JVI.01373-15.
5. Kim, Joo Young, and Jun Chang. 2016. "In Hot Pursuit of the First Vaccine against Respiratory Syncytial Virus." *Yonsei Medical Journal*. Yonsei University College of Medicine. doi:10.3349/ymj.2016.57.4.809.
6. Nair, Harish, D. James Nokes, Bradford D. Gessner, Mukesh Dherani, Shabir A. Madhi, Rosalyn J. Singleton, Katherine L. O'Brien, et al. 2010. "Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections Due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet* 375 (9725): 1545–55. doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1
7. Walsh, Edward E. 2011. "Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults." *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 32 (4): 423–32. doi:10.1055/s-0031-1283282.

8. Paramore, L. Clark, Vincent Ciuryla, Gabrielle Ciesla, and Larry Liu. 2004. "Economic Impact of Respiratory Syncytial Virus-Related Illness in the US: An Analysis of National Databases." *PharmacoEconomics* 22 (5): 275–84. doi:10.2165/00019053-200422050-00001.
9. Karime, L., Arango, O., & Durán, M. A. (2016). Virus sincitial respiratorio (vsr) en menores de 5 años, colombia, 2012 - 2016, 2012–2016. Retrieved from [http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/exámenes-de-interés-en-salud-publica/Virologa/VSR en menores de 5 años.pdf](http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/exámenes-de-interés-en-salud-publica/Virologa/VSR%20en%20menores%20de%205%20años.pdf)
10. Instituto Nacional de Salud. 2017. semana epidemiológica número 50. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2051.pdf?fbclid=IwAR0ycbHjXH1fDNI8jg156t0heaVcUf-RN6upV8LQub1VT0GDFn6L7taXLU>
11. Instituto Nacional Salud. 2018. semana epidemiológica número 41. [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2042.pdf?fbclid=IwAR27t1AfPANtFLqlqWn6caulmGE5n82cCyTGg\\_\\_dvlqa4suT6W2RKInuzYM](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2042.pdf?fbclid=IwAR27t1AfPANtFLqlqWn6caulmGE5n82cCyTGg__dvlqa4suT6W2RKInuzYM)
12. Barbosa, Juliana, Beatriz Parra, Alarcón Liliana, Flor Inés Quiñones, Eduardo López, and Manuel Antonio Franco. 2017. "Prevalencia y Periodicidad Del Virus Sincitial Respiratorio En Colombia." *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 41 (161): 435–46. doi:<http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.511>.
13. Torres, Sandra Mónica Estupiñán, and Esperanza Trujillo Gama. 2004. "Complejo Mayor de Histocompatibilidad y Desarrollo de Vacunas." NOVA. <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/24/47>.
14. Sánchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
15. Arias-Murillo, Y., Castro-Jiménez, M., Ríos-Espinosa, M., López-Rivera, J., Echeverry-Coral, S., y Martínez-Nieto, O. (2011). Análisis de frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en la población colombiana. *Colombia Médica*, 41 (4), 336-343.

<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/725/1186>.

16. Rodríguez Libia M, Giraldo Mabel C, García Natalia, Velásquez Laura, París Sara C, Álvarez Cristiam M et al . Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2007 Dec [cited 2018 Oct 27]; 27( 4 ): 537-547. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572007000400009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000400009&lng=en).
17. Painter, Corrie A, and Lawrence J Stern. 2011. "Structural Insights Into HLA-DM Mediated MHC II Peptide Exchange." *Current Topics in Biochemical Research* 13 (2): 39–55. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
18. Vargas L.E. et al. (2003) MHC allele-specific binding of a malaria peptide makes it become promiscuous on fitting a glycine residue into pocket 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307 148–156. doi:10.1016/S0006-291X(03)01129-X
19. Day, Cheryl L, Nilufer P Seth, Michaela Lucas, Heiner Appel, Laurent Gauthier, Georg M Lauer, Gregory K Robbins, et al. 2003. "Ex Vivo Analysis of Human Memory CD4 T Cells Specific for Hepatitis C Virus Using MHC Class II Tetramers" 112 (6): 831–42. doi:10.1172/JCI200318509
20. Yu, Yang, Dongdong Jin, Shizong Hu, Yan Zhang, Xiaojing Zheng, Jianhua Zheng, Mingfeng Liao, et al. 2015. "A Novel Tuberculosis Antigen Identified from Human Tuberculosis Granulomas." *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (4): 1093–1103. doi:10.1074/mcp.M114.045237.
21. Yin, L., Maben, Z., Becerra, A., & Stern, L. J. (2015). Evaluating the role of HLA-DM in MHC II-peptide association reactions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(2), 706–716. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1403190>
22. Hurwitz, Julia L. 2011. "Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development." *Expert Review of Vaccines*. doi:10.1586/erv.11.120.

23. Chanock, Robert M, Keith Jensen, and Robert H Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *JAMA* 209(4): 422–34.
24. Graham, Barney S. 2016. “Vaccines against Respiratory Syncytial Virus: The Time Has Finally Come.” *Vaccine* 34 (30). Elsevier Ltd: 3535–41. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.083.
25. Higgins, Deborah, Carrie Trujillo, and Cheryl Keech. 2016. “Advances in RSV Vaccine Research and Development - A Global Agenda.” *Vaccine* 34 (26). Elsevier Ltd: 2870–75. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.109.
26. Rudraraju, R., Jones, B. G., Sealy, R., Surman, S. L., & Hurwitz, J. L. (2013). Respiratory syncytial virus: current progress in vaccine development. *Viruses*, 5(2), 577–94. <https://doi.org/10.3390/v5020577>
27. J. Díez y V. Planelles. 2011. Vacuna frente al virus respiratorio sincitial. *An Pediatr Contin*; 9(1):64-8. [http://apps.wl.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=80000599&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=51&ty=130&accion=L&origen=apccontinuada&web=www.apccontinuada.com&lan=es&archivo=v9n1a499pdf001.pdf&anuncioPdf=ERROR\\_publici\\_pdf&fbclid=IwAR0c\\_jnEkHdXA1XLCI83ySN4-10ZkQuVYBNHDKflaio2nmtrgL90TjBjq8](http://apps.wl.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=80000599&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=51&ty=130&accion=L&origen=apccontinuada&web=www.apccontinuada.com&lan=es&archivo=v9n1a499pdf001.pdf&anuncioPdf=ERROR_publici_pdf&fbclid=IwAR0c_jnEkHdXA1XLCI83ySN4-10ZkQuVYBNHDKflaio2nmtrgL90TjBjq8)
28. Rodríguez Libia M, Giraldo Mabel C, García Natalia, Velásquez Laura, París Sara C, Álvarez Cristiam M et al . Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín, Colombia. *Biomédica [Internet]*. 2007 Dec [cited 2018 Oct 27]; 27( 4 ): 537-547. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572007000400009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000400009&lng=en)
29. Zhang, Lianming, Yiqing Chen, Hau San Wong, Shuigeng Zhou, Hiroshi Mamitsuka, and Shanfeng Zhu. 2012. “TepitopePan: Extending Tepitope for Peptide Binding Prediction Covering over 700 Hla-Dr Molecules.” *PLoS ONE* 7 (2). doi:10.1371/journal.pone.0030483
30. Singh, Harpreet, and G. P.S. Raghava. 2002. “ProPred: Prediction of HLA-DR Binding Sites.” *Bioinformatics* 17 (12): 1236–37. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1236.

31. Nielsen, Morten, Ole Lund, Soren Buus, and Claus Lundegaard. 2010. "MHC Class II Epitope Predictive Algorithms." *Immunology*. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03268.x.
32. Chaves, F. A., Lee, A. H., Nayak, J., Richards, K. A., & Sant, A. J. (2012). The utility and limitations of current web-available algorithms to predict peptides recognized by CD4 T cells in response to pathogen infection . *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(9), 4235–4248. doi:10.4049/jimmunol.1103640.
33. Marek Wieczorek, Esam T, *Front Immunol.* 2017; 8: 292.  
Published online 2017 Mar 17, Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355494/>
34. Secretaria distrital de salud. Curso basico de medicina transfusional. editorial maldonado SA
35. Deborah A. Lipski, Rémi Dewispelaere, MHC class II expression and potential antigen-presenting cells in the retina during experimental autoimmune uveitis *J Neuroinflammation.* 2017; 14: 136
36. Brown, J H, T S Jardetzky, J C Gorga, L J Stern, R G Urban, J L Strominger, and D C Wiley. 1993. "Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1." *Nature* 364 (6432): 33–39. doi:10.1038/364033a0
37. William Sherwin, Lars, Bejder, Celine Frère, Michael Krützen, Janet Mann, Tracey Rogers. Fitness & major histocompatibility complex diversity of two bottlenose dolphin populations DOI: 10.13140/RG.2.1.1804.2480.
38. Painter, Corrie A, and Lawrence J Stern. 2011. "Structural Insights Into HLA-DM Mediated MHC II Peptide Exchange." *Current Topics in Biochemical Research* 13 (2): 39–55. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021. Secreted.
39. Bian, Hongjin, John F. Reidhaar-Olson, and Juergen Hammer. 2003. "The Use of Bioinformatics for Identifying Class II-Restricted T-Cell Epitopes." *Methods* 29 (3). Academic Press Inc.: 299–309. doi:10.1016/S1046-2023(02)00352-3.

40. Mecanismos de procesamiento y presentación antigénica en autoinmunidad. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra Mayo 2017
41. Braendstrup P, Mortensen BK, Justesen S, Østerby T, Rasmussen M, et al. (2014) Identification and HLA-Tetramer-Validation of Human CD4+ and CD8+ T Cell Responses against HCMV Proteins IE1 and IE2. PLoS ONE 9(4): doi:10.1371/journal.pone.0094892
42. Blazekovic, F., Odukoya, D., Butler, S. N., Mauro, J. A., Ramsamooj, M., Puleo, E. Blanck, G. (2016). HLA-DR peptide occupancy can be regulated with a wide variety of small molecules. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(3), 593–598. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1089370>
43. Steven G.E. Marsh, Peter Parham, Linda D. Barber. THE HLA. FactsBook Academic press.92101-4495. USA. Capítulo 7. Pag.41-73.
44. Rammensee, H G. 1995. "Chemistry of Peptides Associated with MHC Class I and Class II Molecules." *Curr Opin Immunol* 7 (1): 85–96. doi:0952-7915(95)80033-6.
45. Matsumura, M, D H Fremont, P a Peterson, and I a Wilson. 1992. "Emerging Principles for the Recognition of Peptide Antigens by MHC Class I Molecules." *Science* 257 (1991): 927–34.
46. Scott Southwood, John Sidney, Akihiro Kondo, Marie-France del Guercio, Ettore Appella, Stephen Hoffman, Ralph T. Kubo, Robert W. Chesnut, Howard M Grey and Alessandro Sette. 1998, Several Common HLA-DR Types Share Largely Overlapping Peptide Binding Repertoires *J Immunol. J Immunol* 1998; 160:3363-3373; <http://www.jimmunol.org/content/160/7/3363>
47. HLA-DRB1 major histocompatibility complex, class II, DR beta Gene ID: 3123.
48. Dominguez Horta, María, y Noraylis Lorenzo Pérez, y Ariana Barbera Betancourt, y María Victoria Hernández Cuellar, y Ana María Torres Lima, y M. Nazabal, y H. Camacho, e Isabel María Hernández Cuellar, y Neisy Ortiz, y V. Morera, y Ramón Gabriel Padrón Palomares. 2006. "Caracterización de Moléculas HLA tipo II y evaluación de citocinas en



pacientes cubanos con Artritis Reumatoide". *Revista Cubana de Reumatología* 8 (9-10): 43-51

49. Júlia Kurkó Et al. 2013 Genetics of Rheumatoid Arthritis: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*; 45(2): 170–179. doi:10.1007/s12016-012-8346-7.
50. Albert J. C Zaja, Michael P. Manns, 2010, Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis, *GASTROENTEROLOGY* ;139:58 – 72, doi:10.1053/j.gastro.2010.04.053
51. Kareem Sassi , Jose M. Nieto , Sammy Saab 2015, – Trasplante de Hepatitis Autoimmune, páginas 174-188, Capítulo 15
52. Pos, W. et al. (2012) Crystal structure of the HLA-DM–HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell* 151, 1557–1568
53. Yin, Liusong, and Lawrence J. Stern. 2013. “HLA-DM Focuses on Conformational Flexibility Around P1 Pocket to Catalyze Peptide Exchange.” *Frontiers in Immunology* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00336
54. Liusong Yin, Zachary J. Maben, Aniuska Becerra and Lawrence J. Stern *J Immunol* July 15, 2015, 195 (2) 706-716; Evaluating the Role of HLA-DM in MHC Class II–Peptide Association Reactions DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403190>
55. Gilca, Rodica, Gaston De Serres, Mireille Tremblay, Marie-Louise Vachon, Eric Leblanc, Michel G Bergeron, Pierre Dery, and Guy Boivin. 2006. “Distribution and Clinical Impact of Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in Hospitalized Children over 2 Winter Seasons.” *The Journal of Infectious Diseases* 193: 54–58. doi:10.1086/498526.
56. Vandini, Silvia, Carlotta Biagi, and Marcello Lanari. 2017. “Respiratory Syncytial Virus: The Influence of Serotype and Genotype Variability on Clinical Course of Infection.” *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi:10.3390/ijms18081717.
57. Johansson, Cecilia. 2016. “Respiratory Syncytial Virus Infection: An Innate Perspective.” *F1000Research* 5 (December): 2898. doi:10.12688/f1000research.9637.1.

58. Melero, José A., Vicente Mas, and Jason S. McLellan. 2017. "Structural, Antigenic and Immunogenic Features of Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins Relevant for Vaccine Development." *Vaccine* 35 (3). Elsevier Ltd: 461–68. doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.045.
59. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. 2017. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev* 30:277–319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-16>
60. Emma Rey-Jurado and Alexis M. Kalergis. 2017. Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia—Implications for Vaccine Design. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 556; doi:10.3390/ijms18030556
61. Nicolás M. S. Gálvez, Jorge A. Soto, Alexis M. Kalergis, 2017, New Insights Contributing to the Development of Effective Vaccines and Therapies to Reduce the Pathology Caused by hRSV. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1753; doi:10.3390/ijms18081753.
62. Alexander Kotelkin, Igor M. Belyakov, Lijuan Yang, Jay A. Berzofsky, Peter L. Collins, and Alexander Bukreyev, 2006, The NS2 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Suppresses the Cytotoxic T-Cell Response as a Consequence of Suppressing the Type I Interferon Response. *JOURNAL OF VIROLOGY*,, p. 5958–5967 Vol. 80, doi:10.1128/JVI.00181-06.
63. Claire P Straub, Wei-Har Lau, Faith M Preston, Madeleine J Headlam, Jeffery J Gorman, Peter L Collins and Kirsten M Spann, 2011, Mutation of the elongin C binding domain of human respiratory syncytial virus non-structural protein 1 (NS1) results in degradation of NS1 and attenuation of the virus. *Straub et al. Virology Journal*, 8:252 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-252>
64. Hastie M et al. 2012 The Human Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein 1 Regulates Type I and Type II Interferon Pathways. *Molecular & Cellular Proteomics* 11: 10.1074/mcp.M111.015909, 108–127
65. Peter L. Collins. Rachel Fearn. Barney S. Graham, 2013, espinoza *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 372: 3–38. Doi:10.1007/978-3-642-38919-1\_1.

66. Céspedes P et al. .2014, Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. PNAS, DOI:10.1073/pnas.1400760111.
67. Ruchira Mitra, Pradyumna Baviskar, Rebecca R, 2012, Duncan-Decocq, Darshna Patel, and Antonius G. P. Oomens. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. Journal of Virology p. 4432–4443. 2012. DOI:10.1128/JVI.06744-11
68. Ghildyal, Reena, Adeline Ho, and David A. Jans. 2006. “Central Role of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein in Infection.” FEMS Microbiology Reviews. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x.
69. Liang, Bo, Sonja Surman, Emerito Amaro-Carambot, Barbora Kabatova, Natalie Mackow, Matthias Lingemann, Lijuan Yang, et al. 2015. “Enhanced Neutralizing Antibody Response Induced by Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Expressed by a Vaccine Candidate.”. Journal of Virology 89 (18): 9499–9510. doi:10.1128/JVI.01373-15.
70. Rossey, Iebe, Jason S. McLellan, Xavier Saelens, and Bert Schepens. 2017. “Clinical Potential of Prefusion RSV F-Specific Antibodies.” Trends in Microbiology. doi:10.1016/j.tim.2017.09.009.
71. Gagliardi T, B, Criado M, F, Proença-Módena J, L, Saranzo A, M, Iwamoto M, A, de Paula F, E, Cardoso R, S, Delcaro L, S, Silva M, L, Câmara A, A, Arruda E: Syncytia Induction by Clinical Isolates of Human Respiratory Syncytial Virus A. Intervirology 2017;60:56-60. doi: 10.1159/000480014
72. Carter, Stephen D., Kyle C. Dent, Elizabeth Atkins, Toshana L. Foster, Mark Verow, Petra Gorny, Mark Harris, et al. 2010. “Direct Visualization of the Small Hydrophobic Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Reveals the Structural Basis for Membrane Permeability.” FEBS Letters 584 (13): 2786–90. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.006.
73. Fuentes, S., K. C. Tran, P. Luthra, M. N. Teng, and B. He. 2007. “Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein.” Journal of Virology 81 (15): 8361–66. doi:10.1128/JVI.02717-06.
74. Schepens, Bert, Koen Sedeyn, Liesbeth Vande Ginste, Sarah De Baets, Michael Schotsaert, Kenny Roose, Lieselot Houspie, et al. 2014.

- “Protection and Mechanism of Action of a Novel Human Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate Based on the Extracellular Domain of Small Hydrophobic Protein.” *EMBO Mol Med* 6: 1436–54. doi:10.15252/emmm.201404005.
75. Schepens, Bert. 2015. “Small Hydrophobic Protein of Respiratory Syncytial Virus as a Novel Vaccine Antigen.” *Immunotherapy* 7: 203–6. doi:10.2217/imt.15.11.
76. Melero, José A., Vicente Mas, and Jason S. McLellan. 2017. “Structural, Antigenic and Immunogenic Features of Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins Relevant for Vaccine Development.” *Vaccine* 35 (3). Elsevier Ltd: 461–68. doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.045.
77. Boyoglu-Barnum S, Todd SO, Meng J, Barnum TR, Chirkova T, Haynes LM, Jadhao SJ, Tripp RA, Oomens AG, Moore ML, Anderson LJ. 2017. Mutating the CX3C motif in the G protein should make a live respiratory syncytial virus vaccine safer and more effective. *J Virol* 91:e02059-16. [https:// doi.org/10.1128/JVI.02059-16](https://doi.org/10.1128/JVI.02059-16).
78. Chirkova, Tatiana, Songbai Lin, Antonius G P Oomens, Kelsey A Gaston, Seyhan Boyoglu-Barnum, Jia Meng, Christopher C Stobart, et al. 2015. “CX3CR1 Is an Important Surface Molecule for Respiratory Syncytial Virus Infection in Human Airway Epithelial Cells.” *The Journal of General Virology* 96 (9). Microbiology Society: 2543–56. doi:10.1099/vir.0.000218.
79. Fix, J., Galloux, M., Blondot, M. L., & Eléouët, J. F. (2011). The insertion of fluorescent proteins in a variable region of respiratory syncytial virus L polymerase results in fluorescent and functional enzymes but with reduced activities. *The open virology journal*, 5, 103-8
80. Castagné, Nathalie, Alexandra Barbier, Julie Bernard, Human Rezaei, Jean Claude Huet, Céline Henry, Bruno Da Costa, and Jean François Eléouët. 2004. “Biochemical Characterization of the Respiratory Syncytial Virus P-P and P-N Protein Complexes and Localization of the P Protein Oligomerization Domain.” *Journal of General Virology* 85 (6): 1643–53. doi:10.1099/vir.0.79830-0.
81. Espinoza J, Bueno S, Riedel C, Kalergis A. 2014 Induction of protective effector immunity to prevent pathogenesis caused by the respiratory

- syncytial virus. Implications on therapy and vaccine design *Immunology*, 143, 1–12. doi:10.1111/imm.12313
82. Rey-Jurado, E., & Kalergis, A. M. (2017). Immunological Features of Respiratory Syncytial Virus-Caused Pneumonia-Implications for Vaccine Design. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 556. doi:10.3390/ijms18030556
83. Mylene Corzo-López y Odalys Valdés-Ramírez.\* El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 44, No. 2, mayo-agosto, 2013. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181227534005.pdf>
84. Chartrand, C., Tremblay, N., Renaud, C., & Papenburg, J. (2015). Diagnostic Accuracy of Rapid Antigen Detection Tests for Respiratory Syncytial Virus Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3738-49.
85. Pilie, P., W. A. Werbel, J. Riddell, X. Shu, D. Schaubel, and K. S. Gregg. 2015. "Adult Patients with Respiratory Syncytial Virus Infection: Impact of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplantation on Outcomes." *Transplant Infectious Disease* 17 (4). Blackwell Publishing Inc.: 551–57. doi:10.1111/tid.12409.
86. Paes, Bosco A., Ian Mitchell, Anna Banerji, Krista L. Lanctôt, and Joanne M. Langley. 2011. "A Decade of Respiratory Syncytial Virus Epidemiology and Prophylaxis: Translating Evidence into Everyday Clinical Practice." *Canadian Respiratory Journal*. Hindawi Limited. doi:10.1155/2011/493056.
87. Bont, Louis, Paul A. Checchia, Brigitte Fauroux, Josep Figueras-Aloy, Paolo Manzoni, Bosco Paes, Eric A.F. and Xavier Carbonell-Estrany. 2016. "Defining the Epidemiology and Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants and Children in Western Countries." *Infectious Diseases and Therapy*. Springer Healthcare. doi:10.1007/s40121-016-0123-0
88. Robbie, G. J., Criste, R., Dall'acqua, W. F., Jensen, K., Patel, N. K., Losonsky, G. A., & Griffin, M. P. (2013). A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(12), 6147-53.

89. Graham BS,(2016) , Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. Vaccine , <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.083>
90. J.A. Bastarache, T. Koyama, N.E Wickersham, and L.B. Ware, 2014 ;. Validation of a multiplex electrochemiluminescent immunoassay platform in human and mouse samples. *J Immunol Methods*, doi:10.1016/j.jim.2014.04.006.
91. Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Pérez Del Villar, L., Vizcaíno, C., Vicente, B., Fernández-Soto, P., Muro, A. (2014). In vitro and in vivo studies for assessing the immune response and protection-inducing ability conferred by *Fasciola hepatica*-derived synthetic peptides containing B- and T-cell epitopes. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105323>
92. Creech AL, Ting YS,2018,The Role of Mass Spectrometry and Proteogenomics in the Advancement of HLA Epitope Prediction.*Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201700259.
93. L.E VARGAS,2011, Influencia de HLA-DM en la estabilidad del complejo formado entre la molécula HLA-DR4 y un péptido de la proteína CS de *P. falciparum*. Universidad Nacional Facultad de Medicina, <http://bdigital.unal.edu.co/8745/1/597342.2011.pdf>
94. Yin, Liusong, Peter Trenh, Abigail Guce, Marek Wieczorek, Sascha Lange, Jana Sticht, Wei Jiang, et al. 2014. "Susceptibility to HLA-DM Protein Is Determined by a Dynamic Conformation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecule Bound with Peptide." *Journal of Biological Chemistry* 289 (34). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.: 23449–64. doi:10.1074/jbc.M114.585539
95. Yin, L., J. M. Calvo-Calle, O. Dominguez-Amorocho, and L. J. Stern. 2012. "HLA-DM Constrains Epitope Selection in the Human CD4 T Cell Response to Vaccinia Virus by Favoring the Presentation of Peptides with Longer HLA-DM-Mediated Half-Lives." *The Journal of Immunology* 189 (8): 3983–94. doi:10.4049/jimmunol.1200626.
96. Hall, Frances C., Joshua D. Rabinowitz, Robert Busch, Kevin C. Visconti, Michael Belmares, Namrata S. Patil, Andrew P. Cope, et al. 2002. "Relationship between Kinetic Stability and Immunogenicity of HLA-

- DR4/Peptide Complexes.” *European Journal of Immunology* 32 (3): 662–70. doi:10.1002/1521-4141(200203)32:3<662::AID-IMMU662>3.0.CO;2-5.
97. Lin, Hong Huang, Guang Lan Zhang, Songsak Tongchusak, Ellis L. Reinherz, and Vladimir Brusic. 2008. “Evaluation of MHC-II Peptide Binding Prediction Servers: Applications for Vaccine Research.” In *BMC Bioinformatics*. Vol. 9. doi:10.1186/1471-2105-9-S1-S22
98. Achal Pashine, Robert Busch, 2003, Interaction of HLA-DR with an Acidic Face of HLA-DM Disrupts Sequence-Dependent Interactions with Peptides. *Immunity*, Vol. 19, 183–192, DOI:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00200-0.
99. Viviana Marin-Esteban, Kirsten Falk, Chemical, 2004, Analogues of HLA-DM Can Induce a Peptide-receptive State in HLA-DR Molecules. *JBC Papers in Press*, DOI 10.1074/jbc.M407598200.
100. Alvarado A, Tenorio G.V R, Aguilar S,A, Sandoval T,AH.2006.Promesas y limitaciones de las vacunas antigénicas. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*. [Internet]:37(2):26-37. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937205.pdf>

## ANEXOS

### Anexo 1. Dilución de los péptidos evaluados

Nombre del péptido	Lote	Peso molecular	Dilución			Concentración ( $\mu\text{M}$ )
			H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	DMSO ( $\mu\text{L}$ )	V. final ( $\mu\text{L}$ )	
SH-50	1718260-51582	1830	350	150	500	1092.8
F-137	1718260-51575	1375	350	150	500	1454.5
L-962	1718260-51576	1726	350	300	650	891.34
N-298	1718260-51577	1658	350	150	500	1206.2
L-832	1718260-51578	1738	350	150	500	1150.7
L-449	1718260-51579	1745	350	150	500	1146.1
M-68	1718260-51580	1614	350	150	500	1239.1
G1 58	1718260-51581	1641	350	300	650	937.5



**Anexo 2. Composición del buffer de unión para las moléculas HLA-DR1 y HLA-DR4**

**Composición buffer para moléculas DR1**

**Buffer de unión pH 7.0**

Diluyente: PBS 1x

Volumen final: 100 mL

Componente	Concentración	Cantidad
BSA	0.1 %	100 mg
Azida	0.02%	20 mg
Tween 20	0.1%	100 µL
EDTA	2.5 mM	40 µL

**Composición buffer para moléculas DR4**

**Buffer de unión pH 5.5**

Diluyente: H<sub>2</sub>O destilada

Volumen final: 100 mL

Componente	Concentración	Cantidad
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM	1 379 mg
NaCl	50 mM	292,22 mg
BSA	0.1 %	100 mg
Azida	0.02%	20 mg
Tween 20	0.1%	100 µL
EDTA	1 mM	200 µL
Octyl P glucósido	0.05%	50 mg

### Anexo 3. Protocolo para ensayos de unión

1. Diluir moléculas DR purificadas (3.8  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ ) en buffer de unión.
2. Adicionar en tubo eppendorf 90  $\mu\text{L}$  de la dilución anterior.
3. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  del péptido problema a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  (7500 excesos) solubilizado en agua destilada estéril y DMSO.
4. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de HA biotinilada a una concentración 3.8  $\mu\text{M}$  solubilizado en PBS 1x/DMSO proporción  $\frac{1}{4}$  respectivamente.
5. El volumen final de reacción es 150  $\mu\text{L}$ , incubar 72 horas a 37° C.

En caja de ELISA

6. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de anti DR 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LB 3.1) solubilizado en PBS 1x en cada pozo de reacción.
7. Dejar reaccionar toda la noche a 4°C
8. Lavar tres veces con PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0,05%
9. Bloquear por 2 horas con una solución de BSA al 0,25% en PBS 1X a temperatura ambiente.
10. Lavar tres veces con PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0,05%
11. Adicionar 60  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de la solución del complejo HLA-DR/péptido, incubar 2 horas a temperatura ambiente.
12. Lavar tres veces con PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0,05%
13. Adicionar 50  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de streptavidin fosfatasa dilución 1/500 en PBS 1X y dejar reaccionar por 1 hora a temperatura ambiente.
14. Lavar dos veces con PBS 1X conteniendo Tween 20 al 0,05% y realizar un último lavado con solo PBS 1X.
15. Revelar la reacción con 200  $\mu\text{L}$  de la solución reveladora del kit comercial de la casa KPL (pNPP Microwell Substrate System) que utiliza como sustrato de la fosfatasa el P-Nitrofenilfosfato.
16. Dejar desarrollar color a 37 °C durante al menos 1 hora.
17. Leer en lector de ELISA a 415 nm.

#### **Anexo 4. Cálculos para obtener el porcentaje de unión de cada uno de los péptidos.**

**Nota:** Cada una de las reacciones se realizaron por duplicado.

OD: Densidad óptica

R: Reacción

OD CP1: Densidad óptica control positivo 1

OD p: Densidad óptica péptido evaluado

$$(OD R1 + OD R2) / 2 = \text{Valor promedio de cada reacción.}$$

**Nota:** El sustrato P-Nitrofenilfosfato de la enzima streptavidin fosfatasa es de un color ligeramente amarillo, color que aumenta su intensidad al reaccionar con la enzima, es por ello que la densidad óptica del blanco de reacción debe ser restada a cada una de las OD de los péptidos evaluados, incluyendo los controles.

$$(OD \text{ Control positivo} - OD \text{ Blanco}) = OD \text{ CP1}$$

$$(OD \text{ Reacción de cada péptido evaluado} - OD \text{ Blanco}) = OD \text{ p}$$

Con los valores obtenidos anteriormente se aplica regla de 3 para cada una de las reacciones:

$$\% \text{ de unión de HA biotinizada} = (OD \text{ p} * 100 \% \text{ de unión}) / OD \text{ CP1}$$

$$\% \text{ de unión del péptido} = (100 - \% \text{ de unión de HA biotinizada})$$

**Anexo 5. Desviación estándar del porcentaje de unión de cada péptido a los alelos HLA-DR en presencia y ausencia de DM.**

PEPTIDOS	HLA-DR1		HLA-DR4	
	-DM	+DM	-DM	+DM
SH-50	0,251	4.76	0	9,20
F-137	0,390	0	0,841	4,6
L-962	0,574	5.71	1,59	15,24
N-298	0,366	8,25	7,015	0,090
L-832	3,379	7,93	0,79	10,43
L-449	2,18	0,47	20,34	4,76
M-68	1,11	5,39	5,19	1,88
G1-58	1,48	0	3,46	5,38

## Anexo 6. Protocolo algoritmo PROPRED

Instrucciones de uso:

1. Escribir la siguiente dirección URL en el navegador web  
<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>
2. El usuario debe completar el formulario de envío de secuencia. Una breve descripción de cada campo:
  - Nombre del antígeno: este campo es opcional.
  - Pegar la secuencia del antígeno en uno de los formatos estándar (FASTA, EMBL, PIR, etc.) o la secuencia de aminoácidos en código de una sola letra.
  - El usuario también puede cargar la secuencia de antígenos directamente desde un archivo.
  - Seleccionar el formato de entrada (secuencia de aminoácidos de un solo código, formato estándar FASTA, EMBL, PIR)
  - Seleccionar el umbral más adecuado, este parámetro % de umbral permite al usuario seleccionar diferentes niveles de rigor, para modular los resultados de predicción: un umbral inferior corresponde a una predicción de alta rigurosidad, es decir, a una tasa menor de falsos positivos y a una tasa más alta de falsos negativos. Por el contrario, un valor umbral más alto (restricción baja) corresponde a una tasa más alta de falsos positivos y una tasa más baja de falsos negativos.
  - Seleccionar el formato de visualización: el servidor ofrece diferentes formatos de visualización de resultados, HTML I, HTML II, Vista gráfica.
3. Finalmente se hace clic en el botón "Submit sequence"