

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Exploración de modificaciones estructurales de un
antígeno de la proteína MSP1 de *Plasmodium* spp y su
influencia en su propiedad de reconocimiento molecular
por sueros murinos y humanos, de personas de áreas
postconflicto en Colombia**

Fredy Leonardo Melo Velandia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

Exploración de modificaciones estructurales de un antígeno de la proteína MSP1 de Plasmodium spp y su influencia en su propiedad de reconocimiento molecular por sueros murinos y humanos, de personas de áreas postconflicto en Colombia

Fredy Leonardo Melo Velandia

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Farmacología

Director

Jose Manuel Lozano Moreno Ph.D.

Grupo de investigación: Mimetismo Molecular de los agentes infecciosos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

DECLARACION DE ORIGINALIDAD

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional.

«Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencia bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Fredy Leonardo Melo Velandia

Fecha 02/08/2023

Resumen

Exploración de modificaciones estructurales de un antígeno de la proteína MSP1 de Plasmodium spp y su influencia en su propiedad de reconocimiento molecular por sueros murinos y humanos, de personas de áreas postconflicto en Colombia

Estudios realizados en el marco de investigación del grupo de mimetismo molecular de los agentes infecciosos, evaluaron la reactividad de sueros de áreas endémicas de Colombia (san juan de nepomuceno - bolívar, tierralta - córdoba, nuquí - chocó y tumaco - nariño) (SIVIGILA, instituto nacional de salud, 2018), frente a lisados de dos cepas de referencia, 3D7 y FCB2 de *Plasmodium falciparum*, donde se identificaron bandas de reconocimiento de la proteína MSP1 con movilidades relativas de 195, 83, 42 y 38 kDa, que permitieron identificar la reactividad de sueros frente a la proteína precursora MSP1 y sus fragmentos de procesamiento, lo que valida la importancia de este antígeno de superficie respecto a su papel inmunológico, perfilándola como una proteína blanco en la implementación de modificaciones tipo amida reducida, que promuevan y evidencien una protección efectiva de individuos expuestos a la infección natural.

La búsqueda de secuencias de relevancia inmunogénica en la estructura primaria de la proteína MSP1, a través de herramientas bioinformáticas de procesamiento proteolítico y predictores de determinantes antigénicos B y T, reveló el fragmento ³³EALEDAVLTGYSLFQK⁴⁸, que se traspone a dos secuencias, ³⁸AVLTGYSLFQKEKMLNEGTS⁵⁸ y ⁴²GYSLFQKEKMLNEGTS⁶¹, que han sido estudiadas y reportadas por su capacidad inmunogénica y estimuladora de linfocitos B en otros estudios (Cubillos et al., 2003; Daubenberger et al., 2002; Urquiza et al., 1996). Para el presente estudio, estos fragmentos se identificaron como **B1** (³⁸AVLTGYSLFQKEKMLNEGTS⁵⁸) y **B1.1** (⁴²GYSLFQKEKMLNEGTS⁶¹), debido a su potencial como epítopes **B**.

Con base en la secuencia primaria de los péptidos **B1** y **B1.1** se propusieron modificaciones sistemáticas tipo amida reducida (Ψ -[CH₂-NH]-), en enlaces peptídicos próximos y sobre el motivo ⁴⁸KEKMV⁵², reportado como fundamental en el papel biológico de la proteína MSP1 (Bannister et al, 2000)., con la finalidad de determinar el efecto de la modificación en enlaces peptídicos discretos, sobre las propiedades estructurales, antigénicas e

inmunogénicas del péptido modificado. Para ello se realizaron estudios de antigenicidad a través de métodos inmunoquímicos *Western blot* y ELISA (*in vitro*), y estudios de inmunogenicidad y capacidad protectora frente a un modelo de infección controlado en ratones BALB/c con dos cepas de malaria murina, *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17XL (*in vivo*).

Una vez introducidas estas modificaciones tipo amida reducida, se establecieron dos familias de péptidos análogos denominados **B1An1, B1An2, B1An3 y B1An4**, y **B1.1An1, B1.1An2, B1.1An3, B1.1An4 y B1.1An5**, y se administraron vía intraperitoneal (i.p.) en un esquema de inmunización de 4 dosis formuladas en adyuvante completo e incompleto de Freund, para un grupo de 4 animales por péptido. Una vez alcanzados títulos altos de anticuerpos anti-péptido o anti-análogos, cada grupo experimental se dividió en dos, para llevar a cabo el desafío experimental con cepas de malaria murina, *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL, en experimentos simultáneos.

Seguidamente se determinaron los perfiles de parasitemia y supervivencia para cada grupo de individuos donde la evidencia hallada, es estadísticamente diferente con respecto al grupo control para los animales inoculados con los péptidos y análogos **B1, B1.1, B1An2 y B1An4**, observando porcentajes de parasitemia superiores al 40 % de infección lo que demuestra la ventaja de los péptidos análogos con modificaciones tipo amida reducida sobre sus homólogos nativos.

Los sueros murinos obtenidos después del esquema de inmunización fueron retados con lisados de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, presentando bandas de reconocimiento característica a la proteína MSP1 a 195- 200 kDa, 75-90 kDa, 35-40 kDa y 40- 45 kDa, correlacionadas con las bandas de reconocimiento observadas en la reactividad de los sueros de personas de zonas endémicas de malaria en Colombia, provenientes de los municipios de san juan de nepomuceno - bolívar, tierralta - córdoba, nuquí - chocó y tumaco - nariño. Esto indica que los anticuerpos generados en el modelo murino, estimulados por las secuencias modificadas, reconocen bandas de proteínas de la cepa del *Plasmodium falciparum* que infecta humanos.

Estos hallazgos nos condujeron a proponer el desarrollo de un método de acoplamiento molecular (*in silico*), frente a sitios de unión a alelos de resistencia y sensibilidad a la infección por malaria del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-II), que permitiera identificar patrones de acoplamiento correlacionados con las observaciones

obtenidas en los experimentos de antigenicidad e inmunogenicidad, y relacionar cambios estructurales en el reconocimiento, acople y ajuste de análogos tipo amida reducida versus peptídicos nativos.

Palabras Clave: Proteína MSP1, *Plasmodium falciparum* 3D7, *Plasmodium berghei* ANKA, *Plasmodium yoelii* 17XL, Malaria, Modificación amida reducida, Acoplamiento molecular.

Abstract

Exploration of structural modifications of an MSP1 protein antigen from *Plasmodium* spp and their influence on its molecular recognition property by murine and human sera from people from post-conflict areas in Colombia

Studies carried out within the research framework of the molecular mimicry of infectious agents group, evaluated the reactivity of sera from endemic areas of Colombia (San Juan de Nepomuceno - Bolívar, Tierralta - Córdoba, Nuquí - Chocó and Tumaco - Nariño) (SIVIGILA, national institute of health, 2018), compared to lysates of two reference strains, 3D7 and FCB2 of *Plasmodium falciparum*, where recognition bands of the MSP1 protein were identified with relative mobilities of 195, 83, 42 and 38 kDa, which allowed the identification the reactivity of sera against the MSP1 precursor protein and its processing fragments, which validates the importance of this surface antigen with respect to its immunological role, profiling it as a target protein in the implementation of reduced amide type modifications, which promote and demonstrate effective protection of individuals exposed to natural infection.

The search for sequences of immunogenic relevance in the primary structure of the MSP1 protein, through bioinformatic tools of proteolytic processing and predictors of B and T antigenic determinants, revealed the fragment 33EALEDAVLTYGSLFQK48, which transposes to two sequences, 38AVLTYGSLFQKEKMLNEGTS58 and 42GYSLFQKEKMLNEGTS61, which They have been studied and reported for their immunogenic and B lymphocyte stimulating capacity in other studies (Cubillos et al., 2003; Daubenberger et al., 2002; Urquiza et al., 1996). For the present study, these fragments

were identified as B1 (38AVLTGYSLFQKEKMLNEGTS58) and B1.1 (42GYSLFQKEKMLNEGTS61), due to their potential as B epitopes.

Based on the primary sequence of the B1 and B1.1 peptides, systematic reduced amide type modifications (Ψ -[CH₂-NH]-) were proposed, in nearby peptide bonds and on the 48KEKLV52 motif, reported as fundamental in the biological role of the MSP1 protein (Bannister et al, 2000)., in order to determine the effect of the modification in discrete peptide bonds on the structural, antigenic and immunogenic properties of the modified peptide. For this, antigenicity studies were carried out through immunochemical Western blot and ELISA methods (in vitro), and studies of immunogenicity and protective capacity against a controlled infection model in BALB/c mice with two strains of murine malaria, *P. berghei*. ANKA and *P. yoelii* 17XL (in vivo).

Once these reduced amide modifications were introduced, two families of analogous peptides called B1An1, B1An2, B1An3 and B1An4, and B1.1An1, B1.1An2, B1.1An3, B1.1An4 and B1.1An5, were established and administered via intraperitoneal (i.p.) in an immunization scheme of 4 doses formulated in complete and incomplete Freund's adjuvant, for a group of 4 animals per peptide. Once high titers of anti-peptide or anti-analogue antibodies were achieved, each experimental group was divided into two, to carry out the experimental challenge with murine malaria strains, *Plasmodium berghei* ANKA and *Plasmodium yoelii* 17XL, in simultaneous experiments.

Next, the parasitemia and survival profiles were determined for each group of individuals where the evidence found is statistically different with respect to the control group for the animals inoculated with the peptides and analogues B1, B1.1, B1An2 and B1An4, observing percentages of parasitemia greater than 40% infection, which demonstrates the advantage of analogous peptides with reduced amide-type modifications over their native counterparts.

The murine sera obtained after the immunization scheme were challenged with lysates of *Plasmodium falciparum* strain 3D7, presenting characteristic recognition bands for the MSP1 protein at 195-200 kDa, 75-90 kDa, 35-40 kDa and 40-45 kDa, correlated. with the recognition bands observed in the reactivity of sera from people from malaria endemic areas in Colombia, coming from the municipalities of San Juan de Nepomuceno - Bolívar, Tierralta - Córdoba, Nuquí - Chocó and Tumaco - Nariño. This indicates that the antibodies generated in the murine model, stimulated by the modified sequences, recognize protein bands from the *Plasmodium falciparum* strain that infects humans.

These findings led us to propose the development of a molecular docking method (in silico), against binding sites to alleles of resistance and sensitivity to malaria infection of the major histocompatibility complex class II (HLA-II), which allowed identifying docking patterns correlated with the observations obtained in the antigenicity and immunogenicity experiments, and relating structural changes in the recognition, docking and adjustment of reduced amide type analogues versus native peptides.

Keywords: MSP1 protein, *Plasmodium falciparum* 3D7, *Plasmodium berghei* ANKA, *Plasmodium yoelii* 17XL, Malaria, Reduced amide modification, Molecular docking.

INDICES DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura del merozoíto de *Plasmodium* spp. Tomada y adaptada de (Bannister et al., 2000).

Figura 2. Representación esquemática del papel biológico de la proteína MSP1 en la invasión del glóbulo rojo.

Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Tomado y adaptado de (Maria Chara Karypidou; 2017).

Figura 4. Acoplamiento molecular entre un péptido derivado de malaria y el MHC clase II. Tomado de (Melo F. 2019).

Figura 5. Perfil de reactividad de anticuerpos de sueros de individuos de zonas endémicas de malaria en Colombia por proteínas de lisado de parásito de la cepa 3D7 y FCB2.

Figura 6. Reactividad de anticuerpos séricos de sueros humanos por *Western blot*.

Figura 7. Posibles sitios de corte por proteasas lisosomales para MSP1.

Figura 8. Posibles epítopes B (Color verde), según los cortes proteolíticos teóricos para la proteína MSP1. Servidor remoto ABCPred. Disponible en:<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/index.html>, (Saha et al., 2005).

Figura 9. Análisis bioinformático de la estructura primaria de los péptidos derivados de MSP1.

Figura 10. Síntesis de N-Fmoc-aminoaldehídos a partir de N-Fmoc-aminoácidos. Tomado y adaptado de: (Lozano JM et al., 2013)

Figura 11. Esquema de inmunización del modelo animal murino.

Figura 12. Perfil de parasitemia desarrollada por los animales inmunizados con antígenos nativos derivados de MSP1. Reto experimental con *P. berghei* ANKA.

Figura 13. Perfil de parasitemia desarrollada por los animales inmunizados con antígenos nativos derivados de MSP1. Reto experimental con *P. yoelii* 17XL.

Figura 14. Perfiles de supervivencia de ratones BALB/c inmunizados con péptidos nativos derivados de MSP1 de *Plasmodium* spp, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17 XL.

Figura 15. Perfil de parasitemia desarrollada por animales inmunizados con secuencias nativas vs análogos de la familia **B1** y **B1.1**, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA

Figura 16. Perfil de parasitemia desarrollada por animales inmunizados con secuencias nativas vs análogos de la familia **B1** y **B1.1**, retados con dosis letales de *P. yoelii* 17 XL

Figura 17. Perfiles de supervivencia para ratones BALB/c inmunizados con péptidos nativos derivados de MSP1 de *Plasmodium* spp y sus respectivos análogos, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17 XL.

Figura 18. Reactividad de anticuerpos séricos de ratones BALB/c inmunizados con epítopes modificados, frente a la cepa 3D7 por *Western blot*. Resultados comparativos pre inmune (banda izquierda) y post inmunización (banda derecha) para cada pareja.

Figura 19. Porcentaje de reconocimiento por pruebas ELISA de los sueros humanos.

Figura 20. Conformación tridimensional PepMSP-142-61: Presenta una conformación latamente helicoidal. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 12 puentes de hidrogeno intramoleculares.

Figura 21. Conformación tridimensional péptido PepMSP-142-61-Val52-Leu53: Presenta una conformación helicoidal hasta el aminoácido modificado (valina 11, reducida). la conformación posterior a este aminoácido adquiere conformación Beta. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 8 puentes de hidrogeno intramoleculares.

Figura 22. Conformación tridimensional péptido PepMSP-142-61-Met51-Val52: Presenta una conformación helicoidal hasta el aminoácido modificado (metionina 10, reducida), la conformación posterior a este aminoácido adquiere conformación Beta. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 8 puentes de hidrogeno intramoleculares.

Figura 23. interacciones sHLA-B1.1-TCR y rHLA-B1.1-TCR, péptido nativo B1.1 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul

Figura 24. interacciones sHLA-B1.1 An1-TCR y rHLA-B1.1 An1-TCR, péptido nativo B1.1 An1 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul

Figura 25. interacciones sHLA-B1.1 An2-TCR y rHLA-B1.1 An2-TCR, péptido nativo B1.1 An2 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul

Figura 26. Representación gráfica de la interacción; a) HLA clase II de sensibilidad - péptido **B1.1**; b) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1**; c) HLA clase II de sensibilidad - péptido **B1.1 An1**; d) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1 An1**; e) HLA clase II de sensibilidad, péptido **B1.1 An2**; f) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1 An2**.

Figura 27. Representación gráfica de la interacción; a) sHLA-MSP1⁴²⁻⁶¹-TCR; b) rHLA-MSP1⁴²⁻⁶¹-TCR; c) sHLA-MSP1⁵²⁻⁵³-TCR (**B1.1 An1**); d) rHLA-MSP1⁵²⁻⁵³-TCR (**B1.1 An1**); e) sHLA-MSP1⁵¹⁻⁵²-TCR (**B1.1 An2**); f) rHLA-MSP1⁵¹⁻⁵²-TCR (**B1.1 An2**)

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales y porcentaje de muestras de sueros por zona de procedencia empleada como insumo para el proyecto. Elaboración y construcción; grupo de investigación de mimetismo moléculas de los agentes infecciosos.

Tabla 2. Porcentaje (%) de identidad de secuencias completas de cepas de malaria murina con respecto a la cepa 3D7 de *P. falciparum*.

Tabla 3. Secuencias peptídicas propuestas derivadas de la proteína MSP1 tras estudio bioinformático y comparación con la literatura.

Tabla 4. Análogos diseñados a partir de los péptidos nativos **B1** y **B1.1** derivados de la Proteína MSP1. Tomada grupo de investigación

Tabla 5. Análisis general del perfil de protección y supervivencia de antígenos derivados de MSP1, frente al reto experimental. ^a Datos procesados en Graph Pad Prism 8.0.2. Análisis pareado todas las lecturas por grupo Pre-I vs Post 4ta. ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < .001^{***}$; $p < .0001^{****}$).

Tabla 6. Perfil de estimulación de citoquinas estimuladas por inmunización con péptidos nativos y análogos

Tabla 7. Especificaciones equipo empleado en estudio

Tabla 8. Bolsillos fundamentales en la activación del receptor HLA clase II y los correspondientes aminoácidos que los conforman (W.A Agudelo, 2010).

INDICE ANEXOS

Anexo 1: Aval ético

Anexo 2: Consentimiento informado

Anexo 3: Experimentos in vitro

Anexo 4. Resultados experimentos Western Blot

Anexo 5. Alineamiento de secuencias

Anexo 6. Predicción corte de catepsinas.

Anexo 7. Posición en la secuencia de posibles epítopes B.

Anexo 8. Interacciones estudio *in silico*

1.Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por el parásito del género *Plasmodium*, el cual ha sido uno de los microorganismos más estudiados en las últimas décadas, debido al gran impacto que ha tenido en el ámbito de salud pública a nivel mundial desde su origen y primeros casos documentados. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un estimado de 247 millones de casos ocurrieron en diferentes continentes en el 2021 (OMS, 2023), lo que sugiere un impacto económico y de salud de proporciones incalculables que afecta directamente el bienestar y el desarrollo en general de las poblaciones de zonas endémicas (Sachs & Malaney, 2002).

En la actualidad la búsqueda de nuevos tratamientos con mayor efectividad y protección en el tiempo se ha enfocado en diferentes plataformas tecnológicas, como ARN mensajero, vacunas de tipo recombinante e incluso nuevos medicamentos basados en derivados provenientes de fuentes naturales como la Artemisinina (Youyou, 2011). Así mismo, se reportan numerosos estudios dirigidos a la búsqueda de vacunas que logren una protección efectiva en zonas endémicas para prevenir o atenuar la sintomatología, y disminuir la mortalidad por dicho parásito.

La vacunación se ha considerado una de las estrategias de prevención con mayor efectividad para enfermedades causadas por agentes infecciosos. A través de la instauración en los sistemas de salud pública, un buen número de enfermedades virales han sido erradicadas a nivel mundial, como la viruela y la poliomielitis (Bonanni, 1999).

En las infecciones por *Plasmodium* spp se pueden definir varios y posibles blancos de interés, atendiendo al ciclo de vida del parásito; los estadios pre eritrocíticos, los estadios sanguíneos y los estadios sexuales, con la finalidad de prevenir la infección a través de respuestas inmunitarias mediadas por células, reducción de morbilidad de las etapas eritrocíticas asexuales mediante la reducción de la multiplicación del patógeno y la reducción y prevención de la transmisión por el vector (Hoffman et al., 2015).

Tras la evidencia de protección en un 90 % de voluntarios humanos por inmunización con esporozoítos irradiados (Egan et al., 1993; Hoffman et al., 2002), la transferencia pasiva de inmunoglobulinas como inmunización pasiva en humanos (Sabchareon et al., 1991) y la inmunidad adquirida específicamente en las poblaciones de áreas endémicas (Baird, 1998) han demostrado que la inmunidad frente a infecciones del parásito es posible, y se deben concentrar los esfuerzos en alcanzar un prospecto de vacuna con una efectividad superior al 80 %.

A pesar de los múltiples esfuerzos para desarrollar vacunas para las infecciones por *Plasmodium* spp, no existen en la actualidad investigaciones y desarrollos con plena efectividad y protección para uso en humanos. Lo que se relaciona con los complejos ciclos de vida y las variaciones genéticas, que les permite evadir la respuesta inmune del hospedero (Hoffman et al., 2015).

El avance más representativo en el campo de inmunidad frente infecciones por *Plasmodium* spp, está relacionado con la vacuna RTS,S/AS01E, una vacuna de origen recombinante dirigida contra antígenos en estadios sanguíneos, que contiene específicamente un epítotope B inmunodominante (región repetitiva NANP) de la proteína del circumesporozoíto (CSP), un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y es formulada en un adyuvante a base de liposomas (AS01), la cual fue aprobada recientemente por la OMS para su uso en niños africanos tras ser evaluada en un ensayo clínico aleatorizado y controlado de fase III (OMS, 2021). Se les atribuye actividad protectora a los anticuerpos del isotipo IgG inducidos con la vacunación, en niveles relacionados significativamente con su efectividad (Dobaño et al., 2019).

Otro enfoque empleado ha sido el desarrollo de vacunas de origen sintético, que hacia los años 80 dio paso al candidato denominado SPf66 (Patarroyo, ME, et al., 1987) con el cual se obtuvo protección en el modelo animal del mono *Aotus* y en voluntarios humanos (Acosta et al., 1999; D'Alessandro et al., 1995). Dichas investigaciones generaron conocimiento que

permitió estudiar regiones de alta afinidad de unión a células blanco, lo cual permitió desarrollar una metodología racional para el reconocimiento y selección de regiones no polimórficas de antígenos, proponiendo modificaciones sobre los mismos para generar motivos inmunológicos relevantes (Patarroyo, ME et al, 2011). Los antígenos identificados una vez modificados de manera sitio dirigida han evidenciado un efecto diferencial respecto a secuencias nativas, al ser administrados en esquemas de vacunación específicos en modelos animales (Lozano, JM et al., 2004; Lozano, JM et al, 2006).

El grupo de investigación de mimetismo molecular de los agentes infecciosos, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, ha desarrollado sistemas de antígenos modificados estructuralmente denominados análogos, que se diferencian de los péptidos “nativos” normales, al incluir modificaciones no naturales, tales como sustituciones quirales y/o de enlaces peptídicos, dirigidas a modificar la estructura tridimensional del antígeno, con el objetivo de modificar el reconocimiento molecular en la sinapsis inmunológica. Además, se ha evidenciado que estas modificaciones realizadas de manera sitio dirigida tienen la capacidad de superar las limitaciones propias de los antígenos nativos (Lozano, JM., 2016).

2. Justificación y planteamiento del problema

La Malaria o Paludismo es una enfermedad cuyo perfil de morbimortalidad sigue siendo alarmante en salud pública, alcanzando un estimado de 247 millones de casos y 619000 muertes en diferentes continentes en el 2021 (OMS, 2023), especialmente afectando a las poblaciones de zonas tropicales y subtropicales del mundo, asociadas con la pobreza.

En la actualidad las estrategias terapéuticas e inmunoproliféricas no han logrado reunir las suficientes herramientas para el control epidemiológico y control de esta enfermedad. Sumado a esto, tanto el vector de transmisión (mosquito *Anopheles* spp) como el patógeno mismo (*Plasmodium* spp) han evolucionado, creando resistencia a los insecticidas y a los tratamientos antimaláricos de última generación, usados bajo prescripción médica.

De esta manera, la búsqueda de nuevas plataformas tecnológicas y estrategias moleculares que permitan el control y neutralización de algunos mecanismos de infección desarrollados por *Plasmodium* spp para infectar un vertebrado superior, continúa siendo un problema sin una solución satisfactoria y definitiva.

Por consiguiente, este proyecto pretende relacionar datos *in vitro* e *in vivo* de relevancia, obtenidos por el grupo de investigación de mimetismo molecular de los agentes infecciosos, tras el estudio de las modificaciones de péptidos derivados de la proteína MSP1 (Proteína de Superficie de Merozoito – 1) y su capacidad de reconocimiento de componentes del sistema inmune humoral de individuos provenientes de zonas endémicas de malaria en Colombia (san juan de nepomuceno - bolívar, tierralta - córdoba, nuquí - chocó y tumaco -

nariño), y así determinar la relevancia a nivel molecular, de las modificaciones tipo amida reducida, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas de acoplamiento molecular para dilucidar posibles patrones de unión en la sinapsis inmunológica.

3. Hipótesis

La modificación de elementos estructurales en antígenos nativos derivados de la proteína MSP1 de *Plasmodium* spp., es capaz de modular su reconocimiento antigénico, permitiendo identificar epítopes cuya actividad funcional pueda dirigirse a la neutralización del parásito en el proceso de infección.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar por metodologías inmunoquímicas los patrones de reconocimiento antigénico de antígenos nativos y modificados derivados de la proteína MSP1 de *Plasmodium* spp y acercamiento a estudios computacionales de interacción antígeno-receptores de histocompatibilidad.

4.2. Objetivos específicos

Evaluar la reactividad de sueros murinos y humanos provenientes de zonas posconflicto colombianas frente a los péptidos modificados en contraste con sus correspondientes péptidos nativos derivados de la proteína MSP1.

Realizar el estudio de acoplamiento molecular *in silico* de péptidos antigénicos derivados de la proteína MSP1, y obtener una aproximación teórica del acoplamiento del péptido nativo y del modificado con alelos discretos de HLA humano.

5. Marco teórico

El paludismo o malaria es una enfermedad con un potencial de mortalidad incrementado principalmente en los países tropicales en vía de desarrollo o pobreza extrema. Según la OMS se trata de una enfermedad prevenible y curable, con un diagnóstico rápido y un tratamiento efectivo, puede evitarse la muerte (OMS 2023).

La enfermedad es transmitida por la picadura de mosquitos del género *Anopheles* hembra. A la fecha cinco especies de parásitos son consideradas de importancia por infectar al ser humano; *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. falciparum*, siendo las más peligrosas y mortales *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* (OMS, 2017).

Plasmodium spp pertenece al *filum apicomplexa*, su principal característica es la presencia de organelos adaptados y especializados al proceso de invasión. Se ubican en el extremo denominado apical, donde se expresan proteínas que permiten la unión a ciertos elementos de la membrana de la célula hospedera, participando en el reconocimiento e internalización del parásito, asociándose a la supervivencia y la capacidad de transmisión de la infección.

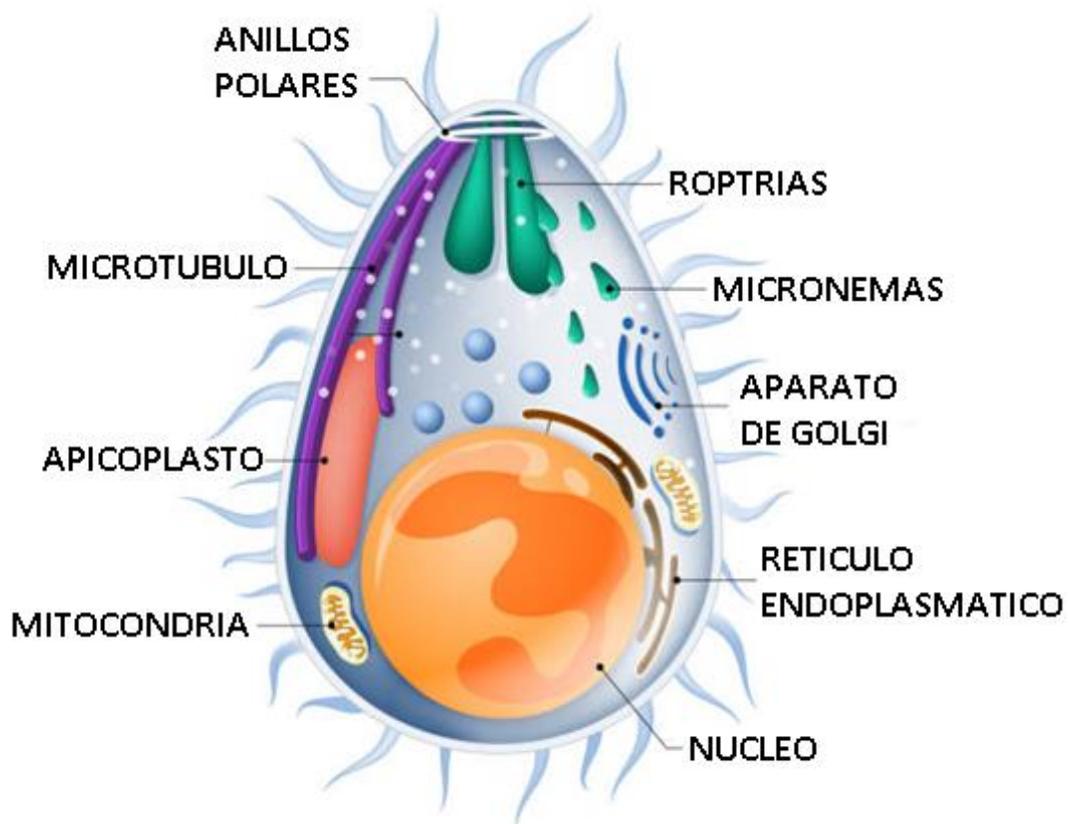
Estudios de microscopía electrónica han mostrado la compleja y sofisticada estructura de los organelos apicales de *Plasmodium* spp como las roptrias, los micronemas y los gránulos densos, que en conjunto descargan su contenido durante el proceso de invasión, cambiando la forma y la composición de la membrana del glóbulo rojo invadido, formando la vacuola parasitófora, permitiendo la adquisición de nutrientes y secreción de proteínas derivadas del parásito (Bannister et al, 2000).

En la figura 1 se ilustra la compleja maquinaria del merozoito, donde se evidencia las roptrias como dos bolsas en forma de pera, que confluyen en el extremo plano del extremo apical. También se muestran, las micronemas las cuales son estructuras mucho más pequeñas y alargadas, y se ubican alrededor de las roptrias, con su contenido granular característico (Bannister et al., 2000).

El ciclo de vida de *Plasmodium* spp pasa por diferentes estadios donde el esporozoito juega un papel central en el ciclo de vida del parásito (Coppi et al., 2011). Gracias a la actividad motora del complejo actina - miosina en su extremo apical, que les permite penetrar en la dermis (del inglés gliding motility) (Mota & Rodriguez, 2001), entrar a la circulación y llegar al parénquima hepático, proceso que tarda aproximadamente entre 5 y 30 minutos (Mishra

et al., 2012). Algunas investigaciones han sugerido que las células de Kupffer, son una principal vía de paso (Ishino et al., 2004), al asociarse a la capacidad fagocítica de dichas células, facilitando el transporte del esporozoito (Pradel & Frevet, 2001). En el hígado se desarrolla el esquizonte que libera entre 10.000 y 30.000 merozoítos al torrente sanguíneo durante un período de 8 a 12 días dependiendo de la especie del parásito.

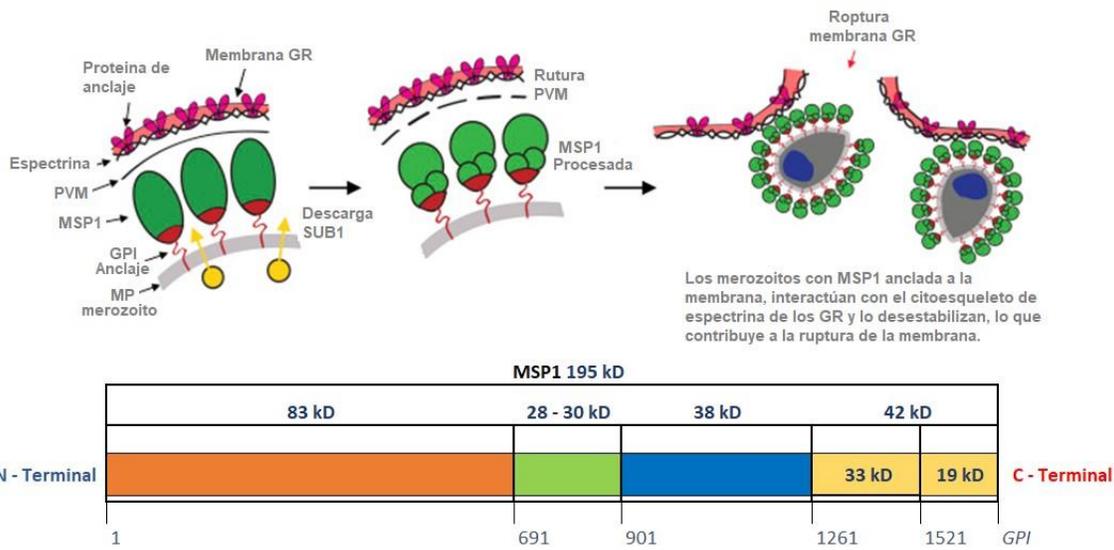
Figura 1. Representación esquemática de la estructura del merozoíto de *Plasmodium* spp. Tomada y adaptada de (Bannister et al., 2000).



Las roptrias son dos bolsas en forma de pera de unos 550 nm de longitud y 250 nm de diámetro en el punto más ancho que confluyen en el extremo plano de la prominencia apical, Por su parte los micronemas son estructuras mucho más pequeñas (120 nm de longitud) y alargadas, se ubican agrupadas alrededor de las roptrias. Los gránulos densos, (hasta 20 dependiendo de la especie del parásito) son estructuras redondeadas presentes en todas las partes del citoplasma de aproximadamente 80 nm de diámetro, (Bannister *et al.*, 2000).

En los estadios sanguíneos, los merozoítos invaden a los glóbulos rojos tras una serie de interacciones con proteínas de la membrana de las células del hospedero, donde es clave la proteína MSP1 (Gerold *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1998), la cual facilita el reconocimiento e interacción con la célula blanco donde se distinguen etapas de interacción, reorientación, unión irreversible, e invasión (Beeson *et al.*, 2016; O'Donnell & Blackman, 2005). Dentro del glóbulo rojo, el parásito toma una forma anillada conocida como trofozoíto joven y posteriormente adquiere una configuración ameboide o en banda, según la especie de *Plasmodium*, denominada trofozoíto maduro. La fragmentación de la proteína MSP1 es clave para la actividad biológica, ya que permite exponer motivos de unión a la membrana del glóbulo rojo como se muestra en el mecanismo de la figura 2. Sus fragmentos característicos son 5; uno de 83 kD, dos de 30 y 38 kD y dos fragmentos de 33 y 19 kD, que se forman a través de un precursor de 42 kD.

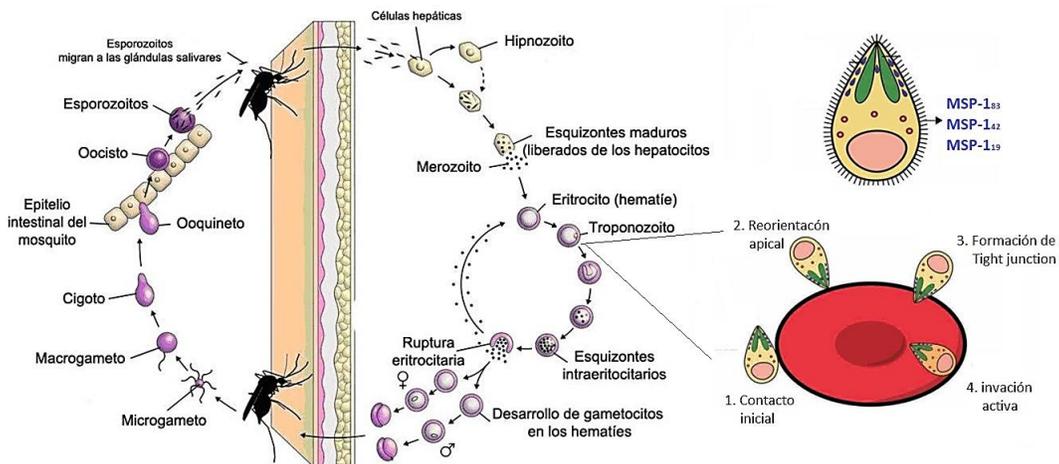
Figura 2. Representación esquemática del papel biológico de la proteína MSP1 en la invasión del glóbulo rojo. Tomado y adaptado de (Cowman *et al.*, 2016).



Posteriormente, en cada glóbulo rojo se produce la esquizogonia que da lugar a la formación de 4 a 36 merozoítos cada 48 a 72 horas. Este estadio es considerado de gran importancia a nivel inmunológico, ya que se expone a las células de sistema inmune circundantes en sangre, cuando es liberado al torrente sanguíneo, justo antes de invadir otros eritrocitos. Los eventos llevados a cabo durante el proceso de invasión de este microorganismo a sus células blanco parecen ser muy similares para todas las especies del *Plasmodium* (Cowman et al., 2016).

En la figura 3 se esquematiza el ciclo de vida de *Plasmodium* spp, donde se evidencia la importancia de comprender la dinámica de infección del parásito en el diseño de tratamientos inmunológicos, con potencial de bloqueo o respuesta inmune del parásito, en el ciclo intra eritrocitario (Maria Chara Karypidou; 2017).

Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Tomado y adaptado de (Maria Chara Karypidou; 2017).



La malaria se encuentra distribuida en regiones tropicales del continente africano, asiático y americano. Tras el análisis de la información de los casos registrados a lo largo del tiempo se han logrado establecer importantes zonas con alto riesgo epidemiológico, lo que pone de manifiesto, que cerca de la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer esta enfermedad. En el año 2021 se registraron cerca de 247 millones de casos de la enfermedad, que costaron la vida de casi 619.000 personas, lo cual es considerado un impacto en salud pública en las zonas afectadas (OMS, 2023).

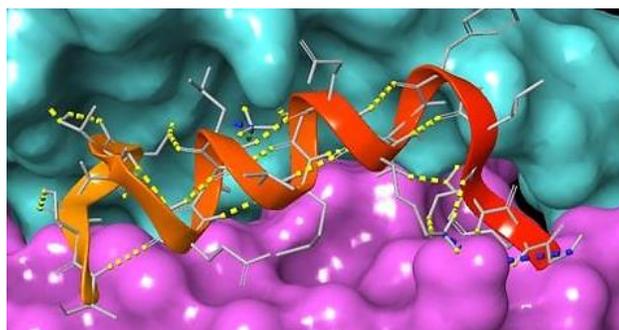
Según la OMS el 95 % de la mortalidad por malaria en el mundo está distribuido en 31 países; Nigeria (23 %), República Democrática del Congo (11 %), la República Unida de Tanzania (5 %), Mozambique (4 %), Níger (4 %) y Burkina Faso (4 %). En cuanto América latina, Brasil, Colombia y Venezuela representan más del 86 % de todos los casos de la región de las Américas (OMS, 2020), indicando la grave problemática de esta enfermedad en la región.

Las condiciones climáticas y geográficas colombianas constituyen ambientes propicios para la transmisión de la malaria. Aproximadamente 85 % del territorio rural está situado por debajo de 1.500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), ocasionando que poco más del 60 % de la población se encuentre en riesgo de enfermar o morir a causa de infecciones por *P. falciparum*. En Colombia, según el boletín epidemiológico semanal de la dirección de vigilancia y análisis del riesgo en salud pública del instituto nacional de salud (INS., 2023), hasta la semana epidemiológica 22 de 2023, se notificaron 32778 casos de malaria no complicada y 779 de malaria complicada.

En las últimas décadas el avance tecnológico ha permitido desarrollar nuevas estrategias computacionales para predecir o determinar el comportamiento molecular de diferentes medicamentos o moléculas de interés. A su vez este avance, ha traído consigo desafíos técnicos y computacionales en el desarrollo de herramientas que puedan predecir con efectividad y precisión el complejo ambiente químico y celular, en el reconocimiento proteico ligando-receptor (S. Y. Macalino, 2012).

El acoplamiento computacional, también llamado “*Docking Molecular*” in silico, tiene como objetivo predecir la orientación óptima de unión, de interacciones moleculares tipo ligando – proteína, péptido – proteína y proteína – proteína, con la finalidad de establecer la estabilidad, afinidad y estructura tridimensional de un complejo. (S. Y. Macalino, 2012) El acoplamiento molecular es un campo del modelado molecular, que consiste en la predicción y estudio de la orientación de un ligando y un receptor que interactúan entre sí. Es decir, es el estudio de como dos o más estructuras moleculares se relacionan a través de interacciones intramoleculares. Por ejemplo, interacciones entre sustrato-enzima, antígeno-anticuerpo, molécula-transportador, molécula señalizadora-receptor, etc (M. Kurcinski 2018). Esto permite determinar patrones moleculares de unión o anclaje y que motivos son clave en la inducción de una respuesta inmune, como se puede observar en la figura 4, un modelo de acoplamiento entre un péptido derivado de malaria y el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) (Melo F. 2019).

Figura 4. Acoplamiento molecular entre un péptido derivado de malaria y el MHC clase II. Tomado de (Melo F. 2019).



Los softwares empleados en el acoplamiento molecular están compuestos por cuatro componentes básicos clasificados así:

- 1- Representación molecular: componente que representa las estructuras y propiedades tanto de ligando como del receptor (átomos, superficies, cuadrícula de representación espacial, enlaces, etc.).
- 2- Método de puntuación: método que evalúa la calidad del acoplamiento en cada predicción, y proporciona un puntaje de “calificación” a cada una de las soluciones según; campo de fuerza, enfoque basado en el conocimiento, etc., teniendo en cuenta tres factores claves de estabilidad molecular; Las energías de interacción entre el par ligando-receptor, energías de solvatación-desolvatación del par ligando-receptor, y factores entrópicos que se dan después de la unión.
- 3- Energías de interacción: interacciones electrostáticas, interacciones de puente de hidrogeno, interacciones de van der waals y fuerzas hidrofóbicas.
- 4- Energías de desolvatación: cadenas de eventos mediados termodinámicamente, que conduce a la formación de interacciones favorables entre el par ligando-receptor donde los contactos hidrofóbicos son las fuerzas impulsoras (residuos hidrófobos asociados para reducir la interacciones con el agua circundante e interacciones electrostáticas entre átomos cargados y moléculas de agua).

Antes de iniciar cualquier proceso de acoplamiento se deben tener en cuenta preparaciones y alistamientos de las estructuras que se emplearán en el estudio, principalmente para las moléculas de carácter proteico, ya sea de tipo ligando o receptor. (D. Masonea, 2014) Generalmente este proceso consiste en identificar y definir correctamente, aminoácidos no esenciales, formas tautoméricas, estados de protonación según el pH al que se simulara el estudio, adición o eliminación de moléculas de agua, puentes intramoleculares, remoción de iones, definición de isómeros, asignación de propiedades de estado conformacional, cargar atómicas, etc. (G. Özcan, 2016).

6. Muestras de sueros de individuos provenientes de zonas endémicas de malaria en Colombia

Dentro de las actividades del grupo de investigación, se realizó un trabajo conjunto y articulado con diferentes entidades y grupos de investigación cooperadores para la construcción de una seroteca disponible para investigaciones futuras, y de esta manera ser usada como insumo y punto de comparación en experimentos funcionales del presente proyecto. A continuación, se presenta el origen de cada uno de los sueros y las respectivas entidades colaboradoras junto con los criterios de inclusión y selección de las muestras.

Se destaca la valiosa colaboración del Grupo Biología Celular e Inmunidad de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá - Dpto. de Farmacia / Facultad de Medicina, bajo la dirección de la Doctora Angela Patricia Rojas (muestras tomadas del municipio de San Juan de Nepomuceno, departamento de Bolívar).

El Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas (GIMBIC) de la Universidad de Córdoba – Montería, con el apoyo de la Doctora María Fernanda Yasnot Acosta (muestras del municipio de Tierralta, departamento de Córdoba).

La Caja de Compensación Familiar del Chocó de Nuquí – Chocó - Confachocó IPS - Doctora Luz Stella Marín Waldo (muestras provenientes del municipio de Niquí, departamento de Chocó). Así mismo se resalta el apoyo del Ingeniero José Edilberto Rincón de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Tumaco (muestras del municipio de Tumaco, departamento de Nariño).

Como grupo control del experimento, se colectaron muestras de sangre y sus correspondientes plasmas de voluntarios bajo consentimiento informado en la ciudad de Bogotá, DC.

Se procedió con los trámites pertinentes para la consecución y obtención de muestras de sueros de personas provenientes de zonas endémicas de paludismo en Colombia, y se establecieron los siguientes criterios de inclusión para construir el banco de muestras.

- Individuos voluntarios de todas las edades y géneros, con diagnóstico positivo para

infección específicamente por *Plasmodium falciparum*, con soporte de historia clínica, libres de enfermedades transmisibles (VIH, hepatitis B, hepatitis C).

- Como sueros control se emplearon muestras de individuos habitantes permanentes de la ciudad de Bogotá, sin antecedentes de malaria y que nunca hayan residido en zonas endémicas de malaria en el país.

En la tabla 1, se muestra el total de sueros y el porcentaje por locación y las características geográficas de cada zona, los cuales son catalogados como zonas endémicas del país con endemidad histórica dada la alta prevalencia de infecciones (instituto nacional de salud, 2023).

Tabla 1. Características generales y porcentaje de muestras de sueros por zona de procedencia empleada como insumo para el proyecto. Elaboración y construcción; grupo de investigación de mimetismo moléculas de los agentes infecciosos.

Locación	N° de muestras	Origen	Prevalencia
Tumaco (Nariño)	8	Universidad Nacional de Colombia - Sede Tumaco	ALTA
Tierralta (Córdoba)	91	El Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas (GIMBIC) de la Universidad de Córdoba – Montería	ALTA
Nuquí (Chocó)	67	La Caja de Compensación Familiar del Chocó de Nuquí – Chocó - Confachocó IPS	ALTA
San Juan de Nepomuceno (Bolívar)	72	Grupo Biología Celular e Inmunidad de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá - Dpto. de Farmacia / Facultad de Medicina	BAJA
Bogotá	13	Voluntarios residentes de la ciudad de Bogotá D.C.	N/A

Consolidación de una seroteca con 238 muestras, provenientes de zonas endémicas de malaria en Colombia, en los departamentos de Bolívar, Córdoba, Nariño y Chocó, y 13 sueros de Bogotá empleados como control negativo, para un total de 251 muestras.

La solicitud del aval ético se tramitó previo a la recolección de muestras remitiendo la respectiva copia de la propuesta, al comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, de quien se recibió respuesta en el mes de noviembre del año 2017 con concepto de Avalado. (ver ANEXO 1)

En todos los casos la toma de muestras se realizó con el debido consentimiento informado, en el cual el donante autoriza el uso de la información para fines investigativos. El formato de consentimiento informado se dispone para su consulta en el ANEXO 2.

Para cada individuo se tomó una muestra de 10 mL de sangre venosa en tubo al vacío con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas al laboratorio según la normativa contemplada en la guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas de la OMS (OMS 2015), para posteriormente ser procesadas y finalmente almacenadas a – 20 °C hasta su respectivo uso.

6.1. Cultivo de cepas y obtención de membranas de *Plasmodium falciparum* 3D7 y FCB2

La cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*, mantenida en cultivo continuo fue amablemente donada por el grupo de investigación de Malaria de la Universidad de Antioquia - Colombia, por colaboración de la Doctora Adriana Lucia Pabón Vidal. Fue transportada en tanque de nitrógeno líquido, manteniendo las condiciones de criopreservación a lo largo del transporte. Por otro lado, la cepa FCB2, fue donada al grupo de investigación dirigido por la profesora Gladys Thalia Cortes Cantín, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Bajo el protocolo establecido por Trager y Jensen., 1976, adaptado en nuestro grupo tal como se describe en (Lozano et al., 2013), se realizó cultivo continuo de las cepas de *Plasmodium falciparum*, en medio de cultivo RPMI 1640, con L-glutamina, 50 mg/L de hipoxantina, 25 mM HEPES, 40 µg/mL de gentamicina, 2 g/L de glucosa, 5% p/v NaHCO₃, suplementado con suero humano al 10 % de tipo A+.

El suero humano empleado fue obtenido a partir de bolsas de plasma amablemente donadas por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), bajo la dirección del Doctor Bernardo Camacho. Las cuales una vez transportadas al laboratorio manteniendo la cadena de frío, fueron procesadas para la inactivación del sistema de complemento, calentando el suero en baño de maría a 56 °C por 30 minutos, seguido de un ciclo de centrifugación a 300 gravedades por 20 minutos. El sobrenadante se colectó en tubos limpios y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Los glóbulos rojos sanos empleados para el mantenimiento de las cepas, fueron tomados por venopunción a donantes voluntarios sanos grupo sanguíneo O, Rh+, que autorizaron su uso con consentimiento informado. Los eritrocitos se separaron del plasma y los glóbulos blancos, por ciclos de centrifugación a 800 graveades por 5 minutos, se lavaron tres veces

con RPMI 1640 más NaHCO₃ al 5 % p/v, y fueron suministrados al cultivo para mantener nivel de hematocrito.

Los parásitos parcialmente sincronizados con sorbitol (Lambros & Vanderberg, 1979), se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar niveles de parasitemia que fluctuaron entre el 5 y 10 %, para ser usados como fuente de antígeno para posteriores inmunoensayos. A partir de protocolos establecidos por el grupo de investigación, basados en (Arlett & Spielmann, 2014), volúmenes de cultivo continuo *Plasmodium falciparum*, fueron sometidos a un proceso de lisis con el objeto hacer fraccionamiento subcelular para aislar membranas y contenido citosólico.

6.2. Ensayos inmunoquímicos *Western blot* con sueros humanos.

Se llevó a cabo según los protocolos del grupo de investigación como se describe en (Lozano, JM., 2011). Brevemente, para resolver las proteínas del lisado de membranas de esquizontes de *P. falciparum*, se empleó montaje tipo preparativo de SDS-PAGE, usando geles del 10 % de acrilamida-bisacrilamida con dimensiones de 6 x 8 cm. Se utilizó como referencia estándar el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, Catalog #161-0375, BIORAD. Se aplicó por gel una concentración aproximada de 100 µg de proteína, con corrida electroforética a 80 V por un tiempo 2 horas.

Las proteínas resueltas fueron electro transferidas sobre membranas de nitrocelulosa Trans-Blot® (0,45 µm) Catalogo 162-0115, en cámara húmeda a 100 voltios constantes durante 1 hora, con una solución transferencia compuesta por Tris 48 mM - Glicina 39 mM - 0,037 % SDS - metanol al 20 %. La eficiencia de la transferencia fue monitoreada por tinción con Rojo de Ponceau 0.02 % en agua (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, U.S.A). Finalizada la transferencia se bloquearon los sitios de unión inespecífica con una solución de leche descremada al 5 % p/v en buffer PBS-Tween 20 - 0,05 % por una hora a temperatura ambiente y se cortaron tiras de 5 mm por cada muestra a analizar. Las membranas con las proteínas transferidas se incubaron a 4 °C durante la noche con una dilución 1:200 de los sueros de los pacientes (provenientes de individuos de zonas endémicas).

Después de remover el exceso de inmunoglobulinas por cinco lavados sucesivos con solución PBS-Tween 20 - 0,05 %, las membranas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-IgG de humanos acoplado a

peroxidasa de rábano (HRP - Horseradish Peroxidase) y/o fosfatasa alcalina en dilución 1:5000 para posterior revelado según instrucciones del fabricante Vector®, Peroxidase (HRP), Substrate Kit SK-4600 / BCIP/NBT Substrate Kit SK 5400. El desarrollo del color fue detenido con agua. Se empleó como control negativo, muestras de suero de individuos provenientes de zonas no endémicas de paludismo, específicamente de Bogotá, cuidadosamente seleccionados atendiendo a los antecedentes parasitológicos, epidemiológicos e inmunológicos de los donantes.

En los proyectos del grupo de investigación, se evaluaron un total de 238 sueros de las cuatro zonas del país consideradas endémicas de malaria en Colombia (san juan de nepomuceno - bolívar, tierralta - córdoba, nuquí - chocó y tumaco - nariño) y 13 muestras de sueros control (bogotá). Como criterio cualitativo de positividad de reconocimiento se tuvo en cuenta la intensidad y resolución de las bandas. En las Figuras 5 y 6 se presenta el resumen de los resultados de los experimentos de *Western blot* respecto a las cepas 3D7 y FCB2, se destaca el comportamiento de los sueros de individuos de nuquí, tierralta y tumaco cuyos porcentajes de reconocimiento son cercanos y/o superiores al 80 %, lo que refleja la epidemiología de la zona frente a este tipo de infecciones.

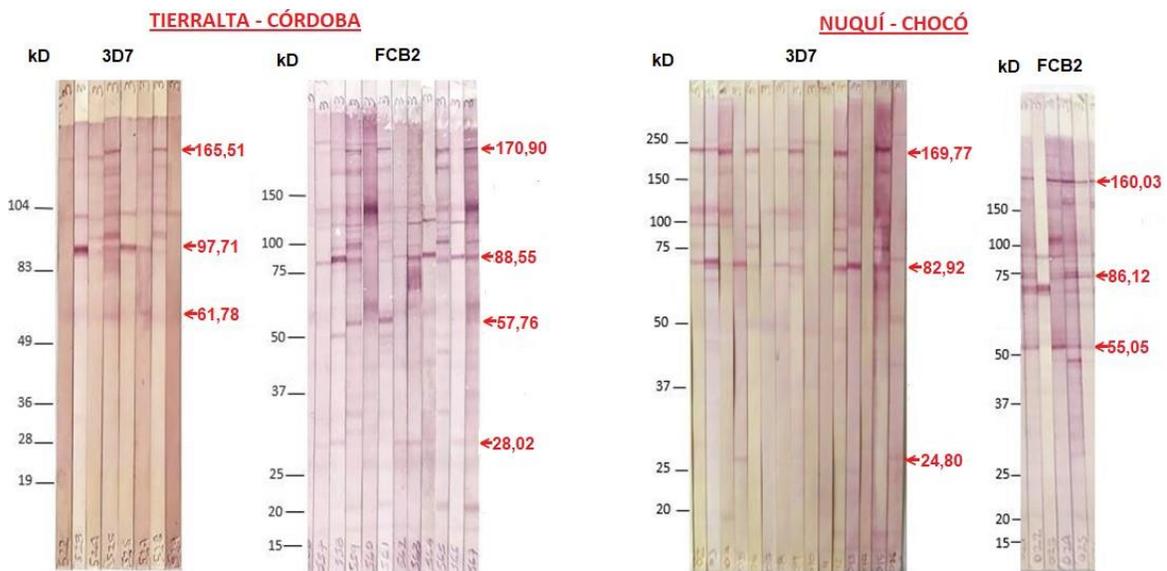
Los resultados expuestos en la figura 5, evidencia un claro reconocimiento de antígenos presente en el lisado de *P. falciparum*, indicando que los sueros humanos provenientes de zonas endémicas de malaria en Colombia presentan un reconocimiento antígeno-anticuerpo frente a las proteínas del parásito, bajo las condiciones de inmunoensayos de *Western blot*. Un punto por resaltar en los resultados experimentales es la presencia de bandas claramente definidas alrededor de 83.9 kDa, 30.16 kDa, 38 kDa, y entre 150 a 250 kDa, indicando la posible presencia de una respuesta humoral frente a la proteína MSP1 y sus fragmentos, según el procesamiento proteolítico reportado en la literatura (Lozano, JM., 2003).

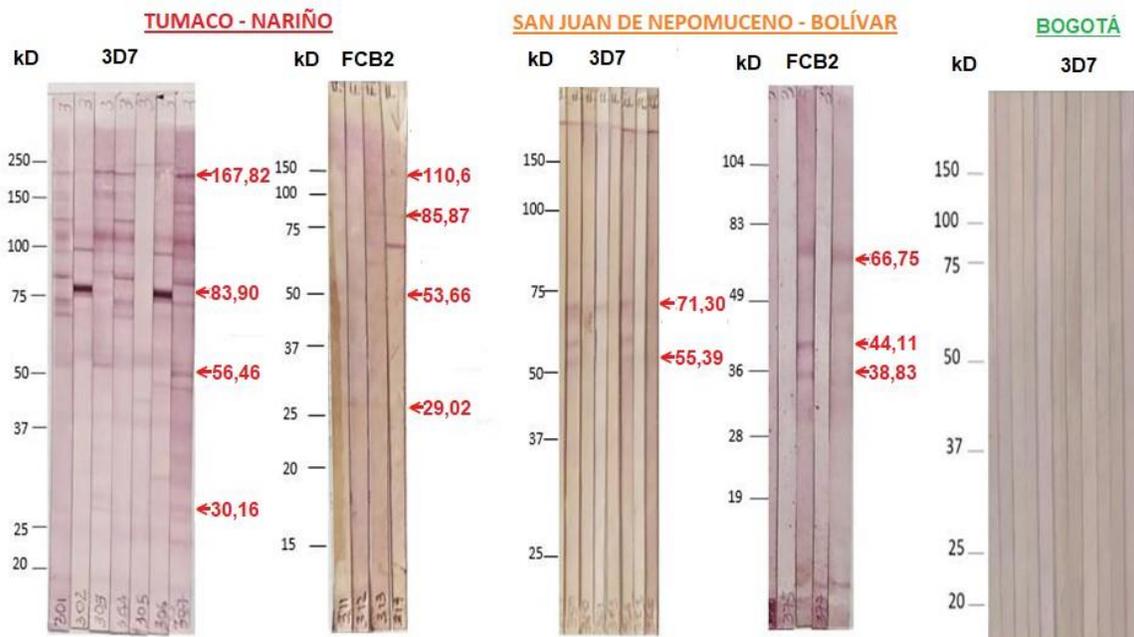
Las flechas en color rojo indican las bandas de reconocimiento correspondiente a la proteína MSP1 y sus fragmentos, indicando que los anticuerpos contenidos en los sueros de personas expuestas y sensibilizadas a la infección del parásito, presentan una respuesta humoral clara y evidente frente al lisado de las cepas 3D7 y FCB2. Esto confirma que las personas expuestas a infecciones reiteradas desarrollan una respuesta inmune efectiva que les permite controlar y manejar la infección, en contraste con los individuos de Bogotá que no presentaron ningún reconocimiento.

Otro punto que resaltar es la poca intensidad de las bandas presentes en el inmunoensayo desarrollado para los sueros de San Juan de nepomuceno - Bolívar, dando indicios de ser una zona con baja o nula endemidad en malaria.

En la figura 6 se resume la proporción de sueros por zona, que presentaron bandas de reconocimiento para la cepa 3D7 y FCB2. Para fines informativos del detalle de los experimentos ver Anexo 3 y Anexo 4.

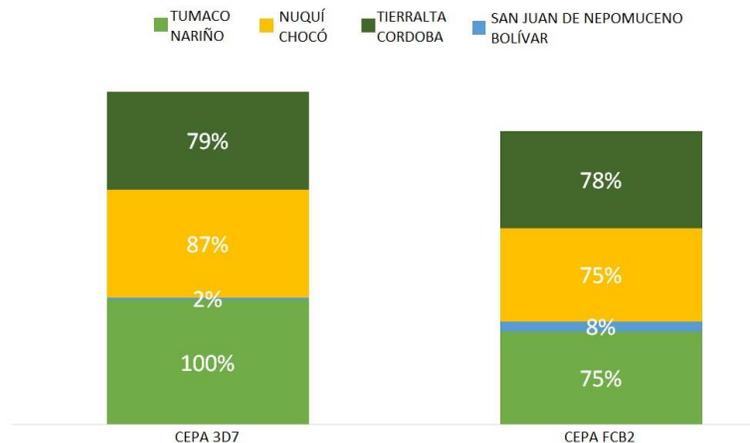
Figura 5. Perfil de reactividad de anticuerpos de sueros de individuos de zonas endémicas de malaria en Colombia por proteínas de lisado de parásito de la cepa 3D7 y FCB2.





Perfil de reactividad de anticuerpos de sueros de individuos de zonas endémicas de malaria en Colombia por proteínas de lisado de parásito de la cepa 3D7 y FCB2. Tierralta – córdoba, nuquí – chocó, tumaco – nariño, san juan de nepomuceno – bolívar y bogotá.

Figura 6. Reactividad de anticuerpos séricos de sueros humanos por *Western blot*.



Porcentaje de reconocimiento de sueros de humanos para proteínas de lisado de cepa 3D7 y FCB2. Se califica como positivo la Presencia de bandas definidas y negativo como la ausencia de bandas.

7. Estudio bioinformático de posibles epítopes y secuencias con potencial antigénico e inmunogénico derivada de la proteína MSP1

Inicialmente se realizó la búsqueda de las secuencias en la base de datos PDB y NCBI según el protocolo establecido en el grupo de investigación, se ejecutó las búsquedas de secuencias tanto para la cepa humana de referencia de *P. falciparum* 3D7 como para cepas específicas de roedores tales como *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17XL.

Posteriormente, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas a través de los servidores remotos BLAST (BLASTp) y empleando la herramienta ClustalW del NPS@ (Network ProteinSequence Analysis), con la finalidad de establecer el grado de identidad entre las secuencias de *Plasmodium* spp seleccionadas, y así considerar la posibilidad de utilizar el modelo murino para posteriores estudios funcionales.

Los resultados del análisis bioinformático permitieron establecer que existen porcentajes de identidad alrededor de 35 % para la secuencia completa de la proteína MSP1 malaria humana cepa 3D7, con respecto a aquellas que infectan roedores, como son *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL, como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje (%) de identidad de secuencias completas de cepas de malaria murina con respecto a la cepa 3D7 de *P. falciparum*.

Porcentaje de Identidad		
<i>P. falciparum</i> 3D7	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>P. yoelii</i> 17XL
100 %	36.21 %	35.67 %

Según el grado de identidad estructural encontrado para las cepas humanas respecto a las dos cepas de malaria murina, sugiere la posibilidad de realizar estudios de capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos derivados de la proteína MSP1, a través de experimentos *in vivo* en el modelo de malaria murina en ratones de la cepa BALB/c.

Para determinar los posibles péptidos derivados de la proteína MSP1, inicialmente la secuencia de la proteína en estudio fue procesada con el servidor *Site Prediction*. Esta

predicción se basa en conjuntos de datos conocidos en repositorios accesibles en la web o generados por experimentos. (Verspurten, et al 2009). En el análisis se consideró específicamente el posible sitio de escisión de las catepsinas B, D, E, G, K y L, con el fin de establecer posibles motivos sustrato de catepsinas e identificar bloques de procesamiento *in vivo*, que de alguna manera flaquearan y/o enmarcaran las secuencias peptídicas de interés.

A continuación, en la figura 7, se presentan los sitios de corte identificados tras el estudio, para la proteína MSP1, en color amarillo se muestran los cortes efectuados por las proteasas ya enunciadas, permitiendo una idea del posible procesamiento de esta proteína en el lisosoma. Para fines informativos del experimento ver Anexo 5.

Figura 7. Posibles sitios de corte por proteasas lisosomales para MSP1.

```

      10 |      20 |      30 |      40 |      50 |
>MSP1.PF3D7_0930300.1 MKIIFFLCSFLFFIINTQCVTHESEYQELVKKLEALEDAVLTGYSLQKQKMMVLNEEEIIT 60
      KGASAQSGASAQSGASAQSGASAQSGASAQSGASAQSGTSGPSPGSGTSPSSRSNTLPRS 120
      NTSSGASPPADASDSDAKSYADLKHVRVNYLFTIKELKYPELFDLTNHMLTLCDNHGFK 180
      YLIDGYEEINELLYKLNIFYDLLRAKLNDCANDYCQIPFNKIRANELDVLKLVFGYR 240
      KPLDNIKDNVGMEDYIKKNKTTIANINELTEGSKKTIIDQKNADNEEGKKLYQAQYDL 300
      SIYNKQLEEAHNLISVLEKRIDTLKKNENIKKLLDKINEIKNPPANSNGTPTNTLLDKNK 360
      KIEEHEEKIKEIAKTIKFNIDSLFTDPLELEYYLREKNKKVDVTPKSQDPTKSVQIPKVP 420
      YPNGIVYPLPLTDIHNSLAADNDKNSYGDLMNPHTKEKINEKIITDNKERKIFINNIKK 480
      IDLEKKNINHTKEQNKKLEDEYKSKKDYELLEKIFYEMKFNNNFNKDVVDKIFRSARYT 540
      NVEKQRYNNKFSSNNSVYVQKLLKALSYLEDYSLRKGISEKDFNHYYTLKTGLEADIK 600
      KLTEEIKSSENKILEKNFKGLTHSANGSLEVSDIVKLQVQKVLLIKKIEDLRKIELFLKN 660
      AQLKDSIHVPNIYKPNKPEPYLYLIVLKKVEVDKLEFIPKVKDMLKKEQAVLSITQPLV 720
      AASETTEDGGHSTHTLSQSGETEVTETEETEETVGHTTVITITLPTQPSPPEVKVVE 780
      NSIEHKSNDNSQALTKTVYLKLDEFLTKSYICHKYILVSNSSMDQKLEEVNLTPEEEN 840
      ELKSCDPLDLEFNIQNNIPAMYSLYDSMNNDLQHLFFELYQKEMIYYLHKLKEENHIKKL 900
      LEEQKQITGTSSTSSPGNTVNTAQSATHSNSQNSASSTNTQNGVAVSSGPVVEES 960
      HDPLTVLSISNDLKGIVSLLNLGNKTKVPNPLTISTTEMEKFYENILKKNNDTYFNDDIKQ 1020
      FVKNSNKVITGLTETQKNALNDEIKKLDKDTLQLSFDLYNKYKLKLDRLFNKKKELGQDKM 1080
      QIKKLTLLKEQLESKLNLSLNNPHNVLQNFVVFNKKKEAEIAETENTLENTKILLKHYKG 1140
      LVKYYNGESSPLKTLSEVSIQTEDNYANLEKFRVLSKIDGKLNDLHLGKKKLSFLS SGL 1200
      HHLITELKEVIKNKNYTGNSPSENNKRVNEALKSYENFLPEAKVTTVVTPPPQPDVTPSPL 1260
      SVRVSGSSGSTKEETQIPTSGSLLTELQVVLQNYDEEDDSLVVLPIFGESEDNDEYLD 1320
      QVVTGEAISVMTDNILSGFENEYDVIYLKPLAGVYRSLKKQIEKNIFTFNLNLDLNSR 1380
      LKRRYFLDVLESDLMQFKHISSNEYIIEDSFKLLNSEQKNTLLKSYKIKESVENDIKF 1440
      AQEGISYYEKVLAKYKDDLESIKKVIKEEKEKFPSSPPTPPSPAKTDEQKKESKFLPFL 1500
      TNIETLYNNLVNKIDDYLINLKAKINDCNVEKDEAHVKITKLSDLKAIDDKIDLFKNPYD 1560
      FEAIKKLINDDTKDMLGKLLSTGLVQNFNTIISKLEGGKFDMLNLSQHQCVKKQCPE 1620
      NSGCFRHLDEREBECKCLLNKQEGDKCVENPNPTCNENNGGCDADATCTEEDSGSSRKKI 1680
      TCECTKPDSYPLFDGIFCSSNFLGISFLLILMLILYSFI 1720

```

Posterior a la determinación de las posibles secuencias peptídicas derivadas de la proteína MSP1 dentro los posibles cortes proteolíticos, se procede a ejecutar la búsqueda de posibles epítopes B que permitan definir cuáles de las secuencias predichas tiene un potencial reconocimiento por parte del sistema del complemento.

Para predecir posibles epítopes B lineales se empleó el servidor remoto ABCPred, disponible en: <http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/index.html>. El análisis se efectuó haciendo uso de recursos del Immune Epitope Database (IEDB) and Analysis Resource, disponible en <http://www.iedb.org/> (Vita et al., 2019; Vita et al., 2014), y a través de los servidores BCPREDS, <http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>, IEDB Analysis resource BepiPred-2.0 <http://tools.iedb.org/bcell/>. Los resultados del análisis bioinformático de epítopes B se muestran en la figura 8.

Figura 8. Posibles epítopes B (Color verde), según los cortes proteolíticos teóricos para la proteína MSP1. Servidor remoto ABCPred. Disponible en: <http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/index.html>, (Saha et al., 2005).

```

      10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
>MSP1.3D7.Pf.Q8I0U8 MKIIFFLCSFLFFIINTQCVTHTESYQELVKKLEALEDAVLTGYSLFQKEKMLVNEEEIIT 60
KGASAQSGASQAQSGASQAQSGASQAQSGASQAQSGASQAQSGTSGSPSGPSGTSSPSSRSNTLPRS 120
NTSSGASPPADASDSDAKSYADLKHRVRNYLFTIKELKYPELFDLTNHMLTLCDNHGFK 180
YLIDGYEEINELLYKLNFYFDLLRAKLNDCANDYCQIPFNLKIRANELDVLKLKLVFGYR 240
KPLDNIKDNVGMEDIKKNKTTIANINELIEGSKKTIQDNKNADNEEGKKLYQAQYDL 300
SIYNKQLEEAHNLISVLEKRIDTLKKNENIKKLLDKINEIKNPPPANSGNTPNTLLDKNK 360
KIEEHEEKIKEIAKTIKFNIDSLFTDPLELEYLREKNKKVDVTPKSQDPTKSVQIPKPV 420
YPNGIVYPLPLTDIHNSLAADNDKNSYGDLMNPHTKEKINEKIITDNKERKIFINNIKK 480
IDLEEKNINHTEQNKLLLEDYEKSKDYELLEKIFYEMKFNNNFNKDVVKIFISARYTY 540
NVEKQRYNKFFSSNNNSVYNVQKLKALSYLEDYSLRKGISEKDFNHYYTLKTGLEADIK 600
KLTEEIKSSENKILEKNFKGLTHSANGSLEVSDIVKLQVQVLLIKKIEDLRKIELFLKN 660
AQLKDSIHVPNIYKPNKPEPYLIVLKKEVDKLEFIPKVKDMLKKEQAVLSITQPLV 720
AASETTEGGHSTHTLSQSGETEVEETEETEETVGHSTTTVTITLPTQPSPPPKVEKVV 780
NSIEHKSNDNSQALTKTVYLKLDLFTKSYICHKYILVSNSSMDQKLEVNLTPEEEN 840
ELKSCDPLDLFNIQNNIPAMYSLYDSMNDLQHLFFELYQKEMIIYLLHLKKEENHIKK 900
LEEQKQITGTSSTSSPGNTTVNTAQSATHSNSQNSASSTNTQNGVAVSSGPAVVEES 960
HDPLTVLSISNDLKGIVSLLNLGNKTKVPNPLTISTTEMEKIFYENILKNDTYFNDDIK 1020
FVKSNSKVIITGLTETQKNALNDEIKKLDLQLSFDLYNKYKLLDRLFNKKELGGQDKM 1080
QIKKLTLLKEQLESKLNLSLNNPHNVLQNFVFFNKKKEAIEAETENTLENTKILLKHYK 1140
LVKYNGESSPLKTLSEVSIQTEDNYANLEKFRVLSKIDGKLNLDNLHLGKKLSFLSSGL 1200
HHLITELKEVIKKNYTGNSPSENKKNVNEALKSYENFLPEAKVTTVVTPPQDVTTPSP 1260
SVRVSGSSGSTKEETQIPTSGSLTELQVQVQLQNYDEEDSLVVLPIFGESDNDEYLD 1320
QVVTGEAIVTMDNILSGFENEYDVIYLKPLAGVYRSLKQIEKNIFTFNLDLNSR 1380
LKKRKYFLDVLSDLMQFKHISSNEYIIEDSFKLLNSEQKNTLLKSYKIKESVENDIKF 1440
AQEGISYKVLAKYKDDLESIKKVIKEEKEFPSSPPTTTPSPAKTDEQKESKFLPFL 1500
TNIETLYNNLVNKIDDYLINLAKINDCNVEKDEAHVKITKLSDLKAIDDKIDLKFNPDY 1560
FEAIKKLINDTKDMLGKLLSTGLVQNFNTIISKLEIGKFQDMLNLSQHQCVKKQQPE 1620
NSGCFRHLDEREECKLLNYKQEGDKCVENPNPTCNENGGCDADATCTEEDSGSSRKKI 1680
TCETKPDSYPLFDGIFCSSSNFLGISFLLILMLILYSFI

```

Tras la implementación de varias herramientas y plataforma informáticas y procesamiento de la secuencia de la proteína MSP1, se definió y estableció una serie de criterios de selección de secuencias como posibles péptidos derivados de la proteína de estudio, así:

- Secuencias con reportes en la literatura y/o con registros en la base de datos de IEDB, que hicieran referencia a su potencial como epítopes.
- Secuencias conservadas y ubicadas en diferentes lugares dentro de la estructura de cada proteína.

- Secuencias enmarcadas en los posibles sitios de fragmentación proteolítica *in vivo*.
- Reportes de residuos con alta capacidad de unión a glóbulos rojos (denominados HABPs siglas en inglés de High Activity Binding Peptides).

El código asignado a las secuencias encontradas tras el análisis bioinformático para posibles epítopes B y T, corresponde a registros internos del grupo de investigación, por convención “B” para epítopes B y “T” para posibles epítopes T.

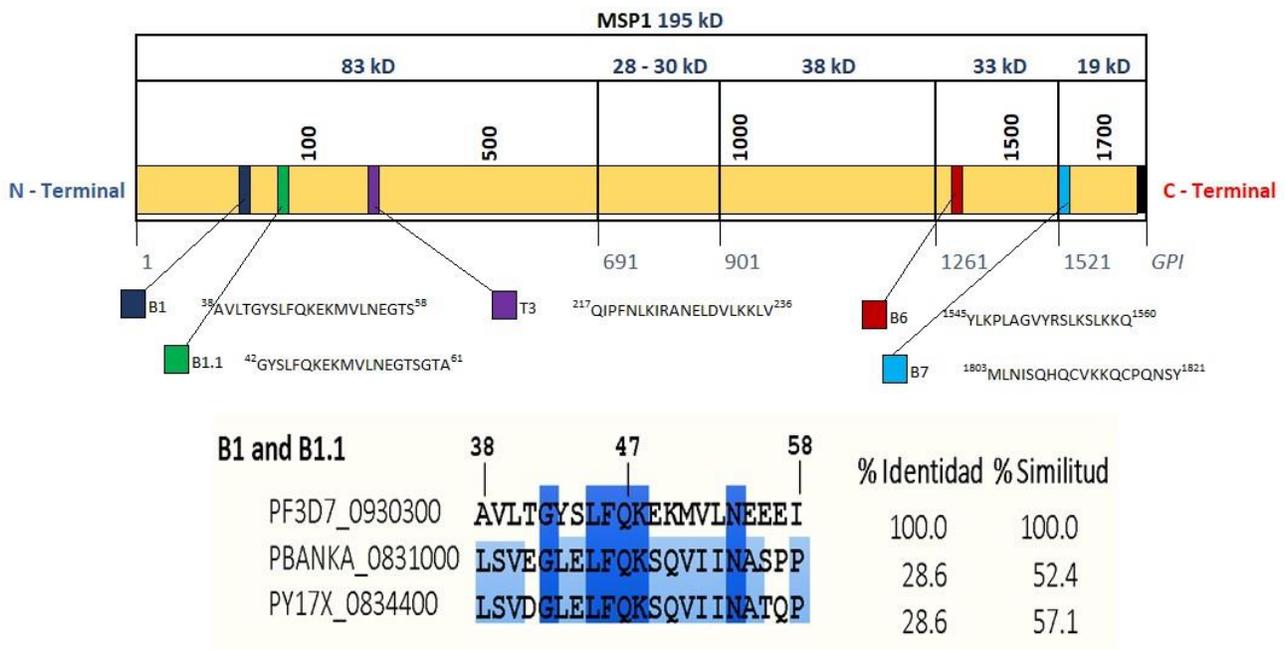
La búsqueda de secuencias de MSP1 con potencial antigénico a través de herramientas bioinformáticas, permitió evidenciar 4 secuencias de interés enfocadas en la búsqueda de epítopes B, como se observa en la figura 9. Para el presente trabajo se estudiará la secuencia ³³EALEDAVLTYGSLFQK⁴⁸, como se observa en la tabla 3, la cual se encuentra ubicada en la región altamente conservada hacia el extremo N-terminal de la proteína MSP1, que se traspone a dos secuencias que han sido estudiada por su capacidad inmunogénica y estimuladora de linfocitos T, y corresponden a (³⁸AVLTGYSLFQKEKMVLNEGTS⁵⁸) y (⁴²GYSLFQKEKMVLNEGTS⁶¹), señalando en subrayado, los residuos de alta afinidad de unión a glóbulos rojos (Cubillos et al., 2003; Daubenberger et al., 2002; Urquiza et al., 1996). Para fines informativos del experimento ver Anexo 5 y Anexo 6.

Tabla 3. Secuencias peptídicas propuestas derivadas de la proteína MSP1 tras estudio bioinformático y comparación con la literatura.

MSP1							
Código	Residuo corte N-terminal	Catepsina implicada	Residuo corte C-terminal	Catepsina implicada	Epítopes propuestos por bioinformática	Péptidos reportados	Referencia
B1	27 - 38	CAT: L; D; K	130	CAT: K	EALEDAVLTYGSLFQK	AVLTGYSLFQKEK <u>MVL</u> NEGTS	(Bastian et al., 2004; Cavanagh & McBride, 1997; Daubenberger et al., 2002; Parra et al., 2000; Reyes et al., 2007)
B1.1						GYSLFQKEK <u>MVL</u> NEGTS ⁶¹	

Para finalizar el estudio, cada una de la secuencia seleccionadas según los criterios descritos anteriormente, se analizaron con el programa EMBOSS Needle que utiliza el algoritmo de alineación Needleman-Wunsch, para encontrar la alineación óptima (incluidos los espacios) de dos o más secuencias, y determinar porcentajes de identidad e identificar regiones de similitud que pueden indicar relaciones funcionales, estructurales y/o evolutivas entre estas secuencias biológicas (Needleman & Wunsch, 1970). Como ya se mencionó se emplearon secuencias de la cepa 3D7 de *P. falciparum* y dos cepas de malaria de roedores y se efectuó la visualización a través del programa Jalview, los resultados se observan en la Figura 9. Para fines informativos del experimento ver Anexo 7.

Figura 9. Análisis bioinformático de la estructura primaria de los péptidos derivados de MSP1.



B1 y B1.1 Alineamiento de fragmentos de las secuencias PF3D7_0930300.1 de *P. falciparum* y las secuencias *P. berghei* PBANKA_0831000.1 y *P. yoelii* PY17X_0834400.1 de MSP1. Grado de identidad ($\geq 80\%$ Azul Oscuro, $\leq 60\%$ Azul claro, $\leq 40\%$ blanco). Tomada de grupo de investigación.

Tras el análisis de la alineación de las secuencias blanco del estudio, se observa que el fragmento ³³EAL⁴⁸EDAVLTGYSLFQK⁴⁸, presenta una alineación de relevancia en los residuos ⁴⁵LFQK⁴⁸, lo cual es interesante ya que contienen uno de los residuos reportados como de alta afinidad de unión a glóbulos rojos, lisina 48 (Bannister et al, 2000). Además,

dicho fragmento se encuentra cerca del motivo ⁵⁰KMV⁵², justificando la razón de proponer modificaciones tipo amida reducida para estas secuencias.

Finalmente, la alineación realizada indica un porcentaje de identidad y similitud relevantes para la secuencia de la cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7, respecto a sus ortólogos *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL, lo que permite ratificar y validar el uso de las secuencias propuestas para los péptidos nativos derivados de la proteína MSP1, **B1** y **B1.1**, (denominados y codificados con la letra B, debido al tipo de epítipo reconocido por el receptor presente en las células B) en ensayos de infección experimental en un modelo de malaria murina.

8. Diseño, síntesis química y caracterización de análogos.

8.1. Diseños de péptidos modificados tipo amida reducida.

Para la presente investigación fueron empleados secuencias nativas obtenidas por predicciones computacionales que tienen probabilidad de formación, posterior a un procesamiento celular. A partir de dichas predicciones se plantearon las respectivas modificaciones tipo amida reducida sistemáticas, entorno y dentro del motivo ⁴⁸KEKMV⁵², que proporcionaron diferentes características moleculares y que a la vez conserva la estructura primaria del péptido, así logrando una modulación estructural a través de estos enlaces isostéricos.

Según lo reportado en la literatura, el péptido modificado tiene una mayor probabilidad de reconocimiento y acople y/o anclaje en el sitio activo de MHC-II (Lozano et al., 2003). Experimentos desarrollados por Bastian, M., y colaboradores, sugieren que modificaciones de este tipo presentan ventajas en la vida media del péptido en un ambiente biológico, que presente una mayor resistencia a la degradación proteolítica y por consiguiente mayor disponibilidad en el medio biológico para una posible interacción (Bastian et al., 2004).

En este trabajo se utiliza la nomenclatura "psi corchete", en la que ψ (griego psi) se refiere a los sustitutos del enlace amida (Spatola, 1983). En total fueron trabajados 2 péptidos nativos y 9 análogos derivados de la proteína MSP1 de *Plasmodium* spp. Para el presente estudio se realizaron modificaciones sistemáticas tipo amida reducida, para identificar residuos claves en la actividad de los péptidos modificados, como se muestra en la tabla 4. El diseño y síntesis de estos se realizó según lo reportado por (Lozano JM et al., 1998).

Tabla 4. Análogos diseñados a partir de los péptidos nativos **B1** y **B1.1** derivados de la Proteína MSP1. Tomada grupo de investigación

Código	Tipo de péptido	Posición en la secuencia	Secuencia
B1	Nativo	Pf.3D7.MSP1 ³⁸⁻⁵⁸	AVLTGYSLFQKEKMVLNEGTS
B1-An1	Análogos tipo amida reducida	Pf.3D7.MSP1 ^{42-ψ[CH₂-NH]-43}	AVLTG-ψ[CH ₂ -NH] YSLFQKEKMVLNEGTS
B1-An2		Pf.3D7.MSP1 ^{43-ψ[CH₂-NH]-44}	AVLTGY-ψ[CH ₂ -NH]-SLFQKEKMVLNEGTS
B1-An3		Pf.3D7.MSP1 ^{45-ψ[CH₂-NH]-46}	AVLTGYSL-ψ[CH ₂ -NH]-FQKEKMVLNEGTS
B1-An4		Pf.3D7.MSP1 ^{51-ψ[CH₂-NH]-52}	AVLTGYSLFQKEKM-ψ[CH ₂ -NH]-VLNEGTS
B1.1	Nativo	Pf.3D7.MSP1 ⁴²⁻⁶¹	GYSLFQKEKMVLNEGTSGTA
B1.1-An1	Análogos tipo amida reducida	Pf.3D7.MSP1 ^{52-ψ[CH₂-NH]-53}	GYSLFQKEKMV-ψ[CH ₂ -NH]-LNEGTSGTA
B1.1-An2		Pf.3D7.MSP1 ^{51-ψ[CH₂-NH]-52}	GYSLFQKEKM-ψ[CH ₂ -NH]-VLNEGTSGTA
B1.1-An3		Pf.3D7.MSP1 ^{50-ψ[CH₂-NH]-51}	GYSLFQKEK-ψ[CH ₂ -NH]-MVLNEGTSGTA
B1.1-An4		Pf.3D7.MSP1 ^{49-ψ[CH₂-NH]-50}	GYSLFQKE-ψ[CH ₂ -NH]-KMVLNEGTSGTA
B1.1-An5		Pf.3D7.MSP1 ^{48-ψ[CH₂-NH]-49}	GYSLFQK-ψ[CH ₂ -NH]-EKMVLNEGTSGTA

8.2. Protocolo de síntesis en fase sólida mediante la estrategia Fmoc para péptidos nativos y modificados

Se obtuvieron 11 secuencias de péptidos derivados y nativos mediante síntesis en fase sólida mediante la estrategia de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como monómeros y polímeros formados para un total de 22 polipéptidos. Los disolventes y reactivos solubles se eliminaron mediante filtración. Los lavados entre desprotección, acoplamiento y pasos de desprotección posteriores se llevaron a cabo con N,N-dimetilformamida (DMF) (5 × 1 min), diclorometano (DCM) (4 × 1 min), alcohol isopropílico (IPA) (2 × 1 min), y DCM (2 × 1 min) usando 1,5 ml de disolvente/50 mg de resina cada vez. El grupo Fmoc se eliminó de la resina mediante dos tratamientos de 15 min con piperidina-DMF (25:75 v/v). Los acoplamiento se realizaron a 20 °C y se monitorearon mediante pruebas estándar de Kaiser para síntesis en fase sólida.

Para la síntesis de formas monoméricas, después de la eliminación de Fmoc de la resina de amida Rink disponible comercialmente (50 mg, 0,46 mmol/g), al primer aminoácido Fmoc (0,115 mmol, 5,0 equivalentes) se le añadió 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (18,2 mg, 0,115 mmol; 5,0 equivalentes) y (DCC) (23,7 mg; 5,0 equivalentes) como reactivos de acoplamiento disueltos en DMF/DCM (7:3, v/v), y la reacción de acoplamiento se agitó durante 2h. A continuación, se eliminó el grupo Fmoc y se incorporó un segundo aminoácido Fmoc a la resina usando las mismas condiciones. La eliminación de Fmoc y las reacciones de acoplamiento del resto de aminoácidos de Fmoc se llevaron a cabo en las mismas condiciones utilizando 5 equivalentes/acoplamiento.

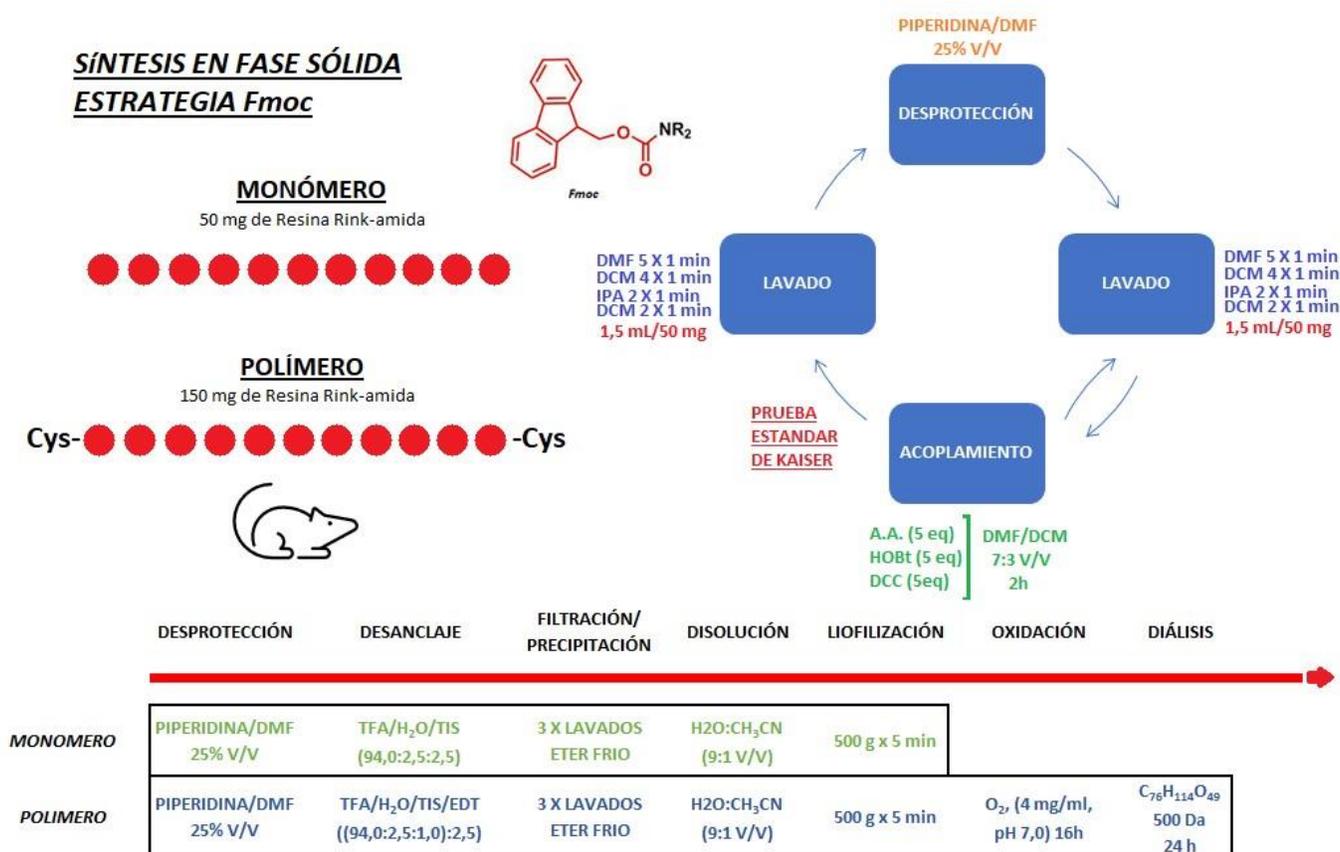
Finalmente, el péptido monómero se desprotegió con Fmoc y se escindió de la resina mediante tratamiento con una mezcla de ácido trifluoroacético-agua-triisopropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (95,0:2,5:2,5 durante 6 h, seguido de filtración y precipitación con dietilo frío). éter (Et₂O). Los productos crudos luego se trituraron 3 veces con Et₂O frío, se disolvieron en agua-acetonitrilo (H₂O:CH₃CN) (9:1 v/v) y luego se liofilizaron.

La síntesis de las formas poliméricas se llevó a cabo en 150 mg de Resina Rink-amida. Para obtener aún más una molécula de alto peso molecular representada por un polímero, se incorporó un residuo de cisteína activo en ambos extremos de la secuencia N y C. La síntesis de las formas poliméricas se llevó a cabo bajo la misma estrategia y condiciones utilizadas para sus monómeros correspondientes (5 equivalentes/acoplamiento). Los péptidos cis sintetizados se desprotegeron con Fmoc y se escindieron de la resina mediante tratamiento con una mezcla de escisión que incluía etanoditiol (EDT) en el sistema TFA/H₂O/TIS/EDT (94,0:2,5:1,0):2,5) durante 6 h seguido de filtración y precipitación con Et₂O frío. Estos productos crudos luego se trituraron 3 veces con Et₂O frío y se disolvieron en H₂O:CH₃CN (9:1 v/v) y se liofilizaron como antes.

Finalmente, los péptidos de cisteinilo se sometieron a oxidación por puentes disulfuro para obtener las formas moleculares poliméricas objetivo. La oxidación se llevó a cabo a partir de una solución de péptido en agua (4 mg/ml, pH 7,0) mediante una corriente de oxígeno con agitación durante 16 h. Los péptidos poliméricos obtenidos se dializaron en agua durante 24 h utilizando una membrana de acetato de celulosa de 500 Da y se liofilizaron adicionalmente como se publicó anteriormente.

A continuación, en la figura 9 se esquematiza el proceso de síntesis empleado en la presente investigación, tanto para los péptidos nativos y modificados.

Figura 9. Esquema general de la síntesis en fase sólida a través de la estrategia Fmoc para péptidos nativos y modificados, como monómero y polímero.



8.3. Síntesis alterna para la obtención del N-Fmoc-L-aminoaldehído

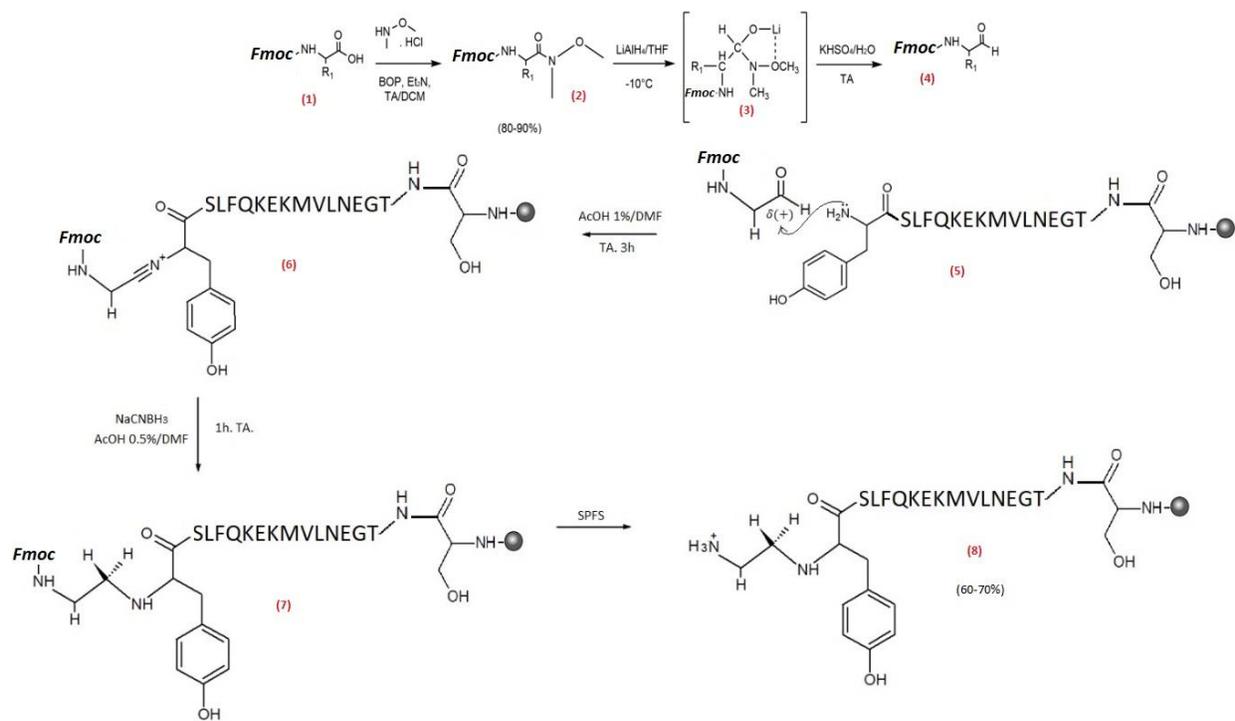
Este proceso involucra síntesis orgánicas alternas, como lo es la reducción a aminoaldehído del aminoácido comprometido en el enlace modificado de la secuencia peptídica, como se muestra en el mecanismo de la figura 10; la reducción de cada uno de los aminoácidos modificados se efectuó siguiendo el procedimiento propuesto por (Fehrentz & Castro, 1983). El procedimiento estándar para la reducción del grupo carbonilo del aminoácido involucra la síntesis de un intermediario (carbamida), seguido de la reducción con LiAlH₄ sobre éter seco. Se observa en (a) el carbono carbonílico de un N-Fmoc- α -aminoácido comercial (1) se protege con N,O-dimetilhidroxilamina formando así el derivado N,O-dimetilcarboxamida (2) Posteriormente, la N,O-dimetilcarboxamida se trata con LiAlH₄ a – 10 °C, para producir la sal de litio (3), como puede observarse en (b). Esta sal de litio (3),

se hidroliza en medio ácido a temperatura ambiente (TA) para dar lugar a la formación del *N*-Fmoc- α -aminoaldehído (4) como se observa en (Lozano JM et al., 2003).

La síntesis de los enlaces isostéricos tipo amida reducida, se llevaron a cabo mediante aminación reductiva in situ, luego de la condensación de los grupos CHO de (4) y el grupo amino libre de (5). Al realizar la desprotección y neutralización de la función amino del último residuo de la cadena peptídica, anclada previamente a la resina o soporte sólido, representado en la figura como una esfera gris, se hizo reaccionar con el *N*-Fmoc- α -aminoaldehído (4) obtenido en la etapa anterior para formar el aducto (6). Posteriormente, este intermediario se trata con NaBH₃CN para reducir el ion iminio y formar el grupo metileno. Finalmente, al producto (7) se realiza la desprotección y se obtiene el producto (8) para dejar libre al grupo amino y continuar con la elongación de la cadena mediante las estrategias normales de síntesis de péptidos en fase sólida (Lozano JM et al., 1998).

Metodológicamente, la reacción de condensación de cada *N*-Fmoc-L-aminoaldehído, consistió en disolver tres equivalentes del aminoaldehído en 2 mL de DMF/ácido acético al 1% y luego poner en contacto con la resina-péptido manteniendo agitación por un período de tres horas. Terminado este tiempo, se descartó la solución aminoaldehído/DMF y se realizaron lavados con DMF, IPA y DCM 3 mL de cada uno por un minuto. Se preparó una solución de un equivalente de NaBH₃CN en DMF/ácido acético al 1 % como parte de una mezcla que se puso en reacción con la resina-péptido por una hora. Finalizado este tiempo, se realizaron los mismos lavados del paso anterior y se hizo la prueba de Kaiser, hasta observar que aparentemente no había grupos amino libres. Terminada la reacción de este acople, se desprotegió el grupo amino y se continuó la síntesis en la forma estándar (Lozano JM et al., 2013). Para la caracterización de estas moléculas, se emplearon metodologías de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (PR-HPLC del inglés Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography) y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Figura 10. Síntesis de N-Fmoc-aminoaldehídos a partir de N-Fmoc-aminoácidos.
Tomado y adaptado de: (Lozano JM et al., 2013)



9. Experimentos de actividad funcional de análogos relevantes en el modelo murino

Para examinar funcionalmente los antígenos seleccionados y sintetizados, de las secuencias nativas y modificadas, y evaluar su potencial para inducir inmunidad protectora frente a infección por *Plasmodium* en fase sanguínea, se llevaron a cabo experimentos de actividad funcional *in vivo*, empleando ratones BALB/c, como modelo animal experimental en malaria, según los protocolos establecidos por el grupo de investigación.

Estos experimentos fueron realizados en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, con la amable colaboración del profesor Jesús Alfredo Cortes Vecino y contó con el respectivo aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias. Según acta 13 de noviembre de 2017. Además, se contempló las respectivas consideraciones dispuestas por la ley acerca del uso ético de animales de experimentación (Ley 84 de 1989. Cáp. V. Art 23^a-26^a; Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud). Así mismo se siguieron las normas éticas establecidas en el bioterio, con especial atención en los elementos decisorios sobre el punto final de experimentación y los protocolos para la disposición final de residuos infecciosos.

9.1. Estimulación de anticuerpos policlonales anti-péptido en modelo de malaria murina

Se emplearon ratones BALB/c hembras y/o machos de 4 a 6 semanas de edad, en grupos de cuatro individuos (n=4), mantenidos en cajas plásticas, bajo condiciones ambientales estables, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con comida y bebida *ad libitum*. Los ratones fueron inoculados vía intraperitoneal (i.p.) con 100 μ L de la formulación (50 μ g de péptido, emulsionado en adyuvante de Freund (completo) la primera vez, e incompleto para las dosis de refuerzo. Se administró PBS a los grupos control. Los ratones se sangraron previa anestesia, días antes de la primera inmunización y semanalmente después de las inmunizaciones posteriores, según el esquema que se presenta en la figura 9, como se describe en (Lesmes et al., 2011; Lozano et al., 2013; Vanegas et al., 2014).

El esquema de inmunización empleado incluyó 4 dosis de inmunización, una sangría pre inmune, una sangría post tercera y cuarta dosis. A partir de muestras de sangre obtenidas por punción retro orbital (aproximadamente 200 μL /animal) se separaron sueros de animales sometidos a esquemas de inmunización con formulaciones definidas de los análogos trabajados, con las cuales se realizaron experimentos de ELISA indirecto. Los anticuerpos policlonales presentes en estas muestras se evaluaron y titularon por su reactividad frente a secuencias nativas y análogos.

9.2. Reto experimental de malaria murina, experimentos *in vivo*

La evaluación de las propiedades, antigénicas e inmunogénicas de las moléculas en estudio se realizó a partir de experimentos que permitieran establecer por una parte la capacidad de los anticuerpos de reconocer cada péptido y/o análogo que lo estimuló, y por otra, el efecto en el desarrollo de malaria causada por *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL en el modelo de reto de infección experimental por malaria murina.

Respectivamente, las cepas fueron amablemente donadas por las profesoras Silvia Blair de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Laboratorio de malaria (Medellín, Colombia) y Lilian Spencer-Valero de la Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología Celular (Caracas, Venezuela).

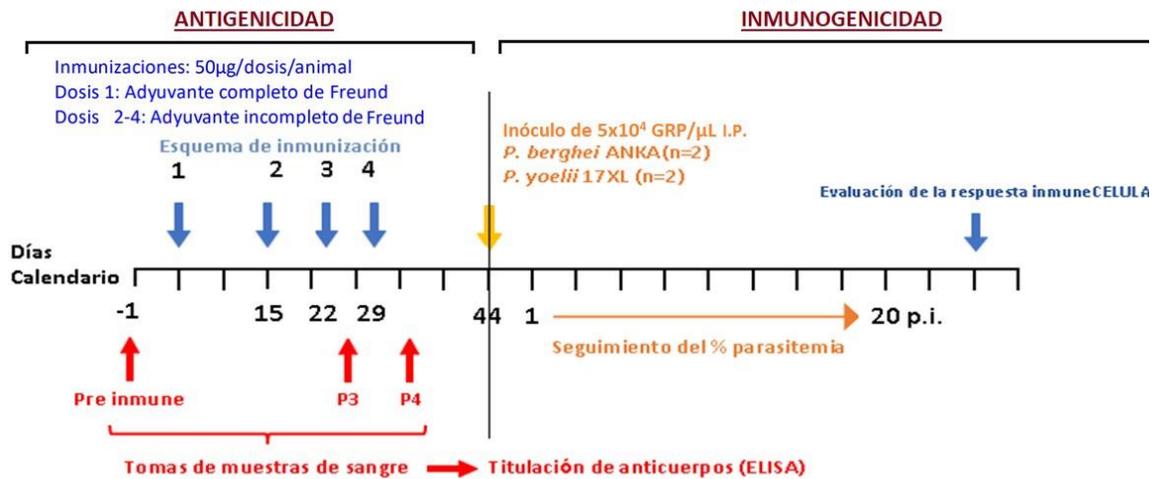
Una vez completado el esquema de inmunización, a los quince días, se realizó el reto experimental vía intraperitoneal (i.p) con un inóculo de 5×10^4 GRP/ μL (Glóbulos Rojos Parasitados/ μL) proveniente de animales donantes con infección en curso. El grupo control fueron animales inoculados con la formulación, pero sin antígeno, y recibieron la misma cantidad de glóbulos rojos infectados con la cepa murina correspondiente.

El diseño experimental incluyó cuatro animales por grupo a ser retados con cada una de las cepas empleadas, es decir, cada grupo de animales se fracciona a la mitad para el reto experimental de malaria murina ($n=2$). El seguimiento del desarrollo de la parasitemia se realizó por microscopía óptica con frotis de sangre periférica y tinción de Giemsa. El cálculo del porcentaje de parasitemia se realizó por recuento de 1.000 glóbulos rojos totales, de tres campos de aproximadamente 300 glóbulos rojos totales.

El monitoreo se llevó a cabo por 20 días como ventana de observación, tiempo después del cual se procedió a realizar eutanasia a los animales sobrevivientes, conservando muestras biológicas a ser empleadas en posteriores ensayos de evaluación de la respuesta inmune

celular para la determinación del perfil Th1/Th2 en ratones inmunizados. Se registró la mortalidad a lo largo del experimento, así como los signos y síntomas relacionados con el desarrollo de la infección. El esquema completo para el estudio funcional se presenta en la figura 11.

Figura 11. Esquema de inmunización del modelo animal murino.



El proceso de inmunización se realizó para grupos de animales, de cuatro individuos cada uno, con los diferentes análogos y grupos control. (Inmunizaciones: 50 ug/dosis/animal Vía I.P.; dosis 1: Adyuvante completo de freud; dosis 2-4 Adyuvante incompleto de freud. El reto experimental con inóculos de 5×10^4 GRP/µL con cepas de malaria de roedores *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17XL. (Lesmes, L., et al., 2011; Lozano, JM., et al., 2013; Lozano, JM., et al., 2017).

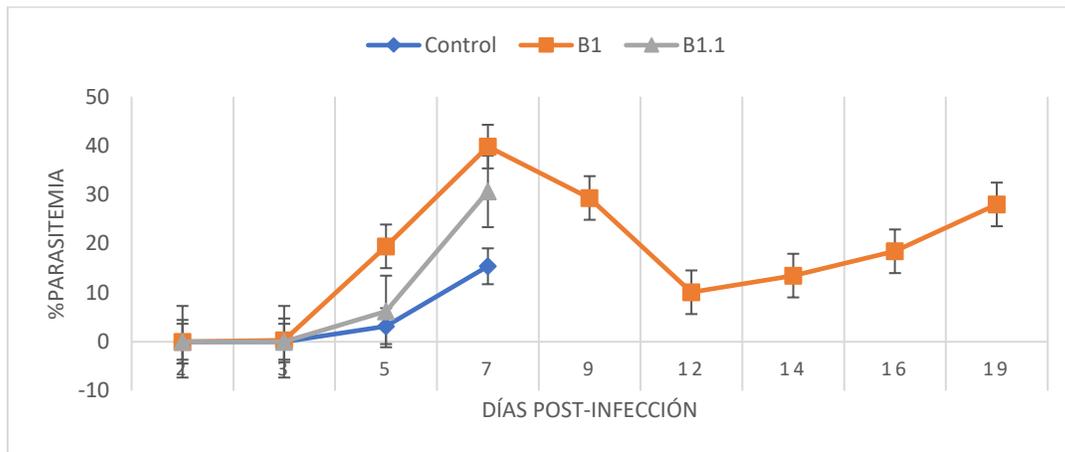
9.3. Perfiles de parasitemia de animales inmunizados con péptidos B1 y B1.1. y retos experimental con *P. berghei* ANKA

En la figura 12, se representa el perfil de la parasitemia post infección de los 2 grupos de animales inmunizados con antígenos nativos de MSP1 y retos experimentalmente con la cepa *P. berghei* ANKA. Cada péptido se enuncia según los nombres y codificaciones diseñadas para el estudio de bioinformática desarrollado.

El comportamiento del desarrollo de la parasitemia de los animales del grupo control se encuentra dentro de las especificaciones teóricas del ensayo. Siguiendo el comportamiento fisiopatológico de esta cepa de *Plasmodium*, donde murieron todos los animales (n=2) en

los primeros 7 días después del reto, en concordancia con la literatura donde se considera que la infección es letal entre el día 6 y el 8 post infección (Sanni et al., 2002).

Figura 12. Perfil de parasitemia desarrollada por los animales inmunizados con antígenos nativos derivados de MSP1. Reto experimental con *P. berghei* ANKA.



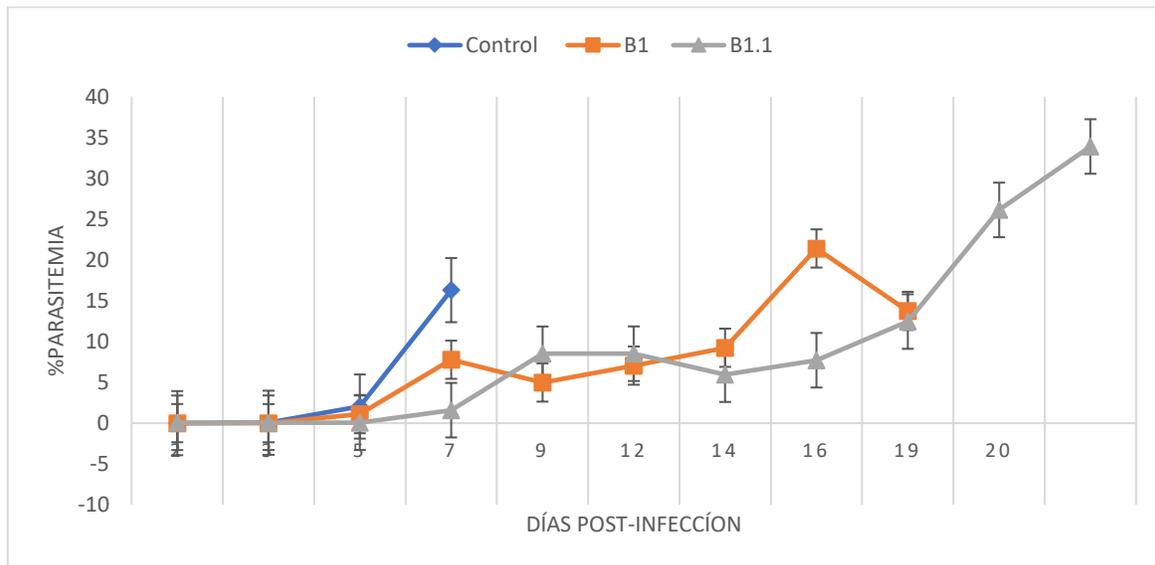
Tras el análisis del perfil de parasitemia se encontró que ambos grupos de animales inmunizados desarrollaron una cinética de parasitemia con picos máximos en el día 7, pero ambos grupos presentaron porcentajes de parasitemias más altos con respecto al control, con un aproximado de 40 % para **B1** y 30 % para **B1.1**. Esto puede sugerir una posible tolerancia al incremento del parásito en sangre con respecto al grupo control. Es decir, los animales inmunizados con **B1** y **B1.1**, presentan mayor cantidad de parásitos en sangre antes de su muerte. Para el péptido **B1** es importante resaltar que posterior al día 7, se observa un aparente control de la infección, llegando a sobrevivir uno o varios individuos al día 20 post infección. En contraste, el grupo **B1.1** no pudo controlar la infección y todos los animales murieron hacia el día 7 del experimento.

9.4. Perfiles de parasitemia de animales inmunizados con péptidos B1 y B1.1. y retos experimental con *P. yoelii* 17XL

Los resultados y el comportamiento del experimento con la cepa *P. yoelii* 17XL, representados en la figura 13, muestran un comportamiento concordante con la agresividad reportada en la literatura para esta cepa de malaria murina, ya que los animales del grupo control mueren a causa de la infección en el transcurso de los primeros 7 días post infección (Sanni., et al., 2002). Sin embargo, el comportamiento y desarrollo de la parasitemia de los grupos **B1** y **B1.1** es similar entre sí, presentando un aumento moderado del porcentaje de

parasitemia que no supera el 35 % al día 7, lo que sugiere un retraso en la esquizogonia eritrocitaria, en comparación con el grupo control.

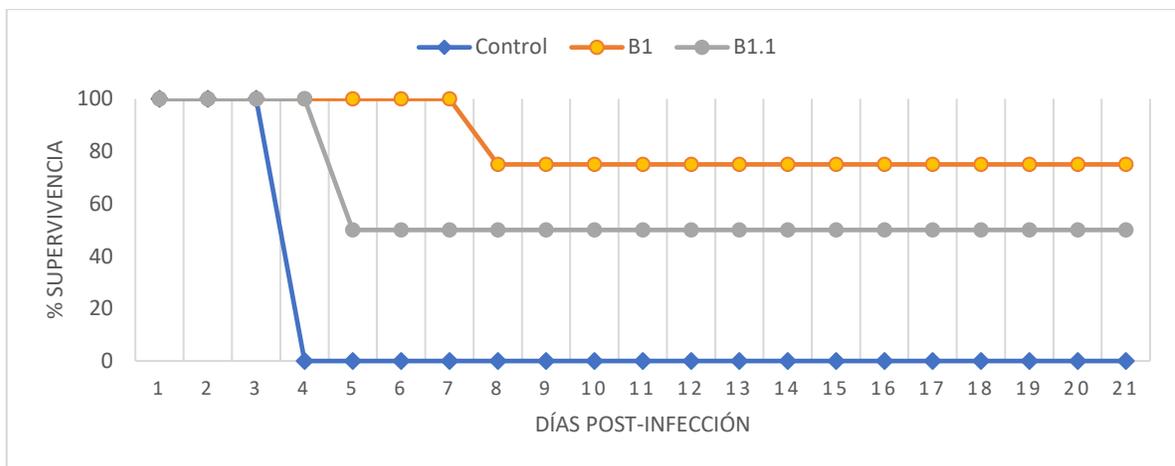
Figura 13. Perfil de parasitemia desarrollada por los animales inmunizados con antígenos nativos derivados de MSP1. Reto experimental con *P. yoelii* 17XL.



9.5. Perfiles de supervivencia de ratones BALB/c Reto *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17 XL.

En los perfiles de supervivencia por inmunógeno, se resalta la diferencia entre perfil del grupo control con mortalidad del 100 % al día 7 post infección, respecto a los grupos de animales inmunizados con las moléculas en estudio. En los grupos de animales inmunizados los porcentajes de supervivencia oscilan entre el 50 y el 75 %, como se puede observar en la figura 14. Esto es una evidencia contundente, de que los animales inmunizados con la familia de péptidos nativos, **B1** y **B1.1**, tienen mayor probabilidad de sobrevivir en comparación con los animales del grupo control.

Figura 14. Perfiles de supervivencia de ratones BALB/c inmunizados con péptidos nativos derivados de MSP1 de *Plasmodium* spp, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17 XL.



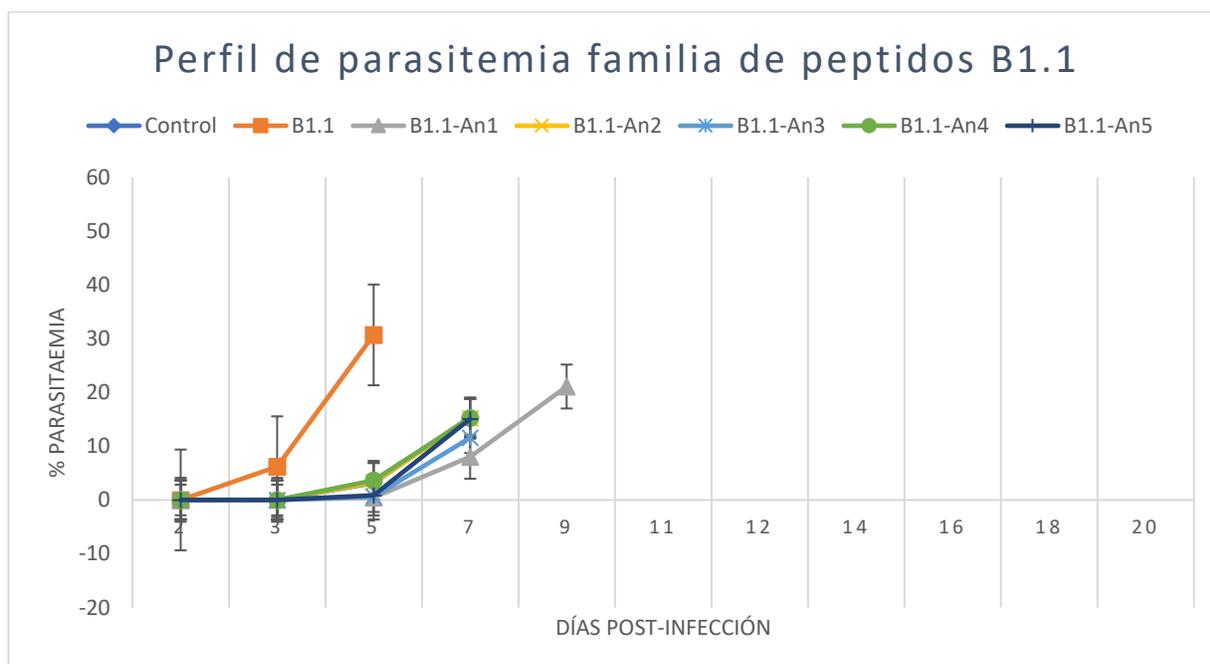
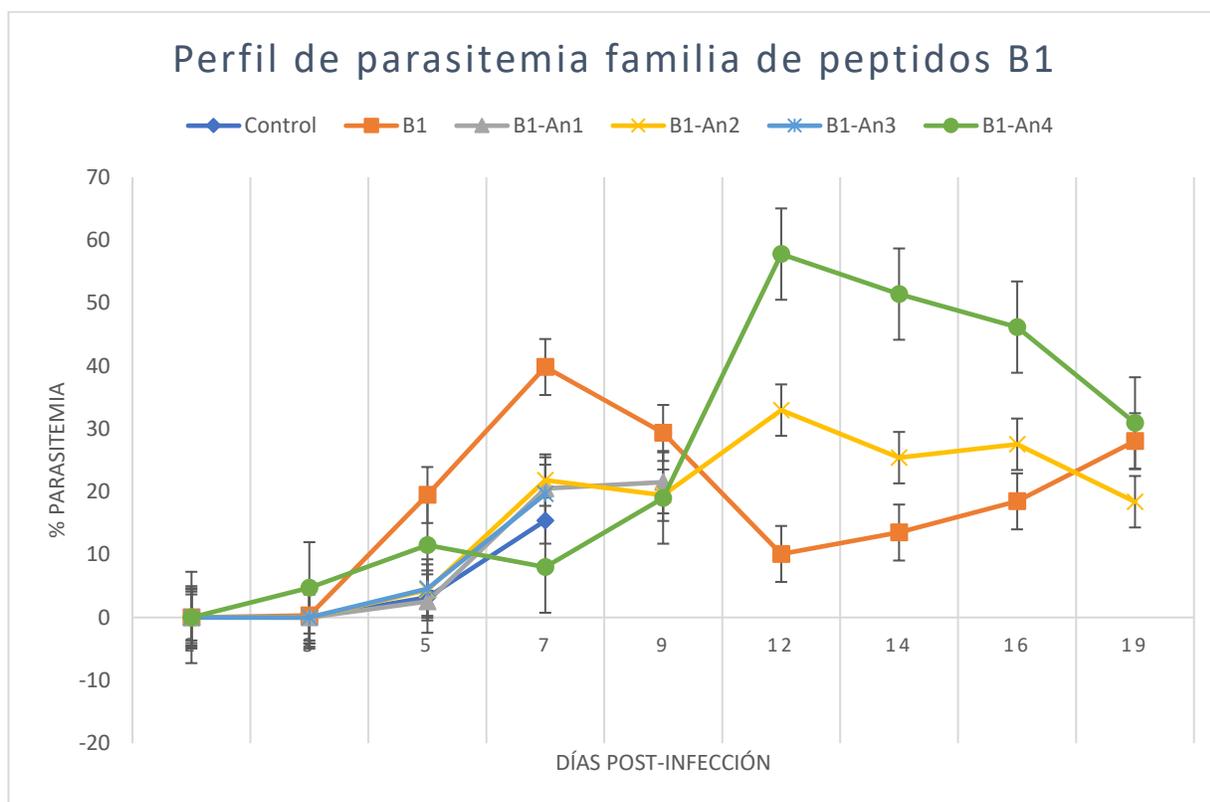
9.6. Perfil de parasitemia de animales inmunizados con análogos derivados de la proteína MSP1 y reto experimental con *P. berghei* ANKA

En la figura 15, se presenta el perfil de parasitemia con los grupos inmunizados con la familia de análogos de cada péptido con el reto de infección de *P. berghei* ANKA.

Para el grupo de animales inmunizados con la familia de péptidos **B1**, se observa que los análogos **B1 An2**, y **B1 An4**, presentan parasitemias de 60 y 30 %, respectivamente, con un pico máximo hacia el día 12. Posterior al día 12 presentan una reducción de parásitos en sangre, con un total de 4 supervivientes hacia el día 20. Por el contrario, para el análogo **B1 An1** y **B1 An3** el desarrollo de la parasitemia, no presenta una diferencia significativa con el grupo control, por lo que se puede asumir que las modificaciones en este punto de la secuencia no están asociados a una capacidad protectora bajo las condiciones del ensayo.

Por otro lado, para el grupo de animales inoculados con la familia de análogos **B1.1** se observa que el péptido nativo y sus análogos, presentan porcentajes de parasitemias superiores al grupo control antes de morir hacia el día 8, sin embargo, la funcionalidad en el reto experimental de **B1.1**, no es significativamente relevante frente a la infección por la cepa *P. berghei* ANKA.

Figura 15. Perfil de parasitemia desarrollada por animales inmunizados con secuencias nativas vs análogos de la familia **B1** y **B1.1**, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA



9.7. Curvas perfil de parasitemia de animales inmunizados con análogos de B1 y B1.1. y reto experimental con *P. yoelii* 17XL

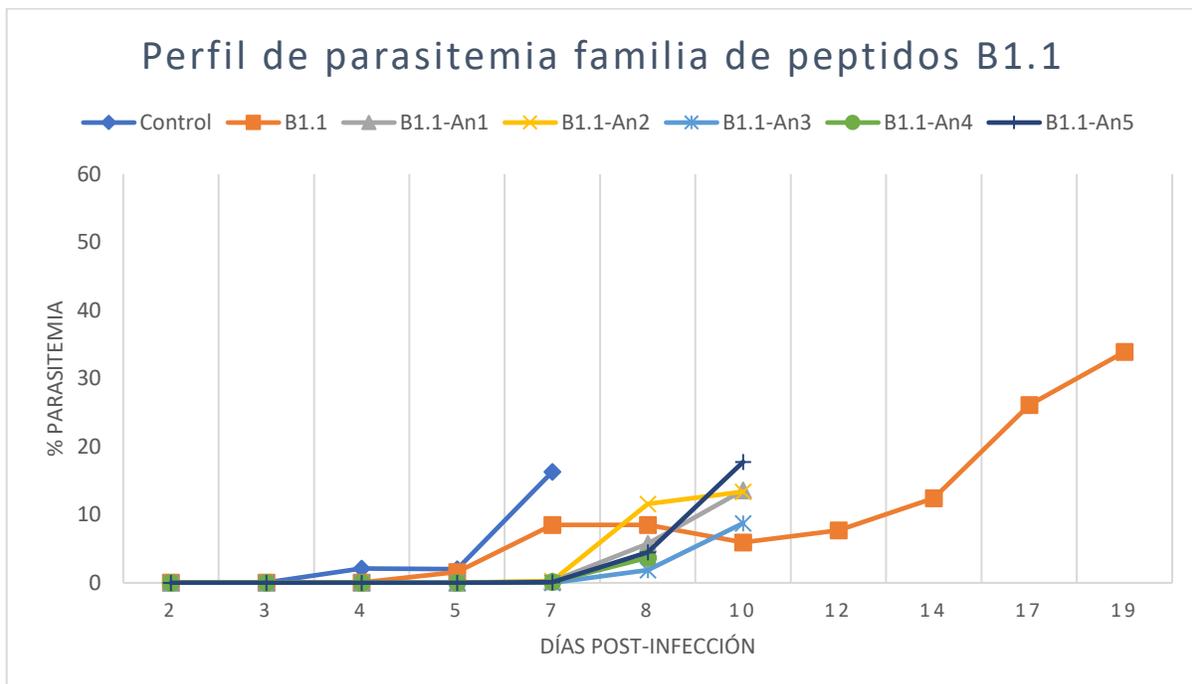
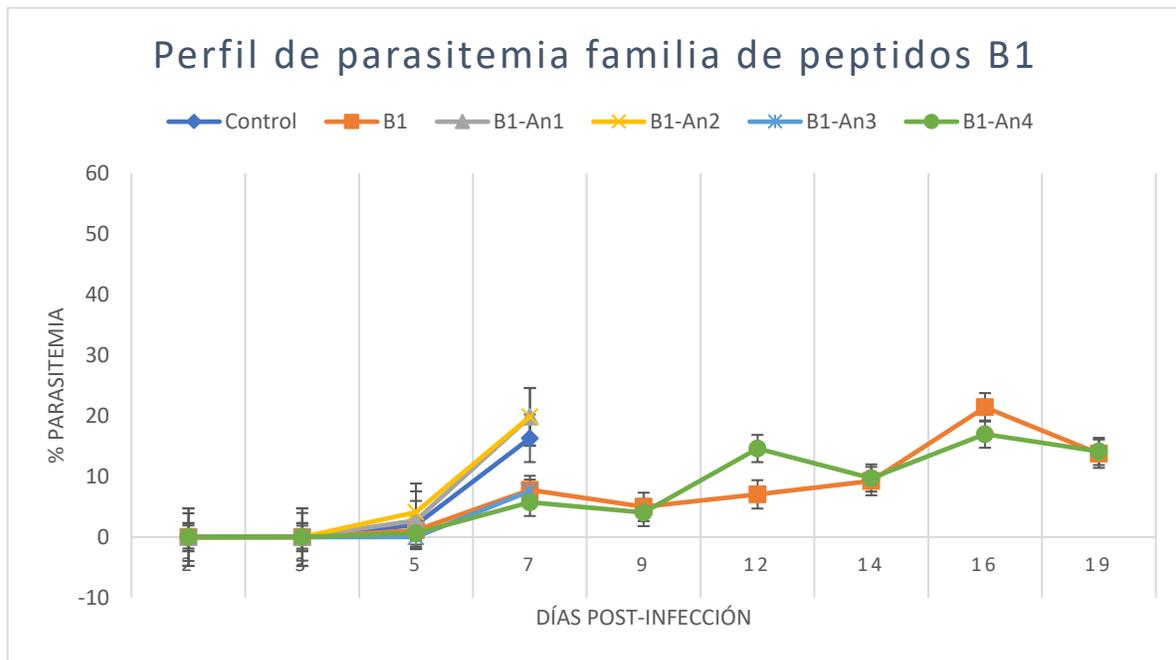
La representación esquemática del perfil de parasitemia desarrollado por los animales retados con dosis letales de *P. yoelii* 17XL se puede observar en la figura 16.

Según los resultados para los grupos de moléculas derivados del péptido **B1**, es de resaltar el comportamiento del péptido **B1An4** que presenta un comportamiento similar al péptido nativo, donde los animales inmunizados alcanzaron la supervivencia al día 20 post infección del experimento, y presenta porcentajes de parasitemia alrededor del 15 % a lo largo de la ventana de observación.

Por otro lado, para la familia de péptidos **B1.1**, se observa que para los grupos de animales inmunizados con los análogos **B1.1 An1**, **B1.1 An2**, **B1.1 An3**, **B1.1 An4** y **B1.1 An5**, no presentan porcentajes de parasitemias superiores con respecto al grupo control (20 %), sin embargo, los animales inmunizados con estos análogos mueren tres días después (día 10 post infección) que el grupo control.

En general los resultados sugieren que los péptidos confieren una mayor probabilidad de supervivencia, y en el caso del análogo **B1An4**, se observa un porcentaje de parasitemia estable y animales sobrevivientes al final de la ventana de observación.

Figura 16. Perfil de parasitemia desarrollada por animales inmunizados con secuencias nativas vs análogos de la familia **B1** y **B1.1**, retados con dosis letales de *P. yoelii* 17 XL

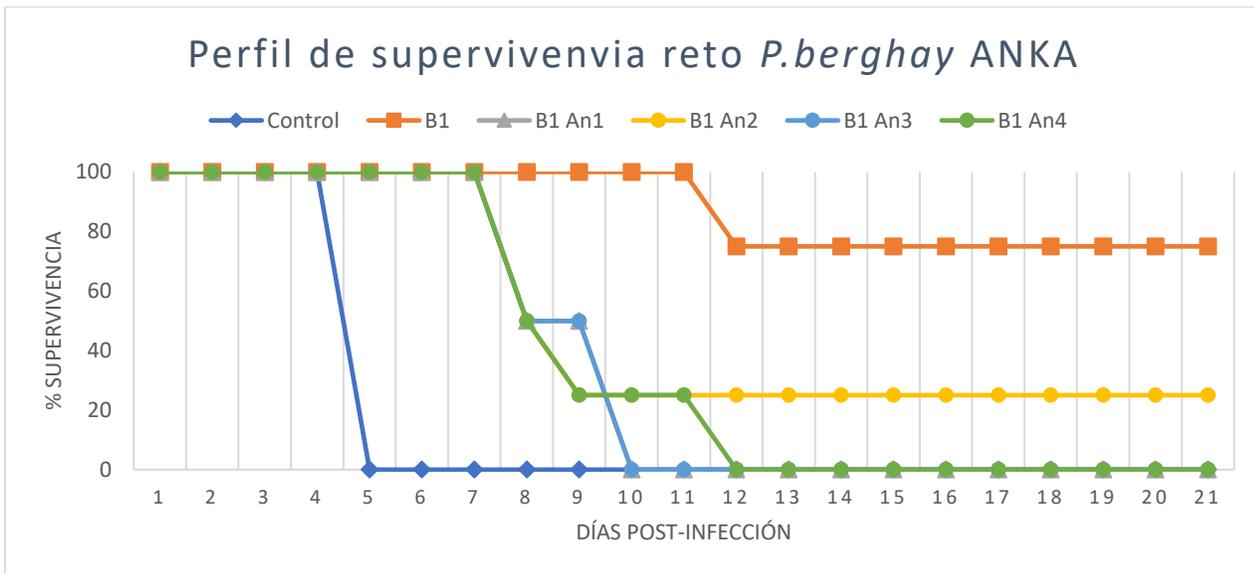


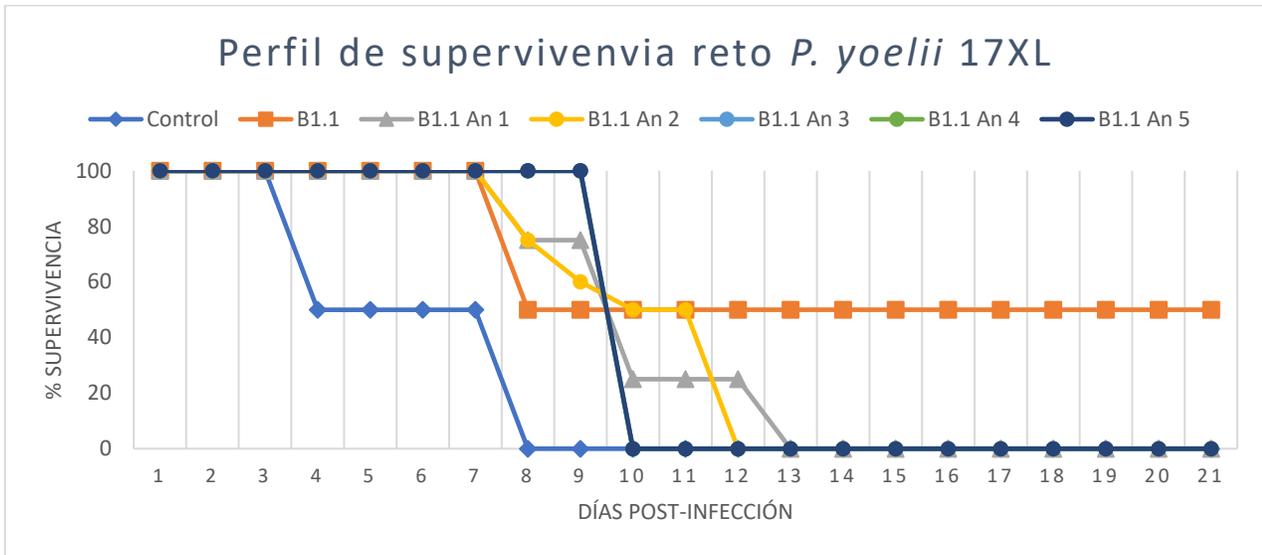
Tras analizar los perfiles de supervivencia para cada cepa de malaria murina empleada en el reto experimental de infección (figura 17), se observa que los péptidos **B1** y **B1An2** en el

reto experimental con la cepa de *Plasmodium berghei* ANKA, presentaron porcentaje de supervivencia del 75 % y 50 % respectivamente. Esto indica que tienen una mayor probabilidad de sobrevivir los animales que son inmunizados con estos péptidos, sumando a la evidencia obtenida en los perfiles de parasitemia anteriormente explicados.

Por otro lado, es de importancia resaltar los resultados obtenidos en los perfiles de supervivencia de los animales retados con la cepa de *Plasmodium yoelii* 17XL (figura 17), donde se resalta el desempeño del péptido **B1.1** el cual presenta un porcentaje de supervivencia del 50 % a partir del día 8 post infección, dando indicios de una presunta protección y funcionalidad como péptido nativo. No obstante, es de resaltar el desempeño del análogo **B1.1An5** el cual alcanzó una supervivencia del 20 % hasta el día 9 post infección, sugiriendo una posible protección asociada a la posición de esta modificación.

Figura 17. Perfiles de supervivencia para ratones BALB/c inmunizados con péptidos nativos derivados de MSP1 de *Plasmodium* spp y sus respectivos análogos, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA y *P. yoelii* 17 XL.





9.8. Evaluación de antigenicidad de sueros de ratón a través de inmunoensayo enzimático de adsorción (ELISA) indirecto

Los anticuerpos estimulados por la inmunización con las diferentes moléculas en estudio fueron determinados por inmunoensayo enzimático de adsorción (ELISA) indirecto bajo los siguientes lineamientos básicos:

- 1- La unión de péptidos como antígenos se llevó a cabo en un volumen de 100 μ L de solución de péptido de concentración 10 μ g/mL disueltos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,3, colocados por pozo en una caja de 96 pozos de fondo plano (Microtest IIITM Falcon F.A.S.T Cat: 3933) a 37 °C por una hora, con incubación toda la noche a 4 °C, para finalizar con una hora a 37 °C. Se realizó en pozos por duplicado para cada muestra de suero evaluada.
- 2- Posteriormente las cajas fueron lavadas 5 veces con solución de lavado (TweeN-20 al 0.1 % en buffer de fosfatos pH 7,0 PBS) y 2 veces con agua destilada. Se bloqueó los sitios de unión no específicos, por adición de 100 μ L de solución de bloqueo (leche descremada al 5 % en PBS) y se incubó una hora a 37°C. Las cajas se lavaron 5 veces con solución de lavado y dos veces con agua destilada.
- 3- A manera de tamizaje, se evaluó la totalidad de las muestras de suero post cuarta inmunización de los grupos de ratones que recibieron el esquema completo. Las muestras de suero se diluyeron individualmente a 1:100 en PBS-Tween 0.1 %, añadiéndose a las placas por duplicado e incubando durante 1 hora a 37 °C. La

antigenicidad de los análogos trabajados se determinó comparando el reconocimiento de los mismos por los sueros pre-inmunes y post-inmunización.

- 4- Posteriormente 100 μ L de anticuerpo secundario (conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, marca Vector Laboratories, catalogo: PI-2000, dilución 1:5000) fueron adicionados y las cajas incubadas y lavadas como ya se indicó. Para revelar se adicionaron 100 μ L de solución de revelado (TMB y H_2O_2 en dilución 1:1).
- 5- Los sustratos para ELISA TMB Thermo Scientific™ Pierce utilizados en este trabajo, detectan la actividad de la peroxidasa de rábano (HRP), produciendo un color azul ($\lambda_{máx} = 370 \text{ nm}$ y 652 nm) que cambia a amarillo ($\lambda_{máx} = 450 \text{ nm}$) tras añadir una solución de ácido fosfórico 0.1 M. Las densidades ópticas se determinaron usando un filtro de 450 nm en un equipo lector de microplacas Multiskan FC ThermoFisher. La cantidad medida es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico en la solución de ensayo.
- 6- Aquellos animales con mayor reconocimiento por los péptidos que estimularon los anticuerpos fueron titulados, colocando 100 μ L de cada una de las diluciones de las muestras de suero (Factor de dilución 1:2 desde 1:100 hasta 1:51200), mantenidas en incubación por una hora a 37 °C. Las cajas fueron lavadas 5 veces con solución de lavado y dos veces con agua destilada.

Todos los grupos de animales fueron inmunizados con los péptidos formulados para la primera dosis con Adyuvante Completo de Freund (ACF) y con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) en dosis posteriores, es decir, el primero de ellos contiene micobacterias, mientras que el segundo no las contiene. La funcionalidad de estos adyuvantes tiene como propósito prolongar el tiempo de vida útil del antígeno, ya que favorecen la formación de un depósito de liberación lenta y prolongada del antígeno en cuestión, lo que estimula y fomenta la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD4+ y la estimulación de células productoras de anticuerpos (Dunbar & Schwoebel, 1990).

El análisis inicial de la capacidad antigénica de los análogos, inicialmente se llevó a cabo a través de inmunoensayos como herramienta analítica, evaluando la reactividad de los sueros de cada ratón inmunizado, y determinar si existe reconocimiento de los antígenos sintéticos con los que fueron estimulados.

A continuación, en la tabla 5, se presentan los resultados del control de la parasitemia y la supervivencia de los animales en experimentación, antigenicidad y títulos de anticuerpos, resaltando aquellos animales que demostraron una diferencia estadísticamente significativa

con respecto a los animales inmunizados con suero pre-inmune. Además, los títulos de anticuerpos se determinaron como la dilución más alta a la que el péptido puede ser reconocido, teniendo en cuenta el valor medio de DO450 nm de los sueros pre inmunes \pm 3 desviaciones estándar (DE).

Las modificaciones sistemáticas de tipo amida reducida, realizadas a **B1**, indican que confiere una protección a los animales inmunizados a medida que la modificación avanza hacia el extremo C-terminal, lo que indica que dicha modificación se realiza sobre posibles motivos de unión o claves en el reconocimiento inmunológico. Así, la modificación M⁵¹-[CH₂NH]-V⁵² en **B1An4**, confiere una destacada protección a los animales con una respuesta diferencial en cuanto a su actividad antigénica e inmunogénica.

Tabla 5. Análisis general del perfil de protección y supervivencia de antígenos derivados de MSP1, frente al reto experimental. ^a Datos procesados en Graph Pad Prism 8.0.2. Análisis pareado todas las lecturas por grupo Pre-I vs Post 4ta. (p < 0.05*; p < 0.01**; p < .001***; p < .0001****).

Identificación antígenos			Control de Parasitemia	Supervivencia	Control de Parasitemia	Supervivencia	Antigenicidad ^a	Títulos de anticuerpos
Posición en la secuencia	Lugar de modificación	ID	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA		<i>Plasmodium yoelii</i> 17XL			
MSP138-58	Nativo	B1	(+)	(+)	(+)	(+)	**	1:400
	G-ψ[CH ₂ -NH]-Y	B1-An1	-	-	-	-	**	1:800
	Y-ψ[CH ₂ -NH]-S	B1-An2	(+)	(+)	-	-	**	1:51200
	L-ψ[CH ₂ -NH]-F	B1-An3	-	-	-	-	NS	1:3200
	M-ψ[CH ₂ -NH]-V	B1-An4	(+)	(+)	(+)	(+)	****	1:400
MSP142-61	Nativo	B1.1	-	-	(+)	(+)	**	1:200
	V-ψ[CH ₂ -NH]-L	B1.1-An1	-	-	-	-	*	1:100
	M-ψ[CH ₂ -NH]-V	B1.1-An2	-	-	-	-	**	1:100
	K-ψ[CH ₂ -NH]-M	B1.1-An3	-	-	-	-	**	1:12800
	E-ψ[CH ₂ -NH]-K	B1.1-An4	-	-	-	-	***	1:100
	K-ψ[CH ₂ -NH]-E	B1.1-An5	-	-	-	-	**	1:400

(+)	Perfil de protección destacado para el reto experimental
-	No presenta protección especial o de relevancia con respecto al control

Por otro lado, el análogo ⁴³Y-ψ[CH₂NH]-S⁴⁴ en **B1An2**, ha sido descrito por Bastian y colaboradores como determinante para el reconocimiento por linfocitos T en el contexto de HLA humano (Bastian et al., 2004), identificado como un epítoto inmunodominante con

capacidad para modular la respuesta inmune en el modelo animal evaluado, lo que es congruente con el comportamiento *in vivo* y *in vitro* en los experimentos realizados.

Para las modificaciones $^{42}\text{G}-\psi[\text{CH}_2\text{NH}]-\text{Y}^{43}$ del análogo **B1An1** y $^{46}\text{L}-\psi[\text{CH}_2\text{NH}]-\text{F}^{47}$ de **B1An3**, no presentan una modulación clara de la infección, en las condiciones de estudio aquí ejecutadas.

Por otro lado, las modificaciones de la familia **B1.1**, indican que solo el péptido nativo presenta una protección relevante en resto con la cepa de *Plasmodium yoelii* 17XL. Por otro lado, las modificaciones realizadas en el par de aminoácidos M⁵¹-V⁵² para el péptido **B1.1An1** y **B1.1An2**, muestran un aumento significativo en el título de anticuerpos, reforzando la relevancia de las modificaciones tipo amida reducida en el epítipo $^{48}\text{KEK}^{\text{MV}52}$ (Lozano et al., 2004).

El incremento del título de anticuerpos de los péptidos propuestos sugiere que ambas familias de análogos indujeron clones de linfocitos B secretores de anticuerpos. Es decir, se demostró a través de la reacción de reconocimiento inmunológico indirecto (ELISA) la capacidad de los péptidos para inducir en ratones la producción de anticuerpos protectores frente a una infección experimental de *Plasmodium* spp.

En general, los sueros de los grupos de ratones inmunizados con análogos, se detectaron niveles de anticuerpos específicos mayores, con respecto a los niveles de anticuerpos detectados en el suero de ratones inmunizados con péptido nativo correspondiente, exceptuando el caso de la familia **B1.1**, que en general presentó títulos de anticuerpos similares con respecto al péptido nativo. Es importante resaltar en el caso del análogo **B1.1An3**, el título de anticuerpos es muy superior al péptido **B1.1**, coincidiendo con el motivo $^{48}\text{KEK}^{\text{MV}52}$, lo que ratifica que las modificaciones tipo amida reducida tienen un efecto potenciador en el reconocimiento del péptido en la sinapsis inmunológica.

10. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular frente a análogos derivados de MSP1

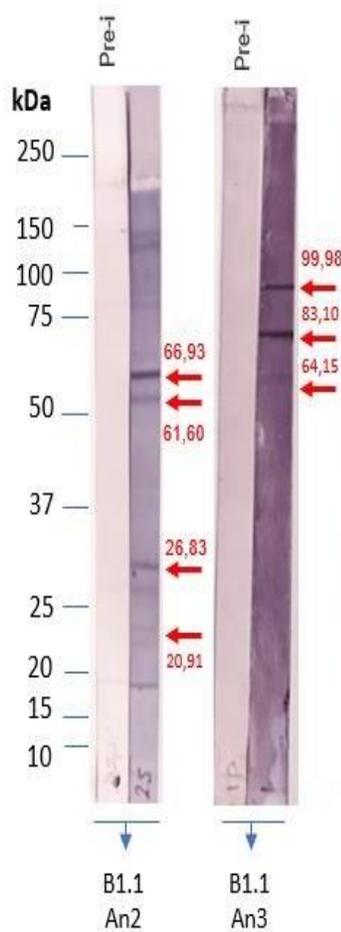
Empleando como fuente de antígeno cultivos continuos de *Plasmodium falciparum* de la cepa de referencia 3D7, se obtuvieron membranas de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa de 0,4 cm de ancho fueron incubadas con los sueros pre inmunes (control) y sueros post 4ta inmunización, de todos los ratones sometidos a esquemas de inmunización. Se emplearon en dilución 1:100 durante toda la noche a 4 °C, con posteriores lavados con PBS–Tween 20 - 0,05 %.

El anticuerpo secundario anti-IgG de ratones acoplado a peroxidasa de rábano (HRP - Horseradish Peroxidase) Vector Laboratories Cat. N° PI-2000, Lote X0328 producido en caballo, en dilución 1:5000 fue incubado por 3 horas, posteriormente las membranas se lavaron cuidadosamente y se revelaron según instrucciones del fabricante Vector®, Peroxidase (HRP), Substrate Kit SK-4600 / BCIP/NBT Substrate Kit SK 5400. El desarrollo del color fue detenido con agua.

10.1. Reactividad de modificaciones no naturales en antígenos de *Plasmodium* spp, por sueros murinos, mediante análisis *Western blot*.

Los anticuerpos policlonales generados tras la estimulación en los ratones por los esquemas de inmunización, fueron evaluados a través análisis de transferencia *Western blot*, para determinar la reactividad frente a proteínas de lisados de esquizontes de *P. falciparum* cepa 3D7, provenientes de cultivos continuos y resueltas. Los experimentos revelaron bandas de reconocimiento únicamente para los sueros de los ratones inmunizados con **B1.1 An2** y **B1.1 An3**, como se observa en la Figura 18.

Figura 18. Reactividad de anticuerpos séricos de ratones BALB/c inmunizados con epítopes modificados, frente a la cepa 3D7 por *Western blot*. Resultados comparativos pre inmune (banda izquierda) y post inmunización (banda derecha) para cada pareja.



Tras el análisis del perfil de reconocimiento de los sueros de ratón, sometidos al reconocimiento por el lisado de proteínas de *P. falciparum* en experimentos de *Western blot*, permitió identificar que las secuencias peptídicas **B1.1 An2** y **B1.1 An3** mostraron relevancia en el reconocimiento antigénico con sueros murinos, mostrando bandas de reconocimiento con una movilidad relativa en 99.98, 83.10, 26.83 y 20.19 kDa respectivamente, indicando un reconocimiento de fragmentos proteolíticos asociados a MSP1, demostrando el potencial inmunogénico de los péptidos modificados frente a antígenos de cepas que infectan a humanos.

10.2. Reactividad de modificaciones no naturales en antígenos de *Plasmodium* spp frente a sueros humanos, a través de inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto.

Los anticuerpos estimulados por la infección natural en individuos de zonas endémicas de malaria en Colombia y su antigenicidad frente a secuencias en estudio, fueron determinados por inmunoensayo enzimático de adsorción (ELISA) indirecto bajo los siguientes lineamientos básicos:

- La funcionalización de las placas de 96 pozos y el protocolo general se llevó a cabo como se indicó en apartados anteriores. Cada muestra de suero humano fue evaluada en dilución 1/200 por duplicado.
- La antigenicidad de los análogos trabajados se determinó comparando el reconocimiento de estos, por los sueros control y los sueros de pacientes catalogados como positivo para infecciones por *Plasmodium* spp (lo cual fue criterio de inclusión).
- Posteriormente 100 μ L de anticuerpo secundario (conjugado anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa, Marca Vector Laboratories, Catalogo: PI-3000, dilución 1:5000) fueron adicionados y las cajas incubadas y lavadas como ya se indicó. Para revelar se adicionaron 100 μ L de solución de revelado (TMB y H₂O₂ en dilución 1:1), la lectura se realizó a 450 nm en un equipo lector de microplacas Multiskan FC ThermoFisher.

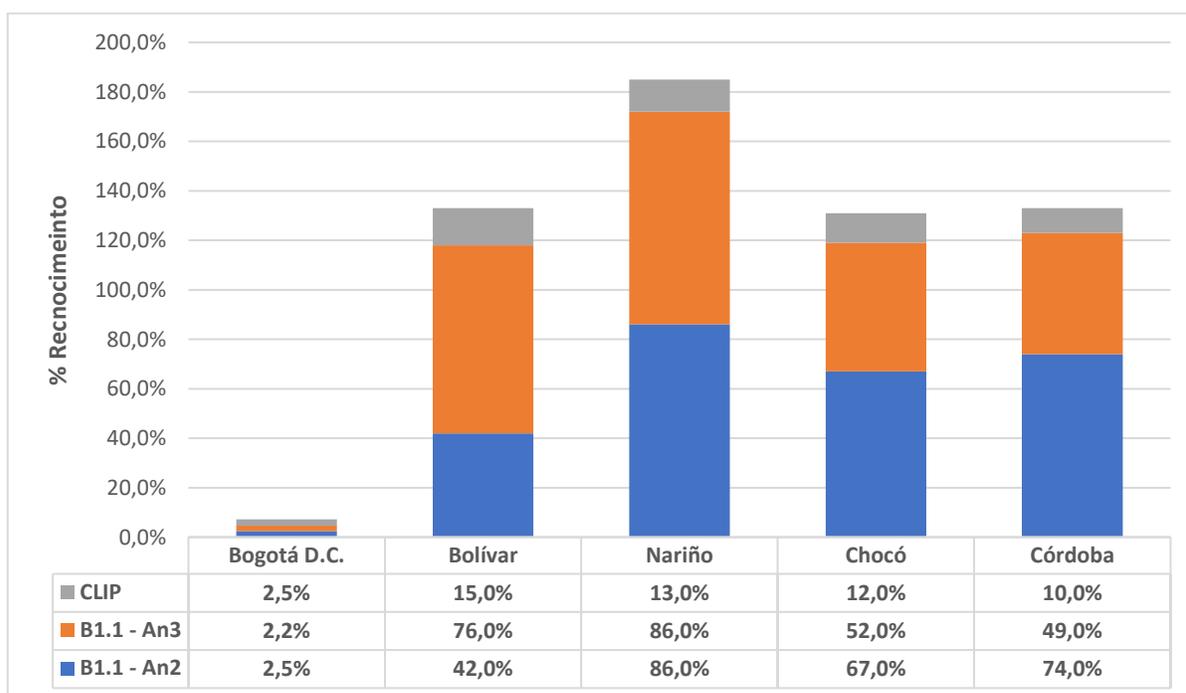
Los datos de los experimentos ELISA y los índices de estimulación de los ensayos de citometría, fueron sometidos a pruebas de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, disponible en <http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>. Para comparar la antigenicidad en inmunoensayos y/o la estimulación de citoquinas de los diferentes péptidos con respecto a las muestras empleadas como control, se emplearon test de comparaciones múltiples para datos paramétricos y no paramétricos según el caso. Las gráficas y el análisis estadístico fueron desarrollados en el software Graph Pad Prism 8.0.2 (San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>), $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$ y $p < 0.0001^{****}$ se consideraron significativos.

El panel de secuencias seleccionadas fue probado contra los 238 sueros de personas expuestas a malaria. Los anticuerpos séricos IgG presentaron reconocimiento específico

por los péptidos **B1.1 An2** y **B1.1 An3**, a diferencia de los sueros de individuos de zonas no endémicas de malaria, usados como control.

A continuación, en la figura 19, se relacionaron el porcentaje de reconocimiento de sueros humanos para cada péptido, en las cuatro zonas endémicas de estudio. Es interesante observar que, en la mayoría de los casos el reconocimiento se acerca o supera el 50 %, además que los sueros provenientes de lugares de alta trasmisión de malaria como son Tierralta, Nuquí, y Tumaco, mostraron un reconocimiento destacado para la mayoría de los análogos.

Figura 19. Porcentaje de reconocimiento por pruebas ELISA de los sueros humanos.



Consolidado por zona endémica. Total: 251 muestras. El reconocimiento positivo se definió como aquellos que tenían DO por encima de la media más 3 Desviaciones Estándar de 13 sueros de control, y como control negativo se empleó el péptido de la cadena invariante asociado a clase II (CLIP).

Es de importancia resaltar que los sueros provenientes de Bolívar presentan un reconocimiento significativamente mayor con los análogos, en contraste con el reconocimiento con el lisado de la cepa *Plasmodium falciparum* 3D7, realizada al inicio para la caracterización de los sueros (Figura 5). Los resultados sugieren que los análogos de la

familia **B1.1**, presentan un reconocimiento superior sugiriendo la importancia y relevancia en la selección de epítopes de origen no natural.

10.3. Determinación experimental de perfiles de respuesta inmune TH1/TH2 en esplenocitos de ratones inmunizados

Aquellos animales que superaron los veinte días como ventana de observación del reto experimental con dosis letales de cepas de malaria murina, fueron sacrificados y de manera aséptica se les realizó esplenectomía según (Coligan, et al., 2007).

Se efectuó perfusión repetida con medio de cultivo RPMI 1640 estéril al órgano aislado y se obtuvo una suspensión celular que se centrifugó a razón de 1200 rpm x 5 min. El botón de células se congeló en solución crio-preservante (30 % RPMI + SFB 60 % + DMSO 10 %) a -80 °C hasta su uso. Las células fueron descongeladas y dispuestas en cajas de 24 pozos a razón 5x10⁶ células para cada pozo, con RPMI 1640 suplementado (penicilina 100 UI/mL, estreptomina 10 mg/mL, SFB al 10 %), a 37 °C / 5 % de CO₂ y fueron estimuladas con 200 nM del péptido correspondiente e incubados por 48 y 72 horas (Fonseca et al., 2016). Los sobrenadantes de cultivo fueron empleados para la cuantificación de citoquinas con el kit BD™ CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (Catalog No. 551287).

Brevemente, se realizó una curva de calibración empleando los estándares, en un rango de entre 0 y 5000 pg/mL, todas las diluciones fueron preparadas con el diluyente del kit comercial. Adicionalmente se preparó la mezcla de perlas de captura que incluía IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-2.

El montaje experimental consistió en hacer reaccionar 50 μ L de cada muestra por 3 horas, en proporción 1:1 con la mezcla de perlas de captura y el reactivo de detección ficoeritrina (PE). Se empleó fitohemaglutinina (PHA) como control positivo de estimulación.

Posterior a la remoción del exceso de anticuerpo de detección no unido, la fluorescencia producida se midió en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences). Los datos fueron procesados con el software Graph Pad Prism 8.0.2. La intensidad de fluorescencia fue proporcional a la concentración de citoquinas en la muestra y se cuantificó cada una a partir de su curva estándar.

Con la finalidad de determinar y validar la existencia de una respuesta celular y determinar la expresión de diferentes citoquinas asociadas a linfocitos Th1/Th2, se obtuvieron células

del bazo de ratones BALB/c previamente inmunizados con las secuencias peptídicas en estudio y que mostraron una relevancia inmunológica en retos experimentales anteriores.

En este experimento se determinó la expresión de TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-2, en sobrenadantes de cultivo de las células aisladas y estimuladas *in vitro* a diferentes tiempos, tras emplear la misma concentración de la molécula inmunogénica. La cantidad de citoquinas expresadas por las células fueron expresadas en pg/mL, y fue determinada a partir de curvas de calibración usando citoquinas recombinantes de ratón de concentración conocida (incluidas en el kit comercial, BD™ CBA Mouse Th1/Th2 Cyokine Kit (Catalog No. 551287). Adicionalmente, se emplearon como control basal de expresión de citoquinas, células provenientes de ratones no inmunizados, pero sometidos al reto infeccioso. En la tabla 6 se reportan los niveles de citoquinas determinadas en algunos de los sobrenadantes de cultivo de células que responden a la estimulación.

Adicionalmente, los datos se normalizaron para cada conjunto de células estimuladas, con el fin de calcular el Índice de Estimulación (IE) como se reporta en (Florez et al., 2021), dividiendo los resultados de las células estimuladas con cada antígeno entre las células provenientes de animales sin estimulación.

Tabla 6. Perfil de estimulación de citoquinas estimuladas por inmunización con péptidos nativos y análogos

	Muestra	TNF [pg/mL]	IFN [pg/mL]	IL-2 [pg/mL]	IL-4 [pg/mL]	IL-5 [pg/mL]	Perfil de Respuesta
		PHA	6,35	139,86	366,31	17,98	
	Control	3,80	1,18	17,01	4,73	ND	
Estimulación 48 horas	B1	15,16	2,32	202,04	9,29	33,86	Th1
	B1An4	ND	1,12	ND	3,31	ND	Th1/Th2
	B1An2	3,59	1,22	79,29	8,08	1,05	Th1
	B1.1	25,07	1,25	108,78	5,65	3,25	Th1
	Control	3,61	1,06	ND	4,85	ND	
Estimulación 72 horas	B1	22,44	1,39	38,44	3,86	2,68	Th1
	B1An4	ND	1,05	ND	3,73	ND	Th1/Th2
	B1An2	ND	1,26	118,65	6,01	3,41	Th1
	B1.1	9,97	1,14	15,60	6,07	6,34	Th1/Th2

ND: No Determinado; Control: Células de ratones sometidos al reto experimental, pero no estimuladas *in vitro* (niveles casales de citoquinas); PHA: Control positivo de estimulación linfocítica.

El perfil de estimulación de citoquinas sugiere que algunos de los péptidos y análogos estimulan predominantemente linfocitos con perfil **Th1** al provocar respuestas de las citoquinas **IL-2**, **TNF- α** , e **IFN- γ** , con una diferencia significativa respecto al grupo control.

Esto sugiere que los linfocitos no exhiben tendencia hacia un perfil **Th2**, por lo que podrían estar dando paso a respuestas articuladas de tipo humoral y celular, como lo describe (Stevenson & Riley, 2004). Una excepción la constituyen el péptido **B1**, que presentan diferencias en la estimulación de estas citoquinas respecto al control. Además, es importante resaltar, una relación de proporcionalidad directa, con cada dosis de inmunógeno suministrado al cultivo *in vitro*, al apreciarse una expresión mayor de citoquinas en cada inmunización.

Estos resultados sugieren la importancia del potencial antigénico y protector de los péptidos con modificaciones tipo amida reducida, en el contexto de una infección por *Plasmodium* spp que exige un conjunto de respuestas mediadas por células y por anticuerpos.

11. Estudio de acoplamiento molecular de péptidos nativos y análogos derivados de la proteína MSP1

11.1. Requisitos y consideraciones previas

Para la ejecución del presente estudio *in silico* es necesario la implementación de una maquinaria computacional capaz de soportar y ejecutar el estudio, con la menor posibilidad de aproximaciones y errores en la ejecución matemática del cálculo, permitiendo un adecuado y óptimo flujo de trabajo.

Para el presente estudio se seleccionó un equipo de trabajo, con las capacidades suficientes (Tabla 7) para ejecutar de manera correcta y óptima los softwares de alistamiento, preparación y ejecución de un estudio típico de acoplamiento molecular;

Tabla 7. Especificaciones equipo empleado en estudio

Sistema Operativo	Procesador	RAM	Disco Duro
Linux Ubuntu versión 11.0 - 2022	Intel Core i9 – Novena Generación	Físico: 16 Gb	Partición Home: 700 Gb
		Virtual: 16 Gb	Partición Raíz: 300 Gb
		Total: 32 Gb	Total: 1000 Gb (1Tb)

11.2. Descarga y obtención de archivos primarios

La información empleada como *in put*, para el presente estudio se extrajo de dos fuentes principales. La primera fue las bases de datos de estructuras de proteínas, Protein Data Bank – PDB, de la cual se obtuvieron los archivos “.pdb” para el complejo mayor de histocompatibilidad HLA, tanto de resistencia como de sensibilidad, codificados en la base de datos como, (HLADRB10101) 1AQD y (HLADRB10401) 5JLZ, respectivamente. También se descargó el archivo de trabajo PDB del T- Cell Receptor – TCR, codificados en la base de datos como 1J8H y el archivo del “Péptido Nativo ⁴²GYSLFQKEK MVLNEGTS GTA⁶¹ codificado en el PDB como 2MU7.

La segunda fuente de los archivos PDB empleados en el estudio, correspondientes a los archivos de los péptidos modificados **B1.1 An1** y **B1.1 An2**, los cuales fueron obtenidos de los datos experimentales de estructura determinada por resonancia magnética nuclear-RMN publicados por (J.M. Lozano, 1998).

El **B1.1** con la secuencia, $^{42}\text{GYSLFQKEKMLNEGTSFTA}^{61}$, no presenta modificaciones químicas en su estructura, es decir, la sección de 20 aminoácidos no tiene ninguna modificación química, como reducción u oxidación o cambio de estereoquímica cada uno de los 20 aminoácidos que conforman la cadena peptídica pertenecen al grupo de los aminoácidos proteicos, canónicos o naturales, dando como resultado una estructura altamente helicoidal, Figura 20.

Sin embargo, para los péptidos modificados **B1.1 An1** y **B1.1 An2**, uno de los aminoácidos de la cadena peptídica presenta reducción tipo amida reducida. Para el péptido **B1.1 An1** la reducción se da en el carbonilo de la valina 11, definiendo la siguiente estructura para el péptido, $^{42}\text{GYSLFQKEKMV-}\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{LNEGTSFTA}^{61}$, Figura 21.

Y para el péptido **B1.1 An2** la reducción se da en el carbonilo de la metionina 10, definiendo la siguiente estructura para el péptido, $^{42}\text{GYSLFQKEKM-}\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{VLNEGTSFTA}^{61}$, Figura 22.

La flexibilidad que proporciona cada uno de estas modificaciones en la estructura nativa del péptido, se ve reflejado en el cambio de estructura terciaria del péptido nativo, pasando de una forma altamente helicoidal, a una forma de Hojas-Beta más flexible y con mayor libertad de movimiento, lo que en principio permitiría un acoplamiento diferente en el bolsillo del complejo mayor de histocompatibilidad.

Figura 20. Conformación tridimensional PepMSP-1⁴²⁻⁶¹: Presenta una conformación latamente helicoidal. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 12 puentes de hidrogeno intramoleculares.

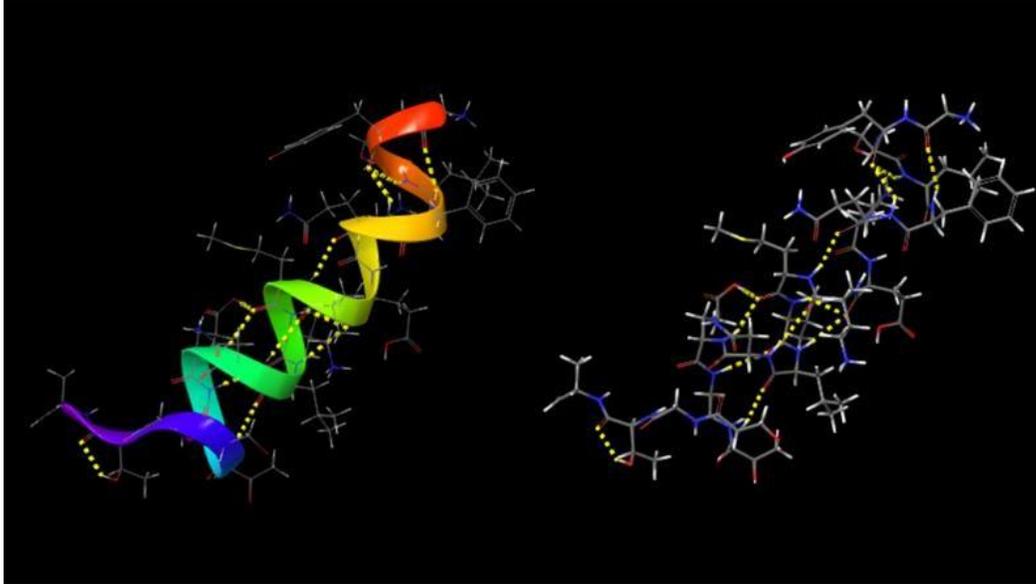


Figura 21. Conformación tridimensional péptido PepMSP-1⁴²⁻⁶¹-Val⁵²-Leu⁵³: Presenta una conformación helicoidal hasta el aminoácido modificado (valina 11, reducida). la conformación posterior a este aminoácido adquiere conformación Beta. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 8 puentes de hidrogeno intramoleculares.

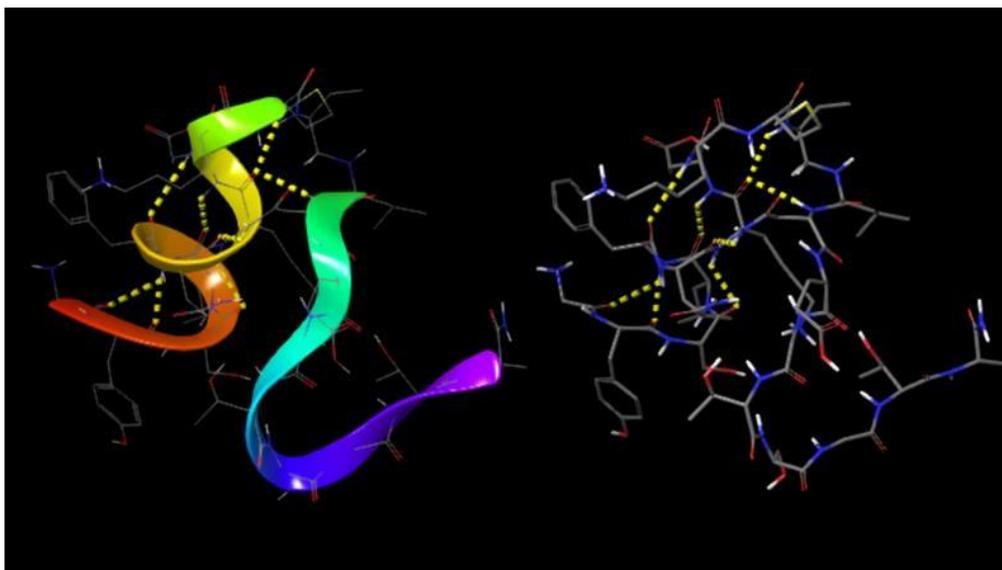
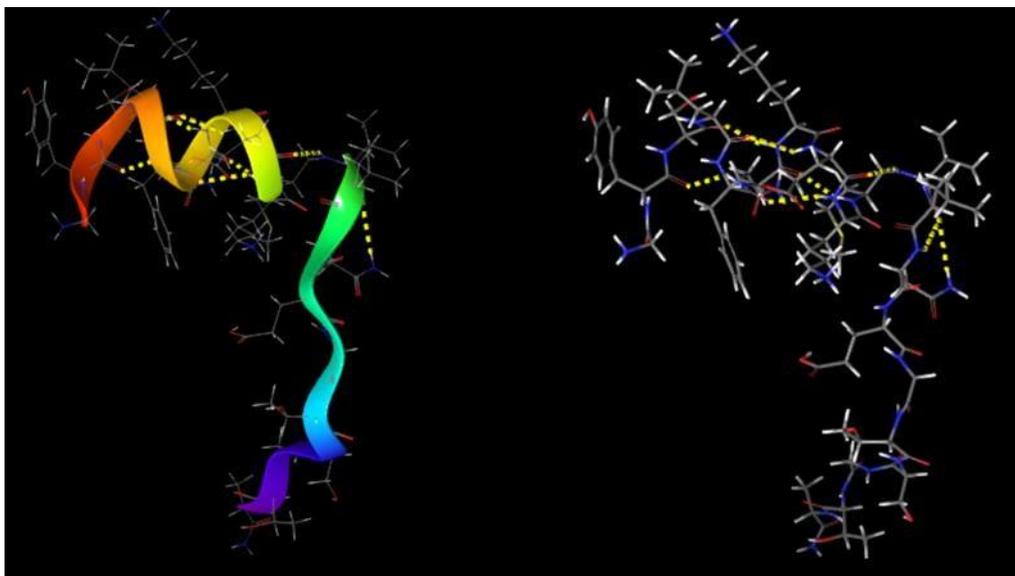


Figura 22. Conformación tridimensional péptido PepMSP-1⁴²⁻⁶¹-Met⁵¹-Val⁵²: Presenta una conformación helicoidal hasta el aminoácido modificado (metionina 10, reducida), la conformación posterior a este aminoácido adquiere conformación Beta. Extremo amino termina (rojo) y extremo carboxilo termina (violeta). Se observan 8 puentes de hidrogeno intramoleculares.



11.3. Preparación archivos PDB receptor - péptido

Tras la obtención y descarga de los archivos pdb, se ajustaron los archivos tanto para los péptidos de estudio como los receptores. Para cada uno de los archivos inicialmente se realizó una minimización de energías, con la finalidad de ajustar las cadenas laterales, hidrógenos faltantes y asignación de cargas formales que lo requirieran a un pH de 7,0. Esta preparación se realizó a través del software bajo licencia académica Maestro by Schrödinger (Maestro | Schrödinger schrodinger.com; Lanzamiento de Schrödinger 2022-2: Maestro, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2021.), ajustando los parámetros anteriormente mencionados, a condiciones estándar, para evitar asignar cargas no deseadas o modificaciones que predeterminaran el proceso de acoplamiento a un resultado en particular.

Adicionalmente, como preparación antes del cálculo de acoplamiento, se realizó para cada uno de los péptidos, únicamente, un cálculo de dinámica molecular de 2 ns, con la finalidad de relajar la estructura y orientar los átomos a la conformación más estable a una

temperatura de 310.15 k, con una concentración de 0.015 M de KCl. El cálculo de dinámica molecular fue realizado con el software GROMACS versión para Linux ajustado con parámetros estándar, como se indica en el manual (Acerca de GROMACS — Página web <https://www.gromacs.org> documentación de GROMACS). GROMACS es Software Libre, disponible bajo la GNU Lesser General Public License (LGPL), versión 2.1. Puede redistribuirlo y/ o modificarlo bajo los términos de la LGPL publicado por la Free Software Foundation; ya sea la versión 2.1 de la Licencia, o (a su elección) cualquier versión posterior.

Para la preparación de los archivos *in put* del cálculo de dinámica molecular por GROMACS, se empleó como herramienta el servidor web CHARMM-GUI.COM ([CHARMM-GUI](#)), con el cual se generan los archivos de coordenadas con los parámetros deseados, para iniciar el cálculo de la dinámica. Tras obtener los archivos posteriores a la ejecución de la dinámica molecular, se procesaron nuevamente para retirar las moléculas de agua y los iones de KCl, y así obtener una estructura libre de iones o molecular de agua, para evitar interferentes en el cálculo de acoplamiento. El ajuste de las estructuras se realizó con el software bajo licencia académica PyMOL by Schrödinger (PyMOL pymol.org; sistema de gráficos moleculares PyMOL, versión 2.0 Schrödinger, LLC.)

11.4. Estudio de acoplamiento molecular

El estudio molecular se realizó bajo la plataforma online ZDOCK, bajo licencia académica exclusivamente (ZDOCK Server: Referencias (umassmed.edu)). Los archivos obtenidos en los pasos de preparación y posterior a la dinámica molecular, fueron directamente cargados en la plataforma, en tres etapas. Inicialmente se carga el archivo correspondiente al receptor, posteriormente se carga el archivo correspondiente al péptido (sea el péptido nativo o modificado) y finalmente se carga un tercer archivo “.txt” donde se indica los residuos activos o implicados en el reconocimiento molecular receptor-péptido, con el objetivo de indicar al algoritmo de acoplamiento que aminoácidos están implicados en posibles uniones tanto en el receptor como en el péptido, simplificando el tiempo del proceso.

Al finalizar el tiempo requerido para el acoplamiento, se genera y descarga el archivo comprimido de compilación de las 1000 estructuras de los posibles acoplamientos, donde varían la forma y la orientación del péptido en la hendidura o sitio activo del receptor. Dicho archivo se emplea como *in put* a un segundo programa de refinamiento, FiberDock,

([FiberDock Server \(tau.ac.il\)](http://FiberDock.Server(tau.ac.il))) el cual refinar el ajuste del péptido en el bolsillo activo del HLA, a través del movimiento y orientación de las cadenas laterales, y flexibilizando la columna vertebral del péptido, tomando como referencia los 1000 modelos propuesto, por el algoritmo de ZDOCK.

NOTA: para el estudio de acoplamiento en ZDOCK, las condiciones fueron estándar y se restringió la unión del receptor a todos los aminoácidos del péptido en particular, es decir, se indicó al programa que todos los 20 aminoácidos que hacen parte de péptido tienen la misma posibilidad de unión al HLA. Por otro lado, para el complejo mayor de histocompatibilidad HLA (receptor) se restringió un conjunto de aminoácidos, tanto en la cadena alfa como la beta, los cuales se encuentran reportados en la literatura como claves en el reconocimiento de antígenos, como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Bolsillos fundamentales en la activación del receptor HLA clase II y los correspondientes aminoácidos que los conforman (W.A Agudelo, 2010).

Posición relativa en el Bolsillo	Residuos que forman el Bolsillo de la Cadena Alfa	Residuos que forman el Bolsillo de la Cadena Beta
1	7,32,34,43	85,86,89,90
4	9	13,70,71,74,78
6	11,62,65,66	9,11,13
7	No participa	28,47,61,67,71
9	69,72,73,76	9,71

11.5. Dinámica molecular y refinamiento final

Como etapa final se ejecuta un cálculo de dinámica molecular sobre las estructuras representativas para cada uno de los acoplamientos estudiados, es decir, para cada uno de los péptidos, nativo y modificados, junto con los dos receptores acoplados (HLA + Péptido + TCR). Para la dinámica final que contempla la interacción molecular completa se emplea el software GROMACS bajo los siguientes ajustes de parámetros:

- Temperatura: 310.15k
- Campo de fuerza: CHARMM36m
- Concentración de KCl: 0.015M
- Tamaño de caja: estándar y ajustada al tamaño de cada complejo
- Presión: constante 1 atm

11.6. Visualización y análisis de las estructuras finales

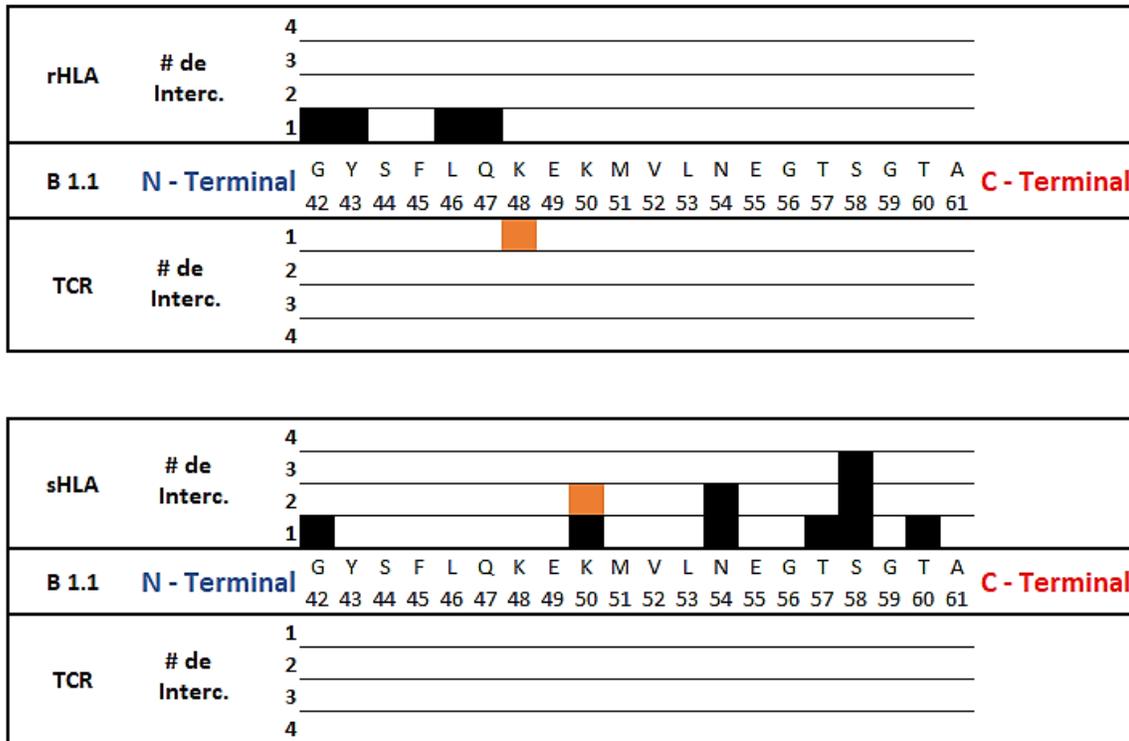
La visualización de las estructuras se realizó a través de Maestro by Schrödinger, ajustando la estructura visualmente y así poder identificar, puentes de hidrógeno, interacciones pi-pi y puentes salinos, considerado como las interacciones de mayor relevancia en el presente estudio, partiendo de la cantidad y presencia de nuevas interacciones, comparadas con el péptido nativo.

11.7. Predicción de la interacción molecular de un péptido nativo y análogos de la proteína MSP1 con HLA clase II y TCR

El estudio de acoplamiento molecular, determino las posibles interacciones del reconocimiento molecular del péptido **B1.1** y los análogos **B1.1 An1** y **B1.1 An2** en la sinapsis inmunológica conformada entre el complejo mayor de histocompatibilidad clase II y el receptor de linfocitos T.

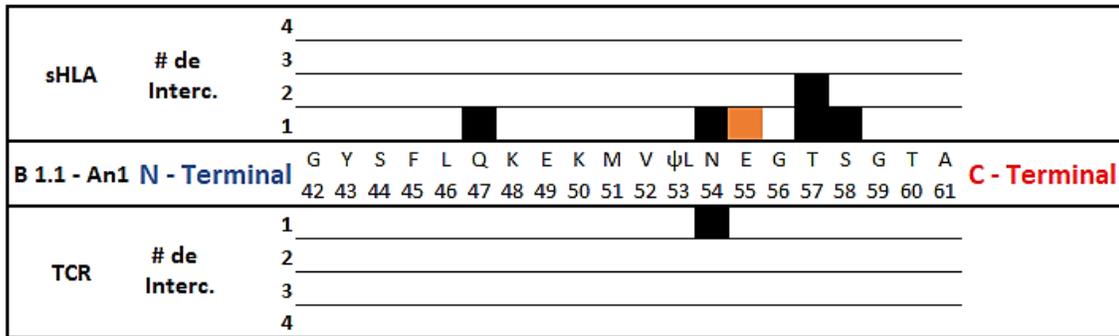
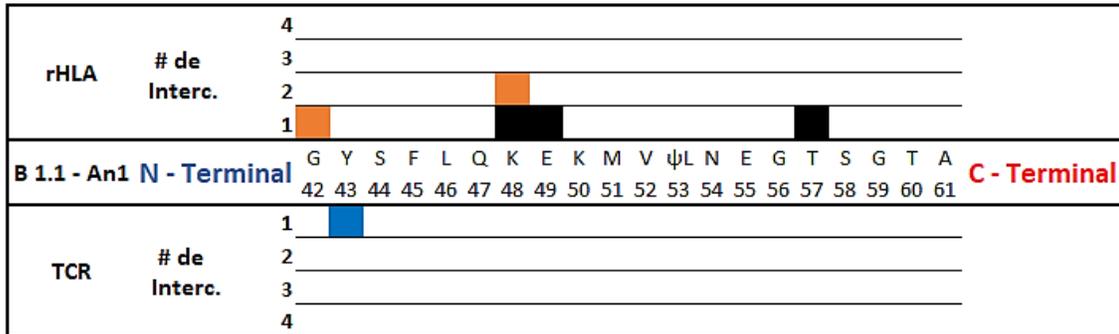
En primera instancia el reconocimiento del péptido nativo **B1.1**, para lo alelos de sensibilidad y resistencia del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, sugiere que el acoplamiento del péptido nativo, presenta una mayor cantidad de interacciones (puentes de hidrógeno y puentes salinos) con el HLA clase II de sensibilidad, con un total de 10 interacciones y uno menor con el HLA II de resistencia, con un total de 4 interacciones, como se observa en la figura 23. Sin embargo, cada una de una de estas interacciones se asocia con aminoácidos que conforman los bolsillos de unión o “pockets”, (tabla 8), relacionados con la activación del receptor HLA clase II, sugiriendo que el péptido nativo B1.1 es claramente reconocido por la hendidura del complejo mayor de histocompatibilidad.

Figura 23. interacciones sHLA-B1.1-TCR y rHLA-B1.1-TCR, péptido nativo B1.1 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul



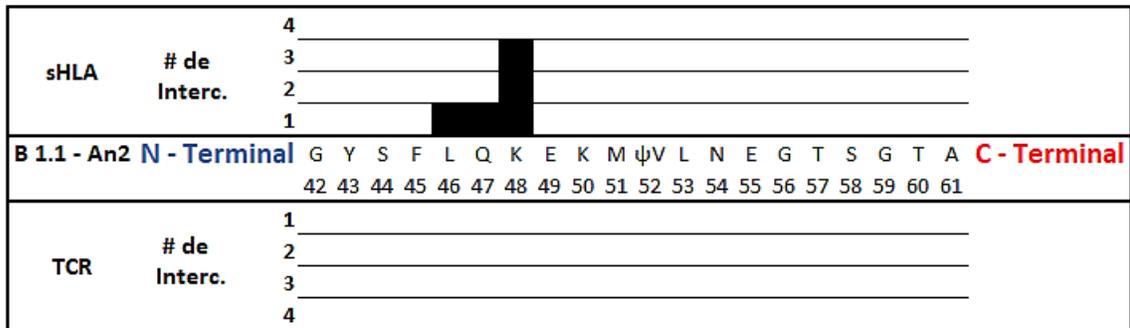
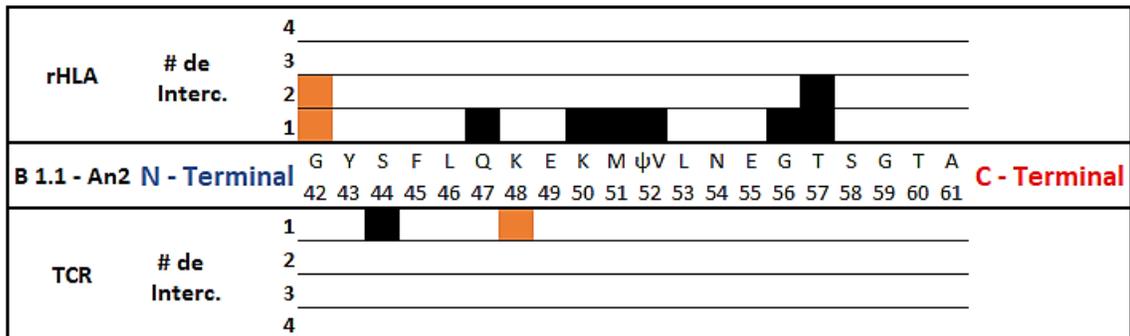
El acoplamiento del análogo **B1.1 An1**, muestra una pérdida de interacciones con en el HLA clase II de sensibilidad, como se muestra en la figura 24, en la zona próxima a la modificación, sin embargo, facilita aparentemente el anclaje del péptido por disminuir la conformación altamente helicoidal del péptido nativo, dando origen a un nuevo puente de hidrógeno con un residuo perteneciente al bolsillo activo 1, del HLA clase II. En cuanto a las interacciones con el HLA clase II de resistencia se observa la nueva formación de 3 puentes de hidrógeno asociados a residuos del bolsillo 6 y 9 próximo a la modificación, indicando que la pérdida de la estructura altamente helicoidal favoreció la pérdida de interacciones, pero favoreció la aparición de nuevas interacciones en otras zonas del péptido.

Figura 24. interacciones sHLA-B1.1 An1-TCR y rHLA-B1.1 An1-TCR, péptido nativo B1.1 An1 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul



Para el segundo análogo **B1.1 An2**, el acoplamiento molecular con el HLA clase II de sensibilidad, muestra un incremento considerable en la formación de puentes de hidrógeno, incluso se llegaron a formar puentes de hidrógeno en la modificación $^{51}\text{M}-\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]\text{-V}^{52}$, indicando que esta permitió la exposición de cadenas laterales antes ocultas por la conformación helicoidal del péptido nativo, forman puentes de hidrógeno con residuos del bolsillo 4, como se observa en la en la figura 25. En cuanto a las interacciones con el HLA clase II de resistencia se observa una pérdida de puentes de hidrógeno al compararlo con su homólogo nativo, sin embargo, como se presenta en todos los casos, las nuevas interacciones se dan con residuos pertenecientes a los sitios activos de HLA clase II, en este caso con el bolsillo 4 y 6.

Figura 25. interacciones sHLA-B1.1 An2-TCR y rHLA-B1.1 An2-TCR, péptido nativo B1.1 An2 Puente de hidrógeno: negro; Puente salino: naranja; Interacción π : azul



Como se indicó en el protocolo, tras el acoplamiento molecular entre el péptido de estudio y el HLA clase II, se procede a ejecutar los cálculos de acoplamiento molecular con el receptor de linfocitos T y estudiar las posibles interacciones en la presentación del péptido a los linfocitos T colaboradores. (A.K. Abbas. 2004)

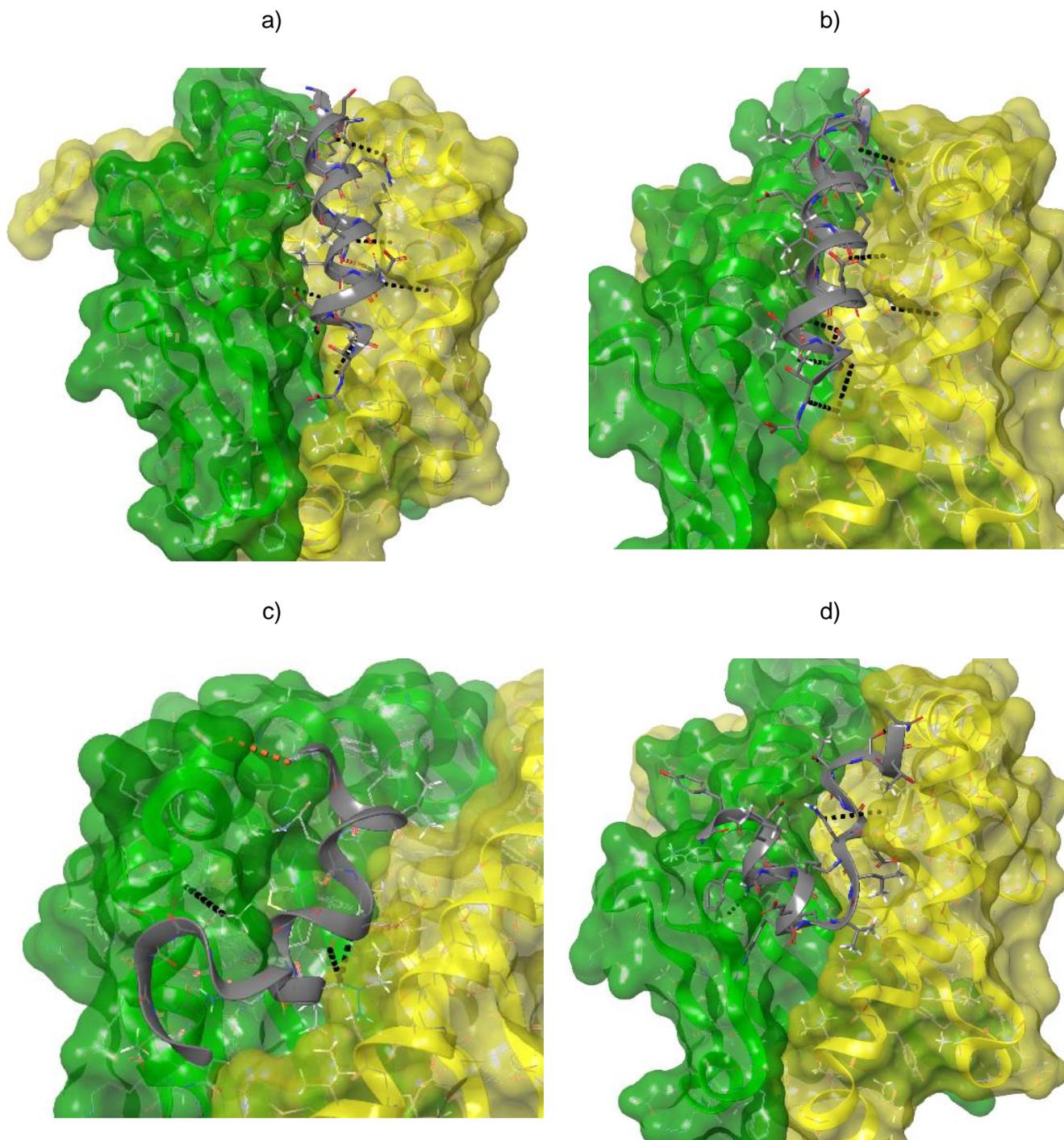
El acoplamiento molecular del complejo **B1.1- HLA clase II**, tanto de sensibilidad como de resistencia evidencian una formación reducida de puentes de hidrógeno, en comparación con la interacción dada con el HLA clase II. Como se muestra en la figura 23 la interacción para el HLA clase II de sensibilidad con el TCR no presenta ninguna interacción lo que sugiere que no se existe un reconocimiento por parte del receptor de linfocitos T, sugiriendo una pobre o nula presentación de péptido en la sinapsis inmunológica. Por otro lado, para la interacción dada con el HLA clase II de resistencia y el TCR, se evidencia la formación de un puente salino, lo que sugiere un reconocimiento por parte del TCR.

Para el complejo **B1.1An1-HLA clase II** y **B1.1An2-HLA clase II**, se observan la formación de diferentes interacciones ya sea de puentes de hidrogeno, como interacciones $\pi - \pi$ y

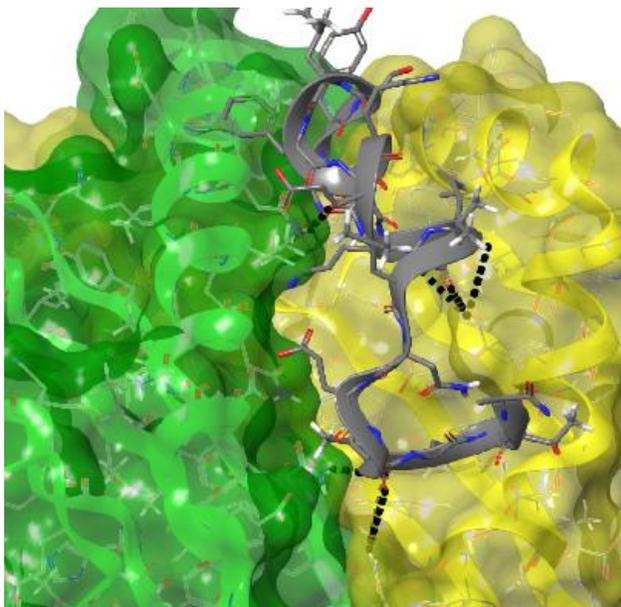
puentes salinos, sugiriendo que las modificaciones tienen la capacidad de favorecer la interacción en la presentación del antígeno a los linfocitos T, como se observa en la figura 24. Sin embargo, es de importancia resaltar la ausencia de formación de interacciones en **B1.1An2-HLA clase II** de resistencia, indicando que el TCR no reconoce la presentación del péptido como se observa en la figura 25.

Finalmente, el estudio de acoplamiento molecular permitió estudiar la influencia de los péptidos nativos y análogos derivados de la proteína MSP1. Y como estas modificaciones influyeron estructuralmente en el reconocimiento por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, permitiendo una orientación e interacción del péptido en los bolsillos activos de la hendidura de reconocimiento. Adicionalmente también se evidencia la exposición de cadenas laterales ocultas, asociado a la estructura altamente helicoidal de péptido nativo **B1.1**. En general los resultados del estudio de acoplamiento molecular *in silico*, sugieren una evidencia clara y contundente de las ventajas de las modificaciones tipo amida reducida, en el reconocimiento antigénico de la respuesta inmune. Para fines informativos del experimento ver Anexo 8.

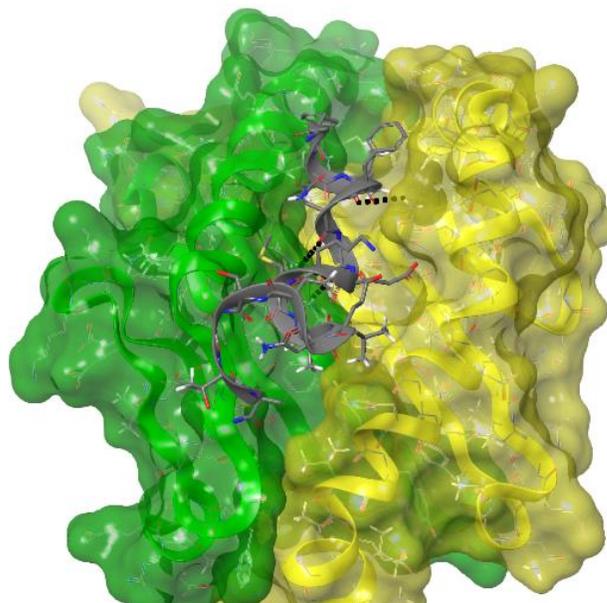
Figura 26. Representación gráfica de la interacción; a) HLA clase II de sensibilidad - péptido **B1.1**; b) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1**; c) HLA clase II de sensibilidad - péptido **B1.1 An1**; d) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1 An1**; e) HLA clase II de sensibilidad, péptido **B1.1 An2**; f) HLA clase II de resistencia - péptido **B1.1 An2**.



e)



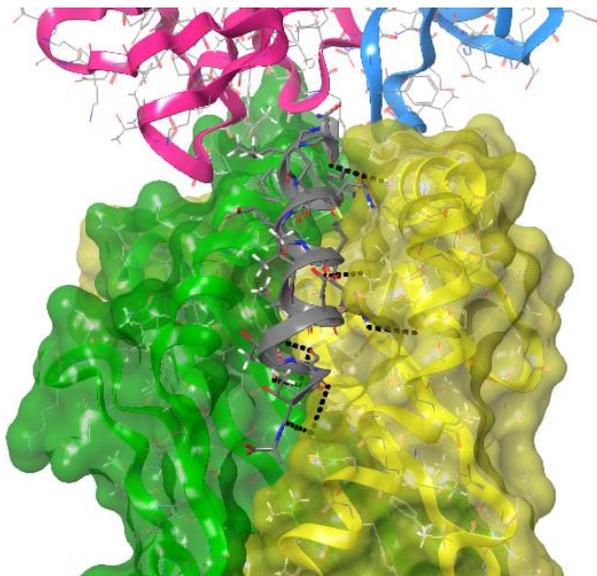
f)



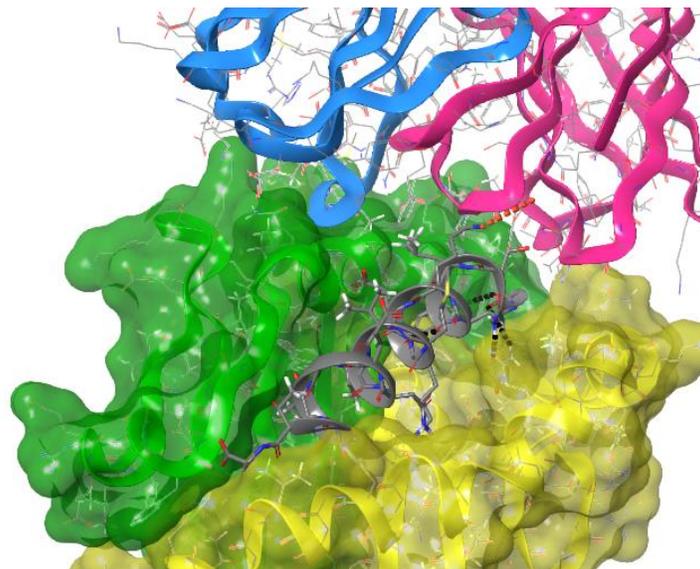
Codigos de colores: Cadena α -1 del HLA clase II: Amarillo; Cadena β -1 del HLA clase II: Verde; Péptido: Color Gris; Puentes de hidrogeno: línea punteada negra; Puentes salinos: línea punteada Naranja.

Figura 27. Representación gráfica de la interacción; a) sHLA-MSP1⁴²⁻⁶¹-TCR; b) rHLA-MSP1⁴²⁻⁶¹-TCR; c) sHLA-MSP1⁵²⁻⁵³-TCR (B1.1 An1); d) rHLA-MSP1⁵²⁻⁵³-TCR (B1.1 An1); e) sHLA-MSP1⁵¹⁻⁵²-TCR (B1.1 An2); f) rHLA-MSP1⁵¹⁻⁵²-TCR (B1.1 An2)

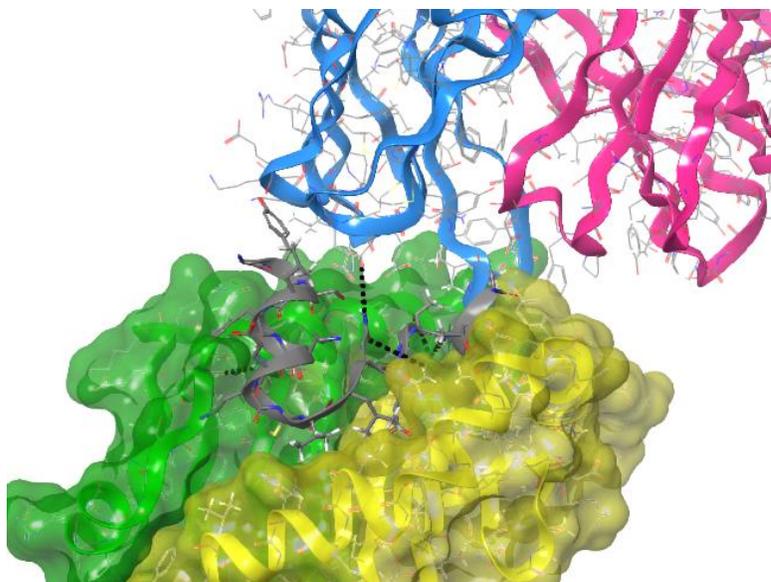
a)



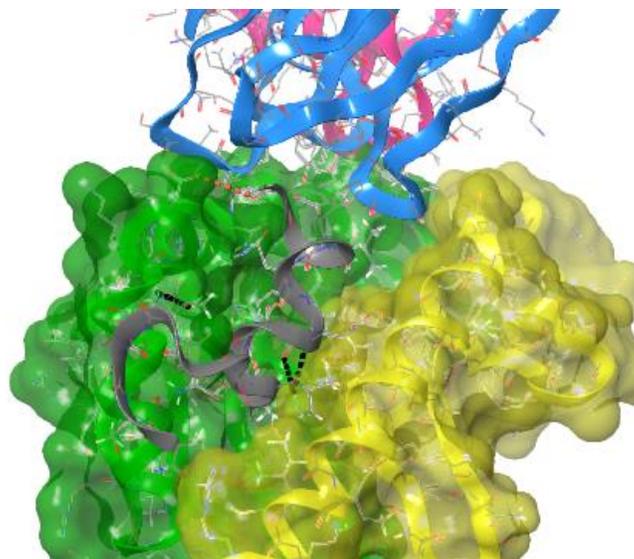
b)



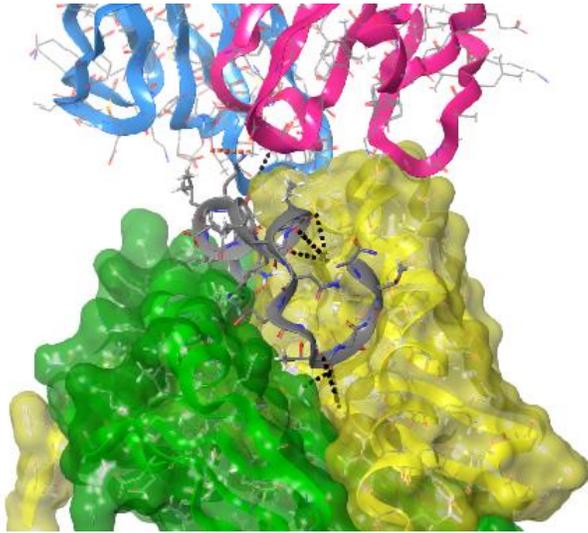
c)



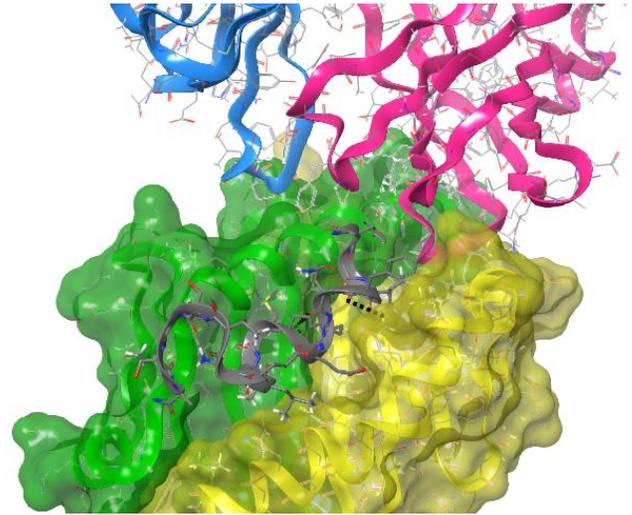
d)



e)



f)



Codigos de colores: Cadena α -1 del HLA clase II: Amarillo; Cadena β -1 del HLA clase II: Verde; Cadena α -1 del receptor TCR: Magenta; Cadena β -1 del receptor TCR: Azul del TCR; Péptido: Color Gris; Puentes de hidrogeno: línea punteada negra; Puentes salinos: línea punteada Naranja.

12. Discusión

La evaluación de la reactividad de sueros humanos de cuatro zonas endémicas de malaria del país (Bolívar, Chocó, Córdoba y Nariño), frente a lisados de cepas de *Plasmodium falciparum* 3D7 y FCB2, a través de inmunoensayos de *Western blot*, evidencia un claro reconocimiento antígeno-anticuerpo frente a las proteínas del parásito. Denotando la presencia de bandas claramente definidas y asociadas al procesamiento proteolítico de la proteína MSP1, a la altura de 190, 83.9, 38 y 30.16 kDa aproximadamente. Esto valida la importancia de la proteína MSP1 en el reconocimiento inmunológico, perfilándola como una proteína diana en la implementación de modificaciones tipo amia reducida, que proporcionen una protección efectiva a individuos expuestos a la infección. Además, se resalta la utilidad de los sueros humanos como referente de reactividad de anticuerpos estimulados en individuos naturalmente expuestos.

La homología estructural de la proteína MSP1 entre la cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7 que infecta a humanos y las cepas *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL que infectan a roedores, mostro una homología de 36.21% y 35.67%, respectivamente. Lo que sugiere que dichos microorganismos comparten fracciones altamente conservadas entre

especies. Esto posibilita realizar estudios de capacidad antigénica e inmunogénica de péptidos derivados de zonas altamente conservadas la proteína MSP1, a través de experimentos *in vivo* en el modelo de malaria murina en ratones de la cepa BALB/c. Permitiendo aproximaciones de tendencias y patrones inmunológicos al comportamiento de la infección en humanos.

A través de herramientas bioinformáticas, se encontraron cuatro secuencias derivadas de la proteína MSP1 con potencial antigénico, enfocadas en la búsqueda de epítopes B lineales. Para la presente investigación se trabajó con el fragmento ³³EALÉDAVLTGYSLFQK⁴⁸, ubicado en una región altamente conservada hacia el extremo *N*-terminal de la proteína MSP1.

La alineación de la secuencia blanco de estudio (³³EALÉDAVLTGYSLFQK⁴⁸) de la cepa de *Plasmodium falciparum* 3D7, respecto a sus ortólogos *Plasmodium berghei* ANKA y *Plasmodium yoelii* 17XL, presenta una alineación de relevancia a la altura de los residuos ⁴⁵LFQK⁴⁸, el cual contiene parte de la secuencia ⁴⁸KEKMV⁵². Al contrastar dichos resultados con la literatura, se reportan dos secuencias que han sido estudiadas por su capacidad inmunogénica y estimulantes de linfocitos T, ³⁸AVLTGYSLFQKEKMVLNEGTS⁵⁸ y ⁴²GYSLFQKEKMVLNEGTS⁶¹ ambas secuencias contienen los fragmentos ⁴⁵LFQK⁴⁸ y ⁴⁸KEKMV⁵² en diferentes posiciones dentro de ambas secuencias, lo que resulta interesante para proponer modificaciones sistemáticas tipo amida reducida para las secuencias ³⁸AVLTGYSLFQKEKMVLNEGTS⁵⁸ (**B1**) y ⁴²GYSLFQKEKMVLNEGTS⁶¹ (**B1.1**), con la finalidad de determinar su influencia en la capacidad antigénica e inmunogénica.

El comportamiento del desarrollo de la parasitemia y la supervivencia de los animales inmunizados con el péptido nativo **B1** y los análogos **B1 An2** y **B1 An4**, retados con dosis letales de *P. berghei* ANKA, sugiere una protección con respecto al grupo control, presentando y controlando picos de parasitemia cercanos al 40%, además varios individuos superaron el límite de supervivencia al día 20 post infección, fijado como día final del seguimiento. Al contrastar estos resultados con el título de anticuerpos generados para cada péptido se observa que para el análogo **B1 An2** (1:51200) es muy superior al título de los péptidos **B1** y **B1 An4** (1:400) sugiriendo una mayor potencia antigénica para el péptido **B1 An2**. Para los animales retados con *P. yoelii* 17 XL es importante resalta que el péptido **B1 An2** pierda la capacidad evitar la muerte por malaria, probablemente debido a la agresividad incrementada de dicha cepa. Por el contrario, el péptido **B1 An4**, continua con

el manejo del pico de parasitemia y extiende la supervivencia de los animales del grupo respecto al control.

El desarrollo de la parasitemia de la familia de péptidos **B1.1** (nativo y análogos), retados con *P. berghei* ANKA y con *P. yoelii* 17 XL, evidencia una baja capacidad en controlar el pico de infección y disminuir la muerte por malaria. Al contrastar los resultados con la capacidad de los sueros de los animales inmunizados con **B1.1 An2** y **B1.1 An4**, frente a un lisado de *P. falciparum* 3D7, muestran un reconocimiento de bandas a 99.98, 83.10, 26.83 y 20.19 kDa asociados a la proteína MSP1. Sin embargo, son incapaces de controlar la infección el modelo murino. Esto sugiere una clara capacidad antigénica de ambos análogos, pero una baja capacidad inmunogénica, es decir, son capaces de reconocer los fragmentos proteicos de la proteína MSP 1 en el parásito, pero no tienen la capacidad de neutralizar e inducir la fagocitosis del parásito. Para el resto de la familia **B1.1 An1**, **B1.1 An3**, **B1.1 An5**, no presentan reconocimiento del lisado de parásito, lo que indica que no posee capacidad antigénica ni inmunogénica.

En general la evidencia sugiere que las modificaciones de los péptidos nativos de la proteína MSP1, presentan modificaciones en el reconocimiento inmunológico en el modelo de malaria murina. Presentado ventajas en el control de la parasitemia y supervivencia de los individuos. Además, la evidencia sugiere que son reconocidos por lisados de parásitos de *P. falciparum* 3D7, indicando el potencial antigénico de los péptidos modificados frente a cepas que infectan humanos.

Se suma a la evidencia la importancia de las modificaciones de los análogos estudiados en el reconocimiento de la sinapsis inmunológica y la presentación de los péptidos al receptor de linfocitos T, como lo demuestra el estudio *in silico* de acoplamiento molecular, donde se resalta el reconocimiento de los análogos en la hendidura del complejo mayor de histocompatibilidad humano clase II, a través de la formación de nuevas interacciones moleculares de tipo puente de hidrógeno y puente salino, probablemente por favorecer una estructura lineal y poco estructurada que expone cadenas laterales ocultas en péptidos nativos con estructuras altamente helicoidales.

13. Conclusiones

1. Se evaluaron mediante metodologías inmunoquímicas (*in vitro*) y computacionales (*in silico*) patrones de reconocimiento antigénico de relevancia en péptidos nativos y modificados derivados de la proteína MSP1, demostrando que las modificaciones puntuales tipo amida reducida, promovieron el reconocimiento en la sinapsis inmunológica y las respuestas antigénicas e inmunogénicas en retos *in vivo*.
2. Se realizaron estudios computacionales de acoplamiento molecular de antígenos derivados de la proteína MSP1, donde se evidencia la relevancia de las modificaciones tipo amida reducida, al aumentar el reconocimiento del péptido modificado en las hendiduras del Complejo mayor de histocompatibilidad humano clase II (HLA-II) y su presentación al receptor de linfocitos T (TCR).
3. Se evaluó la reactividad de sueros de ratones inmunizados con péptidos (nativos y modificados) derivados de la proteína MSP1 y de sueros humanos de zonas endémicas de malaria, evidenciando reconocimiento antigénico de los péptidos modificados y los sueros humanos, frente al lisado de la cepa de *Plasmodium falciparum* de las cepas 3D7 y FCB2.

14. Perspectivas

Refinar y estandarizar el protocolo de acoplamiento molecular, con la finalidad de obtener resultados con mayor grado de exactitud y semejanza a la realidad biológica, y así emplearlo como posible herramienta de tamizaje para evaluar modificaciones tipo amida reducida en péptidos nativos inexplorados.

Probar diferentes cepas de malaria murina, a las empleadas en el presente estudio con los péptidos de las familias B1 y B1.1, y explorar nuevos perfiles de antigenicidad e inmunogenicidad de los péptidos modificados.

15. Bibliografía

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Student Consult (8°; Elsevier, ed.). <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2013.05.007>

Acosta, C., Galindo, C., Schellenberg, D., Aponte, J., Kahigwa, E., Urassa, H., ... Alonso, P. (1999). Evaluation of the SPf66 vaccine for malaria control when delivered through the

EPI scheme in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, 4(5), 368–376. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00406>.

Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.* 77: 72–82.

Akter, J., Khoury, D. S., Aogo, R., Lansink, L. I., SheelaNair, A., Thomas, B. S., ... Haque, A. (2019). Plasmodium-specific antibodies block in vivo parasite growth without clearing infected red blood cells. *PLoS Pathogens*, 15(2), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007599>

Al-Yaman, F., Genton, B., Anders, R., Falk, M., Triglia, T., Lewis, D., ... Alpers, M. (1994). Relationship between humoral response to Plasmodium falciparum merozoite surface antigen- 2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51, 593–602. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.593>

Angulo, I., & Fresno, M. (2002, November). Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 9, pp. 1145–1152. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1145-1152.2002>

Arias-Murillo, Y., Osorio-Arango, K., Bayona, B., Ercilla, Guadalupe., Beltrán-Durán, Mauricio. (2017). Determinación del polimorfismo de HLA-A, -B y -DRB1 en donantes de órganos con muerte encefálica representativos de la población general colombiana, 2007-2014. *Biomédica*, 37, 184-190. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3263>

Arlett, H., & Spielmann, T. (2014). Preparation of Parasite Protein Extracts and Western Blot Analysis. In *Bio-protocol LLC* (Vol. 4).

Arnaiz-Villena, A., Muñoz, E., del Palacio-Gruber, J., Campos, C., Alonso-Rubio, J., Gomez-Casado, E., ... Silvera, C. (2016). Ancestry of Amerindians and its Impact in Anthropology, Transplantation, HLA Pharmacogenomics and Epidemiology by HLA Study in Wiwa Colombian Population. *Open Medicine Journal*, 3(1), 269–285. <https://doi.org/10.2174/1874220301603010269>

Arrunategui, A. M., Villegas, A., Ocampo, L. Á., Rodríguez, L. M., & Badih, A. (2013). Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. *Acta Medica Colombiana*, 38(1), 16–21.

Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., ... Wang, H. (2009). PlasmoDB: A functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), D539. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn814>

Ávila-Portillo, L. M., Carmona, A., Franco, L., Briceño, I., Casas, M. C., & Gómez, A. (2010). Bajo polimorfismo en el sistema de antígenos de leucocitos humanos en población mestiza colombiana. *Universitas Médica*, 51(4), 359–370. <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed51-4.bpsa>

Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M., Gajria, B., Grant, G., ... Whetzel, P. (2003). PlasmoDB: The Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 212–215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg081>

Baird, J. (1998). Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(4), 367–390. <https://doi.org/10.1080/00034989859366>

Bannister, L., Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., & Mitchell, G. (2000). A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages. *Parasitology Today*, 16(10), 427–433. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5)

Bastian, M., Lozano, J. M., Patarroyo, M. E., Pluschke, G., & Daubenberger, C. A. (2004). Characterization of a reduced peptide bond analogue of a promiscuous CD4 T cell epitope derived from the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate merozoite surface protein 1. *Molecular Immunology*, 41, 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.019>

Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>

Battle, K., Karhunen, M., Bhatt, S., Gething, P., Howes, R., Golding, N., ... Hay, S. (2014). Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malaria Journal*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-144>

Beeson, J., Drew, D., Boyle, M., Feng, G., Fowkes, F., & Richards, J. (2016). Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(3), 343–372. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001>

Bergmann-Leitner, E., Duncan, E., & Angov, E. (2012). Malaria Vaccine. In O. Okwa (Ed.), *The Impact of Immune Responses on the Asexual Erythrocytic Stages of Plasmodium and the Implication for Vaccine Development*. <https://doi.org/10.5772/33130>

Bermeo, S., Guerra, M. T., & Ostos Alfonso, H. (2010). Vista de Frecuencias de HLA-A, B y DRB1 en una población de Huila-Colombia. *Revista Facultad de Salud*, 2(1), 9–19.

Bernal, J., & Briceño, I. (2013). Estudios de HLA en Colombia. *Acta Medica Colombiana*, Vol. 38, pp.5–6.

P. (1986). Rabbit and human antibodies to a repeated amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen, Pf 155, react with the native protein and inhibit merozoite invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4), 1065–1069. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.1065>

Birkett, A. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. *Vaccine*, 34, 2915–2920. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.074>

Black, C. G., Wang, L., Wu, T., & Coppel, R. L. (2003). Apical location of a novel EGF-like domain- containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00308-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00308-0)

Black, C. G., Wu, T., Wang, L., Hibbs, A. R., & Coppel, R. L. (2001). Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 114(2), 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00265-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00265-1)

Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S., & Holder, A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 172, 379–382. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.379>

Blackman, M. J., Whittle, H., & Holder, A. (1991). Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49, 35–44. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90128-S](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90128-S)

Blasco, B., Leroy, Di., & Fidock, D. A. (2017). Antimalarial drug resistance: Linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nature Medicine*, 23(8), 917–928. <https://doi.org/10.1038/nm.4381>

Bohley, P., & Seglen, P. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*, 48(2), 151– 157. <https://doi.org/10.1007/BF01923508>

Bonanni, P. (1999). Demographic impact of vaccination: A review. *Vaccine*, 17(SUPPL. 3), 120–125. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00306-0)

Boyle, M. J., Langer, C., Chan, J. A., Hodder, A., Coppel, R. L., Anders, R., & Beeson, J. (2014). Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 82(3), 924–936. <https://doi.org/10.1128/IAI.00866-13>

Cai, Q., Peng, G., Bu, L., Lin, Y., Zhang, L., Lustigmen, S., & Wang, H. (2007). Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a polyepitope *Plasmodium falciparum* candidate vaccine constructed by epitope shuffling. *Vaccine*, 25(28), 5155–5165. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.085>

Camus, D., & Hadley, T. J. (1985). A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science*, 230(4725), 553–556. <https://doi.org/10.1126/science.3901257>

Cavanagh, D. R., & McBride, J. S. (1997). Antigenicity of recombinant proteins derived from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 85(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02826-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02826-5)

Céspedes, N., Arévalo-Herrera, M., Felger, I., Reed, S., Kajava, A. V., Corradin, G., & Herrera, S. (2013). Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine*, 31, 4923–4930. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.082>

Chaves, F., Calvo, J., Carvajal, C., Rivera, Z., Ramírez, L., Pinto, M., ... Patarroyo, M. E. (2001). Synthesis, isolation and characterization of *Plasmodium falciparum* antigenic tetrabranched peptide dendrimers obtained by thiazolidine linkages. *Journal of Peptide Research*, 58(4), 307–316. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2001.00921>

Chen, J. S., Liu, H., Yang, J., & Chou, K. (2007). Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 33, 423–428. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9>

Christopher, A., MacRaild, C. A., Reiling, L., Wycherley, K., Boyle, M. J., Kienzle, V., ... Anders, R. (2012). Antigenic characterization of an intrinsically unstructured protein, *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2. *Infection and Immunity*, 80(12), 4177–4185. <https://doi.org/10.1128/IAI.00665-12>

Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*, 33, 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>

Cohen, S. (1961). Gamma-Globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, 192.

Coligan, J. E., Bierer, B. E., David, M., Shevach, E., & Strober, W. (2007). *Current Protocols in Immunology* (Richard Coico, Ed.). <https://doi.org/10.1002/0471142735>

Collins, C. R., & Blackman, M. J. (2011). Apicomplexan AMA1 in Host Cell Invasion: A Model at the Junction? *Cell Host & Microbe*, 10(6), 531–533. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2011.11.006>

Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B. L., James, E. R., Roggero, M. A., ... Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 341–356. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>

Coppi, A., Pinzon-Ortiz, C., Hutter, C., & Sinnis, P. (2005). The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1), 27–33. <https://doi.org/10.1084/jem.20040989>

Corman, V., Müller, M., Costabel, U., Timm, J., Binger, T., Meyer, B., ... Drosten, C. (2012). Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance*, 17(49), 20334. <https://doi.org/10.2807/ese.17.49.20334-en>

Correa, P., Whitworth, W., Kuffner, T., McNicholl, J., & Anaya, J. (2002). HLA-DR and DQB1 gene polymorphism in the North-western Colombian population. *Tissue Antigens*, 59(5), 436–439. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.590515>.

Cowman, A., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016, October 20). *Malaria: Biology and Disease*. *Cell*, Vol. 167, pp. 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>

Cox, F. (2002, October). History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, pp.595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>

Crewther, PE., Culvenor, J., Silva, A., Cooper, JA., Anders. RF. (1990). Plasmodium falciparum: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp. Parasitol.* 70:193–206

Croft, N. P., & Purcell, A. W. (2011). Peptidomimetics: Modifying peptides in the pursuit of better vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 10(2), 211–226. <https://doi.org/10.1586/erv.10.161>

Crompton, P. D., Kayala, M. A., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Weiss, G. E., ... Pierce, S. K. (2010). A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6958–6963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001323107>

Cubillos, M., Espejo, F., Purmova, J., Martinez, J. C., & Patarroyo, M. E. (2003). Alpha helix shortening in 1522 MSP-1 conserved peptide analogs is associated with immunogenicity and protection against P. falciparum malaria. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 50(3), 400–409. <https://doi.org/10.1002/prot.10314>

Cuesta Astroz, Yesid, & Segura Latorre, Cesar. (2012). Métodos proteómicos aplicados al estudio de la malaria: Plasmodium falciparum. *Acta Biológica Colombiana*, 17(3), 463-484. Retrieved January 18, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2012000300002&lng=en&tlng=es

Culvenor, J., Day, K., & Anders, R. (1991). Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and Immunity*, 59(3), 1183–1187. <https://doi.org/10.1128/iai.59.3.1183-1187.1991>

D'Alessandro, U., Leach, A., Drakeley, C., Bennett, S., Olaleye, B., Fegan, G., ... Targett, G. (1995). Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Lancet*, 346(8973), 462–467. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)91321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)91321-1)

D'Amelio, E., Salemi, S., & D'Amelio, R. (2015, May 3). Anti-Infectious Human Vaccination in Historical Perspective. *International Reviews of Immunology*, Vol. 35, pp. 260–290. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1082177>

Daubenberger, C. A., Nickel, B., Ciatto, C., Grütter, M. G., Pörtl-Frank, F., Rossi, L., ... Pluschke, G. (2002). Amino acid dimorphism and parasite immune evasion: cellular immune responses to a promiscuous epitope of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 displaying dimorphic amino acid polymorphism are highly constrained. *European Journal of Immunology*, 32(12), 3667–3677. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200212\)32:12<3667::AID-IMMU3667>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200212)32:12<3667::AID-IMMU3667>3.0.CO;2-C)

Davies, E. E. (1974). Ultrastructural studies on the early ookinete stage of *Plasmodium berghei nigeriensis* and its transformation into an oocyst. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68(3), 283–290. <https://doi.org/10.1080/00034983.1974.11686950>

De Groot, A. S. (2006, March). Immunomics: Discovering new targets for vaccines and therapeutics.

Drug Discovery Today, Vol. 11, pp. 203–209. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03720-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03720-7)

De Sousa, K., & Doolan, D. (2016). Immunomics: a 21st century approach to vaccine development for complex pathogens. *Parasitology*, 143(Special issue), 236–244. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001079>

Deans, J., Knight, A., Jean, W., Waters, A., Cohen, S., & Mitchell, G. (1988). Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunology*, 10(5), 535–552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1988.tb00241>

Dearsly, A., Sinden, R., & Self, I. (1990). Sexual development in malarial parasites: Gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. *Parasitology*, 100(3), 359–368. <https://doi.org/10.1017/S0031182000078628>

Del Río-Ospina, L., Camargo, M., Soto-De León, S.C., Robayo-Calderón, K.L., Garzón-Ospina, D... (2019). Using next-generation sequencing for characterising HLA-DRB1 and DQB1 loci in a cohort of Colombian women. *HLA Immune Response Genetics*, (94)5, 425-434. <https://doi.org/10.1111/tan.13672>

Dhanda, S. K., Gupta, S., Vir, P., & Raghava, G. (2013). Prediction of IL4 Inducing Peptides. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/263952>

Dhanda, S. K., Vir, P., & Raghava, G. (2013). Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biology Direct*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-30>

Dieng, M. M., Diawara, A., Manikandan, V., Tamim El Jarkass, H., Sermé, S. S., Sombié, S., Idaghdour, Y. (2020). Integrative genomic analysis reveals mechanisms of immune evasion in *P. falciparum* malaria. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18915-6>

Dinko, B., & Pradel, G. (2016). Immune Evasion by Plasmodium falciparum Parasites: Converting a Host Protection Mechanism for the Parasite's Benefit. *Advances in Infectious Diseases*, 06, 82–95. <https://doi.org/10.4236/aid.2016.62011>

Dobaño, C., Sanz, H., Sorgho, H., Dosoo, D., Mpina, M., Ubillos, I., ... Gyan, B. (2019). Concentration and avidity of antibodies to different circumsporozoite epitopes correlate with RTS,S/ AS01E malaria vaccine efficacy. *Nature Communications*, 10(2174), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10195-z>

Donahue, CG., Carruthers, v., Gilk, sd., Ward, GE. (2000). The Toxoplasma homolog of Plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111:15–30

Doolan, D. (Ed.). (2002). *Malaria Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press.

Doolan, D., Dobaño, C., & Baird, J. (2009). Acquired immunity to Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 13–36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>

Drakeley, C., Corran, P., Coleman, P., Tongren, J., McDonald, S. L., Carneiro, I., ... Riley, E. (2005). Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408725102>

Dunbar, B. S., & Schwoebel, E. D. (1990). Preparation of Polyclonal Antibodies. *Methods in Enzymology*, 182(C), 663–670. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82051-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82051-3)

Egan, J., Hoffman, S., Haynes, J., Sadoff, J., Schneider, I., Grau, G., ... Gordon, D. (1993). Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated Plasmodium falciparum sporozoites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(2), 166–173. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.166>

El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit*, 21, 243–255. <https://doi.org/10.1002/jmr.893>

Ellis, R., Martin, L. B., Shaffer, D., Long, C., Miura, K., Fay, M., ... Durbin, A. (2010). Phase 1 trial of the Plasmodium falciparum blood stage vaccine MSP1 42-C1/alhydrogel with and without CPG 7909 in malaria naïve adults. *PLoS ONE*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008787>

Esen, M., Kremsner, P., Schleucher, R., Gässler, M., Imoukhuede, E., Imbault, N., ... Mordmüller, B. (2009). Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*, 27(49), 6862–6868. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.011>

Espejo, F., Bermúdez, A., Vanegas, M., Rivera, Z., Torres, E., Salazar, L. M., & Patarroyo, M. E. (2005). Elongating modified conserved peptides eliminates their immunogenicity and

protective efficacy against *P. falciparum* malaria. Journal of Structural Biology, 150(3), 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.03.007>

Espejo, F., Cubillos, M., Mary Salazar, L., Guzmán, F., Urquiza, M., Ocampo, M., ... Patarroyo, M.

E. (2001). Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues (Vol. 113).

16. ANEXOS

16.1. Anexo 1: Aval ético



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, noviembre 14 de 2017

Profesor
José Manuel Lozano Moreno
Departamento de Farmacia

Respetado Profesor:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 14 de noviembre de 2017 (Acta 13-2017), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P4: Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto: Estudio de la influencia de modificaciones no naturales en antígenos de *Plasmodium spp* frente al componente humoral y celular humano y su efecto en modelos de infección controlada en ratones.

Responsables: **José Manuel Lozano Moreno** (Investigador Principal, Grupo Mimetismo Molecular de los Agentes Infecciosos) y Zulily Johana Rodríguez Parra (Tesisista de Doctorado en Biotecnología).

Observaciones:

En esta investigación se emplearán muestras de sangre de individuos provenientes de zonas endémicas y no endémicas de paludismo en Colombia, lo cual plantea la aplicación de protocolos de consentimiento informado para la obtención de las muestras biológicas. Se garantizará la protección de la identidad de los participantes, la confidencialidad de la información, así como el acceso exclusivo de los investigadores a los datos del estudio. Los datos obtenidos serán usados solamente para los fines científicos del estudio.

El personal participante estará debidamente entrenado en el cuidado y uso de animales de laboratorio, acatando orientaciones contenidas en la Resolución 008430 de 1993 – MSP. También, se seguirán protocolos de gestión ambiental para el reconocimiento y manejo de riesgo por reactivos químicos y biológicos.

Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 008 del 8 de mayo de 2008 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Avalado.

LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

16.2. Anexo 2: Consentimiento informado

SI EXISTE ALGUNA PARTE DE ESTE DOCUMENTO QUE NO ENTIENDA, PREGUNTE A UNA DE LAS PERSONAS ENCARGADAS DEL PRODECIMIENTO ANTES DE FIRMAR.

Ciudad/Municipio: _____ Fecha: _____

Yo: _____ con T.I / C.C: _____

Teniendo completa capacidad y habiendo cumplido 18 años de edad o siendo menor de edad con autorización de un adulto responsable, doy mi consentimiento voluntario para la donación de sangre para la ejecución del proyecto “*ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE MODIFICACIONES NO NATURALES EN ANTÍGENOS DE Plasmodium spp FRENTE AL COMPONENTE HUMORAL Y CELULAR HUMANO Y SU EFECTO EN MODELOS DE*

INFECCIÓN CONTROLADA EN RATONES”, desarrollado en el grupo de investigación MIMETISMO MOLECULAR DE LOS AGENTES INFECCIOSOS de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá, el cual es reconocido por COLCIENCIAS en categoría A, y tiene como objetivo fundamental el diseño de moléculas para hacer frente a enfermedades infecciosas transmisibles como la malaria así como de origen viral como Zika, Dengue y Chikungunya.

Según la explicación que he recibido, la muestra de sangre será tomada y transportada a la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia para llevar a cabo el proceso experimental que se requiera según el propósito de la investigación, los métodos y los medios que tengan lugar.

Procedimiento por seguir:

Si usted es seleccionado y está de acuerdo en participar se le solicitará la donación de aproximadamente 15 mL de sangre obtenida por venopunción y colectada en dos a tres tubos (dependiendo de su tamaño). La muestra será tomada por una persona calificada para tal fin.

Atendiendo a los resultados obtenidos, de manera eventual solicitaremos su amable colaboración en próximas oportunidades para la toma de nuevas muestras de tejido sanguíneo.

Periodo de participación:

Tiempo necesario para la donación aproximadamente 5-10 minutos.

Riesgos mínimos:

No existen riesgos conocidos. Sin embargo, algunas personas pueden presentar malestar general, palidez, mareos, de lo cual se recuperan espontáneamente.

Beneficios:

Su participación es una generosa contribución al desarrollo de la ciencia, cuyas aplicaciones futuras pueden aproximarse a resolver o mejorar la salud de nuestros semejantes frente a la malaria como enfermedad infecciosa que afecta a millones de personas en el mundo y que tiene un impacto económico y en salud pública de proporciones no calculables.

Confidencialidad:

El consentimiento informado se comprende como la participación voluntaria en este estudio. Participar en el mismo NO conlleva ningún riesgo para usted. Su identidad y los datos que sean suministrados serán mantenidos en reserva y de uso exclusivo para esta investigación.

La muestra que usted generosamente dona será utilizada expresamente para los procedimientos aquí descritos y no en otros.

Condiciones de retiro del procedimiento por parte del voluntario

El procedimiento a realizar es totalmente voluntario, y el retiro de éste podrá efectuarse en cualquier momento si así lo desea, sin perjuicio alguno.

Al firmar voluntariamente este documento acepto participar en la investigación en los términos aquí estipulados.

Firma: _____

Nombre: _____

T.I / C.C: _____

Edad: _____

Código de muestra: _____

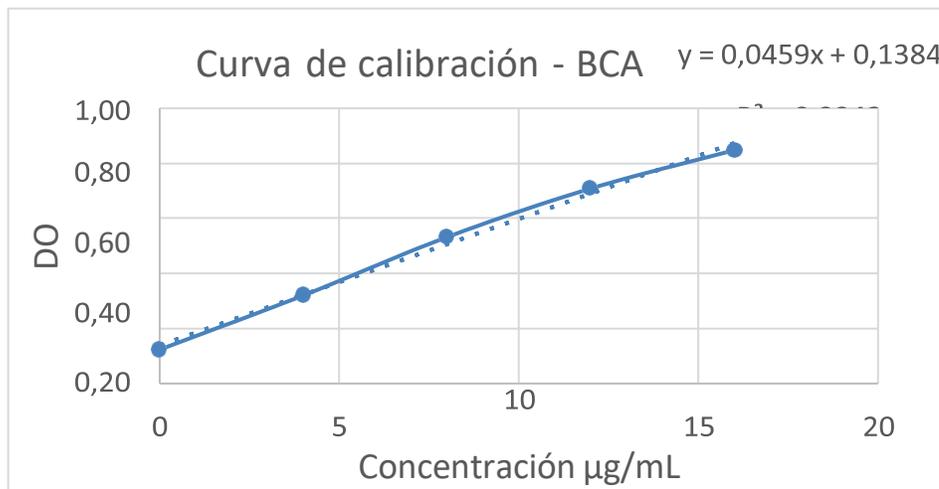
16.3. Anexo 3: Experimentos *in vitro*

Curva estándar BSA

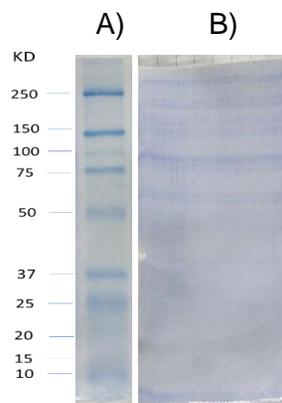
Curva estándar método de cuantificación de proteínas por método de Ácido bicinconico. Kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit: Prod # 23225 Thermo Scientific. Curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA) de 0 a 16 µg/mL.

Microlector de placas: Miltiskan FC, Thermo Fisher - Longitud de onda: 570nm

Utilizando la ecuación de los mínimos cuadrados resultante de la curva de calibración, se calculó la concentración de proteínas en cada muestra analizada.



Perfil electroforético esquizontes de *Plasmodiumfalciparum*



A) Marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope* Catalog #161-0375, BIORAD

B) Lisado *P. falciparum* proveniente de cultivo continuo cepa 3D7

16.4 Anexo 4. Resultados experimentos Western Blot

A través del siguiente enlace o escaneando el código QR, se encuentran las imágenes del perfil de reactividad de anticuerpos de sueros de individuos de zonas endémicas de malaria en Colombia por proteínas de lisado de parásito de la cepa 3D7. Sueros Tumaco; Sueros Bolívar; Sueros Córdoba; Sueros Chocó; Sueros Control.

Enlace:

<https://view.genial.ly/60c7e6ee3903d90d67206fe2/presentation-ensayos-wb-sueros-humanos>

Código QR:



16.5 Anexo 5. Alineamiento de secuencias.

Servidor Remoto: Clustal Omega EMBL-EBI

Programa: clustalo - Versión: 1.2.4. Disponible en:
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Para el análisis de todas las secuencias proteicas de *Plasmodium* spp seleccionadas, se emplearon los parámetros propuestos por

defecto por el programa para ejecutar su algoritmo. Este tiene en cuenta las posibles interacciones y relaciones filogenéticas.

El nombre de cada secuencia de entrada incluye el código ID correspondiente (consultado en bases de datos).

A continuación se presenta un esquema representativo de los parámetros de entrada.

STEP 2 - Set your parameters

OUTPUT FORMAT

ClustalW with character counts ▼

DEALIGN INPUT SEQUENCES	MBED-LIKE CLUSTERING GUIDE-TREE	MBED-LIKE CLUSTERING ITERATION	NUMBER of COMBINED ITERATIONS
no ▼	yes ▼	yes ▼	default(0) ▼
MAX GUIDE TREE ITERATIONS	MAX HMM ITERATIONS	ORDER	
default ▼	default ▼	input ▼	

Como forma de presentación de resultados de alineamiento, se seleccionó el orden en que fueron ingresadas las secuencias a analizar: *P. falciparum* 3D7, seguido por *P. berghei* ANKA y finalmente *P. yoelii* 17XL.

Alineamiento múltiple Proteína de superficie de merozoíto – 1 (MSP-1)


```

MSP1_3D7.Pf_0930300.1 QLSFDLYNYKLLKLDLRFNKKELGDDKQIKLTLLEQLSEKLNLSLNPMMVQNF5V 1111
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 EHYDRYYKLLKLERLYEHEQIQVSNRIQIELSLIKARLLKRNQINGIFYL5GYVN 1207
MSP1.17X.Py.0834400.1 EHYDRYSTYKLLKLERLYNHEIQITNRQIRDLISILKARLLKRNQITLNGVYFLNGVYN 1187
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 FFNKKKEAETAENTLTKLLKHVYGLVKYYNGESSPLKLTSEVSTQEDNYANLEK 1171
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 FFNKRREADQYVDNALKNDHLLKYYKARIKYFTSEAVPLKLTASLDRETHYKLEIK 1267
MSP1.17X.Py.0834400.1 FFNKRREAEQYVDNALKNDHLLKYYKARTKYFTSEAVPLKLTASLDRSENYLKEIK 1247
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 FRVLSKIDGKLNLDLHLGKLLSFLSSGLHHLITELKEVTKNINVTGNSPSENKKVNEA 1231
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 FRAYSRLLEPKININLGEISYVSGGLVYVFEFELLNINVTGKLTNPDTVPEVTNA 1327
MSP1.17X.Py.0834400.1 FRAYSRLLEPKININLGERISYVSGGLHVFEEFKELIDKDYTKKNDPAPEVTNA 1307
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 LKSYENFLPEAKVTTVTPQPDVTP-----SPLSVRVSGSS-----GSTKEETQ 1276
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 FEQYKELLPKGVTSASA--SPAATTPSADAATQATPESRS6SGS6SGSVSSTPEEVA 1385
MSP1.17X.Py.0834400.1 FEQYKELLPKGVTSST--PAVAVTTLAADAAPATPEGAVPGAVPGAVPGAVPG--A 1363
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 IPTSGSLLELQVQVQLQNYDEEDSLVVLPTFGESENDEYLDQVVTGEATSVTMDNIL 1336
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 RSGSGE-----NAVVS--GSSVDNDODDIDQIASGQSENAQEKHIDL 1425
MSP1.17X.Py.0834400.1 VPGSGT-----DTRVA--GSSVDNEDDDYQIASGQSDAPEIDIL 1403
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 SGFENEYDVTYLPVLAQVYISLKKQIEINIFFFLNLDLNSRLKRYKIVLDVLESQMH 1396
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 EAFINSESELYARSLGTYSLKHHITREFSTIKEDITGLNKLQKRNDFLEVLNHELD 1485
MSP1.17X.Py.0834400.1 SEFTNESLYVYTKLGGTYLKLKHHILREFSTIKEDITGLNKLQKRNDFLEVLNHELD 1463
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 QFIHSSNEYIEEDSKLLNSEQNTLLKSYKYIKEYSVENDKFAQEGTSYKVLAKYK 1456
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 LFKDLSTNKVYIRNPYQLDNDKDKQIVNLKYAAQVNEDETTADGKFFNKHIELYK 1545
MSP1.17X.Py.0834400.1 LFKDLSTNKVYIRNPYQLDNDKDKQIVNLKYATGINEDETTTDGIKFFNKHVELYN 1523
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
MSP1_3D7.Pf_0930300.1 DDLESIKVVLEEKFKPPSPPTTPPSPAKTEQKESKFLPFLTNIETLYNLVNIIDD 1516
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 IQLAAVVEQIDAEAA-----TT--DKDEKIKYVPIEDLGLVETLGGSEE 1591
MSP1.17X.Py.0834400.1 TQLAAVVEQIDAEAE-----TNDTKDEKIKYVPIEDLGLVETLGGQEE 1571
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```



MSP1.3D7.Pf_0930300.1 0.395058
MSP1.ANKA.Pb.0831000.1 0.155756
MSP1.17X.Py.0834400.1 0.155756

16.6 Anexo 6. Predicción corte de catepsinas.

Identificación de los posibles sitios de corte por proteasas lisosomales para las diferentes proteínas antigénicas trabajadas.

Servidor remoto: Site Prediction: [http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/\(Verspurten, J., et al., 2009\).](http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/(Verspurten, J., et al., 2009).)

Posible corte proteolítico, Proteína de Superficie de Merozoíto – 2 (MSP-2)

```

>MSP2.3D7.Pf.0206800.1
      10 |          20 |          30 |          40 |
MKVI K T L S I I N F F I F V T F N I K N E S K Y S N T F I N N A Y N M S I R 40
R S M A E S K P S T G A G G S A G G S A G G S A G G S A G G S A G G S A G S G D 80
G N G A D A E G S S S T P A T T T T T K T T T T T T T T N D A E A S T S T S S E 120
N P N H K N A E T N P K G K G E V Q E P N Q A N K E T Q N N S N V Q Q D S Q T K 160
S N V P P T Q D A D T K S P T A Q P E Q A E N S A P T A E Q T E S P E L Q S A P 200
E N K G T G Q H G H M H G S R N N H P Q N T S D S Q K E C T D G N K E N C G A A 240
T S L L N N S S N I A S I N K F V V L I S A T L V L S F A I F I

```

16.7 Anexo 7. Posición en la secuencia de posibles epítopes B.

Posición en la secuencia de posibles epítopes B (Color verde).
Epítopes T (Color fuccia, rojo y violeta oscuro respectivamente para

los alelos MHC-II asociados con protección DRB1*01:01; DRB1*13:02 y DRB3*03:01.

Servidor remoto ABCPred. Disponible en: <http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/index.html>, (Saha *et al.*, 2005)

>MSP2.3D7.P.f.0206800.1

```

      10 |           20 |           30 |           40 |
MKVIKTLSIINFFIFVTFNIKNESKYSNTFINNAYNMSIR 40
RSM AESKPSTGAGGSAGGSAGGSAGGSAGGSAGGSAGGSAGSGD 80
GNGADAEGSSSTPATTTTTKTTTTTTTTTNDAEASTSTSSE 120
NPNHKNAETNPKGKGEVQEPNQANKETQNNNSNVQQDSQTK 160
SNVPPTQDADTKSPTAQPEQAENSAPTAEQTESPELQSAP 200
ENKGTGQHGHHGSRNNHPQNTSDSQKECTDGNKENCGBAA 240
TSLLNNSNIASINKFVVLISATLVLSFAIFI

```

16.8 Anexo 8. Interacciones estudio *in silico*

Tabla a. interacciones sHLA-MSP1⁴²⁻⁶¹-TCR. Puente de hidrógeno: HB; Puente salino: SB; Interacción π : Pi

Epitope-peptido			HLD-DRB1*04:01				TCR			
			α -1		β -1		$\nu\alpha$ -1		$\nu\beta$ -1	
Posición	amino ácido	Interacción	residuo	Interacción	residuo	Interacción	residuo	Interacción	residuo	
42	G Gly			HB	Gln62					
43	Y Tyr									
44	S Ser									
45	L Leu									
46	F Phe									
47	Q Gln									
48	K Lys									
49	E Glu									
50	K Lys			HB/ SB	Gln70/ Asp28					
51	M Met									
52	V Val									
53	L Leu									
54	N Asn			HB/ HB	Asp28 / Gln70					
55	E Glu									
56	G Gly									
57	T Thr	HB	Gln9							
58	S Ser	HB / HB	Asn62/ Gln9	HB	Asn82					
59	G Gly									
60	T Thr			HB	Asn82					

Tabla f. interacciones rHLA-MSP1⁵¹⁻⁵²-TCR (**B1.1 An2**). Puente de hidrógeno: HB; Puente salino: SB; Interacción π : Pi

Epitope-peptido			HLD-DRB1*01:01				TCR			
Posición	amino ácido		α -1		β -1		$\nu\alpha$ -1		$\nu\beta$ -1	
			Interacción	residuo	Interacción	residuo	Interacción	residuo	Interacción	residuo
42	G	Gly								
43	Y	Tyr								
44	S	Ser								
45	L	Leu								
46	F	Phe			HB	Gln70				
47	Q	Gln	HB	Asn62						
48	K	Lys	HB/HB/HB	Asn62/Gln9/Glu11						
49	E	Glu								
50	K	Lys								
51	M	Met								
52	V	Val								
53	L	Leu								
54	N	Asn								
55	E	Glu								
56	G	Gly								
57	T	Thr								
58	S	Ser								
59	G	Gly								
60	T	Thr								
61	A	Ala								

17. Reconocimientos

- Productos académicos:



molecules



Article

Natural *Plasmodium falciparum* Infection Stimulates Human Antibodies to MSP1 Epitopes Identified in Mice Infection Models upon Non-Natural Modified Peptidomimetic Vaccination

Zully Johana Rodríguez ¹, Fredy Leonardo Melo ¹, Angela Torres ^{1,2}, Nikhil Agrawal ³,
 Jesús Alfredo Cortés-Vecino ⁴ and José Manuel Lozano ^{1,*}

¹ Departamento de Farmacia, Mimetismo Molecular de los Agentes Infecciosos, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Carrera 30#45-03, Bogotá DC 111321, Colombia

² Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Carrera 30#45-03, Bogotá DC 111321, Colombia

³ College of Health Sciences, Discipline of Pharmaceutical Sciences, University of KwaZulu-Natal, Westville, Durban 4000, South Africa

⁴ Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Carrera 30#45-03, Bogotá DC 111321, Colombia

* Correspondence: jmlozanom@una.edu.co; Tel.: +57-3102504657

PROTOCOLO ESTUDIO IN SILICO

“Estudio de modificaciones estructurales en enlaces peptídicos de un antígeno derivado de la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum* y su influencia en el reconocimiento molecular y sus propiedades antigénicas e inmunogénicas”

Elaborado por: FREDY LEONARDO MELO VELANDIA

Grupo de investigación: MIMETISMO MOLECULAR DE LOS AGENTES INFECCIOSOS

- Participaciones en eventos:

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

CIENCIAS INVESTIGA, DIVULGA Y SE PROYECTA 2023
Armonizando las funciones misionales en el Marco del Modelo Intersedes UNAL
18 AL 20 DE SEPTIEMBRE 2023

Exploración de modificaciones estructurales de un antígeno de la proteína MSP1 de *Plasmodium* spp y su influencia en su propiedad de reconocimiento molecular por sueros murinos y humanos

Fredy Leonardo Melo Velandia
Estudiante de Maestría en Ciencias-Farmacología
Grupo de investigación: Mimetismo Molecular de los agentes infecciosos

Lo misional como país de una facultad
líder en el escenario de posgrado
— Equidad, transparencia y mérito

Vicedecanatura de Investigación y Extensión
Coordinación de Extensión
Coordinación de Laboratorios

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA