UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la antigenicidad de péptidos derivados de la proteína *Pv*12 de *Plasmodium vivax*, para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria

Yoelis Yepes Pérez

Universidad Nacional de Colombia
Posgrado Interfacultades en Ciencias-Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
2018

Evaluación de la antigenicidad de péptidos derivados de la proteína *Pv*12 de *Plasmodium vivax*, para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria

Yoelis Yepes Pérez

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

Magíster en Ciencias, Microbiología

Director:

Sonia Carolina López Santana M.Sc.

Codirector:

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

Línea de Investigación:

Inmunología celular y molecular

Grupo de Investigación:

Biología Molecular e Inmunología-FIDIC

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades en Ciencias-Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2018

A mis padres,

Armando Rafael Yepes Bonilla y Martha Isabel Pérez Hernández

Sus palabras y enseñanzas son la base de mi vida

Agradecimientos

A Dios, por darme fuerzas en el camino.

A mi directora, Carolina López, por su constante apoyo y acompañamiento en este camino lleno de enseñanzas, muchas gracias.

A mi codirector y jefe, el Doctor Manuel Alfonso Patarroyo, por su exigencia, la cual nos hace mejores cada día y por darme la oportunidad de crecer como profesional en su grupo de investigación.

Al Doctor Manuel Elkin Patarroyo, un ejemplo de vida, que nos inspira y enseña a ser perseverantes con nuestros sueños.

A Diana Díaz y Carlos Suárez, por todo el apoyo, acompañamiento y valiosas sugerencias en el desarrollo de este trabajo. A todos mis compañeros de laboratorio que, con su aporte, han hecho posible este trabajo.

Al posgrado interfacultades en Ciencias-Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, en especial a los profesores Marta Raquel Fontanilla, Daniel Uribe y María Teresa Reguero, por su apoyo y consejo en el desarrollo de la maestría. A Socorro Prieto, por su colaboración incondicional.

A mi familia, mi fuerza, mi motor de vida, sin su apoyo esto nunca hubiese sido posible.

Resumen

La malaria causada por *Plasmodium vivax* es la segunda más prevalente a nivel mundial, siendo esta especie la responsable del 64% de los casos en las Américas. El desarrollo de una vacuna basada en subunidades hace parte de las estrategias de control de la enfermedad, sin embargo, debido a la dificultad en el cultivo continuo del parásito, el estudio de antígenos se ha visto retrasado. El uso de herramientas bioinformáticas y el estudio de proteínas homólogas a aquellas de *Plasmodium falciparum*, ha permitido el avance en la identificación de candidatos potenciales a vacuna.

El objetivo del presente estudio es la identificación *in silico* de epítopes T de la proteína *Pv*12 (homóloga a *Pf*12) y estudiar su antigenicidad *in vitro*. Los epítopes seleccionados mediante el software NetMHCIIpan-3.1, el cual predijo su unión a alelos HLA-DRB1, fueron evaluados mediante ensayos de unión *in vitro* a moléculas HLA-DRB1. La antigenicidad de tres epítopes fue evaluada en células T CD4+ de individuos con previa exposición a malaria por *P. vivax* tipificados para el alelo HLA-DRB1.

Los epítopes 39113 y 39117, de alta afinidad de unión a moléculas HLA-DRB1*04 y 1*11, así como a HLA-DRB1*07 y 1*13, respectivamente, fueron reconocidos por células T CD4+ de memoria, generando una respuesta proliferativa y una producción coordinada de TNF, IL-6 y IL-10, citoquinas que actúan como mediadores de la eliminación del parásito durante la infección. Debido a la respuesta antigénica observada para los epítopes, son propuestos como potenciales candidatos a ser incluidos en el desarrollo de una vacuna basada en subunidades contra P. vivax.

Palabras clave: *P. vivax*, *Pv*12, HLA-DRB1, péptidos sintéticos, epítopes T, linfoproliferación.

Abstract

Plasmodium vivax is the second most prevalent parasite species causing malaria worldwide and is responsible for 64% of the cases in the Americas. The development of subunit-based vaccines is among the control strategies for the disease, however, due to the difficulty of culturing *P. vivax* in a continuous manner, the characterization of candidate antigens has been delayed. The use of bioinformatics tools and the quest for homologous proteins to those already found in *Plasmodium falciparum* have allowed the identification of new *P. vivax* potential vaccine candidates.

The present study was aimed at identifying *Pv*12 (homologous to *Pf*12) protein's T epitopes *in silico* and studying their antigenicity *in vitro*. The epitopes were selected using the NetMHCIIpan-3.1 software, which predicted their binding to HLA-DRB1 alleles and the high binding ones were subsequently evaluated by *in vitro* binding assays to purified HLA-DRB1 molecules. The antigenicity of these epitopes was evaluated in CD4+ T cells collected from individuals with previous exposure to *P. vivax* malaria typed for their HLA-DRB1 allele.

Specific epitopes 39113 and 39117 that bound to HLA-DRB1*04 and 1*11, as well as HLA-DRB1*07 and 1*13, respectively were recognized by memory CD4+ T cells, generating a proliferative response and a coordinated production of TNF, IL- 6 and IL-10, cytokines that may mediate the elimination of the parasite during infection. Due to the antigenic response observed for the epitopes, they are here being proposed as potential candidates to be included in the development of a subunit-based vaccine against *P. vivax*.

Key words: *P. vivax*, *Pv*12, HLA-DRB1, synthetic peptides, T epitopes, lymphoproliferation.

Contenido

Resumen VII

Lista de figuras XII

Lista de tablas XIII

Lista de abreviaturas XIV

Introducción 1

1. Hipótesis 3

2. Objetivos 5

2.1. Objetivo general 5

2.2. Objetivos específicos 5

3. Marco Teórico 7

3.1. La malaria 7

3.2. Ciclo de vida de *Plasmodium* 8

3.3. Respuesta inmune 10

3.3.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad 10

3.3.2. Moléculas CMH clase II 12

3.4. Identificación de candidatos a vacuna en *Plasmodium vivax* 13

3.4.1. Inmunoinformática 14

3.4.2. Proteína *Pv*12 15

4. Materiales y métodos 17

4.1. Tipo de investigación 17

4.2. Población de estudio 17

4.2.1. Área de estudio 17
4.2.2. Tipificación del gen HLA-DRB1 18
4.2.3. Conformación de grupos experimentales 18
4.3. Selección de péptidos 18
4.3.1. Predicción *in silico* de epítopes T 18
4.3.2. Síntesis de péptidos 19
4.4. Selección *in vitro* de epítopes T 19
4.4.1. Cultivo celular 19
4.4.2. Purificación del anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR 20
4.4.3. Purificación de moléculas HLA-DR 20
4.4.4. Ensayos de unión *in vitro* 21
4.4.5. Ensayos de IC50 22
4.5. Ensayos de antigenicidad 22
4.5.1. Ensayos de Linfoproliferación de células T CD4+ 22
4.5.2. Evaluación de citoquinas en sobrenadante 24
4.6. Análisis estadísticos 24
5. Resultados 25
5.1. Grupos experimentales 25
5.1.1. Población de estudio 25
5.1.2. Tipificación del gen HLA-DRB1 y conformación de los grupos experimentales 25
5.2. Selección *in silico* de epítopes T según su unión predicha a moléculas HLA-DRB1 ... 27
5.3. Selección *in vitro* de epítopes T según su unión a moléculas HLA-DRB1 29
5.3.1. Ensayos de unión 29
5.3.2. Ensayos de IC50 32
5.4. Antigenicidad de epítopes T 33
5.4.1. Linfoproliferación de Linfocitos T CD4+ 33

5.4.2. Respuesta de citoquinas frente al estímulo con los epítopes T....35

6. Discusión....37

7. Conclusiones....41

8. Perspectivas....43

9. Aspectos éticos....45

10. Anexos....47

Anexo A. Consentimiento informado para los ensayos de antigenicidad. 47

Anexo B. Consentimiento informado para los ensayos de inmunogenicidad. 50

Anexo C. Consentimiento informado para la obtención de lisado de *P. vivax*. 53

11. Referencias....57

Lista de figuras

Figura 3-1. Reporte del estado de resistencia de los vectores a los insecticidas. 8
Figura 3-2. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. 9
Figura 3-3. Presentación antigénica por las moléculas del CMH clase I y clase II. 11
Figura 3-4. Estructura de la molécula CMH clase II. 13
Figura 3-5. Proteínas identificadas para *P. falciparum* y *P. vivax* en el merozoíto. 14
Figura 3-6. Estructura de la proteína *Pv12*. 16
Figura 5-1. **Frecuencia de los linajes alélicos HLA-DRB1 en la población de estudio.** 26
Figura 5-2. Área de estudio, epidemiología y frecuencia de los linajes alélicos en los grupos experimentales. 27
Figura 5-3. **Ensayos de unión in vitro a moléculas HLA-DRB1**. 29
Figura 5-4. Ensayo de IC50 para los péptidos de alta afinidad de unión. 32
Figura 5-5. Linfoproliferación de linfocitos CD4^{+} estimulados con epítopes T de la proteína *Pv*12. 34
Figura 5-6. Producción de citoquinas en el sobrenadante de CMSP de individuos expuestos. 36

Lista de tablas

Tabla 5-1. Epítopes T seleccionados in silico con NetMHCIIpan-3.1......28

Tabla 5-2. Valores experimentales de unión (%), IC50 experimental y valor relativo IC50. 30

Tabla 5-3. Índices de estimulación del grupo de individuos expuestos y grupo control. 35

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
CPD	Citrate phosphate dextrose
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
DO	Densidad óptica
DOC	Sodium deoxycholate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
DMP	Dimethyl pimelimidate
HA	Hemaglutinina
HLA	Human leukocyte antigen
IC50	Concentración inhibitoria 50
IE	Índice de estimulación
IFN-γ	Interferon gamma
IHWG	International Histocompatibility Working Group
IL	Interleuquina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohaemagglutinin
pNPP	p-nitrophenyl phosphate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBT	Sequence-based typing
SFB	Suero fetal bovino
T_A	Linfocito T ayudador
TNF	Factor de necrosis tumoral
TT	Toxoide Tetánico
UD	Unión débil
UF	Unión fuerte

Introducción

La malaria es una de las enfermedades transmitidas por vectores con mayor impacto a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente 445.000 muertes en el año 2016. Esta enfermedad es causada por parásitos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Las estrategias de control y eliminación de la enfermedad están dirigidas hacia el control del vector y la quimio-prevención, sobre todo en los grupos poblacionales con mayor riesgo como son los niños y las mujeres en embarazo. Aunque los esfuerzos realizados para disminuir el número de casos se han visto reflejados año tras año, la malaria sigue siendo una de las enfermedades de mayor impacto (1). Uno de los principales objetivos para el control de la enfermedad por parte de las autoridades de salud, es el desarrollo de una vacuna efectiva que pueda mejorar la respuesta inmune a la enfermedad (2).

Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2017, la malaria causada por *P. vivax* representó cerca del 36% de los casos de malaria fuera de África, siendo la región de las Américas el área con mayor prevalencia de esta especie, con un 64% de los casos (3). El desarrollo de una vacuna se ha enfocado principalmente en *P. falciparum*, mientras que para *P. vivax* los estudios se han visto retrasados debido a la compleja biología del parásito, pero sobre todo por la falta de un cultivo continuo *in vitro* (4). A pesar de esta dificultad, el estudio en *P. vivax* se ha centrado en la identificación de antígenos candidatos homólogos a aquellos ya descritos en *P. falciparum*, siendo ésta una herramienta para la identificación de moléculas promisorias en el desarrollo de una vacuna frente a *P. vivax*.

La respuesta inmune generada después de una infección natural con malaria, crea una memoria inmunológica que permite controlar la infección ante exposiciones subsecuentes, sin embargo, no genera protección contra la enfermedad (5). Diversos estudios han demostrado que esta inmunidad está principalmente mediada por una respuesta de anticuerpos y por la interacción de células T con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Se

ha demostrado que la respuesta inmune frente a la malaria está fuertemente relacionada con las moléculas del CMH, sobre todo con las de clase II (6). Debido a que estas moléculas son altamente polimórficas, permiten un gran espectro de unión a diferentes antígenos. Se ha observado que el polimorfismo de estas moléculas les permite unir péptidos con diferentes afinidades, sugiriendo que la formación estable del complejo CMH-péptido es dependiente de los linajes alélicos (7, 8).

La selección de péptidos según las afinidades de unión a diferentes linajes alélicos, se ha convertido en una estrategia promisoria para la selección de candidatos con gran especificidad, que permita un mejor anclaje a las moléculas presentadoras de antígenos, induciendo así la activación de la respuesta celular (9). El uso de herramientas bioinformáticas capaces de identificar epítopes con una unión específica a diferentes linajes alélicos del CMH, han demostrado ser útiles en el área de la inmunología, para la identificación de péptidos potenciales candidatos a vacuna.

La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), se ha enfocado principalmente en la identificación de regiones de unión implicadas en los procesos de invasión del parásito malárico a su célula diana; los péptidos de ~20 a.a. de longitud así identificados, son posteriormente modificados para mejorar su ajuste en diferentes moléculas del HLA (por su sigla en inglés Human Leukocyte Antigen) (9-12).

Dentro de los potenciales candidatos a vacuna frente a *P. vivax* identificados en la FIDIC, se encuentra *Pv*12, una proteína identificada con base en su homóloga *Pf*12 en *P. falciparum*. Esta proteína pertenece a la familia de 6 cisteínas, está localizada en la superficie de la membrana del merozoíto y estudios previos demostraron su antigenicidad mediante el reconocimiento de la proteína por sueros de individuos expuestos (13, 14).

En el presente trabajo, se seleccionaron epítopes T de la proteína *Pv*12, con herramientas bioinformáticas y ensayos de unión *in vitro* a moléculas HLA-DRB1 de cuatro linajes alélicos de alta frecuencia en la población endémica para malaria. La antigenicidad fue evaluada estimulando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) provenientes de individuos expuestos, con los péptidos seleccionados y mediante ensayos de linfoproliferación de la población de células $CD4^+$. Adicionalmente, se evaluó la producción de citoquinas producidas tras la estimulación de los CMSP con estos péptidos.

1. Hipótesis

La proteína 12 de *Plasmodium vivax* contiene epítopes T de alta afinidad de unión a moléculas HLA-DRB1, capaces de generar una respuesta proliferativa de linfocitos T $CD4^+$ de individuos expuestos a la infección natural.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar la antigenicidad *in vitro* de péptidos de la proteína *Pv*12 de *Plasmodium vivax*, para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria

2.2. Objetivos específicos

- Genotipificar con métodos de alta resolución el gen HLA-DRB1 de individuos expuestos de zona endémica para la conformación de grupos experimentales correspondientes a los alelos HLA-DRB1*04, *07, *11 y *13.

- Seleccionar epítopes T de la proteína *Pv*12 de *P. vivax*, de acuerdo a su unión *in vitro* a moléculas HLA-DRB1*04, *07, *11 y *13.

- Evaluar la antigenicidad de los epítopes T seleccionados, mediante ensayos *in vitro* con Linfocitos T CD4+ de individuos expuestos correspondientes a los grupos experimentales.

- Establecer si existe una correlación entre la capacidad de unión de los epítopes T y la respuesta celular observada en los ensayos de antigenicidad.

3. Marco Teórico

3.1. La malaria

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*, la cual es transmitida a través de la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Según la OMS, para el año 2016, se presentaron 216 millones de casos alrededor del mundo, sin embargo, entre los años 2010 y 2016, la tasa de incidencia de la enfermedad se redujo en un 18%. A pesar de esto, un notorio incremento en la incidencia de casos ocurrió principalmente en las Américas, además del sur-este de Asia, pacífico occidental y algunas regiones africanas, entre los años 2014 a 2016 (3).

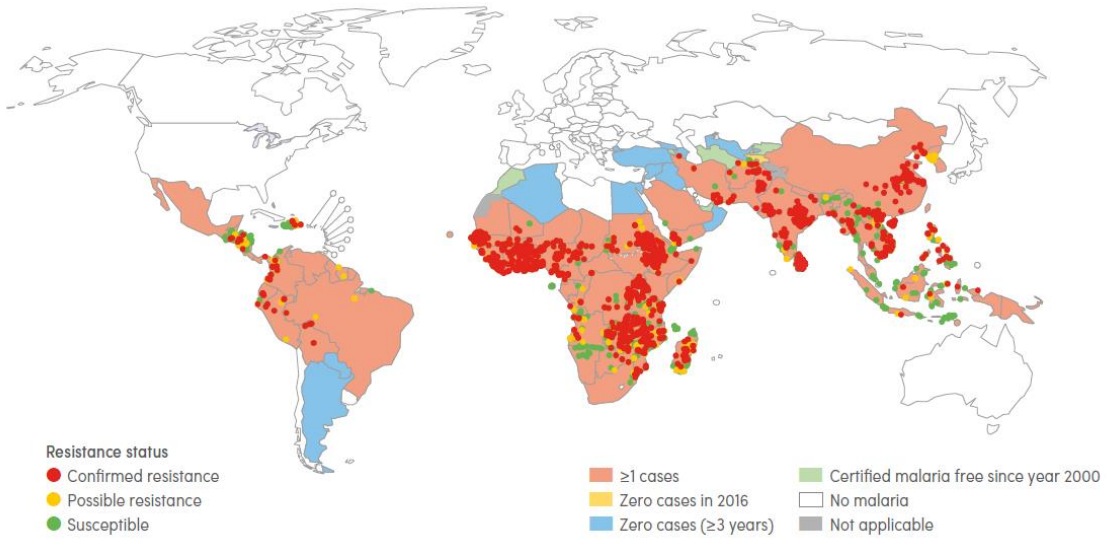
Esta enfermedad es causada por parásitos del filo Apicomplexa, género *Plasmodium*, que en humanos depende de cinco especies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Cerca del 90% de los casos son causados por *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo esta última la de mayor importancia en Asia y las Américas y la segunda especie más prevalente a nivel mundial. Aunque la mayoría de los casos globales son causados por la especie *P. falciparum*, en las Américas, el 64% corresponde a infecciones por *P. vivax* (3).

Las continuas estrategias de control del vector han generado altos grados de resistencia a los insecticidas (Figura 3-1) y el desarrollo de una vacuna para el manejo preventivo de la enfermedad es considerado fundamental por los sistemas de salud a nivel mundial.

El énfasis en el desarrollo de una vacuna ha sido dirigido a *P. falciparum*, donde un gran número de proteínas han sido descritas y evaluadas como candidatos a vacuna. Por otra parte, el estudio en *P. vivax* se ha visto retrasado, debido a que esta especie invade sólo reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros), que corresponden a cerca del 1-2% de las células sanguíneas en

circulación, lo cual ha generado dificultades técnicas para el mantenimiento de un cultivo continuo *in vitro* (4).

Figura 3-1. Reporte del estado de resistencia de los vectores a los insecticidas. (3).



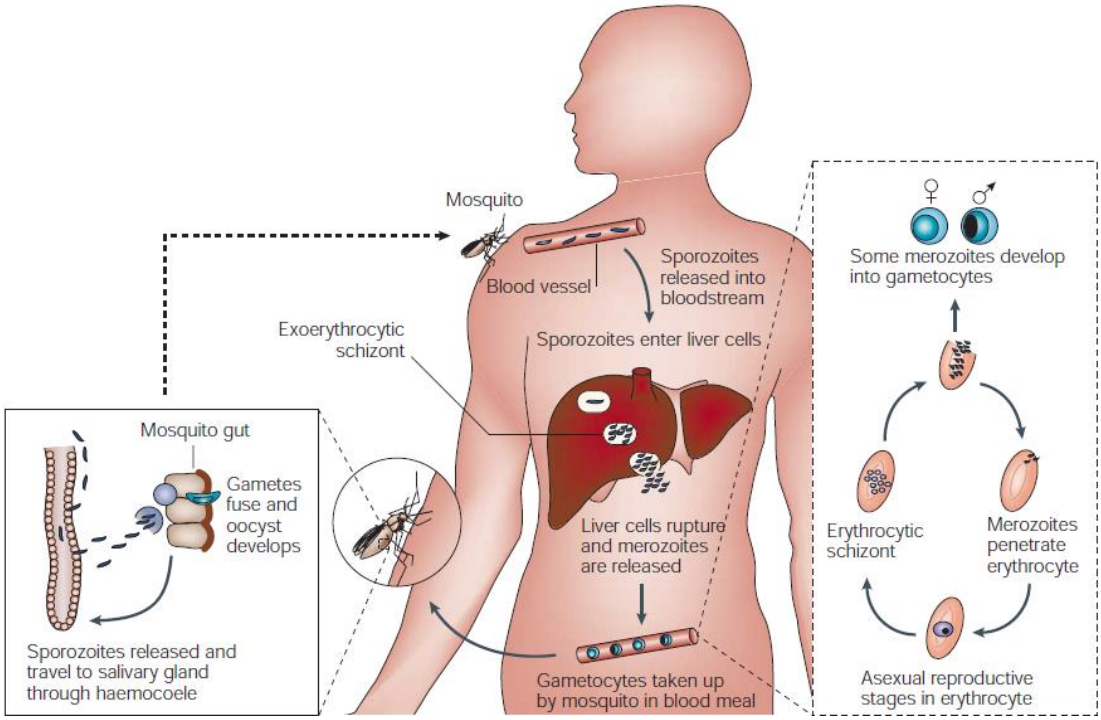
3.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

El ciclo de vida de *Plasmodium* spp. se presenta en dos fases: la fase sexual se lleva a cabo en mosquitos del género *Anopheles* y la fase asexual en el hospedero vertebrado, donde invade hepatocitos en su etapa pre-eritrocítica y glóbulos rojos en la etapa eritrocítica (1). La transmisión natural de la enfermedad inicia con la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*, que inyecta el parásito en forma de esporozoíto (se estima que, en cada picadura, el mosquito inyecta aproximadamente 100 esporozoítos). Estos esporozoítos viajan a través del torrente sanguíneo y circulan hasta llegar al hígado, invadiendo los hepatocitos (esta etapa se conoce como pre-eritrocítica) (15).

Después de invadir las células hepáticas, los esporozoítos se replican y se diferencian a merozoítos que posteriormente son liberados al torrente sanguíneo, donde llevan a cabo su etapa eritrocítica invadiendo glóbulos rojos. Después de múltiples rondas de replicación asexual y ruptura de los eritrocitos, estos seguirán invadiendo otros glóbulos rojos y además,

algunos de ellos se diferenciarán en gametocitos, los cuales pueden ser tomados de nuevo por los mosquitos y continuar su desarrollo sexual para perpetuar el ciclo (1, 16) (Figura 3-2).

Figura 3-2. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (17) .



En el caso de *P. vivax*, al llegar a las células hepáticas genera formas latentes denominadas hipnozoítos, los cuales pueden reactivarse y producir recaídas de la enfermedad (18); además, en la etapa eritrocítica, esta especie invade solamente reticulocitos (19).

Dependiendo de la etapa en que se encuentre (pre-eritrocítica o eritrocítica), el parásito expresa diferentes proteínas en su superficie para la invasión a la célula hospedera, de las cuales algunas están expuestas al sistema inmune y han sido postuladas como candidatos promisorios a vacuna contra la malaria (20).

Debido a que el desarrollo de una vacuna se ha visto limitado por restricciones técnicas, en la FIDIC se ha desarrollado una aproximación para la identificación de proteínas homólogas a aquellas de *P. falciparum* que han mostrado un rol importante durante los procesos de invasión a la célula hospedera (13, 21-28).

3.3. Respuesta inmune

La inmunidad adquirida después de una infección natural con *Plasmodium* permite controlar y tolerar la infección, más no la elimina ni la previene (29). En una primera infección con *Plasmodium* la primera línea de defesa desencadenada es la respuesta inmune innata, seguida de una respuesta inmune adaptativa la cual es mediada principalmente por anticuerpos y/o la interacción de células T ($CD4^+$, $CD8^+$) con las moléculas del CMH, dependiendo del estadio de la enfermedad (30). Las moléculas del CMH desempeñan funciones importantes en el reconocimiento intercelular y la diferenciación entre lo propio y lo extraño, formando un complejo CMH-péptido a través de la presentación de antígenos por parte de las Células Presentadoras de Antígeno (CPA) (8).

Dentro de los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa contra la malaria, se encuentran la respuesta de tipo humoral y celular. La respuesta humoral, está compuesta principalmente por anticuerpos producidos por células B, quienes juegan un papel importante como neutralizadores del patógeno, siendo capaces de reconocer antígenos en forma libre. Los anticuerpos son capaces de bloquear la entrada del parásito a su célula hospedera, además de mediar la lisis dependiente del complemento para la prevención de la fertilización de gametos y desarrollo de cigotos. Por otra parte, en la respuesta celular, las células T $CD8^+$, productoras de interferón-γ (IFN-γ), inhiben el desarrollo del parásito en los hepatocitos y las células T $CD4^+$ activan los macrófagos, para fagocitar los eritrocitos parasitados (17). Este trabajo se enfoca en evaluar la respuesta celular *in vitro*, ante la presentación antigénica a células T $CD4^+$ por parte de moléculas del CMH clase II.

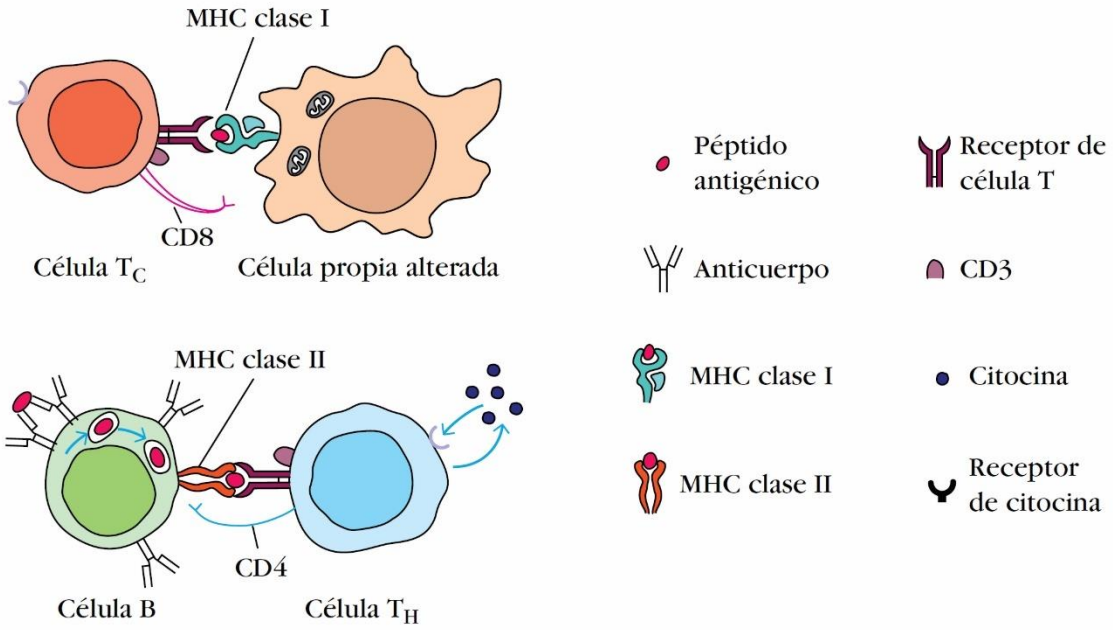
3.3.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

A diferencia de las células B, la respuesta de tipo celular mediada por células T ayudadoras (T_A) y T citotóxicas (T_C) (Linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente), necesita del procesamiento y presentación de los antígenos por parte de moléculas del CMH (Figura 3-3). El CMH en el ser humano se denomina HLA (por su sigla en inglés Human Leukocyte Antigen); este conjunto de genes se encuentra organizado en regiones que codifican tres tipos de moléculas, CMH clase I, clase II y clase III (7). Las moléculas de clase I y II participan en la

presentación de péptidos antigénicos, mientras que las regiones codificantes del CMH clase III, codifican varias proteínas secretadas que desempeñan funciones inmunitarias, algunos componentes del sistema de complemento y moléculas relacionadas con los procesos de inflamación (8).

Las moléculas de clase I están presentes en la mayoría de las células nucleadas, y pueden presentar antígenos endógenos a los linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos tienen como blanco principal de reconocimiento, células que han sido infectadas por microorganismos intracelulares o virus, además células propias alteradas (como las cancerígenas o las que han sufrido procesos de envejecimiento). Hacen su procesamiento vía citosólica generando péptidos de 8 a 10 aminoácidos de longitud para ser unidos y presentados por las moléculas del CMH clase I (31).

Figura 3-3. Presentación antigénica por las moléculas del CMH clase I y clase II. (Tomado y modificado de Kindt, Thomas J. et al.) (8).



Las moléculas de clase II son expresadas constitutivamente solo por CPA profesionales, como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Las CPA son capaces de captar antígenos exógenos, internalizarlos mediante procesos de endocitosis, fagocitosis o ambas, degradarlos en péptidos dentro de los compartimientos de procesamiento de las vías endocíticas y presentarlos sobre su superficie a las células T_A (8).

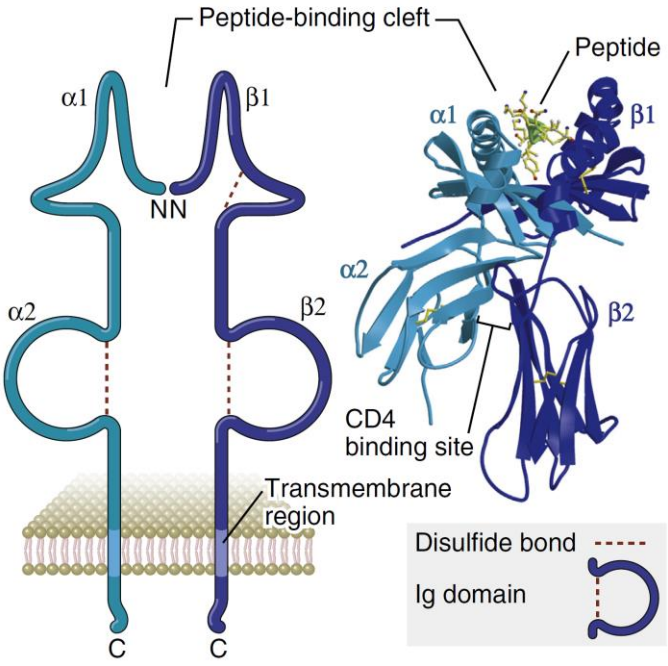
La vía endocítica degrada los antígenos endógenos en tres compartimientos ácidos: endosoma temprano (pH 6,0 a 6,5), endosoma tardío o endolisosoma (pH 5,0 a 6,0) y lisosoma (pH 4,5 a 5,0). El antígeno internalizado pasa de un compartimiento a otro encontrando un conjunto único de enzimas hidrolíticas y un pH cada vez más bajo para cada compartimiento. Los antígenos procesados son convertidos en polipéptidos de 13 a 18 residuos, los cuales se unen a moléculas clase II; este complejo es transportado hasta la membrana para la presentación a células T_A (8).

3.3.2. Moléculas CMH clase II

Las moléculas HLA clase II son glicoproteínas de membrana que funcionan como moléculas presentadoras de antígenos especializadas, formando un complejo estable con los péptidos a presentar, llevándolos a la superficie celular para el reconocimiento por parte de las células T_A. Las moléculas de clase II están compuestas por dos cadenas (α y β) unidas mediante interacciones no covalentes. Cada molécula contiene dominios α1 y α2 en una cadena, y otro β1 y β2; los dominios α2 y β2 se encuentran próximos a la membrana y los dominios de unión α1 y β1 hacia la parte distal, en la cual se encuentra una hendidura de unión al péptido (Figura 3-4). La hendidura es abierta en ambos extremos y es capaz de unir péptidos de 13 a 18 aminoácidos de longitud, que derivan de proteínas exógenas (propias o extrañas) procesadas vía endocítica (8).

El complejo HLA clase II en el ser humano, presenta tres tipos de regiones génicas críticas para la función inmunitaria: DP, DQ y DR (8). Existe un número muy grande de alelos diferentes para cada locus y la capacidad de unión a un antígeno varía de un alelo a otro, presentando diferencias en la afinidad. Los genes de clase II son altamente polimórficos y estudios muestran que la cadena β del HLA-DR presenta más de 480 alelos distintos, mientras que la cadena α es muy conservada, siendo usualmente monomórfica (7). Las diferentes formas alélicas de los genes del CMH da como resultado una amplia diversidad, que permite millones de combinaciones en la formación de haplotipos, permitiendo así una alta variedad en la afinidad de unión de péptidos antigénicos. En malaria, se han encontrado asociaciones en la respuesta inmune a diferentes antígenos relacionadas con especificidad de unión a alelos HLA-DRB1 (6, 9).

Figura 3-4. Estructura de la molécula CMH clase II (32).



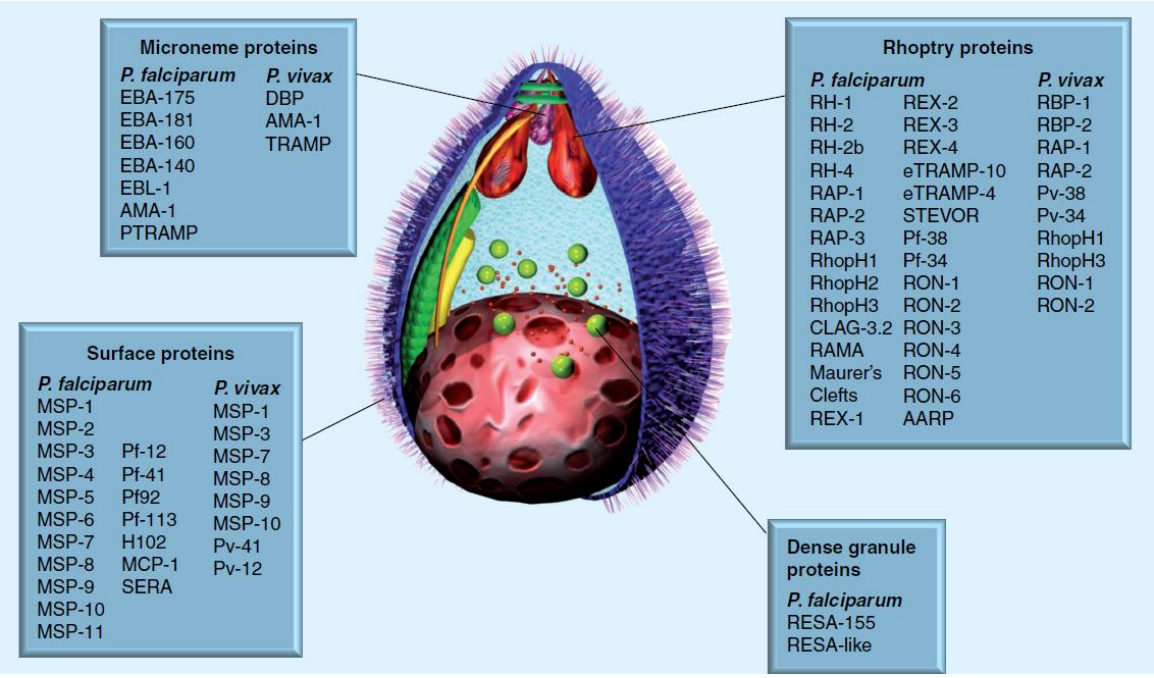
3.4. Identificación de candidatos a vacuna en *Plasmodium vivax*

Aunque las diferentes estrategias de control de la malaria han permitido reducción en el número de casos, esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública alrededor del mundo. El desarrollo de una vacuna que logre controlar y prevenir la enfermedad, hace parte de los objetivos estratégicos y la hoja de ruta en el control de este patógeno (2). A pesar que el desarrollo de una vacuna contra *P. falciparum* está bastante avanzado, el progreso hacia una vacuna contra *P. vivax* es incipiente, y retrasa toda la agenda de erradicación de la malaria.

La complejidad en el ciclo de vida de *Plasmodium*, falta de conocimiento sobre los mecanismos de evasión de la respuesta inmune al parásito, y la falta de un cultivo continuo *in vitro* para *P. vivax*, son las mayores dificultades en el desarrollo de una vacuna. Varias estrategias han sido utilizadas para la identificación de proteínas importantes en los procesos de invasión (33-35), entre ellas, la identificación de proteínas homólogas a aquellas de *P. falciparum* y la adaptación de una cepa de *P. vivax* a un modelo de primates no humanos (36), han permitido avances en

la identificación de proteínas que participan en los procesos de invasión del parásito (Figura 3-5) (37). Estas proteínas han sido identificadas en los estadios del ciclo de vida del parásito, y también su localización en los organelos celulares, estudiando los posibles roles en el desarrollo y procesos de invasión del parásito.

Figura 3-5. Proteínas identificadas para *P. falciparum* y *P. vivax* en el merozoíto (37).



3.4.1. Inmunoinformática

El desarrollo de una vacuna sintética basada en sub-unidades, multi-antigénica, multi-estadio, está basado en la identificación de determinantes antigénicos (epítopes) de diferentes proteínas que muestren un rol importante en el proceso de invasión del parásito (38). La comprensión de los procesos de reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmune, ha permitido el desarrollo de herramientas bioinformáticas alimentadas de datos experimentales, lo cual ha tenido un fuerte impacto en la investigación en el área de la inmunología (39).

El uso de algoritmos para tamizar epítopes de células B y T, permite acelerar el proceso de identificación de posibles sitios de unión, utilizando las secuencias proteicas de los

patógenos(40). Esta metodología, en la cual se utiliza la información genómica para identificar regiones proteicas potencialmente antigénicas, es conocida como "vacunología reversa" (41).

Un epítope es la parte de un antígeno que es reconocido por los receptores de las células B y/o células T del hospedero. Los epítopes peptídicos pueden ser encontrados de manera continua (lineales o secuenciales) o distantes en la secuencia de aminoácidos (conformacionales o discontinuos). Mientras que los epítopes de células B son tanto lineales como conformacionales, los epítopes de células T son siempre lineales (39).

La identificación de epítopes B mediante métodos *in silico* es generalmente enfocada hacia los epítopes lineales. Los predictores son capaces de combinar propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, tales como accesibilidad, hidrofobicidad, flexibilidad, entre otras, para la identificación de posibles epítopes en la secuencia de la proteína (42, 43).

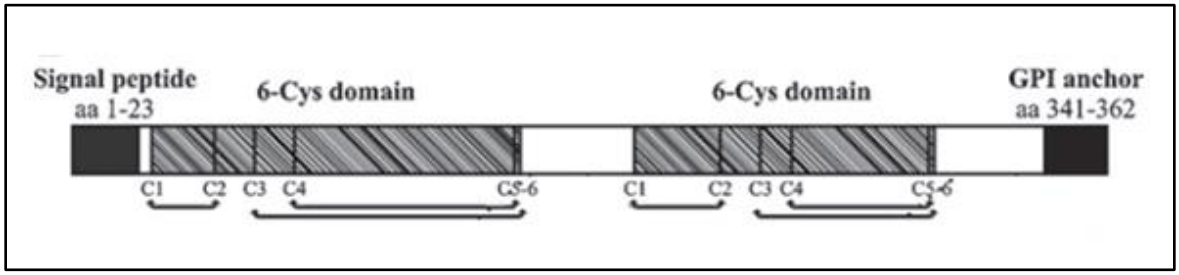
En cuanto los epítopes T, la identificación es un poco más compleja debido al alto polimorfismo presentado por las moléculas del CMH. Diversos servidores web disponen de algoritmos y redes neuronales artificiales para predecir epítopes de células T. Estos se basan en enfoques como considerar los perfiles de anfipaticidad de proteínas, motivos de secuencia, matrices cuantitativas (QM), redes neuronales artificiales (ANN), máquinas de vectores de soporte (SVM), relación cuantitativa de actividad estructural (QSAR) y simulaciones de acoplamiento molecular, entre otros (44).

3.4.2. Proteína *Pv*12

Estudios comparativos del perfil proteómico de *P. vivax* con proteínas homólogas a *P. falciparum* y otras especies de *Plasmodium,* han permitido la identificación de proteínas importantes en el proceso de invasión del parásito y entre éstas, se encuentra la proteína *Pv*12 (14, 35, 37). Este antígeno pertenece a la familia de proteínas de 6-cisteínas (contienen dominios s48/45), posee un tamaño de 362 a.a. y una masa molecular de aproximadamente 41 kDa. La estructura de *Pv*12 contiene un péptido señal (SP), un anclaje a Glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la región C-terminal, y dos dominios de 6 cisteínas (Figura 3-6). Aunque inicialmente se caracterizó como una proteína de roptrias (45), estudios posteriores confirmaron su ubicación en la membrana del merozoíto, al igual que su homóloga en *P. falciparum* (*Pf*12) (13, 46).

Aunque no se ha determinado la función de la proteína *Pv*12 en la fase eritrocítica, algunas proteínas miembros de la familia de 6-cisteínas en *P. falciparum* han mostrado un papel de ligando de unión a otras proteínas, además aquellas proteínas que presentan dominios s45/48 han mostrado ser esenciales para la fusión de los gametos femeninos y masculinos, exflagelación de gametos masculinos, y están implicadas en la replicación de los esporozoítos en las células hepáticas (47). Estas proteínas son especialmente consideradas como candidatos de bloqueo de la transmisión.

Figura 3-6. Estructura de la proteína *Pv*12. (Tomado y modificado de Moreno-Pérez 2012. (13)



Estudios genéticos han demostrado que la proteína *Pv*12 es altamente conservada entre diferentes especies de *Plasmodium*, presentando una baja variabilidad entres aislados de *P. vivax*, además de ser uno de los antígenos más conservados descritos a la fecha para esta especie (48). Esta proteína es reconocida por sueros de pacientes infectados naturalmente (13, 45). Por lo anterior, *Pv*12 es considerado como un candidato promisorio para el desarrollo de una vacuna basada en sub-unidades, multi-antígeno y multi-estadio.

4. Materiales y métodos

4.1. Tipo de investigación

Este estudio es de tipo descriptivo experimental.

4.2. Población de estudio

4.2.1. Área de estudio

Dos áreas de estudio, donde la malaria por *P. vivax* es endémica en Colombia (Bahía Solano – departamento del Chocó y Tierralta – departamento de Córdoba)(49), fueron seleccionadas para realizar la tipificación del gen HLA-DRB1 a individuos que previamente presentaron la enfermedad. Una muestra de sangre periférica de 4 mL fue tomada en un tubo con EDTA (BD Vacutainer) a voluntarios mayores de 18 años, con firma previa de un consentimiento informado (Anexo 1).

Adicionalmente, se seleccionaron individuos para conformar un grupo control de un área no endémica para malaria en Colombia (Bogotá D.C.), que fueron tipificados para los alelos de interés. Los individuos evaluados no presentaban antecedentes de malaria, ni habían visitado zonas endémicas en los últimos dos años. El procedimiento fue llevado a cabo en individuos mayores de 18 años, previa firma de un consentimiento informado (Anexo 2).

A todas las muestras incluidas en los estudios de linfoproliferación se les realizó un extendido de gota gruesa para descartar infecciones activas. Muestras de sangre de individuos con infección activa fueron recolectadas para la obtención de lisado de *P. vivax* utilizado como control positivo en los ensayos de antigenicidad (Anexo C).

4.2.2. Tipificación del gen HLA-DRB1

A partir de 300 µL de sangre total, se extrajo ADN genómico (ADNg), utilizando el kit de purificación "Wizard Genomic DNA" de Promega. El ADNg obtenido fue verificado por gel de agarosa al 1% teñido con Sybr Safe (Invitrogen) y posteriormente cuantificado utilizando una placa µDrop en un espectrómetro MultiSkan GO (Thermo Scientific). Las muestras de ADNg fueron enviadas a los laboratorios de Histogenetics (Ossining, NY, USA) para la tipificación de alta resolución del gen HLA-DRB1 mediante tipificación basada en secuencia (SBT del inglés sequence-based typing).

4.2.3. Conformación de grupos experimentales

El presente estudio se enfocó en cuatro de los linajes alélicos HLA-DRB1 más frecuentes en áreas endémicas para malaria en el mundo (HLA-DRB1*04, *07, *11 y *13) (50). Una vez todos los individuos fueron tipificados, se seleccionaron máximo 8 individuos por cada uno de los linajes alélicos de interés. Individuos homocigotos o que presentaron sólo uno de los alelos de interés fueron seleccionados, mientras que aquellos que presentaban dos alelos de interés fueron descartados. Para el grupo control, fueron seleccionados 2 individuos por alelo.

4.3. Selección de péptidos

4.3.1. Predicción *in silico* de epítopes T

Para la predicción *in silico* de epítopes T, fue utilizada la secuencia de la proteína *Pv*12 de *Plasmodium vivax* reportada en la base de datos PlasmoDB con número de acceso PVX_113775. El servidor NetMHCIIpan-3.1 fue usado para la predicción de epítopes T con una longitud de 15 a.a., dependiendo de su perfil de unión a moléculas HLA-DRB1*0401, *0701, *1101 y *1302 (51).

4.3.2. Síntesis de péptidos

Los epítopes T seleccionados fueron sintetizados y purificados por 21st Century Biochemicals Inc. (Marlborough, MA, USA). Los péptidos fueron caracterizados mediante espectrometría de masas conocida del tipo matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Adicionalmente, fueron sintetizados dos péptidos control marcados con biotina para los ensayos de unión. Estos péptidos han sido reportados en la literatura como péptidos de alta afinidad de unión, $HA_{306-318}$ (PKYVKQNTLKLAT) para las moléculas HLA-DRB1*0401 y *1101 (52, 53), y TT (QYIKANSKFIGITE) para las moléculas HLA-DRB1*0701 y *1302 (54). Los péptidos biotinados se sintetizaron usando sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce Chemical, Rockford).

4.4. Selección *in vitro* de epítopes T

4.4.1. Cultivo celular

Para la obtención de las moléculas HLA-DR, cuatro líneas celulares linfoblastoides B (IHWG) homocigotas para cada alelo de interés (IHW09025 para HLA-DRB1*0401, IHW09051 para HLA-DRB1*0701, IHW09043 para HLA-DRB1*1101 e IHW09055 para HLA-DRB1*1302) fueron cultivadas. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB, HyClone) al 10%, $NaHCO_3$ 2 g/L (SIGMA), piruvato de sodio 1 mM (GIBCO), y solución de antibiótico-antimicótico 1X (SIGMA). El cultivo fue mantenido a 37°C, en una atmósfera de CO_2 al 5%, y una vez el medio era metabolizado, las células eran recolectadas y los pellets congelados a -80°C hasta el proceso de purificación. Cada línea celular fue cultivada hasta obtener un pellet de $5X10^9$ células.

Por otro lado, se llevó a cabo el cultivo del hibridoma L-243 (HB-55 ATCC) para la obtención del anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR, bajo las mismas condiciones de cultivo de las líneas linfoblastoides. Una vez el medio era metabolizado, el sobrenadante del cultivo en el cual se

encontraba el anticuerpo de interés fue recolectado y almacenado a -20°C con azida de sodio al 0,02%, hasta su purificación.

4.4.2. Purificación del anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR

La purificación del anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR del sobrenadante de cultivo, fue realizada mediante cromatografía de afinidad. El sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) saturado al 45% en baño frío y agitación constante, para posteriormente ser dejado en reposo toda la noche. El sobrenadante precipitado fue centrifugado y luego se recuperó el pellet, el cual fue resuspendido en PBS 1X y dializado para retirar el exceso de sales. La muestra dializada fue acoplada a Proteína A Sefarosa CL-4B (GE Healthcare) e incubada toda la noche a 4°C en agitación constante.

Varios lavados fueron realizados a la mezcla y posteriormente se inició el proceso de elución con un gradiente de pH (buffer citrato (pH 5,5), buffer acetato (pH 4,3) y buffer glicina (pH 2,3)) recolectando las fracciones en un buffer neutralizante (pH 7,7). La presencia del anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR en las fracciones obtenidas fue verificada por SDS PAGE y Western blot; posteriormente, las fracciones positivas fueron concentradas por centrifugación en Amicon (Merck Millipore) y cuantificadas con el kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), según especificaciones del fabricante.

4.4.3. Purificación de moléculas HLA-DR

Cuatro líneas celulares linfoblastoides B fueron cultivadas hasta recolectar $5x10^9$ células. Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis a una densidad de 10^8 células/mL e incubadas por una hora en hielo. El lisado de células fue centrifugado a 27,000 x g y se recuperó el sobrenadante, el cual fue incubado con DOC (Desoxicolato de sodio) al 5% por 10 minutos, a 4°C en agitación constante.

El sobrenadante fue ultracentrifugado a 100,000 x g por dos horas para separar la mayor cantidad de detritos celulares posibles. El sobrenadante fue filtrado por membranas de 0,45 y

0,20µm para finalmente ser mezclado con una columna de Proteína A Sefarosa acoplada al anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR mediante entrecruzamiento con DMP (Dimethyl pimelimidate).

La columna fue lavada con diferentes buffers y posteriormente se procedió a la elución de la proteína, recuperando fracciones recolectadas en un buffer neutralizante a pH 6,8. La presencia de las moléculas fue verificada mediante SDS-PAGE, y las fracciones donde se evidenciaba la presencia de la proteína fueron concentradas por centrifugación en Amicon (Merck Millipore) y cuantificadas con el kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), según especificaciones del fabricante.

4.4.4. Ensayos de unión *in vitro*

Para la evaluación de los epítopes T seleccionados, se realizaron ensayos de unión a moléculas HLA-DR purificadas mediante una ELISA convencional. Moléculas HLA-DR [0,1 µM] fueron incubadas con un péptido control marcado con biotina [5 µM], los péptidos seleccionados *in silico* ([250 µM], 50 veces exceso del péptido control) e incubado por 24 horas a temperatura ambiente (T.A.). El complejo CMH-péptido fue incubado por dos horas a T.A. en inmuno-módulos NUNC (Thermo Fisher Scientific) cubiertos con anti-HLA-DR [10 µg/mL] y los sitios inespecíficos bloqueados con BSA al 3% en PBS 1X por una hora a T.A. El ensayo fue incubado con Estreptatividina marcada con Fosfatasa alcalina en dilución 1:500 por una hora a T.A. y posteriormente incubado por 30 minutos con solución reveladora pNPP (*p*-nitrophenylphosphate, SIGMA). La reacción fue leída a 450 nm en un lector de ELISA MultiSkan GO (Thermo Fisher Scientific). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado, y los valores medios fueron utilizados para calcular los valores de unión.

El porcentaje de unión fue calculado con la siguiente formula:

$$100 * \left[1 - \left(\frac{\Delta\ DO\ en\ presencia\ del\ competidor}{\Delta\ DO\ en\ ausencia\ del\ competidor}\right)\right]$$

4.4.5. Ensayos de IC50

El cálculo del valor IC50, fue realizado para aquellos péptidos que presentaron un valor de unión superior al 50%, es decir, los péptidos capaces de desplazar por competición al péptido control en un 50%. Los ensayos de IC50 siguieron la misma metodología, con una curva de concentraciones de los péptidos de alta unión desde 250 µM a 4,2 µM.

El valor de unión de cada punto fue calculado con la siguiente formula:

$$\mathbf{1} - \left(\frac{\Delta\ DO\ en\ presencia\ del\ competidor}{\Delta\ DO\ en\ ausencia\ del\ competidor}\right)$$

Los valores de unión obtenidos fueron graficados obteniéndose una curva de decaimiento exponencial de segundo orden, la formula fue utilizada en el programa Mathematica v11.0 (Wolfram Research, Inc.) para calcular la concentración a la cual el péptido es capaz de desplazar al péptido control en un 50%. Para comparar los valores predichos *in silico* con los obtenidos en los ensayos *in vitro,* fue calculado un valor relativo de unión, dividiendo el valor de IC50 (µM) para cada péptido sobre el valor de IC50 (µM) de su respectivo péptido control. Los péptidos con valores ≤10 fueron considerados buenos péptidos de unión.

Los péptidos que presentaron los valores de IC50 más bajos para cada molécula HLA-DR fueron seleccionados para los ensayos de linfoproliferación; adicionalmente, un péptido de unión universal (a todos los alelos evaluados) fue seleccionado para los ensayos de proliferación. El péptido 39115 fue seleccionado como un péptido control de baja unión experimental, el cual no se unió a ningún alelo evaluado.

4.5. Ensayos de antigenicidad

4.5.1. Ensayos de Linfoproliferación de células T CD4+

A los individuos que conformaron los grupos experimentales (expuestos y grupo control), les fue realizada una segunda toma de muestra de 40 mL de sangre periférica en tubos con CPD (BD Vacutainer).

La muestra de sangre fue centrifugada por 7 minutos a 550 x g para separar la capa leucocitaria; a partir de un gradiente de centrifugación usando Ficoll®-Paque PLUS en proporción 1:2 (Ficoll:Capa leucocitaria) fueron separadas las CMSP, las cuales fueron utilizadas para evaluar la respuesta proliferativa frente a los péptidos seleccionados.

Para identificar las generaciones celulares inducidas por los diferentes antígenos utilizados, las CMSP fueron marcadas con CFSE 5 µM (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Molecular Probes) por 5 minutos a T.A. y posteriormente lavadas tres veces con PBS 1X con plasma autólogo al 10%. Fueron sembradas $2x10^5$ CMSP por pozo, en una caja de 96 pozos de fondo redondo (Costar) en 200 µL de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de plasma autólogo inactivado, $NaHCO_3$ 2,0 g/L (SIGMA), piruvato de sodio 1 mM (GIBCO), y solución de antibiótico-antimicótico 1X (SIGMA). Las CMSP fueron estimuladas con los diferentes péptidos a evaluar, a una concentración final de 10 µg/mL; como control negativo, se utilizó el péptido 39115 de baja unión experimental, como control positivo, se utilizaron lisado de *P. vivax* 5 µg/mL y PHA al 2%; adicionalmente, un pozo sin estímulo (CMSP con sólo medio), se usó como control del ensayo. Las células fueron incubadas durante 5 días a 37°C, en una atmósfera de CO_2 al 5%. Para los ensayos de Linfoproliferación fueron utilizados por individuo 7 pozos por duplicado (para cada antígeno y células control).

Pasado el tiempo de incubación, las células fueron recuperadas y el sobrenadante almacenado a -80°C para evaluar la producción de citoquinas. Las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 humano producido en ratón marcado con Pacific Blue (Clon RPA-T4) (BD Biosciences) y fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos obtenidos con el citómetro fueron analizados con el programa FlowJo v7.6.5 (FlowJo, LLC), con el fin de evaluar la respuesta de proliferación de la población $CD4^+$.

La proliferación celular fue evaluada como la perdida de la intensidad de fluorescencia del CFSE, calculando el porcentaje de la intensidad de fluorescencia de las células en presencia de antígeno, dividida sobre el porcentaje de la intensidad de fluorescencia de las células en ausencia de antígeno. Los resultados fueron expresados como un índice de estimulación (IE), donde un valor ≥2 fue considerado positivo.

Un segundo análisis fue realizado para calcular un valor relativo de proliferación y verificar los valores obtenidos con el programa FlowJo. El valor relativo de proliferación fue calculado dividiendo el valor medio de MFI de la población $CD4^+$ sin estímulo, sobre el valor medio de MFI de la población $CD4^+$ con estímulo. La respuesta proliferativa fue considerada positiva si

se observaba una pérdida del 1% de fluorescencia de la población $CD4^+$ estimulada con respecto a población $CD4^+$ sin estímulo (punto de corte ≥1,01).

4.5.2. Evaluación de citoquinas en sobrenadante

La producción de las citoquinas IFN-γ, TNF, IL-10 e IL-6 fue cuantificada en el sobrenadante del cultivo, mediante el kit BD CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FCAP Array v3.0.1 (BD Biosciences). La producción de citoquinas para cada estímulo fue comparada con la de aquellos pozos con células sin estímulo, tomando como referencia una curva estándar y expresando los valores en pg/mL.

4.6. Análisis estadísticos

Para graficar y analizar los datos obtenidos de los ensayos fue empleado el software GraphPad v5.01 software (GraphPad Software, Inc.). Para los ensayos de linfoproliferación y producción de citoquinas, se realizaron pruebas de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk. Para comparar los resultados del grupo expuesto con el grupo control, se utilizó el test de Mann-Whitney U para variables no paramétricas y el t-test para variables con distribución normal. Para comparaciones múltiples, fue utilizado el test de Kruskal-Wallis con un post-test de Dunn´s. Para todos los análisis se utilizó un intervalo de confianza del 95% y los valores <0,05 fueron considerados significantes.

5. Resultados

5.1. Grupos experimentales

5.1.1. Población de estudio

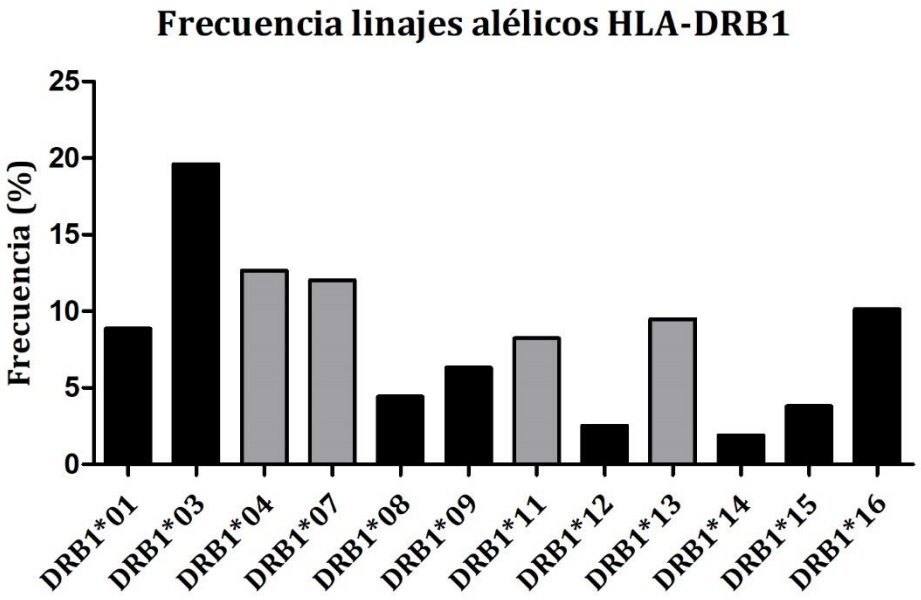
Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en dos poblaciones colombianas donde la malaria por *P. vivax* es endémica. En el municipio de Bahía Solano – departamento del Chocó, fueron tomadas 29 muestras, mientras que en el municipio de Tierralta – departamento de Córdoba, fueron recolectadas 50 muestras, para un total de 79 muestras que hicieron parte del estudio.

Para conformar el grupo control, 8 individuos (dos por alelo de interés) pertenecientes a la ciudad de Bogotá, fueron seleccionados.

5.1.2. Tipificación del gen HLA-DRB1 y conformación de los grupos experimentales

La tipificación del gen HLA-DRB1 se realizó para la conformación de los grupos experimentales y control, seleccionando individuos con linajes alélicos HLA-DRB1*04, *07, *11 y *13, reportados con alta frecuencia en zonas endémicas de malaria en el mundo (50). La evaluación de la frecuencia alélica del gen HLA-DRB1 en las dos poblaciones colombianas arrojó como resultado 12 linajes alélicos (Figura 5-1). Los cuatro linajes alélicos seleccionados representaron una alta frecuencia en la población de estas dos zonas endémicas, cubriendo un 42,4% de los alelos en la población.

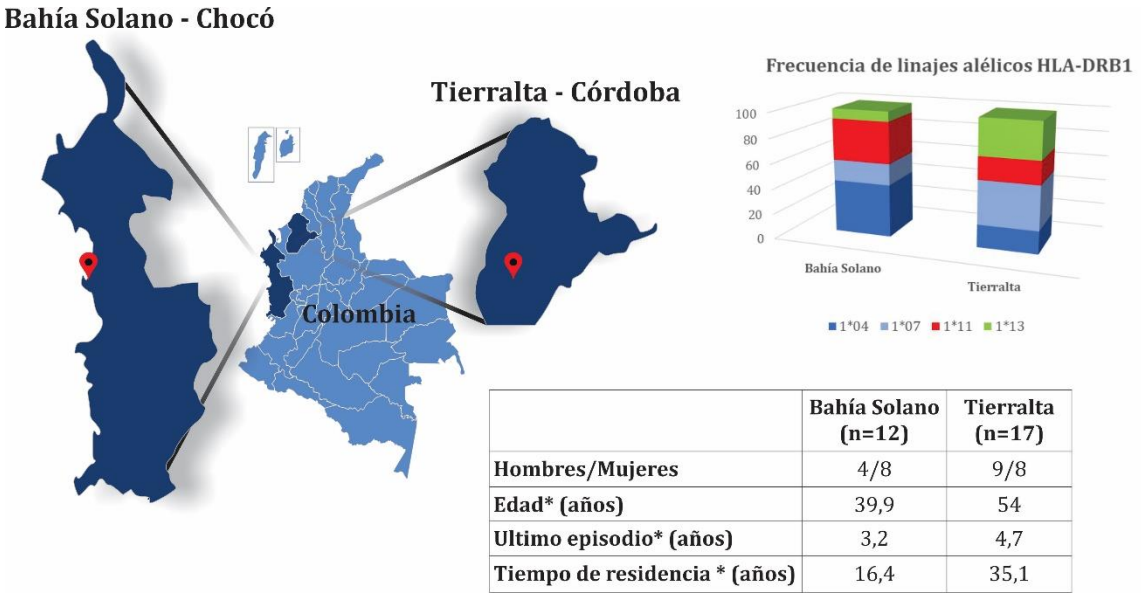
Figura 5-1. **Frecuencia de los linajes alélicos HLA-DRB1 en la población de estudio**. Las barras en color gris resaltan los cuatro linajes alélicos de interés en el estudio. Los doce linajes alélicos fueron resultado de la tipificación de 79 individuos de zona endémica.



HLA-DRB1*04 presentó una frecuencia del 12,66%, el linaje HLA-DRB1*07 una frecuencia del 12,03%, HLA-DRB1*11 un 8,23% y HLA-DRB1*13 un 9,49%, siendo los linajes 1*04 y 1*07 segundo y tercero en orden de la frecuencia total, y 1*11 y *13 quinto y séptimo, respectivamente. Diferente a lo reportado, el alelo de mayor frecuencia en estas poblaciones fue el linaje 1*03 con un 19,62% y los linajes 1*16 (10,13%) y 1*01 (8,86%) entre los de mayor frecuencia.

Para los ensayos de antigenicidad, fueron seleccionados aquellos individuos que presentaran uno de los alelos de interés. Los grupos experimentales contaron con un máximo de 8 individuos. Para el linaje alélico HLA-DRB1*04 y *07, fueron seleccionados 8 individuos por grupo, para el linaje alélico HLA-DRB1*11 7 individuos, y finalmente 6 individuos para el linaje alélico HLA-DRB1*13 (Figura 5-2).

Figura 5-2. **Área de estudio, epidemiología y frecuencia de los linajes alélicos en los grupos experimentales.** Los individuos de Bahía solano – Chocó incluidos en el estudio fueron en su mayoría HLA-DRB1*04 y *11, por otro lado, los individuos seleccionados de Tierralta – Córdoba fueron en su mayoría HLA-DRB1*07 y *13. En la tabla se muestra información epidemiológica adicional.



	Bahía Solano (n=12)	Tierralta (n=17)
Hombres/Mujeres	4/8	9/8
Edad* (años)	39,9	54
Ultimo episodio* (años)	3,2	4,7
Tiempo de residencia * (años)	16,4	35,1

5.2. Selección *in silico* de epítopes T según su unión predicha a moléculas HLA-DRB1

Utilizando el servidor NetMHCIIpan-3.1, fueron seleccionados los epítopes T que presentaron los valores más bajos de %rank (rango percentil para un péptido generado al comparar su puntaje de unión con las puntuaciones de 200,000 péptidos naturales al azar de la misma longitud del péptido consultado) (51). Los diez (10) epítopes T con mejores valores de %rank, fueron escogidos como péptidos de alta afinidad de unión por predicción, a moléculas HLA-DRB1*0401, *0701, *1101 y *1302 (Tabla 5-1) y sintetizados como se describe en la sección 4.3.2.

Los valores de %rank arrojados por el servidor NetMHCIIpan-3.1 permitieron seleccionar péptidos de buena unión si su valor era ≤10, además dentro de este grupo, los péptidos fueron considerados como péptidos de unión débil (UD>2 a ≤10) o péptidos de unión fuerte (UF, ≤2).

Tabla 5-1. **Epítopes T seleccionados *in silico* con NetMHCIIpan-3.1.** Se muestra el valor de %Rank y el CoreF de los péptidos para cada uno de los alelos predichos. CoreF= región central mínima de nueve residuos en contacto directo con la hendidura de unión del CMH.

Posición (a.a.)	Secuencia	Alelo HLA-DRB	CoreF	%Rank	Código del péptido
68-82	RKNYELLPNNCFEQV	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	YELLPNNCF	3,5 14 35 30	39112
250-264	EECFLQGFNLSGKKE	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	FLQGFNLSG	3 24 27 55	39113
280-294	YNKIFYARVPQRIYQ	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	IFYARVPQR FYARVPQRI IFYARVPQR FYARVPQRI	8,5 0,7 0,9 8,5	39114
132-146	KKSYDDVSFRVPPNL	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	SYDDVSFRV DVSFRVPPN SYDDVSFRV	65 65 75 60	39115
159-173	NKAKIRVRKRSGEEY	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	IRVRKRSGE KAKIRVRKR IRVRKRSGE	95 85 13 85	39116
180-194	LGIIEVLIPSLPKKI	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	IEVLIPSLP LIPSLPKKI EVLIPSLPK LIPSLPKKI	14 8 9,5 11	39117
109-123	LVEYLHGAAAIVKRK	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	YLHGAAAIV LHGAAAIVK YLHGAAAIV	3 1,2 11 7	39118
196-210	GCDFTKNTSPLFTKG	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	FTKNTSPLF	6,5 7,5 30 4,5	39119
272-286	LTDLVMDHYNKIFYA	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	LVMDHYNKI	31 37 36 3,5	39120
307-321	KRLVAHFEFATTPDD	1*0401 1*0701 1*1101 1*1302	FEFATTPDD LVAHFEFAT VAHFEFATT LVAHFEFAT	40 65 65 85	39122

5.3. Selección *in vitro* de epítopes T según su unión a moléculas HLA-DRB1

5.3.1. Ensayos de unión

A partir de moléculas HLA-DRB1 purificadas de líneas celulares homocigotas para los alelos en estudio y del anticuerpo monoclonal obtenido del sobrenadante de cultivo del hibridoma, fue determinada la afinidad de unión de los epítopes T seleccionados *in silico* (Tabla 5-2).

Los ensayos de unión *in vitro* para la selección de péptidos de alta afinidad de unión fueron realizados mediante una ELISA competitiva. Los valores son presentados en la figura 5-3 y descritos a continuación.

Figura 5-3. **Ensayos de unión *in vitro* a moléculas HLA-DRB1**. La línea de corte para determinar péptidos con buena afinidad de unión fue de 50%. Aquellos péptidos que sobrepasaron la línea de corte se les realizó ensayos de IC50. Se muestra el porcentaje de unión para cada uno de los péptidos control (HAb y TTb) por alelo.

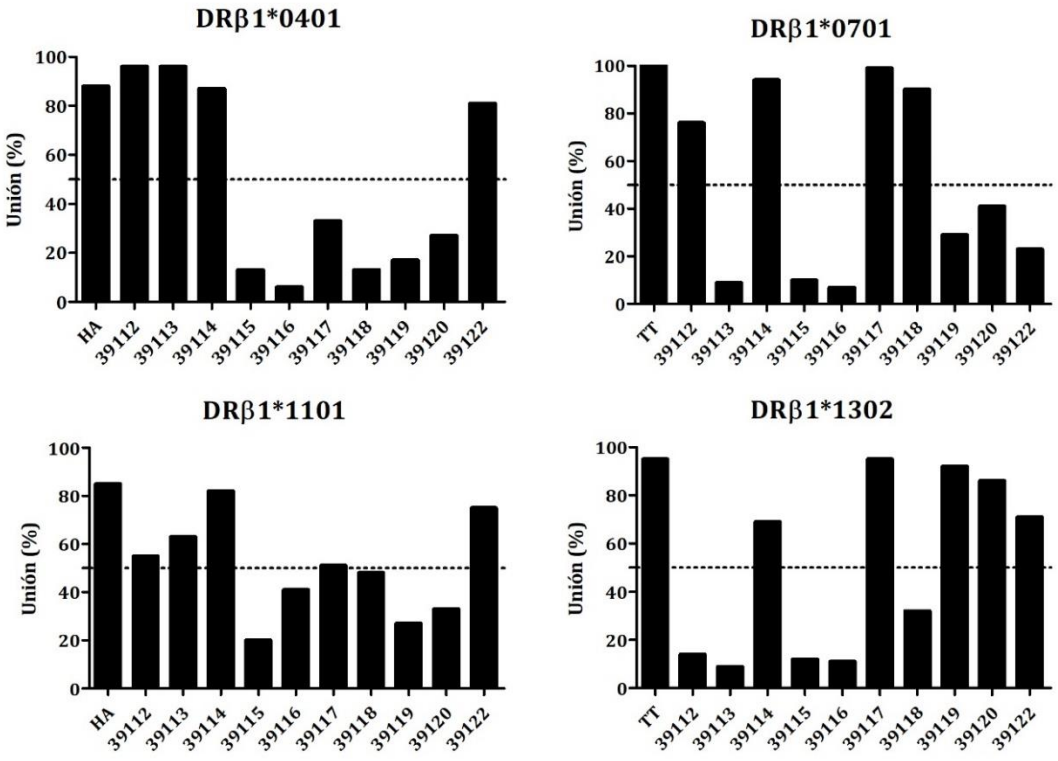


Tabla 5-2. **Valores experimentales de unión (%), IC50 experimental y valor relativo IC50**. *Resultados experimentales. ND= no determinado. El valor relativo de unión fue determinado utilizando los valores de IC50 (µM) de los péptidos controles para cada una de las moléculas.

Código del péptido	HLA-DRB1	Porcentaje de unión*	IC50 µM*	IC50 ratio
39112	DRB1*0401	95,78	7,26	0,37
	DRB1*0701	76,44	29,23	1,25
	DRB1*1101	55,44	250	52,41
	DRB1*1302	14,09	ND	ND
39113	DRB1*0401	95,81	7,36	0,38
	DRB1*0701	8,89	ND	ND
	DRB1*1101	62,88	38,54	8,08
	DRB1*1302	9,28	ND	ND
39114	DRB1*0401	87,38	43,18	2,22
	DRB1*0701	93,87	43,09	1,84
	DRB1*1101	82,09	8,28	1,74
	DRB1*1302	69,37	73,3	9,83
39115	DRB1*0401	12,98	ND	ND
	DRB1*0701	9,86	ND	ND
	DRB1*1101	20,02	ND	ND
	DRB1*1302	12,00	ND	ND
39116	DRB1*0401	5,76	ND	ND
	DRB1*0701	7,33	ND	ND
	DRB1*1101	41,12	ND	ND
	DRB1*1302	10,50	ND	ND
39117	DRB1*0401	33,08	ND	ND
	DRB1*0701	98,56	11,51	0,49
	DRB1*1101	51,13	133,77	28,04
	DRB1*1302	95,42	6,65	0,89
39118	DRB1*0401	13,48	ND	ND
	DRB1*0701	90,02	15,18	0,65
	DRB1*1101	48,21	ND	ND
	DRB1*1302	31,71	ND	ND
39119	DRB1*0401	17,45	ND	ND
	DRB1*0701	29,45	ND	ND
	DRB1*1101	26,94	ND	ND
	DRB1*1302	92,18	7,47	1
39120	DRB1*0401	26,73	ND	ND
	DRB1*0701	40,62	ND	ND
	DRB1*1101	32,68	ND	ND
	DRB1*1302	85,99	38	5,09
39122	DRB1*0401	80,94	58,89	3,03
	DRB1*0701	23,08	ND	ND
	DRB1*1101	74,87	170	35,64
	DRB1*1302	71,13	250	33,51

De los péptidos evaluados con moléculas HLA-DRB1*0401, cuatro fueron capaces de desplazar en más de un 50% al péptido control HAb. Los valores de unión para los péptidos 39112 y 39113 fueron de 96% para cada uno, para el péptido 39114 de 87% y para el péptido 39122 de 81%. Según los valores observados en los ensayos *in vitro* y los valores predichos, se encontró una concordancia del 70% en los datos de la unión de los diez péptidos (considerando tanto alta como baja capacidad de unión); tres de los cuatro péptidos de alta afinidad, se correlacionaron con los valores predichos.

Al evaluar la unión de los péptidos con las moléculas HLA-DRB1*0701, cuatro desplazaron más de un 50% al péptido control TTb, los péptidos 39112 (76%), 39114 (94%), 39117 (99%) y el 39118 (90%). Se encontró un 80% de concordancia entre los datos predichos y los observados para los diez péptidos evaluados. Tres de cuatro péptidos de alta afinidad, se correlacionaron con los valores predichos.

Para las moléculas HLA-DRB1*1101, cinco péptidos desplazaron en más de un 50% al péptido control HAb. Los siguientes péptidos presentaron una alta afinidad de unión: 39112 (55%), 39113 (63%), 39114 (82%), 39117 (51) y 39122 (75%). Los datos observados para los diez péptidos coincidieron en un 70% con los valores predichos. Dos de los cinco péptidos de alta afinidad concordaron con los valores predichos.

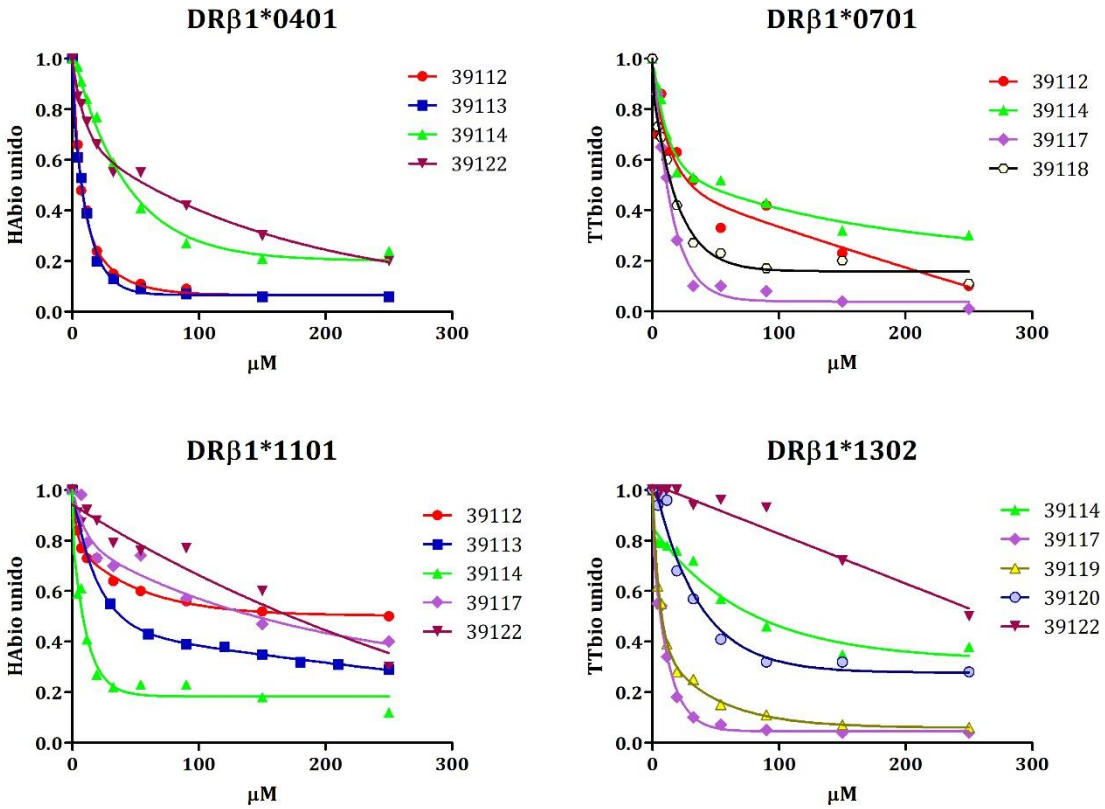
Cinco de los diez péptidos evaluados se unieron con alta afinidad a moléculas HLA-DRB1*1302, desplazando al péptido control TTb en más de un 50%. Los péptidos 39114 (69%), 39117 (95%), 39119 (92%), 39120 (86%) y 39122 (71%), presentaron alta afinidad de unión. La concordancia encontrada fue del 70% entre lo observado y lo predicho para los diez péptidos. De los cinco péptidos de alta afinidad de unión encontrados, solo tres coincidieron con la predicción.

En general, de los 10 péptidos evaluados, al menos 8 se unieron con alta afinidad a una de las cuatro moléculas estudiadas. Los valores experimentales de los péptidos que presentaron alta unión coincidieron en un 61% con los valores de %rank predichos. Al evaluar la concordancia total (alta y baja unión) de los valores predichos por la herramienta NetMHCIIpan-3.1, el 77,5% de los datos concuerdan tanto con los valores de alta como los de baja afinidad de unión.

5.3.2. Ensayos de IC50

En la tabla 5-2, se muestran los valores de IC50 (valor µM en el cual logran desplazar al péptido control en un 50%) de aquellos péptidos de alta unión experimental. Para las moléculas HLA-DRB1*0401 y *0701, se les realizo ensayos de IC50 a 5 péptidos por cada molécula mientras que para las moléculas HLA-DRB1*1101 y *1302, fueron realizados ensayos de IC50 para 6 péptidos por cada molécula (Figura 5-4).

Figura 5-4. **Ensayo de IC50 para los péptidos de alta afinidad de unión.** Diluciones seriadas de los péptidos problemas fueron utilizados para determinar la concentración (µM) a la que desplazaban en un 50% el péptido control.



Para estos ensayos también fue calculado el valor de IC50 de los péptidos controles para cada molécula. Para las moléculas HLA-DRB1*0401, el IC50 del péptido HA fue de 19,44 µM, para moléculas HLA-DRB1*0701, el IC50 del péptido TT fue de 23,37 µM, para HLA-DRB1*1101, el IC50 de HA fue de 4,77 µM, y finalmente para HLA-DRB1*1302, el IC50 de TT fue de 7,46 µM.

Estos valores fueron empleados para calcular el valor relativo de unión; los valores ≤10 fueron considerados como péptidos de buena unión.

Para cada uno de los alelos en estudio, fue seleccionado el péptido con el valor relativo de IC50 más bajo. Para los linajes alélicos HLA-DRB1*04 y HLA-DRB1*11, el péptido 39113 (0,38 y 8,08, respectivamente), para el linaje HLA-DRB1*07 y HLA-DRB1*13, el péptido 39117 (0,49 y 0,89, respectivamente).

Solo uno de los péptidos evaluados se unió con buena afinidad a todas las moléculas en estudio (péptido 39114), siendo considerado como epítope universal. Los péptidos que mostraron mejores afinidades fueron seleccionados para realizar los ensayos de linfoproliferación con los linfocitos T CD4+ de voluntarios de los grupos experimentales para cada linaje alélico.

5.4. Antigenicidad de epítopes T

5.4.1. Linfoproliferación de Linfocitos T CD4+

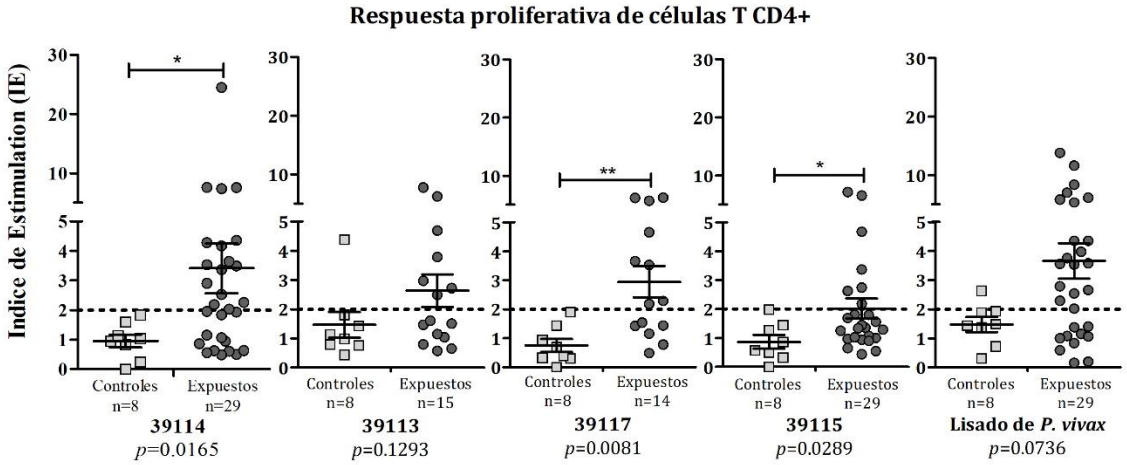
Una segunda toma de muestra fue extraída a los individuos pertenecientes a los grupos experimentales (individuos expuestos y grupo control). Las CMSP fueron separadas con Ficoll® y marcadas con CFSE. Las CMSP fueron estimuladas con los péptidos seleccionados dependiendo del alelo HLA-DRB correspondiente a cada individuo, el péptido 39115 como control de baja unión, lisado de parásito de *P. vivax* y PHA como controles positivos y células sin estímulo (con solo medio) como control del ensayo.

Los resultados de la proliferación fueron evaluados a las 120 horas de cultivo, y los análisis arrojaron los siguientes resultados. Los valores positivos fueron aquellos índices de estimulación (IE) ≥2 (Figura 5-5), y fueron comparados con el grupo control (Tabla 5-3). La estimulación de las CMSP con PHA fue utilizada como control del ensayo.

El péptido 39113 fue utilizado para estimular las CMSP de ocho individuos del linaje alélico HLA-DRB1*04 y siete individuos del linaje HLA-DRB1*11. Del grupo estimulado, 7 de 15 individuos presentaron IE positivos, es decir, un 46,6% de la población evaluada. La media de

estimulación fue de 2,6, sin embargo, los datos no fueron significativamente diferentes a los del grupo control.

Figura 5-5. **Linfoproliferación de linfocitos CD4+ estimulados con epítopes T de la proteína *Pv*12.** Un IE≥2 fue considerado un valor positivo de proliferación, el cual fue calculado sobre las células control sin estimulo. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando un test de Mann-Whitney U comparando los resultados de los individuos expuestos con el grupo control. (* *p*= <0,05; ** *p*= <0,005).



El péptido 39117 fue utilizado para estimular las CMSP de ocho individuos del linaje alélico HLA-DRB1*07 y seis individuos del linaje HLA-DRB1*13. Del grupo estimulado, 8 de 14 individuos generaron una respuesta proliferativa ante el estímulo, es decir, un 57% de la población evaluada. La media de estimulación fue de 2,95, y los datos fueron significativamente mayores a los del grupo control (*p*=0,0081).

Adicionalmente, a todas las CMSP de los individuos en estudio, les fue evaluada la respuesta proliferativa frente al péptido de unión universal 39114. Frente al estímulo, el 55% de los individuos (16/29) presentaron una respuesta positiva. La media de estimulación se observó en 3,4 y fue la más alta de todos los péptidos evaluados, además que fue significativamente mayor a la del grupo control (*p*=0,0165).

El lisado de *P. vivax* utilizado estimuló al 65% (19/29) de los individuos, con una media de proliferación de 3,66. A pesar de esto, no fueron observadas diferencias significativas con el grupo control.

El péptido control 39115 presentó el más bajo reconocimiento de todos los antígenos utilizados, con solo un 28% y la media de estimulación más baja del grupo de individuos

expuestos (2,01). A pesar de los bajos valores de estimulación, el grupo de expuestos presentó diferencias significativas con el grupo control (*p*=0,0289).

Todos los valores medios de estimulación del grupo control fueron <2, para todos los péptidos evaluados y el lisado del parásito.

Al comparar los datos de proliferación analizados con el programa FlowJo y los valores relativos de proliferación de MFI, se observó una alta concordancia con los resultados finales. La mayor diferencia se observó en el estímulo realizado con el lisado de *P. vivax* (12% en la variación de los datos). Para todos los demás péptidos, la diferencia no fue mayor al 5%. Los valores relativos para los individuos del grupo control no superó la línea de corte para ningún antígeno.

Tabla 5-3. **Índices de estimulación del grupo de individuos expuestos y grupo control**. SE= Error estándar (Standard Error), ns=no significativo. Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de Mann-Whitney U comparando los resultados de los individuos expuestos con el grupo control. (* *p*= <0,05; ** *p*= <0,005).

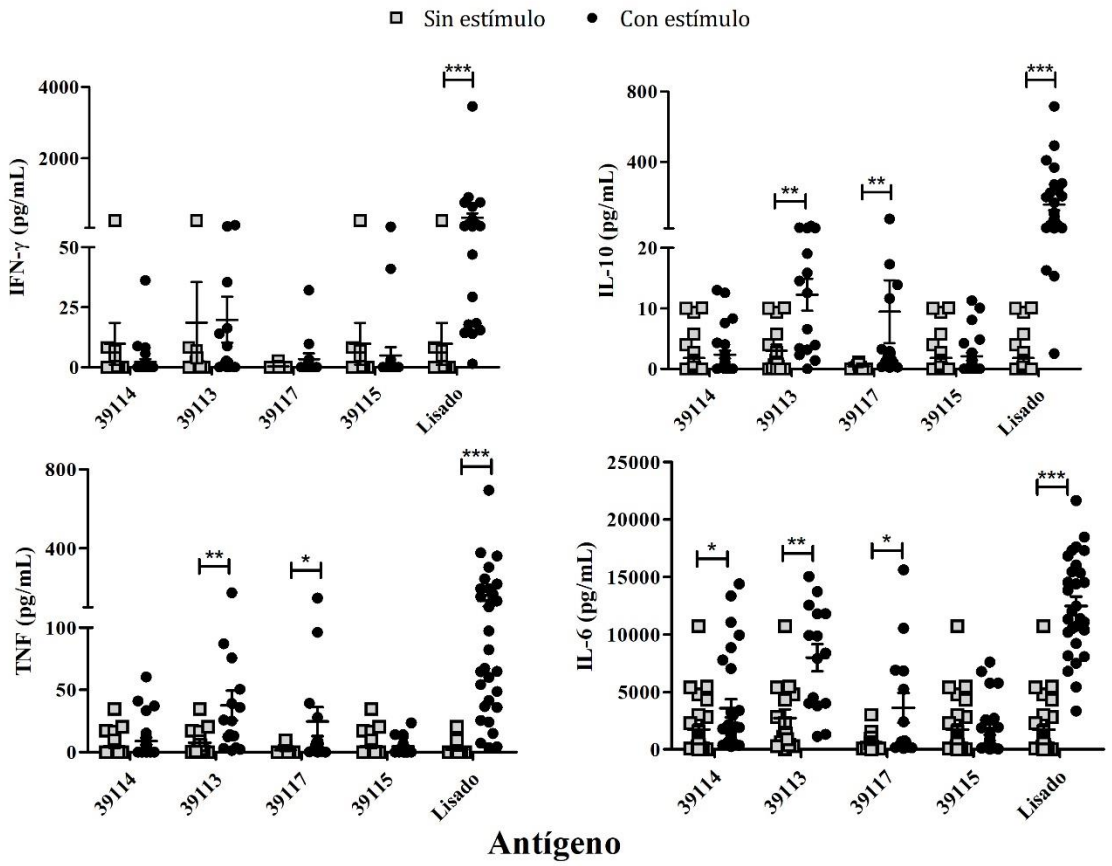
		Índice de estimulación media (IE)		
Antígeno	**HLA-DRB1**	**Individuos expuestos**	**Grupo control**	***p* valor**
39113	DRB1*04 y DRB1*11	2,632 (SE=0,556)	1,465 (SE 0,443)	ns
39117	DRB1*07 y DRB1*13	2,947 (SE=0,545)	0,7500 (SE 0,228)	**0,0081
39114	Epítope universal	3,409 (SE=0,846)	0,9500 (SE 0,217)	*0,0165
39115	Epítope control de baja unión	2,018 (SE 0,347)	0,87 (SE 0,231)	*0,0289
Lisado de *P. vivax*	Control positivo	3,664 (SE 0,607)	1,474 (SE 0,255)	ns

5.4.2. Respuesta de citoquinas frente al estímulo con los epítopes T

La producción de citoquinas en el sobrenadante del cultivo de CMSP estimuladas, fue cuantificada y comparada con los valores basales para cada individuo (Figura 5-6).

El grupo estimulado con el péptido 39113 (linaje HLA-DRB1*04 y *11) presentó un aumento significativo de IL-10, TNF e IL-6. Este mismo comportamiento se observó con el péptido 39117 (linaje HLA-DRB1*04 y *11). Sin embargo, al observar la respuesta de citoquinas generada frente al estímulo con el péptido universal 39114, solo se evidenció un aumento en la producción de IL-6.

Figura 5-6. **Producción de citoquinas en el sobrenadante de CMSP de individuos expuestos.** Las diferencias significativas fueron estimadas utilizando el test de Mann-Whitney U comparando los resultados de las células estimuladas con las células sin estímulo de cada uno de los individuos expuestos. (* *p*= <0,05; ** *p*= <0,005; *** *p*= <0,0005).



La producción de todas las citoquinas evaluadas (IFN-γ, TNF, IL-6 e IL-10) mostró un aumento significativo, al exponer las CMSP frente al lisado de proteínas de *P. vivax*. Caso contrario se observó con el péptido de baja unión experimental 39115, el cual no generó ningún cambio en la respuesta.

6. Discusión

La identificación de antígenos en *P. vivax* para la inclusión dentro de una vacuna basada en sub-unidades, es una estrategia importante en la lucha contra la malaria. La proteína *Pv*12 ha sido identificada como un antígeno de membrana del merozoíto, homóloga a la proteína *Pf*12 y altamente conservada tanto entre especies del género *Plasmodium* como entre aislados de *P. vivax,* por lo que en este estudio se propone evaluar su potencial como candidato a vacuna (13, 46, 55, 56).

Debido a la degradación y procesamiento que sufre el parásito por parte del sistema inmunitario del hospedero, y la presentación antigénica de determinantes antigénicos de sus proteínas, la identificación de péptidos que puedan unirse a moléculas HLA con una gran afinidad, ha mostrado ser una herramienta experimental importante. La molécula HLA-DRB es altamente polimórfica, permitiendo un amplio espectro de unión de diferentes antígenos, encontrándose numerosos linajes alélicos en la población.

Estudios de la frecuencia alélica en las poblaciones donde la malaria es endémica (50), permitió seleccionar cuatro linajes alélicos para la evaluación de la afinidad de péptidos de la proteína *Pv*12. Al realizar la tipificación en dos áreas endémicas para *P. vivax* en Colombia (Bahía Solano y Tierralta), los alelos de interés (HLA-DRB1*04, *07, *11 y *13) estuvieron presentes en la población de estudio en un 42%. Aquí reportamos el linaje HLA-DRB1*03 con mayor frecuencia (19%) en la población de estas zonas endémicas, además de los linajes HLA-DRB1*16 y *01, representando 10% y 8,8%, respectivamente. Juntos, estos siete linajes alélicos cubren en un poco más del 80% de la población en estudio; los datos aquí reportados, proveen así información importante acerca de las características genéticas del HLA en la población colombiana residente en áreas endémicas de malaria causada por *P. vivax*, que

podría ser útil al momento de desarrollar vacunas sintéticas basadas en la especificidad de unión de péptidos a los alelos HLA (9).

Debido a la dificultad de mantener un cultivo continuo *in vitro* de *P. vivax*, el uso de herramientas bioinformáticas es cada vez más importante (57). La identificación de proteínas homólogas a aquellas de *P. falciparum* estudiadas como buenos candidatos a vacuna, permite avanzar en el estudio de *P. vivax*. No obstante, el uso de herramientas bioinformáticas entrenadas con datos experimentales, es solo un primer paso para la selección de epítopes antigénicos (51).

En el presente trabajo de investigación, fueron identificados *in silico* diez epítopes T mediante el software NetMHCIIpan-3.1. Estos epítopes fueron posteriormente seleccionados mediante ensayos de unión *in vitro* a moléculas HLA-DRB1 humanas purificadas, correspondientes a cuatro de los alelos presentes con mayor frecuencia en áreas endémicas para la malaria en el mundo. Nuestros resultados generaron una concordancia del 75% de los datos predichos con los experimentales con las moléculas HLA-DR. Este tipo de ensayos de unión con péptidos de proteínas de *P. vivax* para la evaluación *in vitro* de la afinidad con las moléculas HLA, ha sido empleado en la identificación de péptidos de la proteína DBP de *P. vivax,* para la identificación de candidatos potenciales a vacuna (52).

La selección mediante herramientas *in silico* e *in vitro* nos permitió obtener tres péptidos para la evaluación de su antigenicidad. A los epítopes de mayor afinidad de unión para los linajes alélicos estudiados y un epítope de unión universal, les fue evaluado su potencial antigénico en CMSP de individuos que tuvieron episodios previos de la enfermedad.

Aunque el grupo control (individuos no expuestos) presentaba alelos específicos para a los péptidos seleccionados, no se observó una respuesta proliferativa. Por otro lado, al realizar los ensayos de antigenicidad con CMSP de individuos expuestos a la infección natural estimuladas con los péptidos seleccionados, demostraron ser capaces de generar proliferación de las células T $CD4^+$, mostrando de manera indirecta un reconocimiento por células T de memoria para los epítopes de *Pv*12. Adicionalmente teniendo en cuenta que los individuos en estudio presentaron el último episodio en un periodo mayor a 6 meses, refuerza la idea de una respuesta de memoria.

Aunque los valores del IE encontrados fueron relativamente bajos, son similares a lo ya reportado en otros estudios donde utilizan péptidos de ~20 a.a. de longitud como estímulo

(58). Estos datos contrastan con lo reportado en estudios previos que evalúan la respuesta proliferativa de proteínas completas o alérgenos que se encuentran en constante contacto con el sistema inmunitario, los cuales encuentran valores de estimulación altos (59, 60). Esto resalta aún más la importancia de los epítopes evaluados, que a pesar de ser solo una mínima fracción de la proteína *Pv*12, son capaces de activar células de memoria. Esta respuesta proliferativa en los epítopes 39114 y 39117 fue significativamente mayor al grupo control, presentando un IE medio >2. Además de ser buenos péptidos de unión, son capaces de ser reconocidos por células de memoria del sistema inmune.

El cultivo de las CMSP nos muestra en primera instancia el reconocimiento de células de memoria a epítopes de la proteína *Pv*12, adicionalmente fue evaluado el tipo de respuesta mediadora de la inmunidad celular. Para esto, en los sobrenadantes de cultivo se cuantificó cuatro citoquinas importantes en la respuesta de tipo Th1/Th2 reportadas para malaria. Al realizar el estímulo con los péptidos 39113 y 39117, se pudo observar una respuesta coordinada bajo la producción de IL-6, IL-10 y TNF. Aunque el péptido 39114 fue capaz de generar una respuesta proliferativa significativamente mayor a la del grupo control, sólo generó la producción de IL-6.

Procesos de proliferación y diferenciación celular han sido asociados con la producción de IL-6 (61), concordando con los resultados encontrados en el presente estudio, donde la producción de esta citoquina fue estimulada con la presencia de los antígenos estudiados (péptidos con alta afinidad y lisado de parásito).

Por otra parte, estudios previos han demostrado el papel de las citoquinas proinflamatorias como mediadoras de la inmunidad protectiva contra la malaria, entre estas el TNF, que en conjunto con otras citoquinas como el IFN-γ, actúan sinérgicamente para optimizar la producción de óxido nítrico (ON), importante para la eliminación del parásito (62). Dos de los péptidos evaluados (39113 y 39117) fueron capaces de generar la producción de esta citoquina.

Aquí se mostró cómo epítopes T de la proteína *Pv*12 son reconocidos por células T $CD4^+$ de memoria. Estudios recientes han demostrado que tras un segundo re-encuentro del sistema inmune con parásitos de la malaria, estos linfocitos T $CD4^+$ de memoria de larga vida se expanden rápidamente y se genera una producción de IL-10, obteniendo como resultado final una respuesta anti-parasitaria coordinada fuerte y reguladora. Estos estudios han demostrado la importancia de Linfocitos T $CD4^+$ productores de IL-10 en infecciones secundarias, que

influyen en la naturaleza de las respuestas inmunes anamnésicas durante la infección secundaria de malaria (63).

Es importante resaltar que el estímulo generado con los péptidos 39113 y 39117, aumentó la producción de IL-10 con respecto a las células sin estímulo. Aunque la estimulación con el péptido 39113 no presentó diferencias en los índices de estimulación con respecto al grupo control, el 46.6% de las células T $CD4^+$ de los voluntarios expuestos proliferaron ante este estímulo, además de mantener la media de proliferación del grupo de voluntarios expuestos por encima de la línea de corte.

Las respuestas en conjunto de citoquinas importantes en procesos de eliminación del parásito, proliferación y diferenciación, además de una respuesta secundaria de memoria potencializada, complementada con la capacidad de ser reconocidos por células de memoria del sistema inmune, permiten resaltar la importancia de los péptidos 39113 (con alta afinidad de unión a los linajes alélicos HLA-DRB1*04 y *11) y 39117 (con alta afinidad de unión a los linajes alélicos HLA-DRB1*07 y *13) de la proteína *Pv*12 como potenciales candidatos a vacuna contra malaria producida por *P. vivax*.

7. Conclusiones

En las áreas endémicas estudiadas, la frecuencia de los linajes alélicos HLA-DRB1*03, *04, *07, *16, *13, *01 y *11 cubren hasta un 80% de la población total.

Los resultados de predicción *in silico* concordaron en un 77,5% con los resultados experimentales basados en ensayos de unión *in vitro* a moléculas HLA-DR, confirmando la importancia de estas herramientas para la selección inicial de candidatos con alta afinidad de unión, que simplifican la escogencia de determinantes antigénicos.

Epítopes T de la proteína *Pv*12 son reconocidos por Linfocitos T $CD4^+$ de individuos expuestos a la infección por *P. vivax* pertenecientes a dos zonas endémicas de Colombia.

Los epítopes T 39113 (de alta afinidad de unión a moléculas HLA-DRB1*04 y *11) y 39117 (de alta afinidad de unión a moléculas HLA-DRB1*07 y *13), son capaces de estimular una respuesta coordinada de mediadores celulares (IL-6, IL-10 y TNF) importantes en procesos de proliferación, diferenciación y potencialización de una respuesta secundaria capaz de eliminar el parásito.

El uso de herramientas *in silico* y ensayos *in vitro*, nos permiten concluir que los péptidos 39113 y 39117 son potenciales candidatos a vacuna, gracias al reconocimiento por células T $CD4^+$ y por estimular una respuesta mediadora coordinada, importantes para una respuesta de memoria de larga vida.

8. Perspectivas

Con el fin de confirmar que los péptidos 39113 y 39117 son potenciales candidatos a vacuna es necesario:

- ✓ Evaluar el potencial de estos péptidos nativos y modificados (con base en los estudios realizados en *P. falciparum*, es probable que puedan ser necesarias modificaciones a los péptidos *Pv*12 para mejorar su unión al HLA-DR) mediante ensayos de inmunogenicidad, que puedan confirmar la capacidad de despertar una respuesta inmune coordinada en células de voluntarios que nunca hayan estado expuestos al parásito, y evaluar la capacidad de ser presentados a linfocitos T CD4+ y la generación de memoria inmunológica.
- ✓ A partir de estos epítopes T de alta afinidad a moléculas HLA identificados en este trabajo, se podría diseñar en conjunto con epítopes B (identificados *in silico*) candidatos, con un mayor potencial inmunogénico, capaces de generar una respuesta de memoria tanto celular, como humoral.

9. Aspectos éticos

El presente estudio fue realizado bajo el marco legal de investigación en Colombia, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

La toma de muestras de sangre periférica se realizó de manera voluntaria, previa a la firma de un consentimiento informado anexo al presente documento.

10. Anexos

Anexo A. Consentimiento informado para los ensayos de antigenicidad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL PARA ESTUDIOS DE ANTIGENICIDAD DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Plasmodium vivax*

Este es un estudio de investigación básica, llevado a cabo por el Grupo de Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC. El proyecto se titula **"Estudios de antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas derivadas de *Plasmodium vivax* para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria"** y está a cargo del Dr. Manuel Alfonso Patarroyo.

Usted ha sido seleccionado por cumplir los siguientes requisitos:

- Es mayor a 18 años de edad
- Reside en zonas endémicas de malaria por *Plasmodium vivax*
- Ha presentado uno o más episodios de malaria por *Plasmodium vivax* (no infecciones mixtas con *Plasmodium falciparum*), al menos con 6 meses de anterioridad a la firma voluntaria de este consentimiento
- Ha recibido tratamiento adecuado para la enfermedad

PROCEDIMIENTO A SEGUIR

Inicialmente, se realizará una toma de sangre de 5 mL en tubo con anticoagulante EDTA (tapa lila). Si usted es seleccionado para conformar uno de los grupos experimentales del proyecto, se le solicitará una segunda donación de 40 mL de sangre, que equivalen a 4 cucharadas soperas (usted tiene en su cuerpo el equivalente de 2 botellas de gaseosa de 2 litros y medio).

Las muestras de sangre tomadas se destinarán al estudio de la respuesta del organismo a la malaria, una de las enfermedades más comunes y peligrosas de esta región. Los procesos y análisis correspondientes se llevarán a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC, en Bogotá.

PERÍODO DE PARTICIPACIÓN

La investigación se llevará a cabo durante un año aproximadamente, pero su tiempo de participación en el estudio será solamente para la donación de sangre inicial (alrededor de 10 minutos) y, dependiendo de los resultados obtenidos, se le contactará o no para la segunda donación (otros 10 minutos), como se explicó anteriormente.

RIESGOS MÍNIMOS

De forma inmediata algunas personas pueden presentar malestar general, palidez y mareos, de lo cual se recuperan espontáneamente.

BENEFICIOS

El beneficio más que individual es para la humanidad. Su participación es una generosa contribución al entendimiento de la respuesta del sistema inmune a la malaria, enfermedad global que mata a más de un millón de niños en el mundo e impide el desarrollo socio-económico de los países afectados.

CONFIDENCIALIDAD

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio, excepto mediante una autorización expresa. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en lugar de su nombre. Los hallazgos de la investigación serán compartidos mediante publicaciones científicas y conferencias, siempre manteniendo la confidencialidad de sus datos.

Los elementos celulares de su cuerpo que vienen en la muestra que usted generosamente dona, serán utilizados únicamente en los procedimientos aquí descritos y no en otros. Estos elementos tampoco serán objeto de intervención alguna.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.

HE RECIBIDO UNA EXPLICACIÓN SATISFACTORIA SOBRE EL PROCEDIMIENTO, SU FINALIDAD, RIESGOS Y BENEFICIOS. HE QUEDADO SATISFECHO CON LA INFORMACIÓN RECIBIDA, LA HE COMPRENDIDO, SE ME HAN RESPONDIDO A TODAS MIS DUDAS. COMPRENDO QUE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA Y QUE PUEDO RETIRARME EN EL MOMENTO EN QUE ASÍ LO DESEE.

El propósito de la investigación, los métodos y medios como va a ser llevada a cabo, me han sido explicados por _____, persona calificada que realizará el procedimiento de extracción de la muestra.

Nombre del voluntario _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Teléfono _____

Fecha y ciudad _____

Nombre de testigo _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Fecha y ciudad _____

Anexo B. Consentimiento informado para los ensayos de inmunogenicidad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL PARA ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE *Plasmodium vivax*

Este es un estudio de investigación básica, llevado a cabo por el Grupo de Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC. El proyecto se titula **"Estudios de antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas derivadas de *Plasmodium vivax* para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria"** y está a cargo del Dr. Manuel Alfonso Patarroyo.

Usted ha sido seleccionado por cumplir los siguientes requisitos:

- Es mayor a 18 años de edad
- No reside en zonas endémicas de malaria.
- No ha presentado episodios de malaria.
- No ha permanecido en zonas endémicas de malaria en los últimos 2 años.

PROCEDIMIENTO A SEGUIR

Inicialmente, se realizará una toma de sangre de 5 mL en tubo con anticoagulante EDTA (tapa lila).Si usted es seleccionado y está de acuerdo en participar en este estudio, se le solicitará la donación de 165 mL de sangre, que equivalen a aproximadamente 33 cucharadas soperas (usted tiene en su cuerpo el equivalente de 2 botellas de gaseosa de 2 litros y medio). Este volumen se extraerá en tres momentos diferentes. La primera toma de sangre será de 5 mL en un tubo con EDTA (tapa lila). De acuerdo con los resultados obtenidos, se le solicitará una segunda donación de 60 mL en cinco tubos con heparina (tapa verde) y un tubo seco (tapa roja). Por último, pasados 10 días desde la segunda donación, se extraerán los 100 mL restantes en diez tubos con heparina (tapa verde).

Las muestras de sangre tomadas se destinarán al estudio de la respuesta del organismo a la malaria, una de las enfermedades más comunes y peligrosas de esta región. Los

procesos y análisis correspondientes se llevarán a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC, en Bogotá.

PERÍODO DE PARTICIPACIÓN

La investigación se llevará a cabo durante un año aproximadamente, pero su tiempo de participación en el estudio será solamente para la donación de sangre inicial (alrededor de 10 minutos) y, dependiendo de los resultados obtenidos, se le contactará o no para la segunda donación (otros 10 minutos), como se explicó anteriormente.

RIESGOS MÍNIMOS

De forma inmediata algunas personas pueden presentar malestar general, palidez y mareos, de lo cual se recuperan espontáneamente.

BENEFICIOS

El beneficio más que individual es para la humanidad: su participación es una generosa contribución al entendimiento de la respuesta del sistema inmune a la malaria, enfermedad global que mata a más de un millón de niños en el mundo e impide el desarrollo socio-económico de los países afectados.

CONFIDENCIALIDAD

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio, excepto mediante una autorización expresa. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en lugar de su nombre. Los hallazgos de la investigación serán compartidos mediante publicaciones científicas y conferencias, siempre manteniendo la confidencialidad de sus datos.

Los elementos celulares de su cuerpo que vienen en la muestra que usted generosamente dona serán utilizados expresamente en los procedimientos aquí

descritos y no en otros. Estos elementos tampoco serán objeto de intervención alguna.

HE RECIBIDO UNA EXPLICACIÓN SATISFACTORIA SOBRE EL PROCEDIMIENTO, SU FINALIDAD, RIESGOS Y BENEFICIOS. HE QUEDADO SATISFECHO CON LA INFORMACIÓN RECIBIDA, LA HE COMPRENDIDO, SE ME HAN RESPONDIDO A TODAS MIS DUDAS. COMPRENDO QUE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA Y QUE PUEDO RETIRARME EN EL MOMENTO EN QUE ASÍ LO DESEE.

El propósito de la investigación, los métodos y medios como va a ser llevada a cabo, me han sido explicados por _____, persona calificada que realizará el procedimiento de extracción de la muestra.

Nombre del voluntario _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Teléfono _____

Fecha y ciudad _____

Nombre de testigo _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Fecha y ciudad _____

Anexo C. Consentimiento informado para la obtención de lisado de *P. vivax*.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE LISADO DE *Plasmodium vivax*

Este es un estudio de investigación básica, llevado a cabo por el Grupo de Inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC. El proyecto se titula **"Estudios de antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas derivadas de *Plasmodium vivax* para la selección de candidatos potenciales a vacuna contra la malaria"** y está a cargo del Dr. Manuel Alfonso Patarroyo.

Usted ha sido seleccionado por cumplir los siguientes requisitos:

- Es mayor a 18 años de edad
- Reside en zonas endémicas de malaria por *Plasmodium vivax*
- Presenta malaria por *Plasmodium vivax* (no infecciones mixtas con *Plasmodium falciparum*) actualmente
- No ha recibido tratamiento para la enfermedad

PROCEDIMIENTO A SEGUIR

Con el propósito de obtener glóbulos rojos de su muestra, se le solicitará la donación de 50 mL de sangre, que equivalen a 5 cucharadas soperas (usted tiene en su cuerpo el equivalente de 2 botellas de gaseosa de 2 litros y medio).

Las muestras de sangre tomadas se destinarán al estudio de la respuesta del organismo a la malaria, una de las enfermedades más comunes y peligrosas de esta región. Los procesos y análisis correspondientes se llevarán a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC, en Bogotá.

PERÍODO DE PARTICIPACIÓN

La investigación se llevará a cabo durante un año aproximadamente, pero su tiempo de participación en el estudio será solamente para la donación de sangre, que tomará alrededor de 10 minutos.

RIESGOS MÍNIMOS

De forma inmediata algunas personas pueden presentar malestar general, palidez y mareos, de lo cual se recuperan espontáneamente.

BENEFICIOS

El beneficio más que individual es para la humanidad: su participación es una generosa contribución al entendimiento de la respuesta del sistema inmune a la malaria, enfermedad global que mata a más de un millón de niños en el mundo e impide el desarrollo socio-económico de los países afectados.

CONFIDENCIALIDAD

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio, excepto mediante una autorización expresa. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en lugar de su nombre. Los hallazgos de la investigación serán compartidos mediante publicaciones científicas y conferencias, siempre manteniendo la confidencialidad de sus datos.

Los elementos celulares de su cuerpo que vienen en la muestra que usted generosamente dona, serán utilizados únicamente en los procedimientos aquí descritos y no en otros. Estos elementos tampoco serán objeto de intervención alguna.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.

HE RECIBIDO UNA EXPLICACIÓN SATISFACTORIA SOBRE EL PROCEDIMIENTO, SU FINALIDAD, RIESGOS Y BENEFICIOS. HE QUEDADO SATISFECHO CON LA INFORMACIÓN RECIBIDA, LA HE COMPRENDIDO, SE ME HAN RESPONDIDO A TODAS MIS DUDAS. COMPRENDO QUE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA Y QUE PUEDO RETIRARME EN EL MOMENTO EN QUE ASÍ LO DESEE.

El propósito de la investigación, los métodos y medios como va a ser llevada a cabo, me han sido explicados por _____, persona calificada que realizará el procedimiento de extracción de la muestra.

Nombre del voluntario _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Teléfono _____

Fecha y ciudad _____

Nombre de testigo _____

Firma _____

Cédula _____

Dirección _____

Fecha y ciudad _____

11. Referencias

1. Phillips RS. Current status of malaria and potential for control. Clin Microbiol Rev. 2001;14(1):208-26. Epub 2001/01/09.
2. Moorthy VS, Newman RD, Okwo-Bele J-M. Malaria vaccine technology roadmap. The Lancet. 2013;382(9906):1700-1.
3. WHO. World malaria report 2017. Geneva: 2017.
4. Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J. Cultivation of Plasmodium vivax. Trends Parasitol. 2008;24(2):85-8. Epub 2008/01/09.
5. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. Clin Microbiol Rev. 2009;22(1):13-36, Table of Contents. Epub 2009/01/13.
6. Stern LJ, Calvo-Calle JM. HLA-DR: molecular insights and vaccine design. Curr Pharm Des. 2009;15(28):3249-61. Epub 2009/10/29.
7. Ujvari B, Belov K. Major Histocompatibility Complex (MHC) markers in conservation biology. Int J Mol Sci. 2011;12(8):5168-86. Epub 2011/09/29.
8. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. Inmunología de Kuby2007.
9. Patarroyo ME, Bermudez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. Chem Rev. 2011;111(5):3459-507. Epub 2011/03/29.
10. Espejo F, Cubillos M, Salazar LM, Guzman F, Urquiza M, Ocampo M, et al. Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues. Angew Chem Int Ed Engl. 2001;40(24):4654-7. Epub 2002/10/31.
11. Guzman F, Jaramillo K, Salazar LM, Torres A, Rivera A, Patarroyo ME. 1H-NMR structures of the Plasmodium falciparum 1758 erythrocyte binding peptide analogues and protection against malaria. Life Sci. 2002;71(23):2773-85. Epub 2002/10/18.
12. Salazar LM, Alba MP, Torres MH, Pinto M, Cortes X, Torres L, et al. Protection against experimental malaria associated with AMA-1 peptide analogue structures. FEBS Lett. 2002;527(1-3):95-100. Epub 2002/09/11.
13. Moreno-Perez DA, Areiza-Rojas R, Florez-Buitrago X, Silva Y, Patarroyo ME, Patarroyo MA. The GPI-anchored 6-Cys protein Pv12 is present in detergent-resistant microdomains of Plasmodium vivax blood stage schizonts. Protist. 2013;164(1):37-48.
14. Chen JH, Jung JW, Wang Y, Ha KS, Lu F, Lim CS, et al. Immunoproteomics profiling of blood stage Plasmodium vivax infection by high-throughput screening assays. J Proteome Res. 2010;9(12):6479-89. Epub 2010/10/19.
15. Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84(2):209-12. Epub 1990/03/01.
16. WHO. World Malaria Report 2015. World Health Organization, 2016.

17. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. Nat Rev Immunol. 2004;4(3):169-80. Epub 2004/03/25.
18. White NJ. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. Malar J. 2011;10:297. Epub 2011/10/13.
19. Galinski MR, Barnwell JW. Plasmodium vivax: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. Parasitol Today. 1996;12(1):20-9. Epub 1996/01/01.
20. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. Nature. 2002;415(6872):694-701. Epub 2002/02/08.
21. Moreno-Perez DA, Mongui A, Soler LN, Sanchez-Ladino M, Patarroyo MA. Identifying and characterizing a member of the RhopH1/Clag family in Plasmodium vivax. Gene. 2011;481(1):17-23. Epub 2011/04/26.
22. Moreno-Perez DA, Montenegro M, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Identification, characterization and antigenicity of the Plasmodium vivax rhoptry neck protein 1 (PvRON1). Malaria journal. 2011;10:314. Epub 2011/10/26.
23. Angel DI, Mongui A, Ardila J, Vanegas M, Patarroyo MA. The Plasmodium vivax Pv41 surface protein: identification and characterization. Biochemical and biophysical research communications. 2008;377(4):1113-7. Epub 2008/11/06.
24. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Patino LC, Patarroyo MA. PvRON2, a new Plasmodium vivax rhoptry neck antigen. Malar J. 2011;10:60. Epub 2011/03/16.
25. Mongui A, Angel DI, Gallego G, Reyes C, Martinez P, Guhl F, et al. Characterization and antigenicity of the promising vaccine candidate Plasmodium vivax 34kDa rhoptry antigen (Pv34). Vaccine. 2009;28(2):415-21. Epub 2009/10/20.
26. Mongui A, Angel DI, Guzman C, Vanegas M, Patarroyo MA. Characterisation of the Plasmodium vivax Pv38 antigen. Biochemical and biophysical research communications. 2008;376(2):326-30. Epub 2008/09/16.
27. Mongui A, Perez-Leal O, Soto SC, Cortes J, Patarroyo MA. Cloning, expression, and characterisation of a Plasmodium vivax MSP7 family merozoite surface protein. Biochemical and biophysical research communications. 2006;351(3):639-44. Epub 2006/11/04.
28. Perez-Leal O, Sierra AY, Barrero CA, Moncada C, Martinez P, Cortes J, et al. Identifying and characterising the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 10 Plasmodium vivax homologue. Biochemical and biophysical research communications. 2005;331(4):1178-84. Epub 2005/05/11.
29. Dubois P, Pereira da Silva L. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by Plasmodium falciparum. Research in immunology. 1995;146(4-5):263-75. Epub 1995/05/01.
30. Carvalho LH, Sano G, Hafalla JC, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. Nature medicine. 2002;8(2):166-70. Epub 2002/02/01.
31. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol. 2011;11(12):823-36. Epub 2011/11/15.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book: Elsevier Health Sciences; 2014.
33. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. Nature. 2008;455(7214):757-63. Epub 2008/10/10.
34. Acharya P, Pallavi R, Chandran S, Chakravarti H, Middha S, Acharya J, et al. A glimpse into the clinical proteome of human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. Proteomics Clin Appl. 2009;3(11):1314-25. Epub 2010/12/08.

35. Moreno-Perez DA, Degano R, Ibarrola N, Muro A, Patarroyo MA. Determining the Plasmodium vivax VCG-1 strain blood stage proteome. J Proteomics. 2014;113C:268-80. Epub 2014/10/16.
36. Pico de Coana Y, Rodriguez J, Guerrero E, Barrero C, Rodriguez R, Mendoza M, et al. A highly infective Plasmodium vivax strain adapted to Aotus monkeys: quantitative haematological and molecular determinations useful for P. vivax malaria vaccine development. Vaccine. 2003;21(25-26):3930-7. Epub 2003/08/19.
37. Patarroyo MA, Calderon D, Moreno-Perez DA. Vaccines against Plasmodium vivax: a research challenge. Expert review of vaccines. 2012;11(10):1249-60. Epub 2012/11/28.
38. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. Acc Chem Res. 2008;41(3):377-86. Epub 2008/02/13.
39. Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. Open Biol. 2013;3(1):120139. Epub 2013/01/11.
40. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. Immunology. 2010;131(2):153-68. Epub 2010/08/21.
41. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. Vaccine. 2001;19(17-19):2688-91. Epub 2001/03/21.
42. Solihah B, Winarko E, Hartati S, Wibowo ME, editors. A systematic review: B-cell conformational epitope prediction from epitope characteristics view. Science and Technology-Computer (ICST), 2017 3rd International Conference on; 2017: IEEE.
43. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar VG. In Silico Prediction of Linear B-Cell Epitopes on Proteins. Methods Mol Biol. 2017;1484:255-64. Epub 2016/10/28.
44. Desai DV, Kulkarni-Kale U. T-cell epitope prediction methods: an overview. Immunoinformatics: Springer; 2014. p. 333-64.
45. Li J, Ito D, Chen JH, Lu F, Cheng Y, Wang B, et al. Pv12, a 6-Cys antigen of Plasmodium vivax, is localized to the merozoite rhoptry. Parasitol Int. 2012;61(3):443-9. Epub 2012/03/08.
46. Sanders PR, Gilson PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, et al. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of Plasmodium falciparum. The Journal of biological chemistry. 2005;280(48):40169-76.
47. Tonkin ML, Arredondo SA, Loveless BC, Serpa JJ, Makepeace KA, Sundar N, et al. Structural and biochemical characterization of Plasmodium falciparum 12 (Pf12) reveals a unique interdomain organization and the potential for an antiparallel arrangement with Pf41. J Biol Chem. 2013;288(18):12805-17. Epub 2013/03/21.
48. Forero-Rodriguez J, Garzon-Ospina D, Patarroyo MA. Low genetic diversity and functional constraint in loci encoding Plasmodium vivax P12 and P38 proteins in the Colombian population. Malar J. 2014;13:58. Epub 2014/02/19.
49. INS. Boletín Epidemiológico Semanal-SIVIGILA. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud, 2017.
50. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. Part 11 - HLA-DR. In: Marsh SGE, Parham P, Barber LD, editors. The HLA FactsBook. London: Academic Press; 2000. p. 329-90.
51. Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. Immunogenetics. 2015;67(11-12):641-50. Epub 2015/09/30.
52. Saravia C, Martinez P, Granados DS, Lopez C, Reyes C, Patarroyo MA. Identification and evaluation of universal epitopes in Plasmodium vivax Duffy binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377(4):1279-83. Epub 2008/11/13.

53. Hammer J, Bono E, Gallazzi F, Belunis C, Nagy Z, Sinigaglia F. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. J Exp Med. 1994;180(6):2353-8. Epub 1994/12/01.
54. Doolan DL, Southwood S, Chesnut R, Appella E, Gomez E, Richards A, et al. HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from Plasmodium falciparum pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. J Immunol. 2000;165(2):1123-37. Epub 2000/07/06.
55. Forero-Rodriguez J, Garzon-Ospina D, Patarroyo MA. Low genetic diversity in the locus encoding the Plasmodium vivax P41 protein in Colombia's parasite population. Malar J. 2014;13:388. Epub 2014/10/02.
56. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Abril J, Patarroyo MA. Annotation and characterization of the Plasmodium vivax rhoptry neck protein 4 (PvRON4). Malaria journal. 2013;12:356.
57. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Hvid CS, Lamberth K, Buus S, et al. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. Bioinformatics. 2004;20(9):1388-97. Epub 2004/02/14.
58. Martinez P, Lopez C, Saravia C, Vanegas M, Patarroyo MA. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBPII in individuals exposed to Plasmodium vivax malaria. Microbes Infect. 2010;12(14-15):1188-97. Epub 2010/09/02.
59. Hamari S, Kirveskoski T, Glumoff V, Kulmala P, Simell O, Knip M, et al. CD4(+) T-cell proliferation responses to wheat polypeptide stimulation in children at different stages of type 1 diabetes autoimmunity. Pediatr Diabetes. 2015;16(3):177-88. Epub 2015/02/04.
60. Mojibian M, Chakir H, Lefebvre DE, Crookshank JA, Sonier B, Keely E, et al. Diabetes-specific HLA-DR-restricted proinflammatory T-cell response to wheat polypeptides in tissue transglutaminase antibody-negative patients with type 1 diabetes. Diabetes. 2009;58(8):1789-96. Epub 2009/04/30.
61. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol. 1993;54:1-78. Epub 1993/01/01.
62. Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. Infect Immun. 1996;64(1):44-9. Epub 1996/01/01.
63. Villegas-Mendez A, Inkson CA, Shaw TN, Strangward P, Couper KN. Long-Lived CD4+IFN-gamma+ T Cells rather than Short-Lived CD4+IFN-gamma+IL-10+ T Cells Initiate Rapid IL-10 Production To Suppress Anamnestic T Cell Responses during Secondary Malaria Infection. J Immunol. 2016;197(8):3152-64. Epub 2016/09/16.