



***OPTIMIZACIÓN DE PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DEL ANTÍGENO
AMA – 1 DE Plasmodium yoelii, PARA EL ANCLAJE A MOLÉCULAS H2-IE^d EN
MODELO MURINO.***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ – 2022



***DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE
ANTÍGENO AMA-1 DE *Plasmodium yoelii* DIRIGIDOS A MOLÉCULAS H2-IEd EN
MODELO MURINO.***

LUISA FERNANDA HERNÁNDEZ BERMÚDEZ

Kewin Jair Rodríguez Obediente – MSc (c)
ASESOR EXTERNO- FIDIC

Edith del Carmen Hernández Rojas - MSc
ASESORA INTERNA - UCMC

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C. 2022



***DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE
ANTÍGENO AMA-1 DE Plasmodium yoelii DIRIGIDOS A MOLÉCULAS H2-IEd EN
MODELO MURINO***

LAUREADA _____

MERITORIA _____

APROBADA _____

JURADOS

Liliana Constanza Muñoz

Nelson Arturo Salazar

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C. 2022

Dedicatoria

Con mucho amor, dedico este trabajo a:

A Dios, por permitirme la vida y ser mi guía en cada decisión que tomo

A mis padres Diana y Hernán, pilares de mi vida, por su dedicación y amor incondicional, por brindarme el apoyo constante que me permite creer en mí, por demostrarme que no hay imposibles, son mi mayor inspiración para esta y cada una de las metas de mi vida

A mi hermana Sofi, por siempre estar dispuesta a escucharme, por la paciencia y todas las enseñanzas

A mis abuelas, por sentirse orgullosas de mí e incluirme en todas sus peticiones, a mis abuelos que desde el lugar donde están se esfuerzan por cuidarme y darme templanza para enfrentar todas y cada una de las situaciones, y en general a toda mi familia, por siempre estar dispuestos a ayudar y por confiar en mí

A Jerson, por acompañarme, darme ánimo en días de dificultad y hacerme ver lo lejos que puedo llegar.

Todos fueron parte indispensable para culminar este proyecto de la mejor manera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a todas las personas que en algún momento de mi vida me han apoyado, y me han aportado para ser mejor persona cada día

A mi familia por nunca dejar de creer en mí, por enseñarme a ser valiente y esforzarme por conseguir las cosas que quiero

A mis amigos, la compañía constante que permite disfrutar del camino incluso cuando la meta parece muy lejana

A la vida por demostrarme que no existen imposibles cuando algo se quiere lograr con toda el alma y corazón, y siempre ponerme en el lugar que debo estar y en las situaciones correctas para aprender de cada una

A mis profesores que con su experiencia me demostraron un mundo lleno de conocimiento por explorar en la ciencia y especialmente el área de la salud

A mis asesores Kewin Rodríguez y Edith Hernández, quienes con se esforzaron por enseñarme y acompañarme en este camino lleno de aprendizaje y retos

A la FIDIC, especialmente a la doctora Diana Díaz y todo el grupo de pasantes de Inmunología y Biología molecular, donde siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y compartieron conmigo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2.1. Pregunta problema	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. General.....	15
3.2. Específicos	16
3.2.1. Determinar la antigenicidad de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA – 1 de <i>Plasmodium yoelii</i>	16
3.2.2. Seleccionar péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de <i>Plasmodium yoelii</i> dependientes de su unión a moléculas H2-IE ^d	16
3.2.3. Diseñar y seleccionar <i>in silico</i> péptidos quiméricos con capacidad de unión a H2-IE ^d . 16	
4. ANTECEDENTES	16
5. MARCO REFERENCIAL	18
5.1. Malaria	18
5.1.1. Ciclo de vida.....	20
5.2. Epidemiología	21
5.3. Malaria murina.....	23
5.3.1. <i>Plasmodium yoelii</i>	24
5.3.2. Cultivo celular	24
5.4. Aspectos éticos.....	25
5.4.1. Normativa de manejo animal.....	25
6. DISEÑO METODOLÓGICO	25
6.1. Universo, población, muestra	25
6.1.1. Población de estudio.....	26
6.1.2. Muestra	26
6.2. Justificación	26
6.2.2. Hipótesis	29
7. METODOLOGÍA.....	29
7.2. Infección de ratones con <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL	30

7.2.1. Parasitemia e histología.....	31
1.1. Evaluación de antigenicidad de péptidos derivados de <i>PyAMA-1</i>	31
7.3. Cultivo de <i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL.....	32
7.3.1. Cultivo celular.....	32
7.4. Evaluación de reconocimiento específico de molécula H2-IE ^d por anticuerpo producido <i>in vitro</i>	34
7.4.1. Purificación de moléculas H2-IE ^d	34
7.5. Cuantificación de moléculas H2 - IE ^d	36
7.6. Perfil de unión de péptidos a moléculas H2-IE ^d	36
7.7. Diseño y optimización de péptidos quiméricos para anclaje a moléculas H2-IE ^d	37
8. RESULTADOS.....	37
8.1. Curso de la infección por <i>Plasmodium yoelii</i> en modelo murino.....	38
8.2. Infección <i>in vitro</i> de GRs murinos con <i>P. yoelii</i>	41
8.3. Evaluación de antigenicidad presentada por cada péptido derivado de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de <i>Plasmodium yoelii</i>	42
8.4. Evaluación de capacidad de unión a CMH H2-IE ^d	45
8.4.1. Evaluación de identidad del H2 – IE ^d obtenido.....	47
8.4.2. Cuantificación CMH.....	49
8.5. Constructos diseñados <i>in silico</i> con alta unión a H2-IE ^d	52
9. Discusión.....	59
10. CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida del parásito de la malaria.....	21
Figura 2. Casos notificados, canal endémico de malaria, Colombia, semana epidemiológica 11,2022.....	22
Figura 3. Modelo de infección en modelo murino.....	30
Figura 4. Porcentaje de parasitemia de la infección por <i>Plasmodium yoelii</i>	39
Figura 5. Cortes histológicos de bazo con tinción hematoxilina/eosina.....	40

Figura 6. Seguimiento de formas intraeritrocíticas de <i>Plasmodium yoelii</i> en glóbulos rojos murinos, por microscopia de fluorescencia y marcaje con naranja de acridina.	41
Figura 7. Diagrama de absorbancia presentada por individuo frente a los diferentes péptidos evaluados.	43
Figura 8. Diagrama específico de absorbancias presentadas por cada ratón al ser tratado con cada péptido.	44
Figura 9. Reconocimiento de células humanas presentadoras de antígeno y moléculas de CMH H2-IE ^d obtenidas de cultivo de células PAI por el Anti-DR producido por la línea celular HB55.	46
Figura 10. Dot Blot de fracciones eluidas de la purificación de moléculas H2-IE ^d por columna de sefarosa acoplada a Anti – DR.	48
Figura 11. Western Blot y SDS PAGE confirmatorio de especificidad y pureza de la molécula CMH H2-IE ^d respectivamente.	49
Figura 12. Placa de cuantificación y curva de BSA.	50
Figura 13. Porcentajes de unión al CMH murino H2-IE ^d presentado por cada péptido.	51
Figura 14. Estructura bidimensional constructo A42681.	56
Figura 15. Estructura bidimensional constructo A42903.	57
Figura 16. Estructura bidimensional constructo A42904.	58

Índice de tablas

Tabla 1. Banco de molécula H2-IE ^d purificada.	50
Tabla 2. Características de los constructos seleccionados.	52

RESUMEN

La malaria ha sido descrita por la OMS como una de las enfermedades tropicales de mayor importancia en salud pública debido a las cifras de mortalidad y morbilidad que presentan en su mayor parte en zonas donde los determinantes de salud son precarios, esto debido a las dificultades encontradas para su control y eliminación. La existencia de un tratamiento profiláctico se hace cada vez más necesario para mitigar los efectos de esta afección representando así un reto para la comunidad científica, por esta razón se han diseñado nuevas estrategias para hallar proteínas candidatas a vacuna contra la malaria. En este proyecto se evaluó la antigenicidad y capacidad de unión a Complejo Mayor de Histocompatibilidad H2-IE^d de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA – 1 de *Plasmodium yoelii*, adicionalmente mediante herramientas bioinformáticas se diseñaron 6 constructos de péptidos quiméricos con alta unión a H2-IE^d que permiten ser utilizados como objeto de estudio para la determinación de la respuesta inmune presentada en modelo murino. Los resultados obtenidos nos permiten garantizar la metodología y su aplicabilidad para la evaluación *in vitro* de péptidos y la optimización *in silico* de constructos que representen importancia en el desarrollo de un tratamiento profiláctico peptídico ante esta u otra enfermedad.

Palabras clave: *Plasmodium*, complejo mayor de histocompatibilidad, péptido, AMA-1, bioinformática.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades tropicales con mayor interés en salud pública a nivel mundial debido a que representa un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad, además de impactos negativos a nivel socioeconómico. Es causada por un protozooario intracelular

perteneciente al género *Plasmodium* spp., y es transmitida a través de la picadura del mosquito hembra infectado del género *Anopheles*. El ciclo de vida del parásito es muy complejo e involucra una fase de multiplicación sexuada o esporogónica en el vector y otra asexuada en el humano o esquizogónica, existen más de 150 especies de *Plasmodium* que infectan diferentes vertebrados, pero solo cinco especies afectan al humano (1, 2).

En la región de las Américas, en la actualidad, los casos de malaria se han reducido en un 58% desde el reporte emitido por la Organización Mundial de la Salud para el año 2000. Con relación a malaria se ha reportado como la carga epidemiológica recae en un 90% sobre los países pertenecientes al continente africano, adicionalmente, considerando una tendencia a la disminución de casos reportados durante el 2020 en la región de las Américas, este comportamiento es inverso en la Región de África, lo que esboza una complejidad al interpretar las dinámicas de transmisión de la enfermedad en una población en aumento. No obstante, la ausencia de garantías en la calidad de vida en estos territorios hace que la letalidad de la enfermedad sea alta, de allí, que en el 2020 un 62% de la tasa de mortalidad asociada a malaria se presentó en esta zona (3).

Con el avance de tecnologías para el estudio genético y su relación con el comportamiento de diversos microorganismos se ha podido determinar similitudes entre especies de un mismo género de parásitos, así como es el caso de *P. vivax*, principal agente causal de malaria en nuestro país y en las Américas en general, y *P. yoelii* agente causal de malaria en ratones con curso de infección parecido. Una de las razones descritas para la predominancia de *P. vivax* en continente Americano y Asiático se asocia a la presencia de antígeno Duffy, relevante para la invasión de esta especie, en los individuos con mayor riesgo de contraer la enfermedad (4). La investigación con *P. vivax* representa un reto en el campo de la investigación, debido

a que el mantenimiento de un cultivo continuo del parásito resulta complejo gracias a su preferencia por línea eritroide inmadura (reticulocitos), así como ensayos *in vivo* en humanos no sería una opción por aspectos bioéticos y de regulación legal (5). De este modo se sugieren alternativas con mayor accesibilidad que permitieran desarrollar y evaluar dinámicas de invasión y respuesta inmune que puedan ser escaladas a modelo humano. El modelo de malaria murina que ha sido ampliamente estudiada ofrece estas características, convirtiéndose en un biomodelo flexible para el estudio de malaria a nivel inmunológico (6).

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario diseñar estrategias eficientes para erradicar la infección por malaria, en ese orden de ideas los medicamentos antimaláricos se han convertido en la mejor opción para tratar el cuadro clínico de malaria, sin embargo, las especies de *Plasmodium* spp. involucradas en el desarrollo de la enfermedad en humanos, recientemente han generado resistencia a nuevos fármacos disponibles como la artemisinina (1). La vacunación masiva sería una excelente alternativa, no obstante, una vacuna efectiva contra malaria aún no se encuentra disponible, y su desarrollo tiene muchas limitantes asociadas a la diversidad de haplotipos de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presentes en la población y a la alta tasa de polimorfismos presentes en el parásito, que este usa como mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero (4).

El sistema inmune del hospedero en respuesta a una infección por *Plasmodium* spp., utiliza todos los mecanismos de defensa para lograr disminuir la parasitemia de una manera progresiva y así acortar la duración de la enfermedad, pero no logran eliminar la infección, en esta respuesta se encuentra la participación de la inmunidad innata, en la cual, las principales células encargadas de la respuesta son las células dendríticas, los macrófagos, las

Natural Killer (NKs) y *Natural Killer citotóxicas* (NKTs), que a través de la actividad fagocítica, la producción de IFN tipo I y otras interleucinas ayudan a la eliminación de glóbulos rojos. Además, el control de la enfermedad requiere de la inmunidad adquirida que no siempre es efectiva, sin embargo, está protagonizada principalmente por una respuesta modulada por la producción de anticuerpos contra la infección en estadio eritrocítico, y una respuesta celular mediada por linfocitos T CD8 contra hepatocitos parasitados, en el estadio pre-eritrocítico (7). Estudios científicos enfocados en los procesos moleculares y celulares involucrados en la inmunidad protectora y fisiopatología podrían ayudar al diseño de agentes inmunomoduladores y/o una vacuna eficaz para tratar la malaria (8).

Este trabajo presenta resultados interesantes que sugieren la presencia de péptidos antigénicos derivados de regiones conservadas del antígeno AMA-1 de *Plasmodium yoelii*. Encontramos que esta respuesta posee una relación con la carga parasítica en el biomodelo post-infección. Adicionalmente, estos péptidos poseen un perfil de unión específica a moléculas H2-IE^d de ratón que podría estar asociado a una activación de la respuesta inmune celular contra el parásito. A partir de estos péptidos se diseñaron 6 constructos quiméricos con alta capacidad de unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de ratón determinada por análisis *in silico*, esta metodología permitió la inclusión de un epítipo T artificial que asegure la presentación antigénica y la activación de células T efectoras, garantizando el diseño y selección eficaz de candidatos para el desarrollo de una vacuna peptídica multi-epitope contra la malaria.

Se espera con estos resultados contribuir al conocimiento científico dirigido al desarrollo de pruebas de concepto donde se lleve a cabo la caracterización específica de la respuesta inmune generada tras la inmunización de modelo murino con los péptidos diseñados y

probados en pruebas *in vitro* para así dirigir hacia el desarrollo de tratamientos inmunoprolácticos con un enfoque hacia la población humana.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades tropicales se han convertido en un problema de salud pública debido a sus manifestaciones clínicas agravadas por las condiciones de pobreza relacionadas en diferentes grupos poblacionales alrededor del mundo, adicional a esto, se suma la dificultad para establecer estrategias de prevención y tratamiento. En relación a malaria, según reportes, la carga epidemiológica con más incidencia de la enfermedad se presenta principalmente sobre los países pertenecientes al continente africano, esto asociado los problemas de salud pública y la deficiencia en la calidad de vida en estos territorios, provocando también aumento letalidad de la enfermedad, en el reporte del año 2020 se reportó que la tasa de mortalidad asociada a la malaria se presentó en dicho continente con más del 62% (1).

En el continente americano la situación no es alentadora, Colombia ocupa el segundo lugar con más incidencia de casos, precedida por Brasil, considerando que, pese a los esfuerzos de jornadas de prevención en la mayoría de zonas endémicas con alto riesgo de contagio, estas no resultan del todo efectivas. Sin embargo, la situación no sólo debe atribuirse a las dificultades en los programas de entidades promotoras de salud; mosquitos del género *Anopheles* spp., vector de la enfermedad ha desarrollado niveles de resistencia a insecticidas utilizados ampliamente como control vectorial, promoviendo la supervivencia del mosquito e impactando negativamente sobre la morbilidad – mortalidad asociada a malaria (2).

Considerando la necesidad de controlar esta enfermedad la OMS ha realizado llamados a la creación de nuevos instrumentos de prevención y tratamiento de la enfermedad que durante años ha representado un desafío a la salud pública en países pertenecientes al trópico (9).

Actualmente se conocen un mayor número de cepas pertenecientes a *P. falciparum* y *P. vivax* con desarrollo de resistencia a los medicamentos utilizados para controlar la enfermedad, no obstante, las grandes farmacéuticas no están interesadas en hacer una altísima inversión para un medicamento que estaría destinado a poblaciones sin recursos para costear dichos tratamientos (1). En este momento se desarrollan estudios clínicos con candidatos a vacunas que representan una esperanza para el control de esta enfermedad, sin embargo, estas vacunas no están exentas de presentar efectividad limitada como consecuencia del polimorfismo descrito en los diferentes estadios del parásito dentro de su ciclo de vida (9).

Puntualizando, se ha descrito como vacunas con base en baculovirus dirigidas a la proteína AMA1 de *P. yoelii* han demostrado capacidad protectora parcial o completa ante infecciones causadas por *P. yoelii* en ratones BALB/c (10).

Por otra parte, previos estudios han reportado asociaciones entre los haplotipos del CMH y la inmunogenicidad inducida por vacunas como las dirigidas contra hepatitis B, influenza, ántrax, rubéola, entre otros (11). Teniendo en cuenta lo anterior, la modulación de la respuesta inmune adaptativa está directamente relacionada con el tiempo de unión del complejo TCR (receptor de células T) :p (péptido): CMH-II, o el perfil de expresión p:CMH-II en la superficie de células presentadoras, lo que a su vez estimula la expansión clonal de células efectoras y de memoria, cruciales para el control de un patógeno (12).

El modelo animal sugerido para la investigación de malaria humana es el mono *Aotus spp.*, sin embargo, existen numerosas complicaciones de carácter ético con el manejo de los mismos dentro de proyectos de avances científicos (13). Una alternativa de modelo animal es el sistema murino dentro del cual cabe destacar la relación existente entre el CMH humano (HLA, del inglés, Human Leukocyte Antigen) y su respectivo H2 en sistema murino, en humanos se encuentran coexpresadas en superficie celular tres isotipos de moléculas clase II, (HLA DR, DQ y DP), y dos de estas a su vez se presentan en el modelo murino como isoformas denominadas I-A e I-E con homología alta para moléculas HLA DQ y HLA DR respectivamente (14).

Debido a lo anterior y con el fin de hallar una opción diferente al primate no humano que cumpla con la objetividad de realizar ensayos seguros y que permitan un acercamiento real al comportamiento de la patología se propone como modelo, malaria murina causada por *Plasmodium yoelii* que facilite la evaluación del comportamiento y cinética de la respuesta inmune estimulada por tratamientos inmunoprolácticos con un enfoque dirigido al anclaje del inmunógeno al CMH y a la activación de una respuesta inmune celular efectore que sea capaz de controlar la infección por malaria.

2.1. Pregunta problema

¿Podrán los péptidos derivados de regiones conservadas de PyAMA-1 unirse de forma específica *in vitro* a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de ratón, y a su vez ser inmunogénicos?

3. OBJETIVOS

3.1.General

Optimizar péptidos quiméricos derivados de la proteína AMA-1 de *Plasmodium yoelii* para el anclaje a moléculas H2-IE^d de ratón.

3.2.Específicos

- 3.2.1.** Determinar la antigenicidad de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA – 1 de *Plasmodium yoelii*.
- 3.2.2.** Seleccionar péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *Plasmodium yoelii* dependientes de su unión a moléculas H2-IE^d.
- 3.2.3.** Diseñar y seleccionar *in silico* péptidos quiméricos con capacidad de unión a H2-IE^d.

4. ANTECEDENTES

El mayor problema que se presenta actualmente en el tratamiento de la malaria es la aparición de parásitos con resistencia a los medicamentos utilizados tradicionalmente, razón por la cual la implementación de alternativas para el manejo de la enfermedad, así como el desarrollo de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad se convierten en necesidades cada vez más críticas (2). Por un lado, se encuentra el avance en las técnicas moleculares mediante las cuales se puede hacer la identificación de antígenos involucrados en la interacción hospedero – patógeno en los que se pueda identificar una estrategia para el desarrollo de vacunas con una eficaz capacidad protectora, sin embargo, la misma diversidad antigénica que utiliza el patógeno como vías de evasión a la respuesta inmune limita la eficacia de vacunas diseñadas previamente (15).

En este orden de ideas, el Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA1), es un antígeno muy estudiado por su relevancia en el proceso de invasión en los parásitos del género *Apicomplexa* incluidos *Toxoplasma gondii*, *Babesia* spp., y los agentes causantes de la malaria

Plasmodium spp. (16), por estudios anteriores se ha podido conocer la composición y la función de este antígeno, el cual es una proteína transmembrana presente en los micronemas, y en la superficie de las formas invasoras de estos parásitos (17). Puntualizando, en *Plasmodium yoelii* (PyAMA-1) se conoce que está presente en la superficie de los merozoitos, el cual juega un rol fundamental en la reorientación del parásito que promueve la invasión a glóbulos rojos del hospedero, a través del complejo proteico generado con el antígeno de cuello de las roptrias RON2, durante la patofisiología presente en el estadio sanguíneo es donde se espera el desarrollo de la enfermedad (18), sin embargo, estudios realizados respecto a la patofisiología con *P. falciparum* plantean un perfil funcional en cuanto a la invasión en células hepáticas (19).

Esta proteína ha sido caracterizada en estudios previos donde se reporta que los dominios I/II de PyAMA-1 se ha visto relacionado con la unión a eritrocitos murinos mediante análisis de rosetas, utilizando técnicas de proteína recombinante en superficie de células COS-7 (20), por la presencia de bucles polimórficos entre dichos dominios, relacionado con esto existe evidencia significativa que estas moléculas son cruciales para la función de *PfAMA1* (17). Adicionalmente, se ha descrito que la inmunización con el antígeno recombinante de AMA-1 derivado de varias especies de *Plasmodium* spp. tiene una capacidad de protección cuando se realiza retos homólogos en modelo animal, de igual forma, como se ha asociado control de la malaria clínica con la presencia de anticuerpos específicos contra el agente etiológico, estos estudios también reportan un incremento en la respuesta inmune humoral efectiva contra el parásito tras la inmunización con el complejo AMA-RON2 de forma recombinante, estos anticuerpos son capaces de inhibir la entrada del parásito a glóbulos rojos (21, 22).

Dentro de las alternativas para el desarrollo de vacunas, se ha estudiado la posibilidad del bloqueo de proteínas con alto poder antigénico del parásito, la vacuna RTS,S /AS01, la cual está dirigida a la proteína del circumsporozoito (CSP) presente en abundancia en los esporozoitos, es decir el estadio pre eritrocítico del parásito, esto con el fin de prevenir la progresión a la etapa asexual de la infección (23, 24), a pesar de los avances en esta vacuna se ha observado una eficacia parcial contra la enfermedad clínica y la malaria complicada que disminuye con el tiempo, por lo cual la probabilidad de la erradicación de la malaria es baja (23, 25).

Por otro lado, estudios sobre vacunas dirigidas a AMA-1 como por ejemplo FMP2.1/AS02 ha sido unas de las mejores candidatas para vacunas dirigidas contra *P. falciparum* en estadio sanguíneo, la vacuna de tipo monovalente, no ha presentado un porcentaje de eficacia relevante a nivel global ni ha presentado especificidad de alelo (26, 27).

En este orden de ideas, el diseño y la implementación de péptidos sintéticos trae ventajas como la consistencia entre diferentes producciones de los inmunógenos, el costo del proceso de desarrollo, y una alta especificidad de la respuesta inmune inducida. Uno de los mayores retos evidenciados con el uso de péptidos al desarrollar vacunas es debido a que no son lo suficiente inmunogénicos por sí solos (27). Por esta razón con este proyecto se tiene un enfoque prometedor al apuntar a epítomos de células B y T que han sido descritos en relación con la eficacia protectora con el objetivo de una respuesta inmune equilibrada (28).

5. MARCO REFERENCIAL

5.1.Malaria

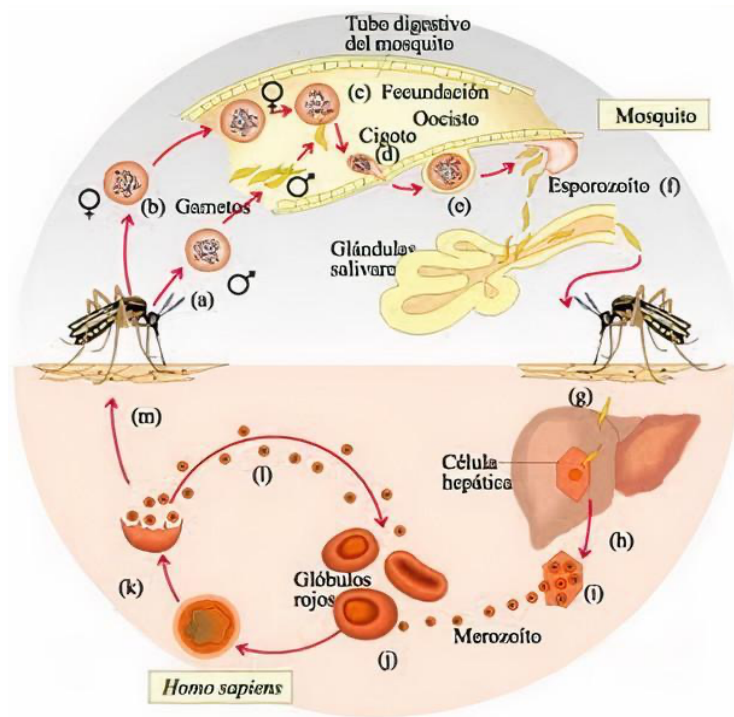
La malaria es una enfermedad infecciosa endémica, y la primera enfermedad tropical priorizada por la organización mundial de la salud, es causada por el grupo de parásitos del género *Plasmodium* spp., en humanos es causada por 5 especies, siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las más importantes a nivel epidemiológico, dicho grupo de parásitos son transmitidos a través de la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles* spp., en cuyas glándulas salivales se encuentran las formas infectantes del parásito (29). Sin embargo, se puede presentar transmisión vertical, es decir de una madre infectada al feto, o por inoculación directa de glóbulos rojos infectados ya sea por vía transfusional, o por trasplante de órganos (30). El ciclo de vida del parásito incluye hospederos tanto vertebrados como invertebrados; en el ciclo en el hospedero vertebrado consiste en un estadio extra-eritrocítico o hepático (asintomático) y otro eritrocítico (sintomático) (31).

Las características clínicas de la malaria dependen de la especie de *Plasmodium* infectante, como también del número de parásitos y del estado inmunitario del hospedero, las manifestaciones clínicas y el cuadro clínico clásico en un individuo no inmune, los síntomas suelen aparecer entre 10 y 15 días luego de la infección del mosquito y consisten en escalofríos, episodios febriles y sudoración, sin embargo, la fiebre puede estar ausente al principio de la infección (1). Durante el proceso de infección y el avance de la enfermedad puede que se presente disfunción de órganos vitales, por aumento del número de parásitos en sangre, y puede llegar a desencadenarse una enfermedad grave con manifestaciones como por ejemplo: coma, acidosis metabólica, anemia severa, falla renal o edema aguda del pulmón, a lo que se le conoce como malaria complicada, la cual especialmente se presenta en los casos de infección por *P. falciparum*, ya que si no se trata en las primeras 24 horas puede agravarse de manera crónica, llevando a la muerte de la persona (1, 32).

5.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los parásitos del género *Plasmodium* es complejo, pero es similar en todas las especies que infectan mamíferos, la transmisión es a través de un vector; mosquitos hembra del género *Anopheles* spp., el ciclo del parásito está compuesto por una fase exoeritrocítica y otra intraeritrocitaria, la primera tiene lugar en el hígado y abarca la esquizogonia, y la segunda es la esquizogonia dentro del glóbulo rojo.

La infección comienza cuando la hembra *Anopheles* spp., por medio de la picadura inocula esporozoitos haploides quienes van a llevar a cabo su desarrollo en los hepatocitos; luego de la multiplicación en las células del hígado, éstas por ruptura liberan merozoitos que invaden y se multiplican en los glóbulos rojos, en el torrente sanguíneo, un porcentaje de dichos merozoitos invaden nuevamente glóbulos rojos sano aumentando la parasitemia en el hospedador, otro pequeño porcentaje de merozoitos se desarrollan en células precursoras de los gametos haploides, o conocidos también como gametocitos, quienes llevan a cabo la fertilización y el desarrollo del cigoto diploide en ookinetes, este proceso tiene lugar en el intestino medio del vector, allí los ookinetes maduros penetran las células de la pared del intestino medio del mosquito, una vez al exterior del intestino medio se convierten en ooquistes, los cuales, migran a la probóscide del mosquito en forma de esporozoitos y mediante la picadura del vector al hospedero vertebrado, en ese caso el ratón, se reinicia el ciclo. (Figura 2.) (33, 34)



Tomado de blog virtual: Plasmodium y malaria.

Figura 1. Ciclo de vida del parásito de la malaria.

5.2. Epidemiología

La malaria es considerada un problema de Salud Pública a nivel mundial por la elevada carga de la enfermedad, se estima que en el año 2020 se produjeron 241 millones de casos de malaria en el mundo, y causando aproximadamente 409,000 muertes en el mismo año, según el Informe Mundial sobre el paludismo del año 2020, señalando que la tasa de mortalidad tuvo una disminución de 200 mil casos del 2018 al 2019, sin embargo, los casos estimados presentaron un aumento de 1 millón de casos aproximadamente. En el año 2019 la población de África subsahariana soportó alrededor del 90% de la carga mundial de la enfermedad (2, 35).

En las Américas, según la actualización epidemiológica de la Organización Panamericana de la Salud 2020, la situación se caracteriza por una reducción en el número de casos confirmados a comparación con el año 2019, la mayor disminución de los casos fue registrada en Venezuela, seguido por Brasil, Colombia, Guyana, Perú, Ecuador, Guatemala y México(36). Respecto a Colombia, hasta la semana epidemiológica 36 del 2021, 3 departamentos reportaron un aumento en el número de casos mayor al dato histórico registrado, Meta, Cauca y Risaralda, además de brotes relacionados con actividad minera(37).

Según datos del SIVIGILA, en la semana 11 del año 2022 se notificaron 1.423 casos de malaria, llegando a un total de 12.171 casos acumulados. Se mantiene la predominancia de *Plasmodium vivax* como agente causal de la mayoría de casos de malaria con un 61.9%, seguido de *Plasmodium falciparum* con un 37.3% e infección mixta con un 0.8% (Figura 1.)

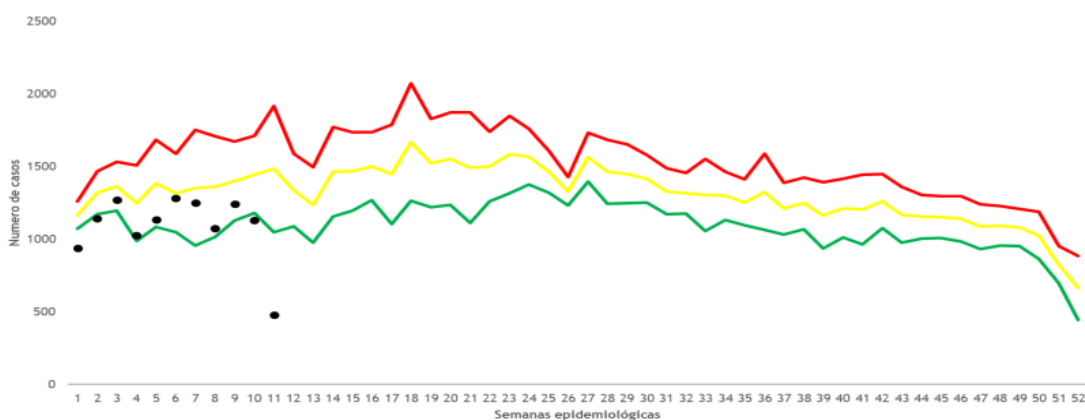


Figura 2. Casos notificados, canal endémico de malaria, Colombia, semana epidemiológica 11,2022
 La epidemiología de la malaria es compleja, ya que presenta variaciones considerables en las diferentes zonas geográficas, y a falta de un tratamiento inmunoproláctico efectivo la

propagación de la enfermedad con las diferentes cepas del parásito, al haber un aumento en la resistencia a los fármacos y de vectores resistentes a los insecticidas, además de la baja cobertura de las estrategias preventivas existentes, la escasez de vacunas seguras y eficaces y la debilidad de los sistemas de salud pública, por eso, es de suma importancia la implementación de nuevas medidas y estrategias para la erradicación de la enfermedad (35).

5.3. Malaria murina

Recientemente se ha empleado las infecciones de malaria murina para el estudio la respuesta inmune y la evaluación de la actividad antimalárica en el desarrollo de nuevos compuestos, ya que se ha visto que el comportamiento de las especies de *Plasmodium* spp en ratones es parecido al de las especies que infectan al hombre (4).

Se han descrito varias especies de parásitos causantes de malaria en roedores distintos de los murinos, pero estas han sido poco estudiadas y aun no se tienen los ciclos de vida completos definidos para cada especie, además, hay poco material e información disponible para hacer las comparaciones críticas entre ellos (38).

Actualmente, existen cuatro especies de *Plasmodium* que infectan roedores y que son utilizados como modelos experimentales de la enfermedad: *P. chabaudi*, *P. vinckei*, *P. berghei* y *P. yoelii* (39). Las diferencias entre estas cuatro especies radican en la morfología, tiempo y tipo de desarrollo, ya sea, sincrónico o asincrónico, como por ejemplo, *P. chabaudi* y *P. vinckei* muestran un desarrollo sincrónico de sus etapas sanguíneas, mientras que las otras dos especies presentan infecciones relativamente asincrónicas en roedores de laboratorio, otra diferencia importante entre dichas especies de *Plasmodium* es la preferencia por infectar los glóbulos rojos en un grado de madurez diferente, por ejemplo, *P. chabaudi* y *P.*

vinckei tienen tropismo por glóbulos rojos tanto inmaduros como maduros, *P.berghei* y *P.yoelii* tienen una marcada preferencia por reticulocitos (38). Dichas características y diferencias tienen influencia en la interacción parásito-hospedador y juegan un papel importante en el curso de la infección, su virulencia y la patogenicidad asociada (6).

5.3.1. *Plasmodium yoelii*

Esta especie de *Plasmodium* es uno de los cuatro modelos murinos que comúnmente se usan para la investigación de vacunas contra la malaria, se reconocen tres subespecies de *Plasmodium yoelii*: *P. yoelii yoelii*, *P. yoelii killicki* y *P. yoelii nigeriensis* (40), también son utilizadas para el estudio de los mecanismos inmunes y la patogénesis, con la invasión de glóbulos rojos, tiene tropismo por los reticulocitos, sin embargo, puede invadir eritrocitos maduros. La subespecie más utilizada es *P. yoelii yoelii*, la cual, cuenta con diferentes cepas 17XL y YM, las cuales son consideradas letales, y 17XNL entre las no letales, estas diferencias de letalidad se localizan a nivel genético y a nivel transcripcional (41).

5.3.2. Cultivo celular

El cultivo celular es un modelo por medio del cual se logran mantener ciertas especies de células en crecimiento constante bajo condiciones específicas y controladas, esta metodología es ampliamente utilizada en investigación científica, estudios acerca de producción de vacunas, ingeniería de proteínas, interacción o señalización celular, entre otros. Dentro de las células que se pueden cultivar y mantener *in vitro* es preciso recalcar la procedencia de la célula, información que indicará el tipo de cultivo celular que se pretende mantener, se han establecido dos formas de iniciar un cultivo celular, está el cultivo primario, el cual se fundamenta en el mantenimiento de células idénticas a las presentes en el desarrollo natural, por ejemplo, las células obtenidas luego de un sacrificio. Por otro lado, encontramos

las células de línea celular las cuales presentan características agregadas por medio de alteraciones genéticas que les confieren habilidades de replicación continua, lo que facilita su mantenimiento en un cultivo.

Cada una de las células presentan requerimientos para su crecimiento y obtención, variables, tales como, la temperatura, porcentaje de gases presentes en la atmósfera, nutrientes suficientes para su crecimiento, así como también equipos y personal adecuado para su manipulación.

5.4.Aspectos éticos

A lo que respecta, las bases legales constituirán una firmeza que se une a la investigación, con el motivo de que está de cavidad legal a proyecto, entre la que están.

5.4.1. Normativa de manejo animal

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

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1.Universo, población, muestra

Este proyecto de investigación se fundamenta en la obtención de resultados a partir de la experimentación y su posterior análisis, de esta forma se pretende evaluar el diseño de

péptidos quiméricos y su unión con la molécula CMH murino para la utilización posterior del mismo para caracterizar respuesta inmune generada tras su inoculación en ratón.

6.1.1. Población de estudio

Para el presente estudio se utilizaron ratones hembra cepa BALB/c con edad entre 6 – 8 semanas. (Bioterio Universidad Nacional de Colombia).

6.1.2. Muestra

Para este estudio se utilizaron 50 ratones hembra cepa BALB/c con edad entre 6 – 8 semanas (Bioterio, Universidad Nacional de Colombia).

6.2. Justificación

La salud pública es una de las preocupaciones más frecuentes dentro de los planes de gobierno y así mismo de las organizaciones encargadas de garantizar de manera efectiva e integral el bienestar de las poblaciones, dentro de los temas en salud que presentan mayor incidencia se encuentran las infecciones tropicales que a pesar de ser ampliamente estudiadas corresponden a un tema delicado en países en vía de desarrollo, por ejemplo, la malaria, una de las enfermedades tropicales con cifras más alarmantes alrededor del mundo con aproximadamente 241 millones de casos reportados en 2020 (2, 35). Representa un desafío para las instituciones ya que siendo un padecimiento potencialmente mortal, puede ser curable e incluso prevenible, esta prevención hasta el momento es basada en técnicas anti vectoriales, las cuales no han sido del todo efectivas debido al costo que implica mantenerlas, por ejemplo, sobre las décadas de 1950 - 1960 con la iniciativa “Erradicación mundial de la malaria” se logró reducir la transmisión de la enfermedad por medio del uso de insecticidas específicos que al pasar el tiempo han sido modificados dado a las resistencias adquiridas de

los transmisores directos del parásito, adicional a esto la falta de recursos y el abandono de gobiernos llevan a limitar el control que se puede llegar a tener sobre la transmisión de la enfermedad y sus consecuencias (2).

Una estrategia que ha demostrado ser eficiente para la erradicación y el manejo correcto de enfermedades es la vacunación y en el caso de la malaria su desarrollo no ha sido una tarea fácil esto debido principalmente a la variedad de proteínas que son expresadas por el parásito según la etapa en la que se encuentre (42).

Adicionalmente la falta de apoyo económico para la investigación de esta enfermedad retrasa y perjudica la calidad de vida de millones de personas a lo largo de las zonas afectadas. El desafío de encontrar una vacuna contra la malaria se ha llevado sin éxito durante varios años, ya que, a pesar de los ensayos y estudios experimentales aún no se ha hallado una fórmula que permita prevenir la malaria en un 100% (43), en general el desarrollo de una vacuna contra la malaria incluye el reconocimiento de proteínas de *Plasmodium* relevantes en el proceso infectivo y con capacidad de modular la respuesta inmune generada en el hospedero, adicional a esto el enfoque primordial para desarrollar vacunas se basa en encontrar la expresión de estas proteínas dentro del ciclo vital del parásito, las cuales inducen la producción de anticuerpos que puedan bloquearlas cuando el parásito intente infectar al ser humano (44), la vacuna que se encuentra en estudios más avanzados es la RTS, S / AS01, es una vacuna de proteína recombinante monovalente que se dirige a un fragmento del antígeno del parásito de la proteína circumsporozoito (*Pf* CSP) de *Plasmodium falciparum* (23), a pesar de los esfuerzos la RTS,S muestra una variación significativa en la respuesta de los individuos inmunizados, lo que sugiere una eficacia de protección parcial y una probabilidad baja de cumplir con el objetivo de erradicar la malaria (25).

El desarrollo de vacunas peptídicas se ha convertido en una de las estrategias de vacunación más atractivas, puesto que, a comparación con las vacunas tradicionales, las vacunas basadas en péptidos sintéticos optimizados son viables, con facilidad de producción, alta estandarización con un bajo costo (45). Este tipo de vacuna permite la conjugación de diversos epítomos, para la inducción de una respuesta inmune mediada por células B y T, es decir, una respuesta inmune dirigida a la síntesis de anticuerpos específicos, determinando la dirección y la especificidad de esta (46). La implementación de este método de vacuna contra la malaria, durante las últimas décadas se han realizado ensayos direccionados a los estadios pre eritrocíticos y eritrocíticos de *P. falciparum*, demostrando el potencial de las vacunas peptídicas para la producción de anticuerpos capaces de neutralizar el parásito e inhibirlo en el estadio sanguíneo (47).

Por lo anterior en esta investigación se pretende evaluar la respuesta inmune protectora inducida por péptidos quiméricos optimizados para la unión a moléculas H2-IE^d en ratones BALB/c, con el fin de analizar y desarrollar una alternativa de tratamiento preventivo contra la enfermedad y así contribuir a la disminución de eventos en salud relacionados con la malaria.

6.2.1. Impacto esperado

Con este proyecto y el desarrollo de la prueba de concepto con la cual se evaluará la respuesta inmune generada en modelo murino tras la inmunización con péptidos quiméricos optimizados para el anclaje a CMH específicamente, se espera contribuir al avance investigativo para la creación de un tratamiento inmunoproláctico preventivo contra la malaria.

6.2.1.1. Usuarios directos e indirectos

Para este proyecto se tienen destinados como usuarios directos centros de investigación que tienen como objetivo realizar estudios relacionados con la identificación de antígenos involucrados en la interacción hospedero – patógeno, tomando como precedente la metodología implementada en este estudio utilizando malaria murina como modelo de investigación. Los resultados estarán disponibles para análisis y/o discusión en próximos estudios donde se evalúen proteínas candidatas para el desarrollo de un tratamiento inmunoproláctico preventivo para controlar enfermedades de interés en salud pública. Por otro lado, como usuarios indirectos de este proyecto de investigación se tiene a lectores interesados en conocer temas de salud, referencias bibliográficas relacionadas a malaria, metodología utilizada para investigación, así como también epidemiología acerca de esta enfermedad.

6.2.2. Hipótesis

Los péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *P. yoelii* tienen alta unión a H2 - IE^d, y serán candidatos para el diseño de constructos quiméricos capaces de estimular una respuesta inmune dirigida contra el parásito de la malaria.

7. METODOLOGÍA

7.1. Mantenimiento de biomodelo

Ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad, con un peso aproximado de 18 – 25 gramos del Bioterio - Instituto Nacional de Salud, fueron alimentados según condiciones experimentales con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, una temperatura de 22-24°C y una humedad de 50 ± 5%. Los animales fueron tratados de acuerdo con la norma colombiana establecida en la resolución del Ministerio de Salud No. 8430 de 1993, además de la Ley 84

de 1989 sobre “*El uso de animales vivos en experimentos e investigación*”. El comité de manejo bioético en experimentación y practica con animales de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales de Colombia aprobó los protocolos de uso de animales de laboratorio de este proyecto.

7.2. Infección de ratones con *Plasmodium yoelii* 17XNL

La infección de los ratones se realizó a partir de crioviales de glóbulos rojos parasitados (GRp) con *Plasmodium yoelii* 17XNL - GFP que se encontraban almacenados en nitrógeno líquido. En un tubo fondo cónico de 50 mL, los GRp fueron tratados con 200µL de NaCl 12% gota a gota mezclando ligeramente, esta mezcla fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), luego se agregaron 10 volúmenes de NaCl 1.6%, y se centrifugó a 500xg a 20°C durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado. Se realizaron 3 lavados con 10 volúmenes del medio RPMI 1640 suplementado con 1% de hipoxantina (RPMI+H), manteniendo las condiciones de centrifuga. Finalmente, para proceder a realizar la inoculación en el ratón vía intraperitoneal, los GRp fueron suspendidos en medio RPMI+H y cuantificados por microscopia de fluorescencia (Fig. 3).

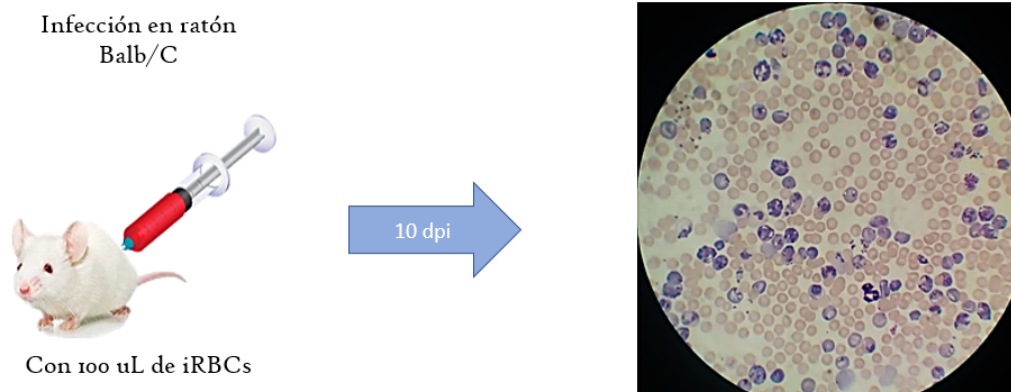


Figura 3. Modelo de infección en modelo murino.

7.2.1. Parasitemia e histología

Las dinámicas de parasitemias en el modelo murino fueron determinadas por microscopía de luz y tinción con Giemsa. Brevemente, se realizaron extendidos con muestras de sangre periférica obtenidas a partir de punción en vena facial cada 48-72 horas. Los extendidos fueron cubiertos con una película de Giemsa – Sales Fosfatadas, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (ALBOR). Adicionalmente, se registraron síntomas observados en los ratones infectados y se realizó esplenectomía de ratones con diferentes condiciones de parasitemia para caracterizar histológicamente la microarquitectura del bazo bajo estas condiciones, mediante tinción Hematoxilina/Eosina.

7.3. Evaluación de antigenicidad de péptidos derivados de *PyAMA-1*

Para evaluar la capacidad antigénica de los péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *P. yoelii*, se utilizó el suero recolectado de 8 individuos con malaria experimental. Brevemente, en una placa de 96 pozos se realizó el acople de 1 µg de cada péptido/pozo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, esto se realizó por duplicado. Posteriormente, las cajas fueron tratadas con solución de bloqueo (leche descremada en solución de lavado PBS 1x + Tween 20 al 0.005%) durante 1 hora. Luego el antígeno fue expuesto a los sueros obtenidos de ratones infectados (suero hiperinmune) y suero de ratones sanos como control (suero preinmune) durante dos horas a TA en dilución 1:200, luego se utilizó Anti-Mouse Biologend® acoplado a peroxidasa como anticuerpo secundario y se reveló con Thermo-Scientific Pierce TMB-Blotting 1-Step Solution® evidenciando un viraje a color azul dependiente a la cantidad de anticuerpo secundario unido, se incubó durante 15 – 30 minutos en oscuridad, la reacción se frenó con H₂SO₄ 2M, tomando una coloración amarilla. Se determinó la reactividad mediante espectrofotometría utilizando una longitud de

onda única de 450nm. En cada tratamiento se realizó 3 lavados con PBS 1X + Tween 20. Como control positivo se utilizó lisado de parásito obtenido del cultivo *in vitro*.

7.4. Cultivo de *Plasmodium yoelii* 17XNL

Para mantener un cultivo *in vitro* de *Plasmodium yoelii*, se utilizaron crioviales de GRp con una parasitemia del 25 – 30%. Brevemente, los GRp fueron tratados con 200µL de NaCl 12% gota a gota mezclando ligeramente, esta mezcla fue incubada durante 5 minutos a TA, luego se agregaron 10 volúmenes de NaCl 1.6%, y se centrifugó a 500xg a 20°C durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado. Se realizaron 3 lavados con 10 volúmenes del medio RPMI 1640 suplementado con 1% de hipoxantina (RPMI+H), manteniendo las condiciones de centrifuga. El cultivo se mantuvo en cajas de 25 cm² utilizando 5 mL de medio RPMI+H, suplementado con suero fetal bovino (SFB-Hyclone) 20%, hematocrito de 4% (glóbulos rojos de ratón BALB/c) y fueron incubadas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂. Posterior a la estabilización del cultivo, los GRp fueron cosechados y preservadas en medio de congelación (Glicerol, Sorbitol, NaCl) para uso en ensayos posteriores

7.4.1. Cultivo celular

Para la obtención de la molécula H2-IE^d, la línea celular PAI fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 2 g/ L (SIGMA), piruvato sódico 1 mM (GIBCO), SFB (Hyclone) 10-20% y solución antimicótico-antibiótico 1X (SIGMA). El cultivo fue mantenido a 37°C, en una atmosfera de CO₂, una vez el medio fue metabolizado, las células fueron colectadas por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, luego congeladas a -

80°C hasta el proceso de purificación. Esto se realizó hasta obtener alrededor de 5×10^9 células. al 5% para eliminar excesos de DMSO.

Adicionalmente, se llevó a cabo el cultivo del hibridoma ATCC HB-55, bajo las mismas condiciones expuestas anteriormente. Puntualmente, se colectó y almaceno el sobrenadante en NaN_3 0.02% para la purificación del anticuerpo monoclonal dirigido contra moléculas HLA-DR.

7.4.1.1.Purificación y acople Anti – DR

Para obtener el anticuerpo purificado obtenido del sobrenadante del cultivo ATCC HB55, se inició con la descongelación que estaba almacenado a -20°C con Ázida de Sodio al 0,02%, se realizaron centrifugaciones para lavar restos celulares. Luego de esto se precipitaron las proteínas por medio de la saturación del sobrenadante al 45% con Sulfato de Amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, este proceso se realizó en baño frío 0°C para evitar cambios en la proteína promovidos por temperatura, adicional a esto se incubó a 4°C durante toda la noche, posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 10000 rpm, el pellet obtenido fue resuspendido en PBS1X, para eliminar los restos de sales presentes se dializó utilizando membrana de celulosa. Se realizó concentración del anticuerpo utilizando polietilenglicol 20000.

El acople del Anti – DR a la columna de proteína A sefarosa se realizó en un tubo de fondo cónico de 50 ml donde se agregó el anticuerpo a la sefarosa en una proporción de 1:1 y se incubó en agitación elíptica toda la noche a 4°C , la mezcla se transfirió a una columna de cromatografía de vidrio hasta su sedimentación, luego se realizaron lavados con 15 volúmenes de Buffer Tris (Tris Cl, NaCl, NaN_3) pH 8,6, finalmente se hizo elución del

anticuerpo retenido utilizando gradiente de pH con 3 volúmenes de cada buffer en el siguiente orden: buffer Citrato (Ácido cítrico monohidratado, Citrato trisódico dihidratado, NaCl) pH 5.5, buffer Acetato (Acetato de sodio anhidro, NaCl) pH 4,3 y buffer Glicina (Glicina, NaCl) pH 2,3 a un flujo bajo (aprox. 0.2ml/min). Se colectaron las fracciones obtenidas que contenían buffer neutralizante (Fosfato dibásico de sodio anhidro Na_2HPO_4) pH 7,7 en una proporción de 1:4. Se lavó la columna con 15 volúmenes de Tris Buffer pH 8.6 y se almacenó a 4°C para su uso.

7.5. Evaluación de reconocimiento específico de molécula H2-IE^d por anticuerpo producido *in vitro*

Para confirmar el reconocimiento a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad murino efectuado por el anticuerpo obtenido a partir del cultivo de hibridoma HB-55 se realizó citometría de flujo. Las células fueron incubadas con el anticuerpo Anti – DR en dilución 1:200 durante 2 horas a TA, posterior a esto se hicieron 3 lavados con 200µL de PBS 1x con pH ajustado a 7.2, luego se hizo incubación con anticuerpo secundario Anti-Mouse marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en dilución 1:100, finalmente se leyeron 100.000 eventos utilizando el citómetro BD FACSCanto-II.

7.5.1. Purificación de moléculas H2-IE^d

Para la purificación de la molécula de CMH murino se realiza la suspensión de las células en buffer de lisis (PBS 0.05M, NaCl 0.15M, NP-40 1%, PMSF 1mM, Iodoacetamida 25mM, Ácido capríónico 5 mM, inhibidores de proteasas 10µg/mL) a 0°C durante una hora, este lisado se centrifugó a 27.000x g durante 15 minutos, se recolectó el sobrenadante el cual es

tratado durante 10 minutos con solución de desoxicolato DOC al 5%, posterior a esto el sobrenadante fue ultra centrifugado a 100.000x g durante 20 minutos y se puso en contacto con la proteína A Sefarosa acoplada previamente con Anti – DR, así mediante lavados continuos con 3 soluciones diferentes se lograron eliminar contaminantes e inespecificidades, posterior se realiza la obtención con el buffer diseñado específicamente para la elución de la molécula y su estabilización en alícuotas de 1 mL (48).

La molécula obtenida fue confirmada mediante SDS-PAGE (del inglés, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) y Western blot (WB). Para esto, se tomó 12 μ L del sobrenadante que contiene la molécula purificada, los cuales se homogenizaron con buffer Laemmli (0,5M de tris-HCL pH 6,8; 25% de glicerol; 10% de SDS y 0,5% de azul de bromofenol) en una proporción 1:1. Estas muestras se resolvieron en SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida, posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por 30 minutos a 12 voltios. Los geles fueron teñidos con azul de Comassie por 1 hora a TA, y decolorado con varios lavados con agua destilada.

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo 5% de leche descremada preparada en PBS (13 mM de NaCl; 0,27mM de KCl; 0,43mM Na₂HPO₄.7H₂O y 0,14mM de KH₂PO₄) más detergente Tween 0,05% durante 1 hora a TA. Brevemente, las muestras fueron expuestas a un anticuerpo monoclonal anti-DR purificado diluido en solución de bloqueo e incubado por 1 hora, se realizaron 3 lavados con PBS1X-Tween 20 0.05%, luego se incubo con anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:6000 preparada en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante reacción enzima – sustrato, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

7.6. Cuantificación de moléculas H2 - IE^d

La cuantificación de molécula obtenida se realizó utilizando el kit *Micro Protein Assay Kit* – *Thermo Fisher*®, la cual tiene como fundamento el BCA (Ácido bicinconínico) y la reducción que hacen las proteínas de iones cúpricos (Cu²⁺) a iones cuprosos (Cu⁺) en un medio con pH alrededor de 8, esto consiste en que dos moléculas de BCA reaccionan con un ion cuproso promoviendo una coloración morada a la solución, el tono que presente está relacionado de forma directa con la cantidad de proteína presente en la muestra. Cada muestra, así como cada punto de la curva se realizó por duplicado, las absorbancias encontradas fueron medidas con el equipo SkanIt en única longitud de onda (562nm) (Protocolo Micro Protein Assay®).

7.7. Perfil de unión de péptidos a moléculas H2-IE^d

Para evaluar la capacidad de unión de los péptidos derivados de regiones conservadas de *P. yoelii* a moléculas H2-IE^d purificadas se realizó una ELISA convencional. Brevemente, moléculas H2-IE^d [0.1 μM] fueron incubados con un péptido control marcado con biotina [5 μM], los péptidos derivados del antígeno AMA-1 se evaluaron 50 veces exceso respecto al control [250 μM] e incubado por 24 horas a TA. Inmunomódulos NUNC (*Thermo-Fisher Scientific*®) cubiertos con anti-H2-IE^d [10 μg/mL] y tratados con BSA 3% en PBS1X, fueron expuestos al complejo CMH-péptido por 2 horas a TA. Luego, el ensayo fue incubado con Estreptavidina acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:500 por una hora a TA y posteriormente incubado por 30 minutos con solución reveladora pNPP (*SIGMA*). La reacción colorimétrica fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro MultiSkan GO (*Thermo Fisher Scientific*®). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado (48).

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

Se realizó el diseño y optimización de péptidos quiméricos para el anclaje a moléculas H2-IE^d de ratón. Para esto, se ejecutó un análisis *in silico* de los mejores epítotos T predichos utilizando las herramientas bioinformáticas NetMHCIIpan 3.2 (49) y NetMHCIIpan 4.0 (50), utilizando como criterios de selección aquellos que presentaron un Rank de <2% para péptidos de alta unión a H2-IE^d, y para péptidos con unión débil, un Rank $2 > X \leq 5$ % (49, 50). Adicionalmente, se realizó una predicción de epítotos B con una longitud de 13 residuos, sobre péptidos con capacidad de inhibir la invasión del *P. yoelii* a glóbulos rojos murinos caracterizados previamente en la FIDIC, para articularlos hacia el extremo -COOH y/o NH₂ del epítoto T artificial diseñado *in silico*, se incluyeron 3 residuos de contexto como se reporta en la literatura (50). Estos péptidos quiméricos fueron dimerizados utilizando una secuencia GPGPG caracterizada previamente que le confiere flexibilidad y proteólisis por catepsinas al constructo (51). Una vez diseñados los constructos dimericos, se realizó una predicción de corte utilizando la herramienta MHC-NP (52) y se determinó la estructura secundaria del constructo (53).

7.9. Análisis de la información

Para el análisis estadístico y la creación de las gráficas para este proyecto fue utilizado el software GraphPad Prism v9.3.1. (GraphPad Software, Inc®). Para todos los resultados se utilizó un intervalo de confianza del 95% y los valores >0.05 fueron considerados como significantes.

8. RESULTADOS

8.1. Curso de la infección por *Plasmodium yoelii* en modelo murino.

Se realizó infección con glóbulos rojos parasitados vía intraperitoneal en ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad, para mantener la infectividad del parásito para ensayos posteriores. Brevemente se midió el porcentaje de parasitemia a partir de los 2 días post-infección (d.p.i.). tomándose una muestra de sangre por punción en la vena facial cada 48 horas post infección. Se registraron los siguientes datos de parasitemias obtenidas en el modelo.

Como se observa en la Fig. 4 la infección con *Plasmodium yoelii* fue efectiva, registrando una parasitemia de 21.6%, 10 días post-infección. Adicionalmente, se realizó un seguimiento de signos presentes en el biomodelo, evidenciándose un progreso sintomatológico característico malaria. Teniendo en cuenta lo anterior, se correlaciono el porcentaje de parasitemia obtenido mediante microscopía con los signos de cada individuo. A medida que avanza la infección, síntomas como variaciones en peso y temperatura, el pelo hirsuto, palidez en orejas y cola asociadas a anemias graves, y esplenomegalia hiperreactiva fueron más evidentes.

Además de esto se realizó seguimiento de parasitemia a 8 ratones durante 12 días para evaluar el curso de la infección, caracterizar microarquitectura tisular en bazo y coleccionar suero hiperinmune para ensayos de antigenicidad.

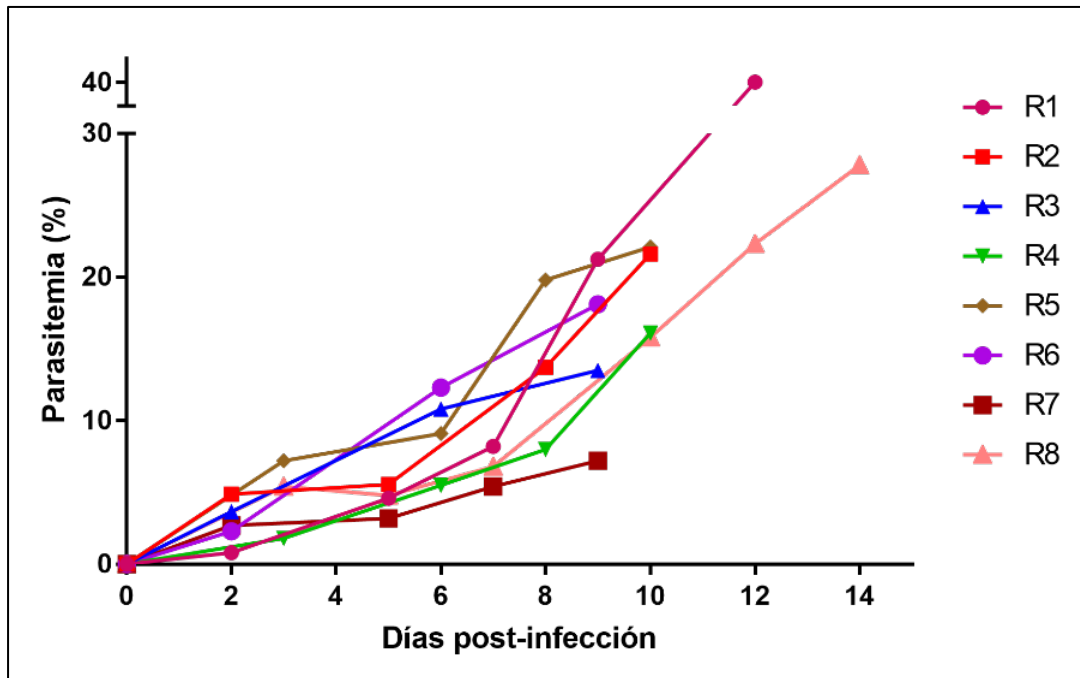


Figura 4. Porcentaje de parasitemia de la infección por Plasmodium yoelii.

A partir de estos registros se pudo monitorear el curso de la infección de 8 ratones a lo largo de 12 días aproximadamente, se observó que el ratón 1 tuvo un aumento significativo de carga parasítica a partir del día 7 p. i. llevando una tendencia creciente hasta alcanzar parasitemia máxima de 43% en el día 11, la más alta reportada en este grupo, en el caso del ratón 2 el día 2 p. i. se registró una parasitemia mayor a la de los demás individuos debido probablemente al estado basal que presentó al momento de la infección, ya que luego tuvo un comportamiento moderado y llegó a tener parasitemia máxima de 22% en el 10° d. p. i., en el ratón 3 se observó una tendencia creciente de desde el día 2 p. i. hasta el día 6 donde tuvo una disminución del ritmo de aumento de carga parasítica llegando así a presentar una parasitemia máxima de 12% en el día 9 p. i., el ratón 4 presentó un aumento moderado de carga parasítica desde el inicio de la infección hasta el día 8 donde tuvo un incremento significativo de parasitemia alcanzando niveles de 15% como punto máximo en el día 10 p. i., el ratón 5 no tuvo una tendencia constante durante el curso de la infección presentando

valores de parasitemia de 9% en el día 6 p. i., y dos días después una carga parasítica de 20% teniendo como máximo registro 22% en el día 10 p. i., el ratón 6 presentó un incremento medido desde el inicio de la infección hasta alcanzar 19% en el día 9 p. i., el ratón 7 fue el individuo con menor carga parasítica, a lo largo de 9 días solo alcanzó un 8% de parasitemia, en contraste, el ratón 8 tuvo un crecimiento constante de parasitemia y alcanzó la segunda parasitemia más alta reportada en este grupo, 25% al día 14 p. i., estos individuos fueron sacrificados y se realizaron cortes histológicos del bazo para evaluar las alteraciones en la microarquitectura tisular de este órgano involucrado en la resolución y control de esta enfermedad (54).

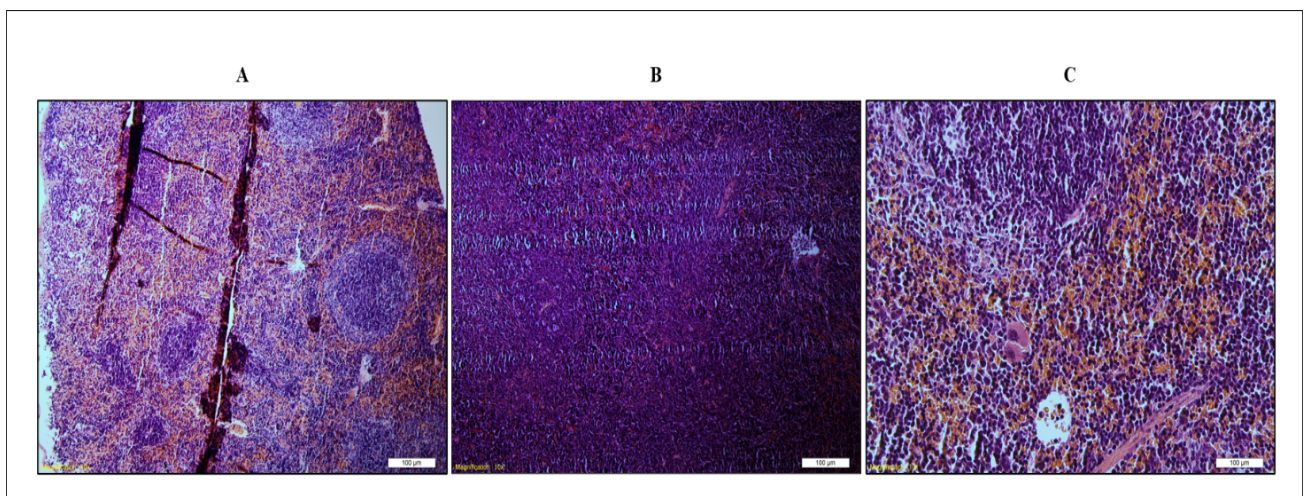


Figura 5. Cortes histológicos de bazo con tinción hematoxilina/eosina (A), bazo proveniente de ratón sano. (B), bazo de ratón con parasitemia de 20%. (C), Megacariocito con formas parasitarias intracelulares.

Con respecto a la microarquitectura tisular del bazo y los cortes histológicos realizados se observó como en un bazo de ratón sano *Fig. 5(A)* se diferencian las estructuras principales del bazo, pulpa blanca correspondiente a centros germinales, pulpa roja correspondiente a GR *Fig. 5 (B)* bazo de ratón con parasitemia 20%, se observa infiltración masiva de células del sistema inmune que no permite la diferenciación de estructuras tisulares propias del bazo.

Fig. 5 (C) Megacariocito con presencia de formas parasitarias intracelulares debido a la eritropoyesis extramedular realizada por el biomodelo.

8.2. Infección *in vitro* de GRs murinos con *P. yoelii*.

Se identificaron formas intraeritrocíticas de *Plasmodium yoelii* a partir de cultivo primario de glóbulos rojos murinos, para el mantenimiento de este se utilizó medio RPMI suplementado con SFB 10% e hipoxantina, y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂. Una vez el cultivo se estabilizó se hicieron revisiones periódicas para conocer de forma experimental el desarrollo intraeritrocítico del parásito en función del tiempo, considerando una duración del ciclo completo de 18 – 20 horas, teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un seguimiento de la infección *in vitro* de *P. yoelii* 17XNL-GFP por microscopia de fluorescencia, caracterizando formas intracelulares por estadio de desarrollo como se observa en la Fig. 5.

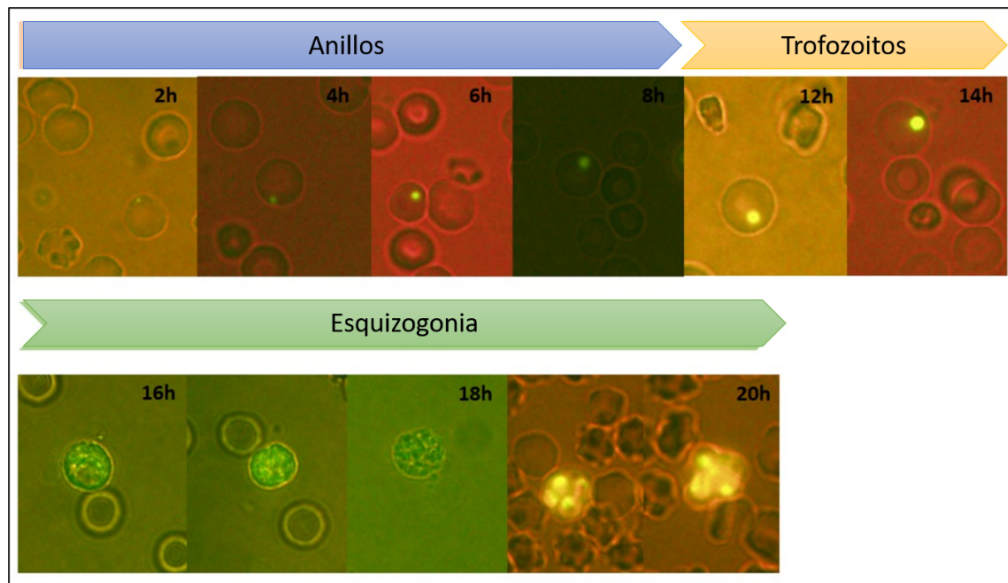


Figura 6. Seguimiento de formas intraeritrocíticas de *Plasmodium yoelii* en glóbulos rojos murinos, por microscopia de fluorescencia y marcaje con naranja de acridina.

Se encontraron anillos tempranos durante las primeras 8 horas de infección intraeritrocítica, luego durante las 6 horas posteriores se observó una diferenciación a trofozoitos maduros y pasadas las 18 horas post-infección comienza el proceso de esquizogonia.

8.3. Evaluación de antigenicidad presentada por cada péptido derivado de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *Plasmodium yoelii*

Los datos de antigenicidad fueron correlacionados con la parasitemia que presentó cada ratón (Fig. 5) tomando como referente la media de parasitemia alcanzada, dando como resultado una tendencia directamente proporcional entre estas variables. Además de esto se representaron los datos de antigenicidad de cada ratón con cada péptido mediante un diagrama donde se ejemplifica visualmente la variabilidad de absorbancias leídas en la prueba, así como se muestra el control positivo correspondiente al lisado de parásito y 3 de los controles negativos correspondientes a suero preinmune. En la gráfica se señala con línea punteada el límite de control negativo dado por la absorbancia dada en los controles negativos (sueros preinmunes).

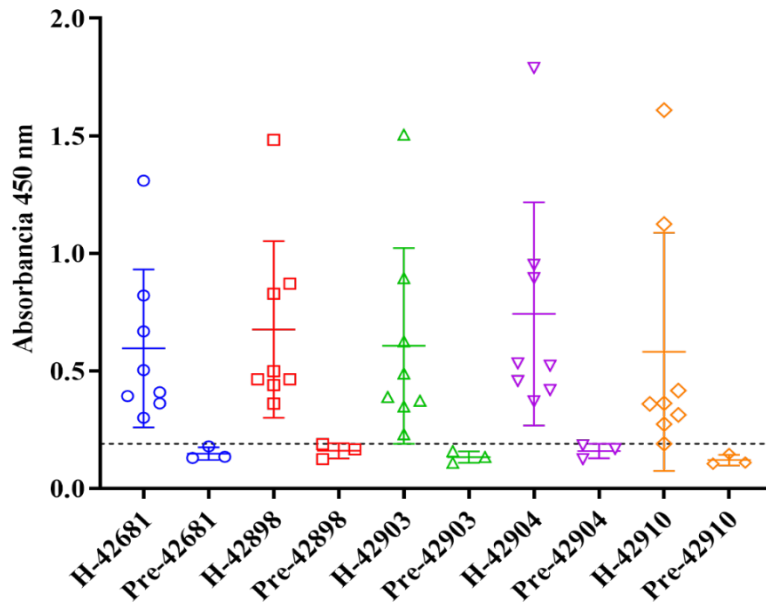


Figura 7. Diagrama de absorbancia presentada por individuo frente a los diferentes péptidos evaluados. Se presentan los datos como (H-número de péptido), para referirse a la reactividad que hubo con el suero hiperinmune correspondiente al ratón que cursó la infección y (Pre-número de péptido) para la reactividad con suero preinmune, ratón que no ha estado en contacto con la malaria.

Al usar la prueba de antigenicidad se pudo confirmar el reconocimiento que tienen los péptidos derivados de regiones conservadas de AMA-1 de *P. yoelii* al entrar en contacto con inmunoglobulinas presentes en el suero de los 8 ratones utilizados como grupo muestra. Para ordenar los resultados de antigenicidad de cada péptido se tuvo en cuenta la media de absorbancia obtenida tras la medición de la prueba. De esta forma se clasificó el péptido 42910 como el de menor capacidad antigénica con un 0.586, seguido en orden ascendente por el péptido 42681 con una media de 0.595, así mismo se encontró el péptido 42903 con una media de absorbancia de 0.605, con el péptido 42898 se encontró una absorbancia media de 0.675 y el péptido que mayor antigenicidad demostró fue el 42904 con una media de 0.741, sin embargo, aunque los péptidos 42910 y 42681 tienen medias de absorbancia relativamente bajas, superan la línea de corte establecida con las mediciones obtenidas de los controles negativos, lo que confirma la capacidad antigénica de los 5 péptidos evaluados

aunque en diferentes niveles (Fig. 6). Además de esto se muestran los datos de absorbancia por cada ratón al estar en contacto con los diferentes péptidos (Fig. 7).

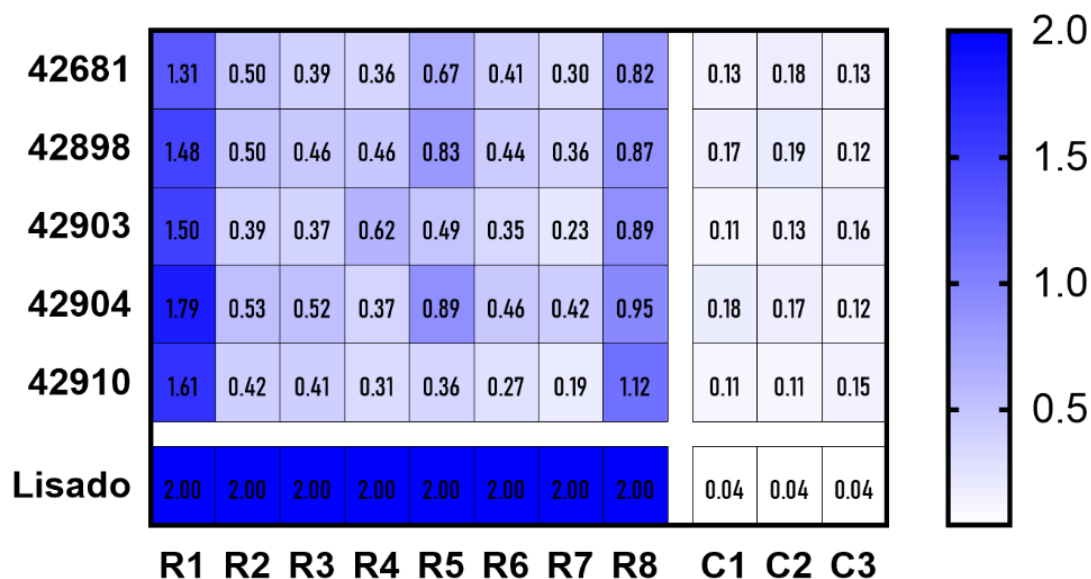


Figura 8. Diagrama específico de absorbancias presentadas por cada ratón al ser tratado con cada péptido.

Al analizar las absorbancias encontradas se observó una capacidad antigénica diferente con cada péptido proporcional a la parasitemia presentada al momento de recolección del suero de cada uno de los 8 ratones utilizados en la prueba. El individuo con mayor antigenicidad presentada fue el ratón 1 el cual registró una parasitemia máxima de 43% al día de su sacrificio (Fig. 4) y en las mediciones de absorbancias presenta datos entre 1.31 y 1.79 los valores más altos encontrados. Esta relación proporcional se presentó en la totalidad de individuos, por ejemplo, el ratón 7 cuya parasitemia máxima fue de 8% presenta niveles muy bajos de inmunogenicidad frente a todos los péptidos registrando absorbancias entre 0.19 y 0.42, en contraste a esto vemos como el ratón 8, individuo que obtuvo la segunda parasitemia más alta presentó absorbancias entre 0.82 y 1.12 valores significativamente altos que

confirman la relación entre la carga parasítica y la inmunogenicidad frente a los diferentes péptidos.

8.4. Evaluación de capacidad de unión a CMH H2-IE^d

Al momento de obtener un cultivo continuo y sin presencia de contaminación de las células PAI, con densidad celular de 1×10^5 cel/mL se realizó la purificación de CMH por medio de columna de sefarosa, según protocolo diseñado previamente, esto con el fin de obtener molécula pura, confirmada y cuantificada para realizar ensayos de reconocimiento con el anticuerpo producido por biorreactor para los estudios posteriores, con los cuales se realizó citometría confirmatoria con el anticuerpo producido para verificar la unión del mismo a células de CMH que podría predecir una unión a H2 - IE^d murino.

Mediante el biorreactor y su funcionamiento se logró obtener anticuerpo a partir de células HB55 (Linfoblasto, isotipo IgG2A). Para confirmar la especificidad del anticuerpo obtenido se realizó citometría de flujo (Fig. 9) por medio de la cual se evaluó reconocimiento del anticuerpo por células humanas y células de ratón, para de esta forma revisar la unión a CMH clase II y HLA DR, respectivamente. Una vez se obtenga suficiente anticuerpo y sea verificado se utilizará para el acople de la resina empleada para obtener molécula CMH clase II.

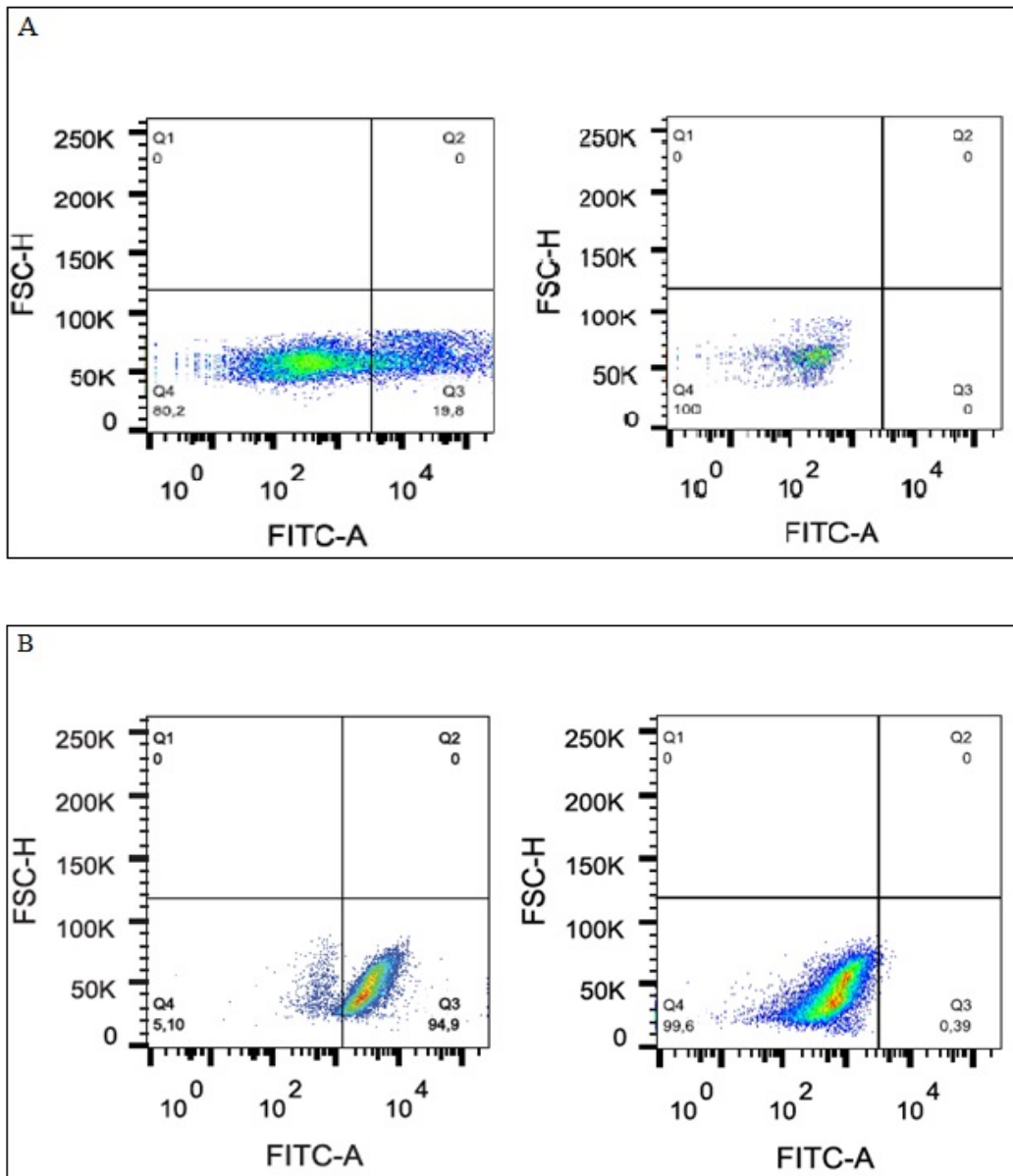


Figura 9. Reconocimiento de células humanas presentadoras de antígeno y moléculas de CMH H2-IE^d obtenidas de cultivo de células PAI por el Anti-DR producido por la línea celular HB55. (A). Reconocimiento de células humanas presentadoras de antígeno por anticuerpo Anti – DR. (B). Reconocimiento de CMH murino por Anti – DR dirigido originalmente a células humanas.

Se logró evaluar y confirmar el reconocimiento específico del anticuerpo producido en el cultivo del hibridoma HB55 a CMH expresado en línea celular PAI, que originalmente estarían dirigidas a reconocimiento de células presentadoras de antígeno en humano, en esta gráfica se evaluó el reconocimiento efectivo a los dos sistemas otorgando identidad al

anticuerpo y promoviendo la utilidad del modelo murino para investigaciones de este tipo, adicionalmente se utilizaron células marcadas y no marcadas para lograr diferenciar las poblaciones y posteriormente realizar la comparación que permita evaluar de forma cuantitativa la prueba. En la fig. 9 (A-B). se compara el reconocimiento de Anti – DR en células humanas presentadoras de antígeno encontrando un porcentaje de reconocimiento 0 del 19.8 en células marcadas con FITC frente a un 94.9% de reconocimiento en las células provenientes de línea celular PAI, esta comparación nos demuestra la especificidad de reconocimiento que posee el Anti – DR purificado tanto en células humanas y con un porcentaje aún mayor en moléculas de CMH murino (H2-IE^d), de forma paralela se hizo la lectura por citometría de los dos grupos de células, pero en ausencia del marcaje con FITC para evidenciar de forma clara la migración celular dentro del diagrama según las condiciones leídas en el citómetro de flujo.

8.4.1. Evaluación de identidad del H2 – IE^d obtenido

Luego de realizar la purificación de molécula de CMH por medio de columna acoplada a sefarosa se realizaron Dot Blot como prueba cualitativa para evaluar la obtención de la molécula, obteniendo los siguientes datos:

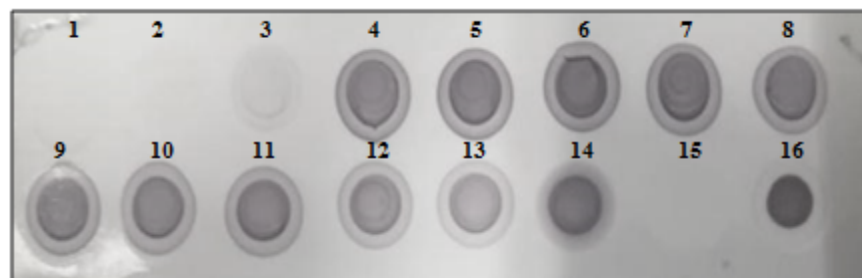


Figura 10. Dot Blot de fracciones eluidas de la purificación de moléculas H2-IE^d por columna de sefarosa acoplada a Anti – DR. Muestras de fracciones de la purificación realizada por cromatografía de afinidad (Pozos 1-15). Control positivo pozo 16 (HLA).

En este estudio se realizaron pruebas de inmunodetección en los que se permite evaluar la presencia/ausencia de la proteína de interés, en este caso se usó Dot Blot luego de cada purificación para confirmar la presencia de molécula CMH en las fracciones de elución recolectadas de la molécula por medio de la columna de Proteína A sefarosa previamente acoplada con Anti – DR. El control positivo utilizado para esta técnica fue molécula CMH de humano. La primera señal encontrada de CMH obtenido se localizaba desde la tercera fracción en la mayoría de los procesos de purificación, a partir de esta fracción se mantenía una tendencia creciente de concentración de proteína hasta la fracción 14 donde disminuye, a partir de este resultado favorable se realizaron pruebas con mayor especificidad para analizar y comprobar que la molécula extraída si fuera en efecto la molécula de interés (Fig. 10).

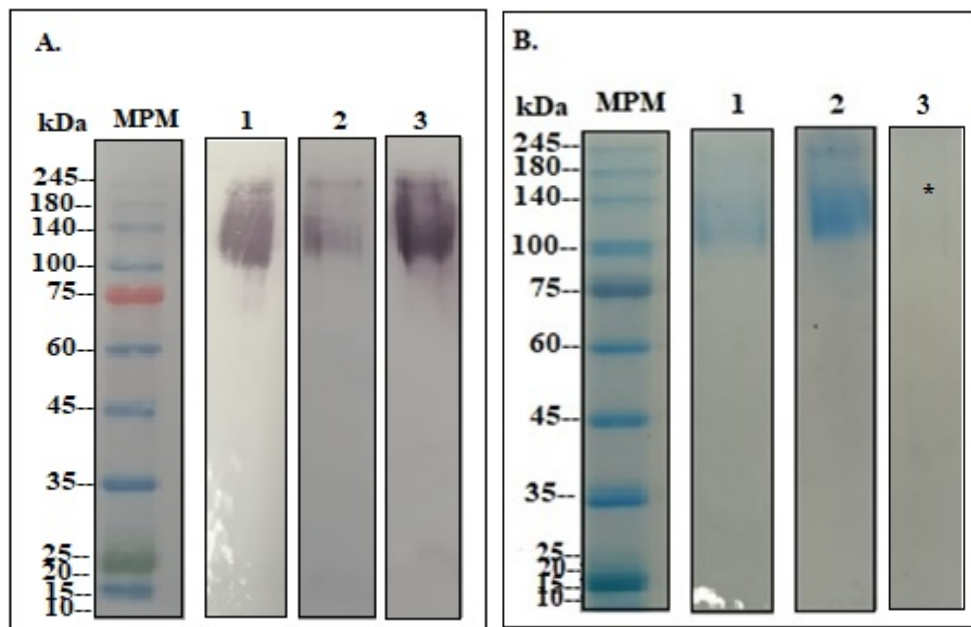


Figura 11. Western Blot y SDS PAGE confirmatorio de especificidad y pureza de la molécula CMH H2-IE^d respectivamente. (A) Western blot. Carriles 1,2,3 purificaciones consecutivas de CMH. (B) Gel con azul de coomassie. Carriles 1,2,3 purificaciones realizadas de molécula CMH. 3* indicación de la banda presente.

Posterior a la concentración, se confirmó la identidad de la molécula mediante WB con el uso de anticuerpo específico para molécula de CMH y la pureza de la molécula se determinó por SDS-PAGE. A partir de ello se pudo comprobar la integridad de la molécula visualizando única banda en altura correspondiente a 180 kDa, peso que ha sido descrito anteriormente para la identificación de H2-IE^d, esta banda se observó tanto en el WB como en el gel de SDS teñido con Azul de Coomassie [Fig. 11 (A-B)]. Al comprobar mediante estas pruebas la molécula obtenida se pudo continuar con su uso en pruebas adicionales requeridas para el desarrollo del proyecto. Además de esto, la no visualización de bandas adicionales nos asegura que no hay contaminación ni formación de dímeros de proteína que podrían afectar la funcionalidad en pruebas posteriores.

8.4.2. Cuantificación CMH

La cuantificación de CMH se realizó con el kit Micro Protein Assay – Thermo Fisher. En la placa las columnas 1 – 2 corresponden a la curva realizada para la determinación de la concentración de las muestras mediante regresión lineal. Así mismo en la columna 3-4 se encuentra la molécula de CMH purificada y concentrada en diluciones 1:10 y 1:50 con su respectiva réplica.

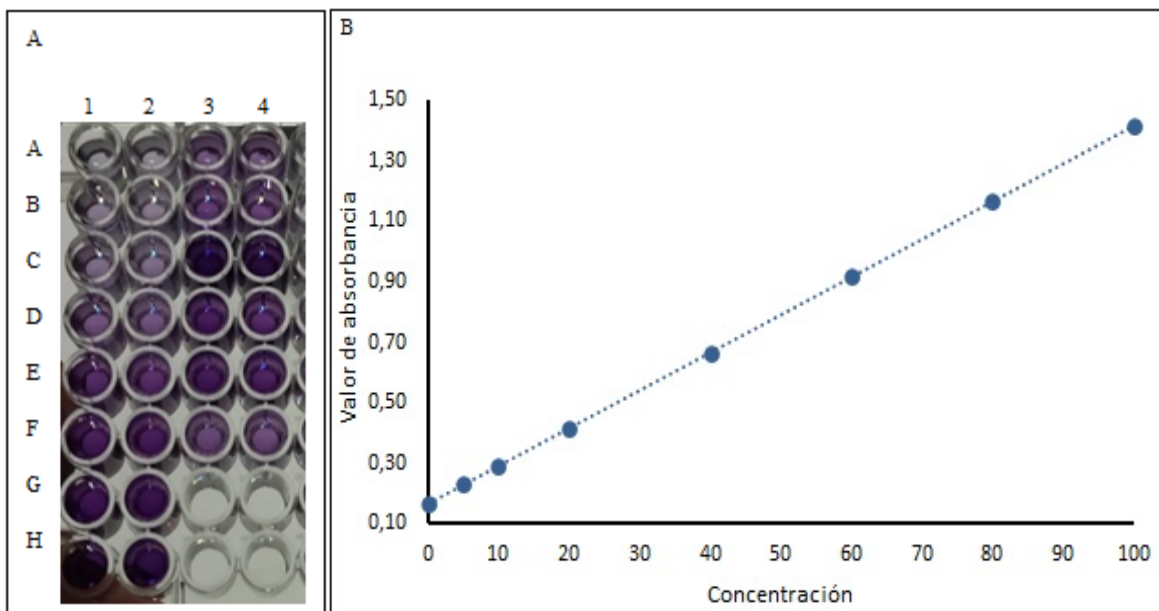


Figura 12. Placa de cuantificación y curva de BSA. (A). Placa de cuantificación realizada con el kit Micro ProteinAssay Kit – Thermo Fisher (B). Curva de regresión lineal con datos de absorbancia y concentración.

Tabla 1. Banco de molécula H2-IE^d purificada.

<i>Purificación CMH murino</i>	Concentración µg/mL	Cantidad	Total, mg/mL
1	133,99	312 ug	1,164 mg
2	180,17	540 ug	
3	155,98	311,8 ug	

Se obtuvo un total de 1,164 mg de CMH murino y se almacenó en -20°C hasta su uso. Con esta cantidad se puede afirmar que el proceso de obtención es eficiente. La cuantificación tiene validez debido a la curva realizada según la recomendación de la casa comercial presentó el coeficiente de determinación R^2 de 0.9988, el cual es un factor crítico puesto que respalda los cálculos de concentración por medio de técnica de cuantificación colorimétrica.

8.4.3. Capacidad de unión de los péptidos con el CMH H2-IE^d

Al evaluar la capacidad de unión de los péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *P. yoelii* mediante una ELISA convencional se encontró que el porcentaje de unión es bajo con respecto a la proteína de unión a mielina (MBP) que fue usada como control positivo. Se recomendó repetir el ensayo con el fin de revisar la unión que presenten los péptidos preseleccionados de una forma más extensiva y bajo distintas condiciones, se espera que los resultados sean relativamente mayores, con un margen mínimo de unión cercano al 45%.

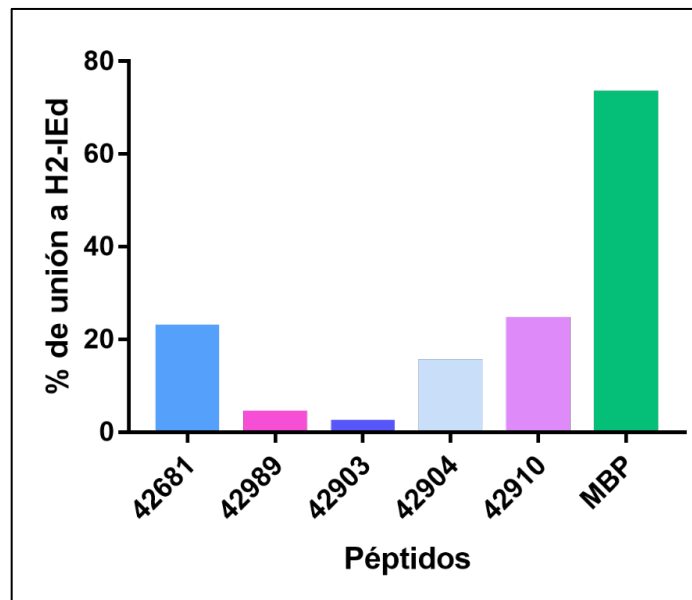


Figura 13. Porcentajes de unión al CMH murino H2-IE^d presentado por cada péptido.

Se detectaron porcentajes de unión muy inferiores con respecto a lo esperado, sin embargo, los péptidos 42910, 42681 y 42904 fueron los péptidos con mayor capacidad de unión encontrados en comparación con los otros HABPs evaluados, presentando una unión de aproximadamente 25% y 22%, respectivamente. No obstante, estos péptidos se encontraban

50 veces más concentrados en comparación con el péptido control, considerando lo anterior, estos péptidos no fueron competentes para anclarse a moléculas H2-IE^d. Por otra parte, para el caso del péptido 42903 y 42898 el porcentaje de unión fue realmente bajo lo que puede significar una ineficiente capacidad de unión a moléculas de CMH. Estos resultados sugieren que los HABPs derivados de la proteína PyAMA-1 no son capaces de inmunomodular la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

8.5. Constructos diseñados *in silico* con alta unión a H2-IE^d

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, a partir del uso de herramientas bioinformáticas se logró el diseño de 6 constructos de péptidos quiméricos dimerizados, para mejorar el anclaje a moléculas H2-IE^d y a su vez optimizar el perfil de inmunomodulación de los HABPs, con el objetivo de generar una respuesta inmune celular y humoral capaz de controlar la infección por *Plasmodium* spp. En la Tabla 2 se encuentran las características con mayor relevancia y sus datos para los péptidos quiméricos seleccionados. Además de esto uno de los criterios de exclusión de péptidos fue el análisis de cada constructo en pBLAST contrarrestado con el proteoma de ratón, donde se encontraron homologías de 4 - 5 aminoácidos.

Tabla 2. Características de los constructos seleccionados.

Péptido	Secuencia	Hidrólisis NP+NN	Estructura secundaria	Helix %	Sheet %	Coil %	IE-Rank NORIE ^d	BA-Rank NORIE ^d	IE-Rank CTXIE ^d	BA-Rank CTXIE ^d
42681_n53641	INPWDKYMKEYWHMKGTRRKPPS	NO	CCCCCCHCHHEECCCCCCCC	13,04	8,70	78,26	0,37	0,89	0,25	0,74
42681_n80D45	INPWDKYMKEYYVRHTPQTRHQK	NO	CCCCCCHCHEEECCCCCCCC	8,70	17,39	73,91	0,25	0,44	0,08	0,29
42903_n303D4	YSSNDANNENQFYIAKKPESNRN	NO	CCCCHHHHCHHHHCCCCCCCC	34,78	0,00	65,22	0,49	2,39	0,49	0,21
42903_n76653	YSSNDANNENQYKFHKIPAKDKH	NO	CCCCHHHHCHHHHECCCCCCCC	34,78	4,35	60,87	0,02	0,33	0,39	0,22
42904_c34385	NPYIMNHPNKRTPEKIENYKDL	NO	CCCECCCCCCHHHHHHCC	26,09	8,70	65,22	0,71	2,06	0,26	0,93
42904_n722A7	TPEKIENYKDLFRNKTPNRRRSW	NO	CCCCHHHHHHHHCCCCCCCC	34,78	0,00	65,22	0,45	0,36	0,36	0,57

Las características mostradas en la anterior tabla son el resultado de varios procesos de exclusión que fueron aplicados a los 45 péptidos pre – seleccionados. Los constructos y las

características mostradas en la tabla anterior nos permiten tener una predicción bioinformática de la estructura del péptido. Las propiedades evaluadas están dispuestas en porcentajes correspondientes a cada tipo de estructura, por ejemplo, las subestructuras presentes se denominan como helicoidales para referirse a formas enrolladas, desordenada, designado para la fracción lineal de la estructura, y hoja plegada que es la parte de la estructura dispuesta como hoja plegada beta. Además de esto los rangos de elución de peptidoma (IE) y de afinidad de unión (BA) siendo evaluados tanto en los extremos amino, como carboxi - terminal permitieron un panorama más extenso para hacer la selección. El péptido 42681_n53641 con la secuencia mostrada en la tabla 2, no presenta hidrólisis mediada por catepsinas, los porcentajes de hélice y hoja plegada son bajos lo que es favorable para la estructura que tomará proteína, el porcentaje de desordenada al contrario se espera que sea alto, dado que en esta zona la proteína estará dispuesta de forma lineal permitiendo el reconocimiento más fácil por los receptores de CMH clase II, además de esto presenta buenos rangos de IE NORIEd (0,37) y de IE CTXIEd (0,25) así como de BA NORIEd (0,89) y de BA CTXIEd (0,74), este factor fue tomado en cuenta para garantizar la síntesis de la molécula una vez seleccionada, similar es el caso del péptido 42681_n80D45 donde se pudo predecir una no hidrólisis, porcentajes bajos de formación de estructuras de helice (8.70) y de hoja plegada (17.39) y un porcentaje alto de desordenada (73.91%), presentó buenos niveles de IE (0,165) y BA (0,365) promedio de ambas disposiciones del péptido. Al revisar el constructo 42903_n303D4 se comporta de la misma manera en hidrólisis y en los porcentajes determinantes de estructura presenta helice, hoja plegada, y desordenada de 34.78, 0 y 65.22 respectivamente, con este péptido la afinidad de unión en ubicación NORIEd es alta de 2.39, mientras que los demás datos IE (NORIEd 0,49 – CTXIEd 0,49) y BA (CTXIEd 0,21) se encuentran dentro del margen aceptable. El péptido 42903_n76653

presentó valores aceptables de hélice y hoja plegada, aunque en el porcentaje de desordenada estuvo relativamente baja con respecto a los demás péptidos, se observó rangos favorables de IE – BA, (0,205 – 0,275) en porcentaje promedio respectivamente. Un comportamiento similar se vio con el péptido 42904_c34385, sin embargo, su porcentaje de desordenada fue más alto y el rango de BA en NORIEd fue más alto que lo esperado presentado un valor de 2.06, con respecto a los valores de IE se encontró un promedio de 0,485. Al revisar el péptido 42904_n722A7 destaca la presencia de 0 en el porcentaje de hoja plegada, pero las demás características evaluadas son favorables, incluso IE y BA donde los promedios encontrados fueron 0,405 y 0,465 respectivamente. Esta revisión se realizó con los 45 péptidos iniciales.

La homología encontrada corresponde a la revisión realizada mediante pBlast donde compararon las proteínas codificadas a partir de los codones que a su vez está relacionado con la disposición de los aminoácidos dentro de una secuencia. Las homologías encontradas suponían un reto ante la posibilidad de que al usar péptidos que contuvieran codificaciones para proteínas propias del ratón el sistema inmune no los detectara como agentes extraños, debido a esto se realizó la medición de antigenicidad (Fig. 7) donde se encontró capacidad antigénica de todos los péptidos evaluados. Para realizar la predicción de la estructura bidimensional se utilizaron estrategias bioinformáticas donde se pudiera observar las diferentes estructuras secundarias, tales como, *coi*, hoja plegada y random.

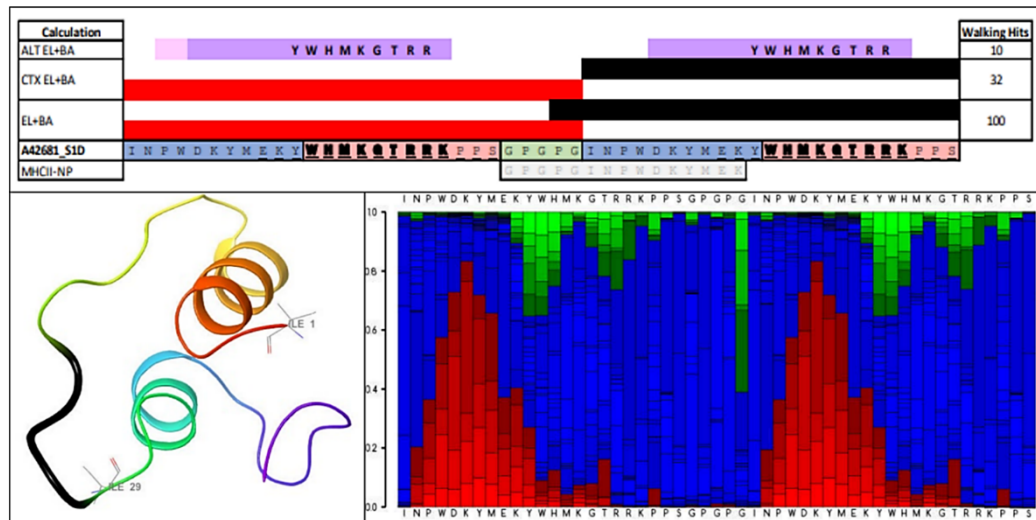
8.5.1. Estructuras bidimensionales

Con el diseño bidimensional de las estructuras se confirma la conformación de cada péptido, así como un acercamiento a la interacción que estos tendrían con el CMH mediado por el reconocimiento específico y la unión efectiva que podría generar un estímulo que promueva una respuesta inmune en el biomodelo. Dentro de las gráficas se encuentran los aminoácidos

que conforman cada epítotope, tanto regiones determinantes antigénicas para células T, como aquellas específicas para linfocitos B (42681, 42903 y 42904) en cada constructo, su ubicación, los puntos de corte y la ubicación de linker. Se logro el diseño dimerizado de los 6 constructos seleccionados, con el objetivo de promover una mejor internalización de estos por células presentadoras de antígenos involucradas en el estímulo de una respuesta inmune dirigida contra el agente etiológico.

Adicionalmente dentro de la gráfica se representa mediante colores la proporción de cada estructura secundaria encontrada para cada polipéptido, lo cual como se explicó anteriormente, puede sugerir cuales de estos constructos pueden tener un perfil de unión eficiente a moléculas H2-IE^d, y posteriormente ser utilizados para los ensayos de seguridad e inmunización *in vivo* para caracterizar la respuesta inmune protectora estimulada por estos constructos.

A.



B.

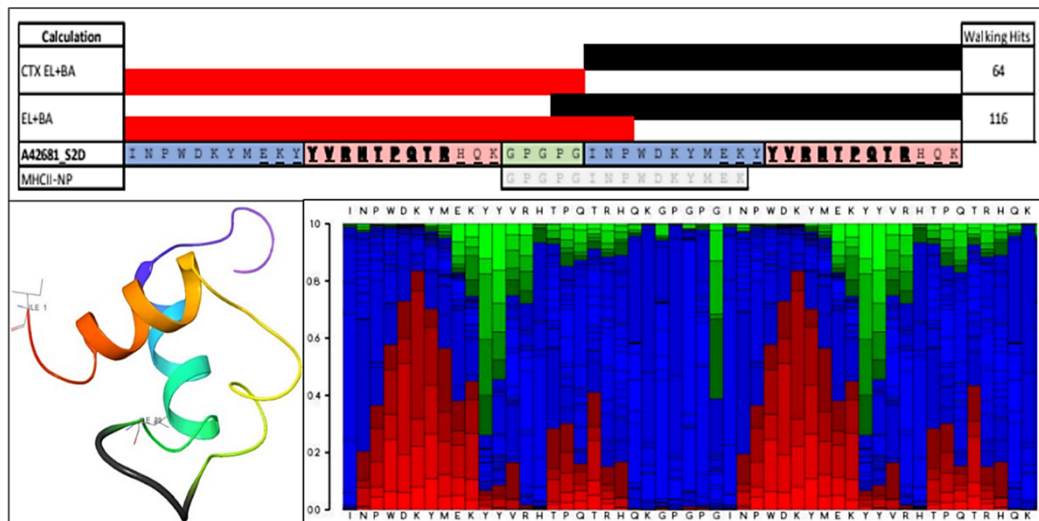


Figura 14. Estructura bidimensional péptido 42681. (A) Constructo A42681_S1D. (B) Constructo A42681_S2D. Primer core de unión representado por barra roja, segundo core de unión representado por barra negra. Proporción de estructura secundaria diferenciadas por color, para estructura helice color rojo, desordenada con color azul y hoja plegada con color verde.

En el caso de los constructos A42681_S1D y A42681_S2D la estructura secundaria se encuentra representada por aquellas de tipo desordenada, como era esperado según los datos cuantitativos mostrados previamente (Tabla 2). En la Fig. 14B es posible observar que la región de estructura hélice es mayor a la deseada, lo que dificulta la capacidad de

reconocimiento por el CMH, por otro lado, en la Fig. 14A se puede ver la zona roja con una disminución que se evidencia en la estructura secundaria permitiendo así que el constructo este dispuesto en una forma un poco más lineal, lo que sugiere un mejor reconocimiento y acople al CMH.

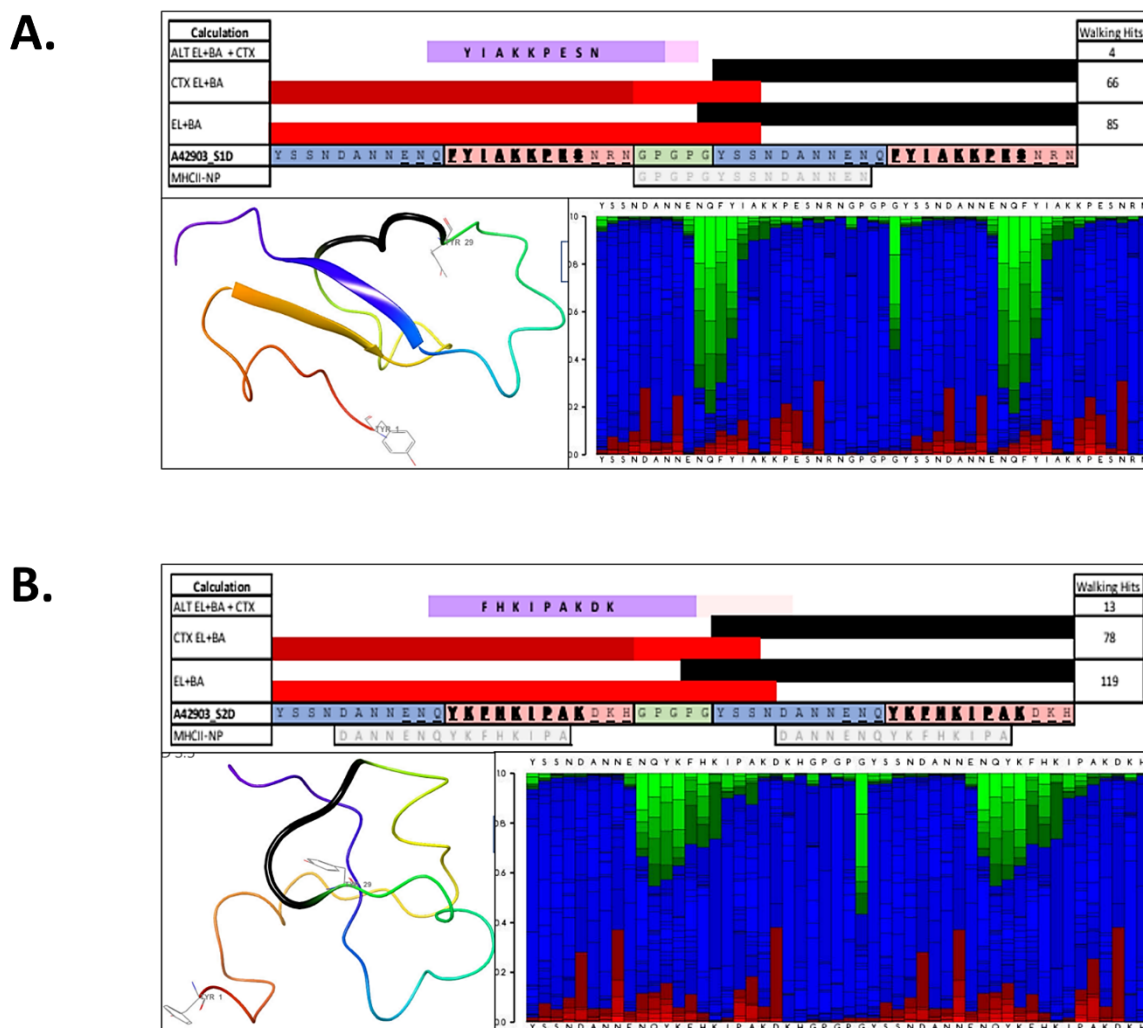
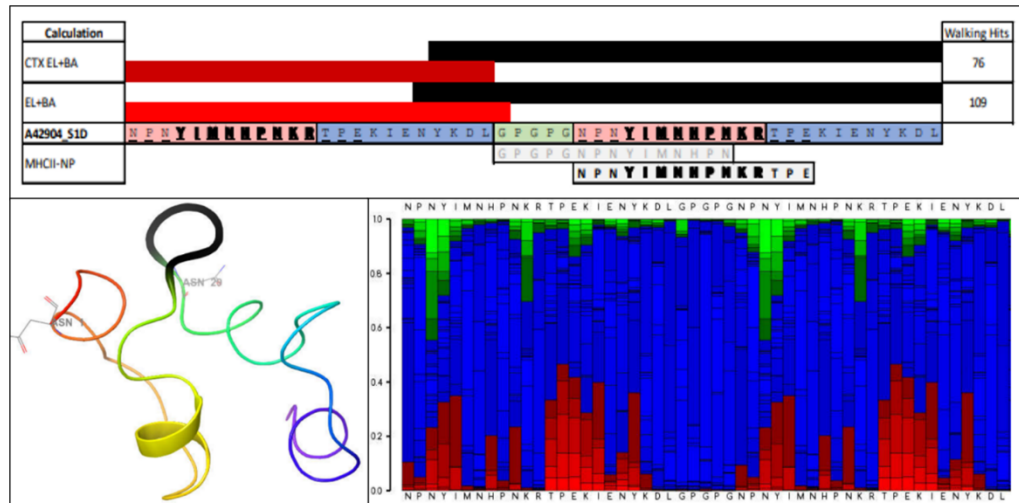


Figura 15. Estructura bidimensional péptido 42903. (A) Constructo A42903_S1D. (B) Constructo A42903_S2D. Primer core de unión representado por barra roja, segundo core de unión representado por barra negra. Proporción de estructura secundaria diferenciadas por color, para estructura hélice color rojo, desordenada con color azul y hoja plegada con color verde.

En contraste a las estructuras correspondientes a los constructos dimerizados A42681_S1D y A42681_S2D (Fig. 14), en el caso de los constructos A42903_S1D y A42903_S2D se evidencia un porcentaje más bajo de estructura helicoidal lo cual se evidencia en la gráfica

de estructura donde se observa una disposición con mayor linealidad lo que podría sugerir una unión más sencilla con el CMH, estas diferencias están demostradas en las dos orientaciones de la estructura, al tener conocimiento de las secuencias de aminoácidos que conforman al polipéptido se puede confirmar el comportamiento y las características que le confiere a la estructura la posición en la que se encuentre cada residuo, información que puede ser relevante al implementar esta metodología con péptidos adicionales de así ser necesario.

A.



B.

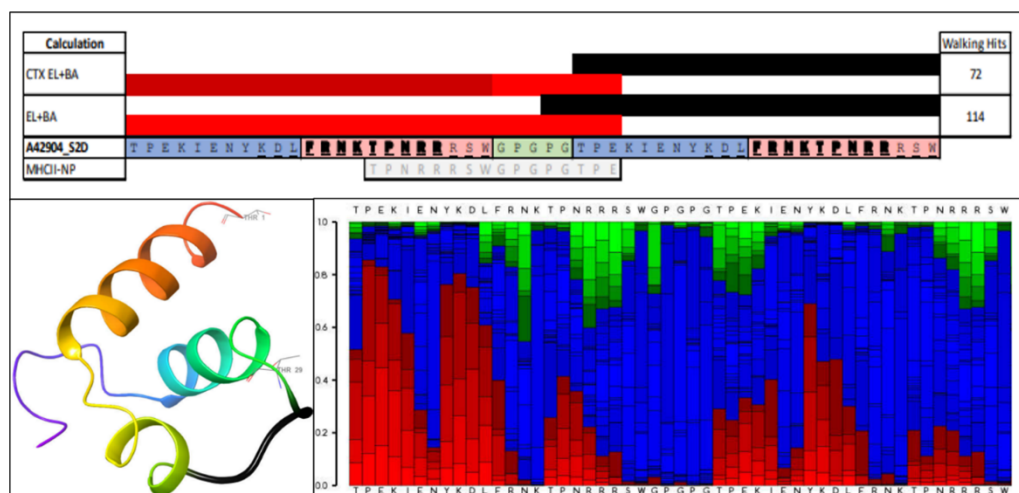


Figura 16. Estructura bidimensional péptido 42904. (A) Constructo A42904_S1D. (B) Constructo A42904_S2D. Primer core de unión representado por barra roja, segundo core de unión representado

por barra negra. Proporción de estructuras secundarias diferenciadas por color, para estructura hélice color rojo, desordenada con color azul y hoja plegada con color verde.

Al observar la estructura secundaria de los constructos A42904_S1D y A42904_S2D con la disposición del epítipo B hacia amino-terminal u orientado hacia el extremo carboxi-terminal, se puede observar una diferencia significativa en la proporción de estructura secundaria de tipo helical donde para la Fig. 16B se ve una mayor proporción de zona roja, correspondiente a este tipo de estructura, lo que refleja una predominancia de hélices estructurales, esto a su vez sugiere una baja afinidad en el reconocimiento por el CMH. Con respecto a la Fig. 16A se pueden observar giros aleatorios dentro de la estructura debido principalmente a la ubicación de cada residuo, no obstante, se evidencia una proporción alta y predominante que corresponde a una estructura desordenada lo cual puede inferir una interacción más estable con el CMH.

9. Discusión

En este proyecto de investigación se implementó una metodología a partir de péptidos derivados de regiones conservadas del antígeno AMA-1 de *Plasmodium yoelii* seleccionados previamente en FIDIC. Estos péptidos fueron evaluados para realizar una caracterización de cada uno y así elegir las mejores opciones para ser utilizadas en el diseño de constructos de péptidos quiméricos optimizados para la unión a moléculas H2-IE^d. Al conocer las características de cada péptido se procedió con la predicción bioinformática de epítopes T mediante los programas NETMHCIIpan 3.2 y 4.0, luego de aplicar varios factores de exclusión y múltiples pruebas *in silico* se obtuvieron 6 constructos que deben ser evaluados *in vitro* e *in vivo* para determinar si pueden ser candidatos para el desarrollo de un tratamiento

inmunoproliférico en el biomodelo y de esta forma comprobar la eficacia del método y su posterior utilización en estudios con enfoque a población humana.

El curso de la infección causada por la cepa *Plasmodium yoelii* 17XNL en los individuos utilizados en este trabajo demostró ser coherente y mantener características descritas anteriormente por varios autores (55-57). Las parasitemias encontradas a partir del 5 d.p.i. con valores de 8% confirman que el método utilizado para la infección del biomodelo fue eficiente, al evaluar la carga parasítica usando microscopía de luz se evidenciaron comportamientos específicos de especie, por ejemplo, un alto porcentaje de GRs parasitados, malformación en la membrana del GR en estadios pre-esquizogonia (58). Es pertinente mencionar que la pérdida de estructura de la membrana afecta al glóbulo rojo promoviendo un daño en su función y flexibilidad celular (59). El curso de la infección y demás similitudes descritas previamente entre *P. yoelii* y *P. vivax* (18, 60, 61) validan el modelo implementado en este trabajo, en función de la caracterización de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *P. yoelii*. En esta investigación se logró identificar péptidos antigénicos y, con baja o nula capacidad de unión a moléculas H2-IE^d con estos datos obtenidos experimentalmente articulados a un análisis robusto *in silico* se logró diseñar constructos peptídicos quiméricos que integran epitopos B (HABPs derivados de la proteína PyAMA-1) y epitopos T, este último optimizado para el anclaje eficiente y específico al complejo mayor de histocompatibilidad de ratón, como una estrategia para el desarrollo de una vacuna basada en péptidos inmunomoduladores de una respuesta dirigida para el control de una infección por *Plasmodium* spp.

El análisis de cortes histológicos de bazo evidenció daño a la microarquitectura tisular relacionada a la infiltración masiva de células de sistema inmune (Fig. 5). Estudios previos

han reportado cambios en la colescencia entre pulpa roja y blanca según la cepa causal de la infección, por ejemplo Yong Fu y colaboradores explican las diferencias histológicas de la infección entre cepas *P. yoelii* 17XNL y *P. yoelii* 17XL en varios tejidos, respecto al bazo, describieron que la esplenomegalia se presenta en ambos casos (infección con Py17XL y Py17XNL) a los 6 días p. i., pero la hiperplasia esplénica es mayor en la cepa no letal, no obstante en la infección causada por la cepa letal la alteración de la microestructura y diferenciación celular dentro del bazo es significativamente más evidente en comparación con Py17XNL (62), esto posee una relación directa con la esplenomegalia encontrada en los ratones que fueron infectados durante este estudio y la alteración en tejido esplénico evidenciado por microscopía óptica mediante tinción con hematoxilina y eosina (Fig. 5).

Por otro lado, Lacerda y colaboradores, observaron en su estudio que la muerte celular esplénica tras la infección por *P. yoelii* N67C estuvo mediada por la apoptosis generada luego de la expresión de caspasa 3 en las diferentes células involucradas, estos resultados los obtuvieron mediante inmunotinciones que no fueron realizadas en este estudio (54). Además, Y Peng junto a sus colaboradores demostraron que la proteína Erythrocyte-binding-like (PyEBL) de *P. yoelii* está relacionada con la evolución de la enfermedad, la sustitución C741Y en el polipéptido represento cambios significativos en la resolución de la infección mediada por la respuesta inmune del hospedero, debido a un cambio en la expresión y localización intracelular de este antígeno, así como también modificaciones en la interacción de PyEBL a la proteína banda 3 de la estructura del GR, que podría estar relacionada con el aumentando de la expresión de fosfatidilserina (PS) en la superficie del GR, esto a su vez eleva la fragilidad osmótica del GRp, y desencadena la fagocitosis mediada por PS-CD36, lo cual contribuye en la disminución de la carga parasítica y mejorando la tasa de supervivencia

de los individuos. Con este tipo de estudios se demuestra la importancia de las proteínas involucradas en la interacción huésped – patógeno y lo imprescindible de estudiarlas para desarrollar métodos profilácticos efectivos contra esta enfermedad (63).

Ahora bien, en el cultivo de parásito sincronizado mediante la técnica de sorbitol estandarizada en FIDIC se pudo observar el ciclo completo del parásito y su duración bajo condiciones específicas, encontrando así la congruencia con lo descrito por González Azcarate (6), este modelo permite evaluar características adicionales de esta especie *in vitro*, tales como, los GR parasitados en estadios de trofozoíto temprano, maduro y la presencia de anillos intraeritocítico (Fig. 6).

Previamente ha sido descrito la importancia que tiene encontrar péptidos derivados de regiones conservadas de diversas proteínas presentes en varias especies de *Plasmodium*, una de las metodologías que se ha implementado para hallar estos péptidos es aplicar criterios de exclusión tales como el uso de epítopes B predichos, evaluar la capacidad de los péptidos de inhibir de desarrollo de infección, así como también la inhibición de invasión del parásito, unión específica a la célula blanco y la antigenicidad presentada, este último factor fue caracterizado en este estudio, esta metodología es aplicada en FIDIC para la clasificación y selección de péptidos utilizados en distintos proyectos de investigación (64, 65). Los péptidos que utilizando los criterios anteriormente descritos han sido clasificados como HABPs y presentan relevancia en este estudio son los péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA-1 de *P. yoelii*, fueron los siguientes: 42681, 42898, 42903, 42904, 42910.

La antigenicidad es definida como la capacidad que presenta un antígeno para producir una reacción inmune específica (66), en contexto actual los inmunógenos pueden estar descritos

como cualquier sustancia propia o ajena que pueda ser reconocida por el sistema inmune (67); en este proyecto se encontró que los péptidos 42904 y 42898 fueron los que presentaron mayor reactividad frente a sueros obtenidos de 8 ratones con infección experimental de *Plasmodium yoelii yoelii* 17XNL los cuales reportaron parasitemias variables al momento de la sangría (Fig. 5; Fig. 7). Estos resultados sugieren que la reactividad antigénica es directamente proporcional a la carga parasítica y el curso de la infección (68).

Por ejemplo, en este proyecto dentro de las mediciones de unión realizadas por ELISA se encontró una unión a H2-IE^d de aproximadamente 75% al utilizar la proteína básica de mielina, la cual representa un porcentaje ideal de alta unión, no obstante, en el caso de los péptidos evaluados no se obtuvo un buen perfil de unión. En los constructos de péptidos quiméricos la unión será dependiente del epítipo T artificial optimizado, no de la parte evaluada correspondiente al epítipo B. En este orden de ideas encontrar porcentajes bajos en los péptidos de regiones conservadas del antígeno AMA-1 evaluados no resulta desfavorable, considerando que este porcentaje aumentará al evaluar el constructo final donde están incluidos epítopos T adicionales. Rodríguez J, sugiere que la variabilidad en los porcentajes de unión en los péptidos pueden estar relacionados con la disposición geométrica de la estructura bidimensional de los péptidos (69), razón por la cual se realizó el diseño previo de los constructos para evitar este problema. Dicho esto, para evitar baja capacidad de unión debido a la estructura se realizó la predicción de estructura secundaria y terciaria de los constructos quiméricos, puesto que las estructuras favorecidas para la unión a moléculas H2-IE^d son estructuras desordenadas, y las menos favorecidas son las helicoidales.

Adicional a esto, una característica especial de la molécula CMH está relacionada con la interacción necesaria para el anclaje efectivo de la misma con epítopos específicos, en este

caso se evidenció la predicción eficaz y rigurosa de regiones reconocibles por CMH H2-IE^d que resulta relevante para seleccionar péptidos derivados de proteínas que sean posibles candidatos a vacunas, por ejemplo Rodrigo Nunes utilizó péptidos sintéticos quiméricos constituidos por epítopes B y T, los constructos que diseñaron para inoculación en el modelo murino permitieron la evaluación comparativa de la respuesta inmune generada con el uso de epítope T heterólogo (derivado de toxoide tetánica) o un epítope T homólogo unidos al epítope B derivado de la proteína PvMSP9, de esta forma se observó que aunque con el uso de ambas combinaciones de epítopes B -T se generó respuesta inmune en el ratón garantizando su funcionamiento, se encontró una mejor respuesta de carácter humoral posterior a la inoculación con el uso del epítope T heterólogo unido al epítope B con estos datos se confirma el enfoque prometedor para el desarrollo de vacunas con esta estrategia, además este determinante antigénico está descrito como epítope universal para ratones y humanos, razón por la que actualmente es utilizado ampliamente (70). Para la selección de epítopes B de 13 residuos de longitud se tuvo en cuenta la caracterización previa que se realizó en FIDIC, donde ya tienen establecida la capacidad de inhibición de la invasión, por otro lado para la predicción de epítopes T se utilizaron los software NetMHCIIpan 3.2 y NetMHCIIpan 4.0, estos programas han sido ampliamente utilizados para el diseño de péptidos que son evaluados en distintas enfermedades, por ejemplo, Reynisson B, demuestra los beneficios que tiene este programa sobre otros de la misma rama enfocándose en la integración de datos reportados en las diferentes bases de datos (71), Nielsen B y colaboradores recalcan que la superioridad de este programa frente a otros radica principalmente en el funcionamiento equivalente para alelos de HLA -DR tanto reportados anteriormente como aquellos que son considerados nuevos (72). Adicionalmente, S Tourdot, propone un enfoque para mejorar la antigenicidad celular incluyendo aminoácidos de alta

unión para mejorar el reconocimiento específico del péptido por moléculas CMH (73, 74). Esta metodología estuvo dirigida a lograr unión efectiva entre péptidos optimizados y diferentes moléculas de CMH. El éxito de esta estrategia ha representado un avance en el desarrollo de vacunas debido a la utilidad que tiene en un escenario posible de inmunización masiva, donde la restricción de eficacia es mediada por haplotipos de diferentes razas con ubicaciones geográficamente distantes, esto para garantizar una mayor cobertura en la protección inmune estimulada por estos polipéptidos optimizados (75).

En este estudio se evaluó la antigenicidad y capacidad de unión a Complejo Mayor de Histocompatibilidad H2-IE^d de péptidos derivados de regiones conservadas de la proteína AMA – 1 de *Plasmodium yoelii*, adicionalmente mediante herramientas bioinformáticas se diseñaron 6 constructos de péptidos quiméricos con alta unión a H2-IE^d que permiten ser utilizados como objeto de estudio para la determinación de la respuesta inmune presentada en modelo murino. Los resultados obtenidos nos permiten garantizar la metodología y su aplicabilidad para la evaluación *in vitro* de péptidos y la optimización *in silico* de constructos que representen importancia en el desarrollo de un tratamiento profiláctico peptídico ante esta u otra enfermedad.

10. CONCLUSIONES

- La técnica utilizada para la infección y el manejo del biomodelo fue eficaz obteniendo parasitemias en los individuos a partir del día 5, y un monitoreo confiable en las cargas parasíticas evidenciando así la relación que conserva con la sintomatología clínica presente en el sujeto.

- El anticuerpo producido a partir del cultivo de hibridoma HB55 demostró una alta especificidad en el reconocimiento de células del CMH, resultado evidenciado a partir de los datos encontrados en citometría.
- La obtención de molécula CMH a partir de cultivo de células PAI y su posterior purificación y evaluación de la identidad de la molécula permitió el uso de esta en varios ensayos realizados a lo largo del desarrollo del proyecto con total confianza.
- La antigenicidad presentada por cada péptido al ser expuesta a las inmunoglobulinas de cada ratón corresponde de forma directamente proporcional a la parasitemia del sujeto en el momento de recolección del suero.
- Los resultados obtenidos nos permiten garantizar la metodología y su aplicabilidad para la evaluación *in vitro* de péptidos y la optimización *in silico* de constructos que representen importancia en el desarrollo de un tratamiento profiláctico peptídico ante esta u otra enfermedad.
- Con estos resultados se aportó al conocimiento científico dirigido al desarrollo de pruebas de concepto donde se lleve a cabo la caracterización específica de la respuesta inmune generada tras la inmunización de modelo murino con los péptidos diseñados y probados en pruebas *in vitro* para así dirigir hacia el desarrollo de tratamientos inmunoprolácticos con un enfoque hacia la población humana.

Recomendaciones

Se sugiere continuar con el proceso de síntesis de los péptidos quiméricos optimizados, realizar pruebas de seguridad para su uso *in vivo* y evaluar la respuesta inmune generada tras la inmunización del biomodelo con estos constructos.

Realizar diseños adicionales *in silico* de péptidos derivados de regiones conservadas de diferentes proteínas presentes en otras especies de *Plasmodium* spp., como *P. vivax*, con la metodología implementada en el actual proyecto para poder generar mayor número de candidatos a vacuna que puedan ser evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

1. OPS, OMS. Guía para atención clínica integral del paciente con malaria. Bogotá: Ministerio de la Protección Social. 2010.
2. Organization WH. World malaria report 2021. 2021.
3. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020.
4. Pérez DAM. Determinación del proteoma de la cepa vcg-1 de *Plasmodium vivax* y caracterización de moléculas candidatas para su inclusión en el desarrollo de una vacuna: Universidad de Salamanca; 2017.
5. Prieto P. Comités de ética en investigación con seres humanos: relevancia actual en Colombia Experiencia de la Fundación Santa Fe de Bogotá. Acta Médica Colombiana. 2011;36(2):98-104.
6. González I. Inmunidad a la malaria letal en modelos murinos: adquisición espontánea o mediada por tratamiento quimioterapéutico. 2013.
7. Stevenson M, Riley E. Innate immunity to malaria. Nature Reviews Immunology. 2004;4(3):169-80.
8. Rojas W, Anaya J, Cano L, Aristizábal B, Gómez L, Lopera D. Inmunología de Rojas: CIB Fondo Editorial; 2007.
9. Tobón-Castaño A. Acciones necesarias para la eliminación de la malaria en Colombia. Revista Ciencias de la Salud. 2020;18(3):1-3.
10. Alonso P. Vacunas contra la malaria.
11. Goodman A, Forbes E, Williams A, Douglas A, de Cassan S, Bauza K, et al. The utility of *Plasmodium berghei* as a rodent model for anti-merozoite malaria vaccine assessment. Scientific reports. 2013;3(1):1-13.
12. Draper S, Sack B, King C, Nielsen C, Rayner J, Seder R, et al. Malaria vaccines: recent advances and new horizons. Cell host & microbe. 2018;24(1):43-56.
13. Tubo N, Pagán A, Taylor J, Nelson R, Linehan J, Ertelt J, et al. Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. Cell. 2013;153(4):785-96.
14. Carvalho L, Oliveira S, Alves F, Brígido M, Muniz J, Daniel-Ribeiro C. Aotus infulatus monkey is susceptible to *Plasmodium falciparum* infection and may constitute an alternative experimental model for malaria. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000;95(3):363-5.
15. Nardin E. The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials. Human vaccines. 2010;6(1):27-38.

16. Fenton B, Clark J, Khan C, Robinson J, Walliker D, Ridley R, et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35-to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(2):963-71.
17. Parker M, Penarete-Vargas DM, Hamilton P, Guérin A, Dubey J, Perlman S, et al. Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA–RON2 pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(2):398-403.
18. Tyler J, Treeck M, Boothroyd J. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends in parasitology*. 2011;27(9):410-20.
19. Mitchell G, Thomas A, Margos G, Dluzewski A, Bannister L. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and immunity*. 2004;72(1):154-8.
20. Yang A, Lopaticki S, O'Neill M, Erickson S, Douglas D, Kneteman N, et al. AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cellular microbiology*. 2017;19(9):e12745.
21. Fraser T, Kappe S, Narum D, VanBuskirk K, Adams J. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001;117(1):49-59.
22. Narum D, Ogun S, Thomas A, Holder A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infection and immunity*. 2000;68(5):2899-906.
23. Millares J. La vacuna contra la malaria: un gran desafío para la humanidad.
24. Srinivasan P, Ekanem E, Diouf A, Tonkin M, Miura K, Boulanger M, et al. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(28):10311-6.
25. Neafsey D, Juraska M, Bedford T, Benkeser D, Valim C, Griggs A, et al. Genetic diversity and protective efficacy of the RTS, S/AS01 malaria vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(21):2025-37.
26. Dennison S, Reichartz M, Abraha M, Spreng R, Wille-Reece U, Dutta S, et al., editors. *Magnitude, Specificity, and Avidity of Sporozoite-Specific Antibodies Associate With Protection Status and Distinguish Among RTS, S/AS01 Dose Regimens*. *Open Forum Infectious Diseases*; 2021: Oxford University Press US.
27. Ouattara A, Niangaly A, Adams M, Coulibaly D, Kone A, Traore K, et al. Epitope-based sieve analysis of *Plasmodium falciparum* sequences from a FMP2. 1/AS02A vaccine trial is consistent with differential vaccine efficacy against immunologically relevant AMA1 variants. *Vaccine*. 2020;38(35):5700-6.
28. Pérez M. *Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)*: Universitat de Barcelona; 2007.
29. Marussig M, Rénia L, Motard A, Miltgen F, Pétour P, Chauhan V, et al. Linear and multiple antigen peptides containing defined T and B epitopes of the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein: antibody-mediated protection and boosting by sporozoite infection. *International immunology*. 1997;9(12):1817-24.

30. Leiton J, Montoya J, Villaroel M, Mondragón E. Influencia de la fuerza de infección y la transmisión vertical en la malaria: Modelado Matemático. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 2017;13(1):4-18.
31. Ochoa J, Osorio L. Epidemiology of urban malaria in Quibdo, Choco. *Biomedica*. 2006;26(2):278-85.
32. Ospina M, Mancel E, Pacheco O, Quijada H. Enfermedades transmitidas por vectores. *Malaria. Boletín Epidemiológico Semanal*. 2015;52:35-9.
33. Khanam S, Sharma S, Pathak S. Lethal and nonlethal murine malarial infections differentially affect apoptosis, proliferation, and CD 8 expression on thymic T cells. *Parasite immunology*. 2015;37(7):349-61.
34. Vale N, Aguiar L, Gomes P. Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs? *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5:275.
35. Salud INd. Boletín epidemiológico semana 11. ins.gov.co: Instituto Nacional de Salud; 2022 [
36. Delgado J, Flores L, Chico M. Malaria importada en países no endémicos de las Américas, factores predisponentes 2013–2017. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2021;61:52.
37. Granda S, Jiménez M. Paludismo: El desarrollo de una vacuna. *Control Calid SEIMC*. 2005:1-10.
38. Huang B, Pearman E, Kim C. Mouse models of uncomplicated and fatal malaria. *Bio-protocol*. 2015;5(13).
39. Killick-Kendrick R. *Rodent malaria*: Elsevier; 2012.
40. Taylor-Robinson A. Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Experimental parasitology*. 2010;126(3):406-14.
41. Boundenga L, Ngoubangoye B, Ntie S, Moukodoum N, Renaud F, Rougeron V, et al. Rodent malaria in Gabon: diversity and host range. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2019;10:117-24.
42. Vasquez G, Patiño E, Garcia L, Barrera L. Los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II: regulación y relación con infecciones intracelulares. *Acta méd colomb*. 2001:73-81.
43. Gardner M, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman R, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*. 2002;419(6906):498-511.
44. Oliva S. La malaria y la controversia sobre su vacuna. *Offarm: farmacia y sociedad*. 2001;20(4):140-3.
45. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Awuondo K, Leach A, et al. Four-year efficacy of RTS, S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(12):1111-20.
46. Reyes C, Molina-Franky J, Aza-Conde J, Suárez C, Pabón L, Moreno-Vranich A, et al. Malaria: Paving the way to developing peptide-based vaccines against invasion in infectious diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020;527(4):1021-6.
47. Moisa A, Kolesanova E. Synthetic peptide vaccines. *Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario*. 2012:201-28.
48. Yepes-Pérez Y, López C, Suárez CF, Patarroyo MA. Plasmodium vivax Pv 12 B-cell epitopes and HLA-DRβ1*-dependent T-cell epitopes in vitro antigenicity. *PloS one*. 2018;13(9):e0203715.

49. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018;154(3):394-406.
50. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *Journal of proteome research*. 2020;19(6):2304-15.
51. Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J, et al. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *The Journal of Immunology*. 2002;168(11):5499-506.
52. Giguère S, Drouin A, Lacoste A, Marchand M, Corbeil J, Laviolette F. MHC-NP: predicting peptides naturally processed by the MHC. *Journal of immunological methods*. 2013;400:30-6.
53. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*. 2015;43(W1):W389-W94.
54. Lacerda-Queiroz N, Riteau N, Eastman R, Bock K, Orandle M, Moore I, et al. Mechanism of splenic cell death and host mortality in a *Plasmodium yoelii* malaria model. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12.
55. Lesmes L, Gallego G, Carreño L, Hoebecke J, Lozano J. Actividad funcional de anticuerpos inducidos por péptidos-miméticos derivados del antígeno msp-2 del plasmodium, como potenciales agentes inmunoterapéuticos en malaria causada por plasmodium yoelii y plasmodium berghei en ratones balb/c. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2011.
56. Martínez C. Estudio comparativo y evaluación del impacto de la cloroquina en muestras de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium vinckei*; según la producción de derivados hematimétricos. 2004.
57. Langhorne J, Quin S, Sanni L. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol*. 2002;80(80):204-28.
58. Deharo E, Gautret P, Mufioz V, Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. *Biblioteca virtual em saúde*. 2000.
59. Martínez M. Estudio comparativo y evaluación del impacto de la cloroquina en muestras de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium vinckei*; según la producción de derivados hematimétricos. 2004.
60. Carlton J, Angiuoli S, Suh B, Kooij T, Perteu M, Silva J, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*. 2002;419(6906):512-9.
61. Taylor H, Triglia T, Thompson J, Sajid M, Fowler R, Wickham M, et al. *Plasmodium falciparum* homologue of the genes for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins, which is transcribed but not translated. *Infection and immunity*. 2001;69(6):3635-45.
62. Fu Y, Ding Y, Zhou T, Ou Q, Xu W. Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of *Plasmodium yoelii*. *Journal of Parasitology*. 2012;98(2):310-5.
63. Peng Y, Qi Y, Zhang C, Yao X, Wu J, Pattaradilokrat S, et al. *Plasmodium yoelii* erythrocyte-binding-like protein modulates host cell membrane structure, immunity, and disease severity. *MBio*. 2020;11(1):e02995-19.

64. Obando-Martinez A, Curtidor H, Vanegas M, Arévalo-Pinzón G, Patarroyo M, Patarroyo M. Conserved regions from *Plasmodium falciparum* MSP11 specifically interact with host cells and have a potential role during merozoite invasion of red blood cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;110(4):882-92.
65. Patarroyo M, Bermúdez A, Alba M, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche L, et al. IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electron and Topochemical Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123249.
66. Rodríguez L, Jaimes R. Evaluación de la antigenicidad de péptidos derivados de la proteína pv12 de *Plasmodium Vivax* en muestras obtenidas de individuos de zonas endémicas de Colombia. 2018.
67. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de Kuby*: McGraw Hill; 2007.
68. De Jesús R, Torres E. Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. *J Bol Mal Salud Amb*. 2006;46(2).
69. Rodríguez J, Bernal P, Prieto S, Correa C. Teoría de péptidos de alta unión de malaria al glóbulo rojo: predicciones teóricas de nuevos péptidos de unión y mutaciones teóricas predictivas de aminoácidos críticos. *Inmunología*. 2010;29(1):7-19.
70. Rodrigues-da-Silva R, Correa-Moreira D, Soares I, de-Luca P, Totino P, Morgado F, et al. Immunogenicity of synthetic peptide constructs based on PvMSP9E795-A808, a linear B-cell epitope of the *P. vivax* merozoite surface protein-9. *Vaccine*. 2019;37(2):306-13.
71. Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic acids research*. 2020;48(W1):W449-W54.
72. Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, et al. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS computational biology*. 2008;4(7):e1000107.
73. Tourdot S, Oukka M, Manuguerra J, Magafa V, Vergnon I, Riche N, et al. Chimeric peptides: a new approach to enhancing the immunogenicity of peptides with low MHC class I affinity: application in antiviral vaccination. *The Journal of Immunology*. 1997;159(5):2391-8.
74. Fonseca J, Cabrera-Mora M, Singh B, Oliveira-Ferreira J, da Costa Lima-Junior J, Calvo-Calle J, et al. A chimeric protein-based malaria vaccine candidate induces robust T cell responses against *Plasmodium vivax* MSP119. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-18.
75. Rodríguez J. Teoría de unión al HLA clase II: teoría de probabilidad, combinatoria y entropía aplicadas a secuencias peptídicas. *Inmunología*. 2008;27(4):151-66.