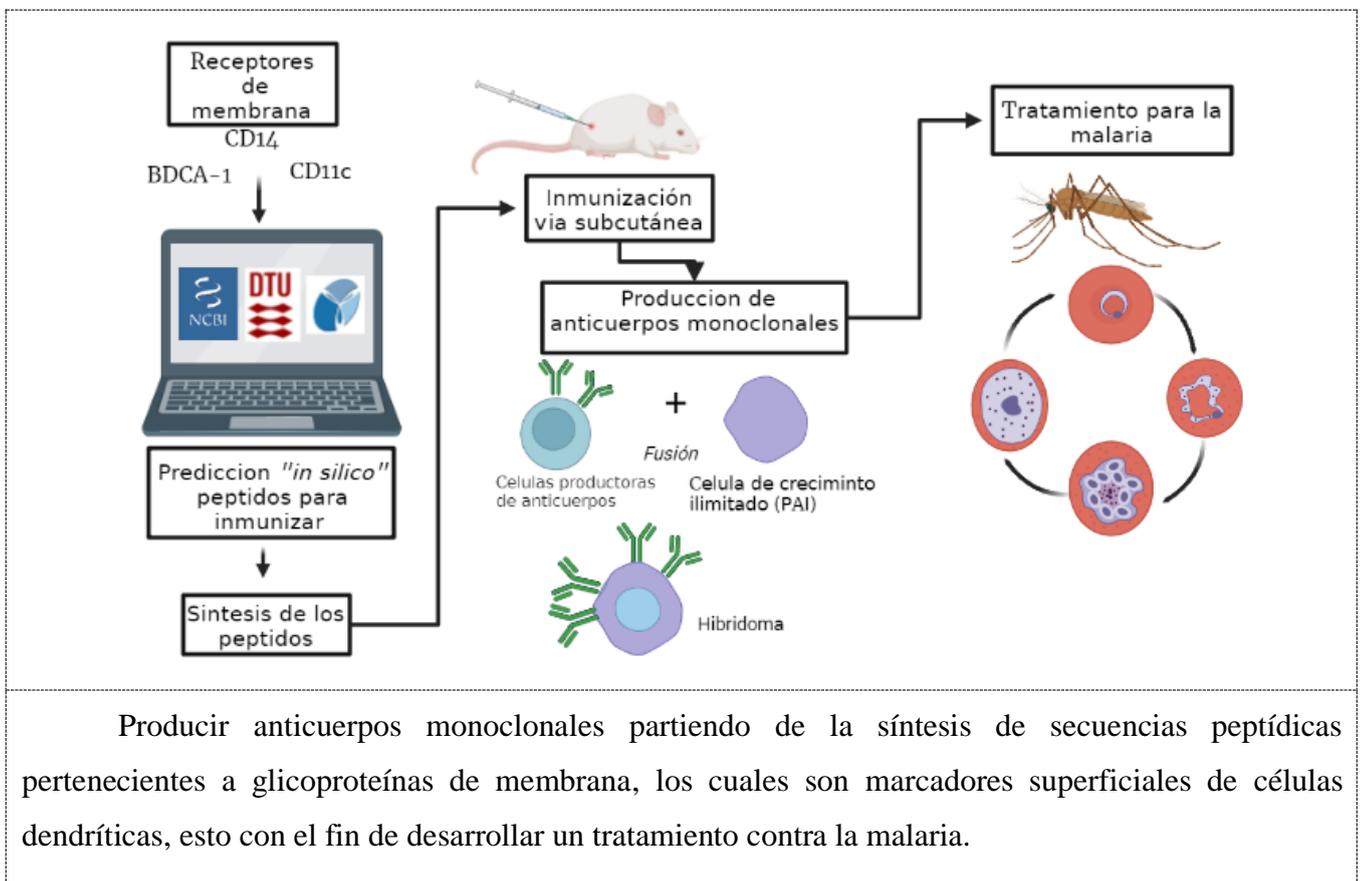


Producción de anticuerpos monoclonales en células dendríticas de *Mono Aotus spp.*

*Production of monoclonal antibodies in dendritic cells of *Mono Aotus spp.**

Graphical Abstract (GA)



Producción de anticuerpos monoclonales en células dendríticas de *Mono Aotus* spp.

*Production of monoclonal antibodies in dendritic cells of *Mono Aotus* spp*

*Ana María Concha González**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por:

MSc. Yuly Elien Bernal Rosas Universidad Antonio Nariño.

PhD. Diana Diaz Arévalo Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Resumen

De las enfermedades tropicales la malaria o paludismo es una de las de mayor preocupación por su alta tasa de contagio, principalmente en las poblaciones en países en desarrollo, es transmitida por el vector *Anopheles* spp. y es causada por el parásito *Plasmodium* spp., entre los tratamientos que se han desarrollado para curar y prevenir esta enfermedad no han sido eficientes, por lo que la búsqueda de un tratamiento es de gran interés. En este trabajo se realizó una producción de anticuerpos monoclonales los cuales están diseñados para reconocer y unirse específicamente a una molécula o antígeno específico el cual fue inducido por la inmunización con un péptido sintético para generar una respuesta inmunitaria específica de ratones hembras de la cepa BALB/c. Se hizo una predicción de las regiones inmunogénicas de los marcadores de membrana de las células presentadoras de antígenos en el modelo *Aotus* spp. mediante análisis “in silico”. Las regiones previstas se sintetizaron y utilizaron para producir una respuesta inmunitaria en los ratones, también se realizó la fusión de células PAI y células de vaso de ratón y se realizó la evaluación de inmunogenicidad y afinidad de los clonos en *Homo sapiens* y *Aotus* spp., en donde se obtuvo una respuesta positiva por lo péptidos sintéticos fueron reconocidos por anticuerpos monoclonales.

Palabras Clave: Anticuerpos monoclonales, malaria, síntesis de péptidos.

Producción de anticuerpos monoclonales en células dendríticas de *Mono Aotus* spp.

*Production of monoclonal antibodies in dendritic cells of *Mono Aotus* spp*

Abstract

Malaria is one of the tropical diseases of greatest concern due to its high rate of contagion, mainly in populations in developing countries, it is transmitted by the vector *Anopheles* spp. and is caused by the parasite *Plasmodium* spp. among the treatments that have been developed to cure and prevent this disease have not been efficient, so the search for a treatment is of great interest. In the present work, monoclonal antibodies were produced which are designed to recognize and bind specifically to a specific molecule or antigen which was induced by immunization with a synthetic peptide to generate a specific immune response in female BALB/c mice. Prediction of the immunogenic regions of membrane markers of antigen-presenting cells in the *Aotus* spp. model was performed by in silico analysis. The predicted regions were synthesized and used to generate an immune response in mice, the fusion of PAI cells and mouse vessel cells was also performed and the evaluation of immunogenicity and affinity of the clones in *Homo sapiens* and *Aotus* spp. was performed, where a positive response was obtained because the synthetic peptides were recognized by monoclonal antibodies.

Keywords: Monoclonal antibodies, malaria, peptide synthesis.

1. Introducción

Las enfermedades tropicales como el dengue, el cólera, la fiebre amarilla, la tuberculosis y la malaria (o paludismo) son un importante objeto de estudio y encontrar formas de prevenirlas y tratarlas es de gran interés a nivel mundial, en la Fundación Instituto de inmunología de Colombia (FIDIC) están enfocados en el desarrollo de una vacuna para prevenir y combatir varios tipos de estas infecciones.

La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium* spp., esta enfermedad genera una alta preocupación en el hombre, debido a las funestas consecuencias que causa su contagio, es transmitida por la picadura del mosquito hembra infectado de la especie *Anopheles* spp., se pueden encontrar más de 400 especies diferentes, donde 40 de ellas son vectores de transmisión de la enfermedad (OMS, 2022). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) casi la mitad de la población mundial está expuesta a contraer esta infección, 241 millones de personas de 85 países contrajeron malaria en 2020 y se presentaron aproximadamente 627.000 víctimas que perdieron la vida en ese mismo año (OMS, 2022). Esta enfermedad tiene una incidencia en los países tropicales y subtropicales, siendo el mayor porcentaje de incidencia en África, Asia Sudoriental, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental (WHO, 2017). En Colombia según lo reportado por el Instituto Nacional de Salud (INS) en el boletín epidemiológico de la semana 43 del año 2022 se notificaron 1.475 casos de malaria, teniendo un acumulado de 60.994 casos, de los cuales 59.619 son de malaria no complicada y 1.375 de malaria complicada, los departamentos con mayor incidencia de casos de malaria fueron Chocó, Nariño, Córdoba, Antioquia y Guainía (INS, 2022)

Diversos estudios han demostrado que esta infección por parásitos ha disminuido gracias a diversas estrategia que en su mayoría son dirigidas por la WHO, pero estos esfuerzos por la eliminación de la malaria a nivel mundial podrían verse afectados por varios factores tales como: la resistencia a los medicamentos e insecticidas, las creencias y prácticas sociales,

demográficas, culturales y de comportamiento, y la infraestructura de salud no reformada (Dhiman, 2019; OMS, 2022), por lo que la malaria es aún la principal causa de mortandad a nivel mundial. La infección es causada por un protozoo pequeño que hace parte del grupo de especies de *Plasmodium* spp., estos son parásitos intracelulares ameboides que acumulan un pigmento palúdico (hemozina), es un metabolito insoluble de la hemoglobina (Vuk et al., 2008). De las 172 especies de *Plasmodium* spp. podemos encontrar cinco especies que pueden provocar paludismo en el ser humano, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, *P. falciparum*, y *P. vivax* siendo los dos últimos aquellos que representan un mayor riesgo para la salud, tienen mecanismo de infección más letal para el ser humano, y si no es tratada de manera rápida y adecuadamente se puede desencadenar casos graves y potencialmente mortales (Danel, 2018; OMS, 2022; Talapko et al., 2019)

El ciclo de vida que presenta el parásito *Plasmodium* spp. es complejo, se desarrolla en dos fases: la primera es una fase sexual y la segunda es una fase asexual, como se muestra en la figura 1. La infección que se da por este paracito comienza en el momento que un mosquito *Anopheles* hembra infectada pica a una persona sana e inyecta el parásitos *Plasmodium* spp., en forma de esporozoítos, en el torrente sanguíneo, los esporozoítos pasan rápidamente al hígado humano en donde se van a multiplicar asexualmente en las células del hígado durante los siguientes 7 a 10 días, sin causar síntomas, luego los parásitos, en forma de merozoíto, se liberan de las células hepáticas en vesículas, viajan a través del corazón y llegan a los pulmones, donde se asientan en los capilares pulmonares. Las vesículas finalmente se desintegran, liberando a los merozoíto para que entren en la fase sanguínea de su desarrollo. En el torrente sanguíneo, los merozoíto invaden los glóbulos rojos (eritrocitos) y se multiplican nuevamente hasta que revientan. Luego invaden más eritrocitos. Este ciclo se repite, causando fiebre cada vez que los parásitos se liberan e invaden las células sanguíneas. Algunas de las células sanguíneas infectadas abandonan el ciclo de multiplicación asexual. En lugar de replicarse, los merozoíto de estas células se convierten en formas sexuales del

parásito, llamadas gametocitos, que circulan en el torrente sanguíneo, y finalmente cuando un mosquito pica a un ser humano infectado, ingiere los gametocitos, que se desarrollan aún más hasta convertirse en células sexuales maduras llamadas gametos, los gametos femeninos fertilizados se convierten en ooquistes que se mueven activamente y excavan a través de la pared del intestino medio del mosquito y forman ooquistes en la superficie exterior. Dentro del ooquiste se desarrollan miles de esporozoítos activos. El ooquiste finalmente estalla y libera esporozoítos que viajan a las glándulas salivales del mosquito. El ciclo de infección humana comienza de nuevo cuando el mosquito infectado pica a otra persona sana (CDC, 2020; Josling & Llinás, 2015; PATH, 2015; Soulard et al., 2015; Talapko et al., 2019; Vuk et al., 2008). Todas las especies de *Plasmodium* spp. conducen a la ruptura de los eritrocitos lo que conlleva una severa consecuencia, la anemia (Achan et al., 2011; Cowman et al., 2016; Vuk et al., 2008).

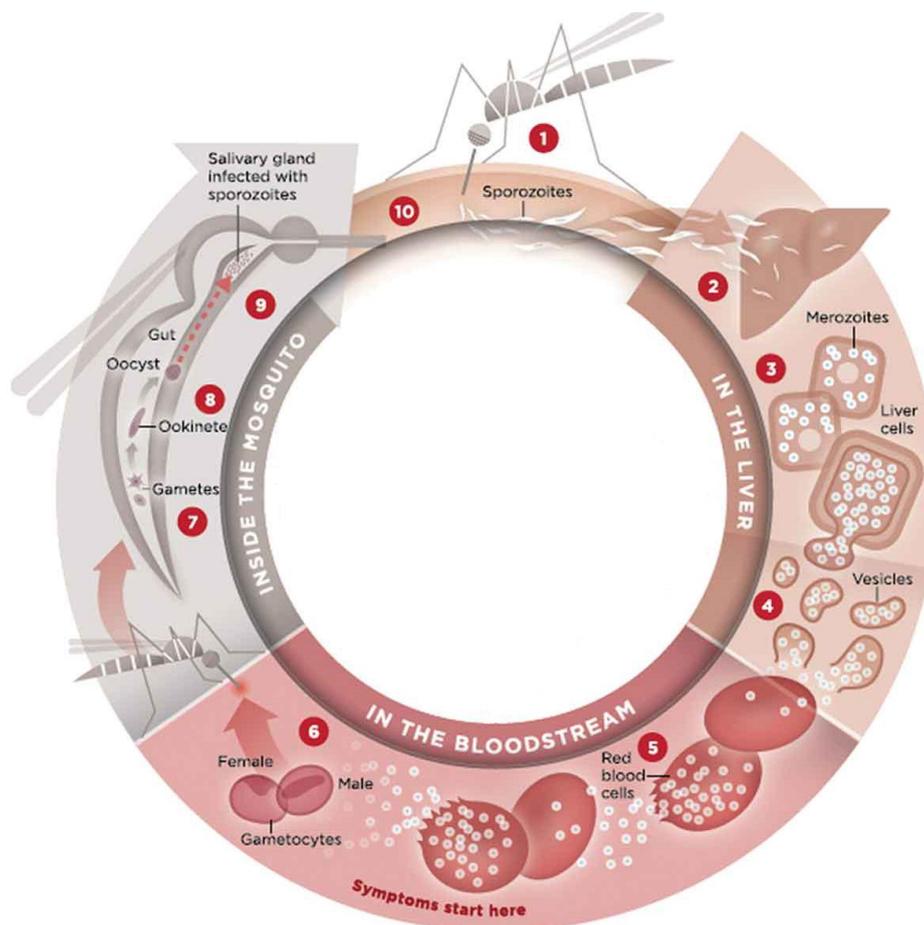


Figura 1. Ciclo de vida del parásito que produce la malaria. Adaptada de (PATH, 2015)

Entre los tratamientos que se han desarrollado para combatir esta infección parasitaria se encuentra el uso de algunos fármacos, uno de ellos tiene como principio activo la artemisinina de la planta *Artemisia annua*., el cual es un antipalúdico que ha demostrado ser muy útil en el tratamiento de esta afección, este fue descubierto por el grupo de científicos dirigidos por Dr. Youyou Tu lo que le otorgó un premio nobel de Fisiología y Medicina en el 2015 (Talapko et al., 2019). Los esfuerzos para el desarrollo de una vacuna peptídica eficiente contra este parásito se siguen realizando en muchos laboratorios a nivel mundial. En el desarrollo de vacunas para esta infección parasitaria podemos encontrar diversos mecanismos acción, en donde se tendrá en cuenta el estadio del ciclo de vida del parásito dentro del organismo o en el mismo vector de transmisión. Se encuentran las vacunas pre-eritrocitarias en las que su principal objetivo es inhibir la motilidad de los esporozoítos previniendo así la invasión de hepatocitos, la segunda estrategia está enfocada en la fase de infección del parásito en los eritrocitos por lo que está se dirige a la superficie del merozoíto para inhibir la invasión de eritrocitos, también están las vacunas que bloquean la transmisión, en donde se inhibe el desarrollo de oocinetos en el intestino medio del mosquito y por último las vacunas multietapas o multigenicas en donde se dirige a diferentes proteínas del parásito y potencialmente a diferentes etapas del ciclo de vida (Draper et al., 2018; Laurens, 2018).

La única vacuna contra la malaria que se prueba actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 esta es RTS,S/AS01 (RTS,S), se clasifica entre las vacunas dirigidas a la fase pre-eritrocitarias, solo es efectiva frente a *Plasmodium falciparum* y es administrada a los niños con la intención de reducir significativamente los cuadros de malaria y malaria grave, este plan piloto de vacunación solo está enfocado en la inmunización de primera infancia que viven en zonas de transmisión moderada o alta y con ello prevenir contagios, pero según estudios sobre este plan de inmunización se ha visto que después de los 5 años los niños que fueron vacunados sufrieron un mayor riesgo de malaria clínica (Laurens, 2018), demostrando de esta manera que la eficacia de esta vacuna es baja en la generación de una

respuesta inmunitaria a largo plazo. Se han encontrado grandes desafíos a la hora de desarrollar estas vacunas, entre los cuales podemos encontrar: el complejo ciclo de vida del parásito tanto dentro como fuera del huésped humano, el alto nivel de diversidad genética en las poblaciones de *Plasmodium* spp. que les permite evadir la respuesta inmune humana y, potencialmente, una vacuna contra la malaria inducida por respuesta, además la incapacidad de mantener especies de *Plasmodium* spp. en cultivo que infectan a los humanos, con la excepción de *P. falciparum* (Cubides Amézquita, 2019; Laurens, 2018; López et al., 2017; Talapko et al., 2019).

Se considera que la búsqueda de una vacuna contra esta enfermedad es uno de los proyectos de investigación más importantes en el área de salud pública. Los modelos animales que se han utilizado han ayudado en gran medida a entender cómo se da el desarrollo de la infección la interacción entre patógeno-hospedero y la respuesta inmunológica. El modelo que más se ha utilizado es el modelo con primates como lo es el mono *Aotus* spp. este puede presentar una susceptibilidad a la infección en el laboratorio, lo que facilita la evaluación de vacunas y medicamentos para tratar y controlar esta enfermedad, por lo que es el modelo animal recomendado por la WHO para realizar los estudios vacunales contra la malaria (Contacos & Collins, 1968; Riccio et al., 2015; Rieckmann et al., 1981). Actualmente se cuenta con muy pocos ejemplares de ese tipo de simios por lo que se ha venido desarrollado estas investigaciones con el modelo de *mus musculus* ya que este cuenta con muchas similitudes en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el cual es codificado en el cromosoma 6 para ambas especies Estas moléculas juegan un papel importante en el reconocimiento y la presentación de antígenos a las células T, que son un tipo de célula inmunitaria que puede reconocer y atacar a los invasores extraños. (Canales & Walz, 2019; Khanna & Burrows, 2011; Vanhooren & Libert, 2013)

La respuesta que da el sistema inmune ante la infección se produce mediante varios mecanismos, uno de ellos es la inmunidad innata o natural, y el otro es la inmunidad adquirida, esta última está integrada por la inmunidad celular y la inmunidad humoral, las cuales trabajan en conjunto para combatir al agente infeccioso mediante la liberación de anticuerpos producidos por los linfocitos B y las células plasmáticas derivadas de ellos. Las células dendríticas (CDs) hacen parte fundamental de la respuesta inmune debido a que participan en ambos tipos de inmunidad, estas células son las que presentan el antígeno más fuerte, además pueden activar los linfocitos T colaboradores que no han tenido contacto antigénico previo, los marcadores que presentan las CDs dan la oportunidad de identificar y reconocer los mecanismos de presentación de antígeno de las mismas, haciendo énfasis en la importancia de producir anticuerpos monoclonales que sean capaces de reconocer estos marcadores (Amorim et al., 2016; Cruz Castro & Díaz Barrera, 2019; Rojas, 2017).

Los anticuerpos monoclonales son herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en diagnóstico y tratamiento, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas (Machado et al., 2006) estos anticuerpos son inmunoglobulinas modificadas y diseñadas específicamente para actuar frente a dianas concretas, con el objetivo de interrumpir un proceso patológico, estimular una acción celular determinada o desviar un mecanismo celular hacia una vía de interés (Castillo, 2015). Para la producción de anticuerpos monoclonales se requieren una serie de pasos generales entre los cuales encontramos: La inmunización de un modelo animal con un antígeno específico el cual puede ser producido en el laboratorio, como lo son los péptidos sintéticos, posteriormente se realiza la extracción de estas de las células inmunizadas que se encuentran en el bazo del modelo animal para finalmente realizar una fusión con células de mieloma, con el fin de producir células híbridas con la capacidad de crecer infinitamente en el laboratorio produciendo anticuerpos específicos (Beck et al., 2010; Geng et al., 2015; Posner et al., 2019).

Con lo anterior se evidencia que la principal herramienta sobre la que se propone seguir investigando debe estar enfocada en el estudio de la respuesta inmune natural del huésped mediante la implementación del desarrollo de vacunas peptídicas, parte fundamental en el desarrollo de este tipo de vacunas es la producción de anticuerpos monoclonales puesto que estos son células especializadas que hacen parte del sistema inmune, producidas por las células B, con la capacidad de reconocer moléculas específicas como los antígenos (Geng et al., 2015) por lo que el principal objetivo del presente trabajo es producir anticuerpos monoclonales para la identificación de células dendríticas del modelo de mono *Aotus* spp., para lo cual se van a emplear herramientas bioinformáticas para la búsqueda de las secuencias peptídicas que se emplearan en la inmunización de los ratones y así realizar la producción de anticuerpos monoclonales a partir de la inducción de un antígeno específico en ratones, con ello, obtener las células plasmáticas específicas de antígeno del bazo de los ratones, en donde las células plasmáticas aisladas se fusionarán con célula inmunes cancerosas para la inmortalidad y finalmente se evaluarán su respuesta en el modelo *Aotus* spp. y *Homo sapiens*

2. Materiales y Métodos

2.1 Población y muestra

En el estudio se utilizaron esplenocitos las cuales son células blancas que se encuentran en el bazo, como lo son linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos, los cuales se obtuvieron de ratones hembras de cepa BALB/c, con un peso de 20 gramos y aproximadamente 10 semanas de edad, provenientes de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), se separaron en grupos de dos individuos por cada péptido a evaluar y se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Instituto de Inmunología (FIDIC), proveyéndoles un ambiente óptimo y garantizando para el bienestar de los animales y la seguridad del personal que los maneja. Los ratones se mantuvieron a temperatura ambiente y se alimentaron con comida Rodent Diet 5010 y agua, el aseo de las cajas en donde se mantiene los animales se realizó cada 3 días, en donde se cambió el aserrín el cual es previamente autoclavado y se

realiza cambio de agua y abastecimiento de comida. Cabe mencionar que el desarrollo del proyecto cuenta con el aval del comité de ética de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A regulado por el acuerdo No. 285/2008, capítulo VII.

2.2 Selección *in silico* de secuencias peptídicas

Para la predicción *in silico* de las secuencias peptídicas se emplearon diversas herramientas bioinformáticas como TMHMM Server, SignalP 6.0, IEDB Analysis Resource y NIH. En donde lo que primero se realizó fue la búsqueda de las secuencias de las proteínas de interés en el modelo animal *Aotus* spp. estas proteínas son: Glicoproteína de superficie de células-T CD1c (BDCA-1), integrina alfa-X (CD11c) y antígeno de diferenciación de monocitos (CD14), estas son de gran importancia y se han estudiado previamente, por lo que en ese estudio se busca corroborar los datos obtenidos. Como primer paso, se obtuvieron las secuencias en formato FASTA en la base de datos NCBI Protein, posteriormente se empleó la herramienta TMHMM Server con el cual se logró predecir las hélices transmembranales de estas proteínas y así conocer la porción que se encuentra fuera de la membrana y están disponibles, y con una mayor probabilidad que sean reconocidas por los anticuerpos que se van a generar en el presente estudio. Usando SignalP 6.0 Server se identificó el péptido señal para su respectiva remoción.

Después de predecir la fracción extracelular y el péptido señal se continuó con la identificación de los epítopes reconocidos por las células B y células T, se empleó el programa Bepi Pred - 2.0 y se realizó un alineamiento de las secuencias de *Mus musculus*, *Homo sapiens*, y *Aotus* spp. descritas en GenBank para así realizar la selección de los péptidos a sintetizar e inmunizar en ratones, donde el criterio de selección fue que las secuencias difirieran en el 50% o menos de homología entre *Mus musculus* y *Aotus* spp. y más del 90% para la homología entre *Aotus* spp. y *Homo sapiens*.

2.3 Síntesis de las secuencias peptídica

Las secuencias de las proteínas seleccionadas fueron sintetizadas químicamente por el grupo funcional de síntesis química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), mediante el sistema de fase sólida múltiple usando la aproximación de tert-butoxycarbonyl (t-Boc) (Houghten, 1985). Los péptidos se hidrolizaron con TFA/TIS/H₂O (95%/2,5%/2,5%), siendo purificados mediante RP-HPLC, con posterior liofilización y análisis mediante espectrometría de masas (Maldi-TOF) para confirmar su peso molecular. Adicionalmente, se realizó dicroísmo circular (que es una aproximación de la composición estructural de las proteínas en disposición de las hojas alfa, beta hélices y polipropinil); el espectro se registró a 20°C utilizando un espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a un sistema Peltier PFD-425S para el control de la temperatura. Se utilizaron soluciones de péptido en 0,1 mg/mL en diferentes porcentajes de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (Roccatano et al., 2002). Los espectros se recogieron de 195 a 260 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 mm (los parámetros utilizados fueron: velocidad de exploración de 100 nm / min), el tono de datos 0,2 nm, la respuesta 2s, 1 nm ancho de banda y 3 scans). Como resultado de la síntesis química de las secuencias peptídicas de interés, fueron entregados los péptidos en estado liofilizado, uno por cada proteína de membrana.

2.4 Inmunización de los ratones

Se realizaron dos inoculaciones subcutáneas de los péptidos los cuales se prepararon bajo una proporción de 30 µl de péptido acoplados con KLH + 30 µL de adyuvante incompleto de Freund, en una tercera inmunización vía intraperitoneal se preparó 30 µL de péptido en PBS + 30 µL de adyuvante incompleto de Freund, los ratones se dividieron en 3 grupos y se inocularon con los péptidos seleccionados previamente. Para obtener el suero pre-inmune a cada ratón se le realizó una punción de la vena facial con una lanceta, por lo que se realizó una sangría previa a la primera inmunización. A cada ratón se les realizó dos inmunizaciones las cuales se llevaron a cabo cada 14 días, tras las inoculaciones se procedió a realizar una

toma de muestras de sangre para así obtener el suero, se puede observar en la figura 2. Los ratones fueron sacrificados mediante método físico por dislocación cervical con previa sedación empleando una combinación de Ketamina + Xilacina teniendo en cuenta las normas éticas del bienestar animal. Para finalizar, se hará una toma de muestra de sangre después del sacrificio mediante una punción cardiaca.

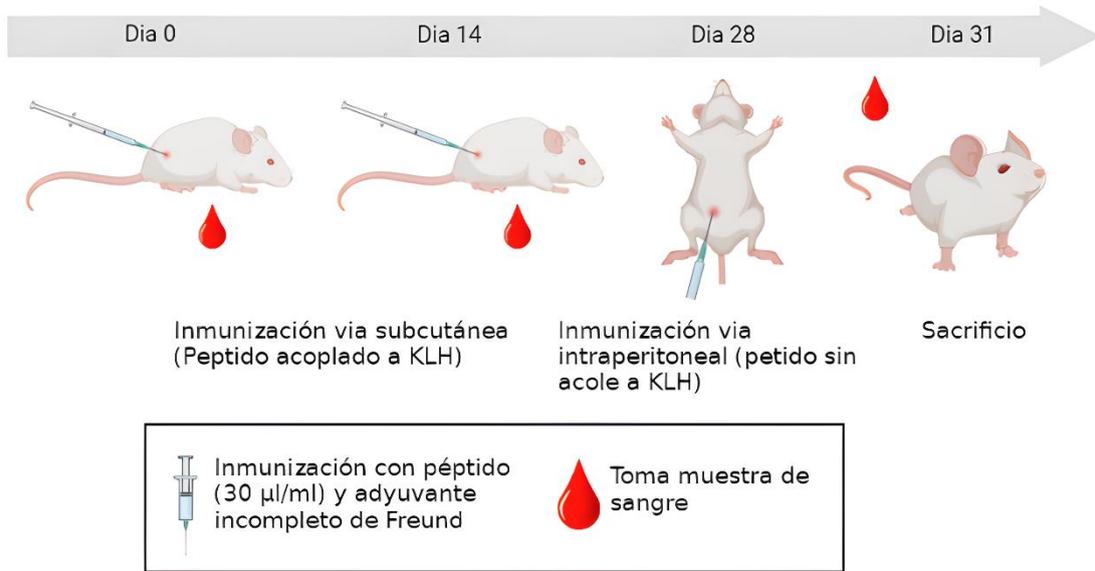


Figura 2. Protocolo de inmunización con los péptidos sintetizados.

2.5 Obtención de los esplenocitos

Posteriormente a la eutanasia se retiró el bazo a cada ratón, estos fueron llevados a un medio de cultivo IMDM completo, el cual es adecuado para cultivos celulares de alta densidades y proliferación celular rápida, en este medio se obtuvieron los esplenocitos mediante la perfusión del bazo, para finalizar se realizó un recuento empleando una cámara de Neubauer®.

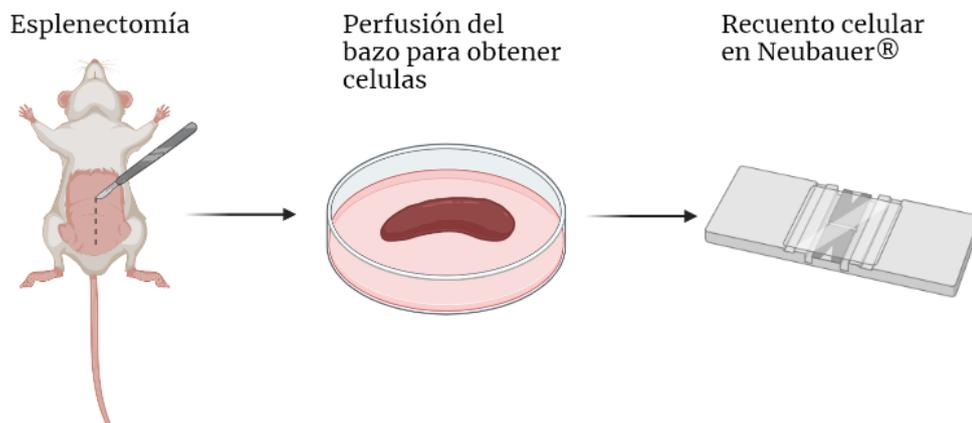


Figura 3. Protocolo para la obtención de los esplenocitos.

2.6 Obtención del hibridoma

Para obtener la producción del hibridoma previamente se realizó un cultivo de células de mieloma (PAI) las cuales no producen anticuerpos, estas deben alcanzar una concentración de 20 millones de células. Para realizar la fusión las células se deben mezclar una proporción de 1 célula de mieloma por cada 5 de bazo mediante el uso de polietilenglicol (PEG) el cual se adiciono de a 1 ml durante un minuto gota a gota, inmediatamente al realizar esto se diluyo con 1ml de medio IMDM incompleto el cual también se sebe adicionar gota a gota. Posteriormente se debió llevar las células híbridas a 10 mL, se centrifugo y se resuspendió a una concentración de 1'000.000 de células/ mL en medio HAT-20% de suero fetal bovino (HAT: Hipoxantina, Aminopterin y Timidina). Estos hibridomas fueron cultivados en placas de 96 pozos e incubados durante 16 días a 37° en una atmósfera con CO₂ al 5%. Para seleccionar los clones óptimos a los 12 días de incubación se realizó una prueba ELISA en la cual se analizó el sobrenadante de las células híbridas. Los clones que sen obtuvieron como resultado positivo fueron separados en cajas de cultivo, posteriormente se les realizo un análisis a los clones mediante inmunofluorescencia de los cuales se obtuvieron un resultado positivo fueron clonados mediante dilución limitante.

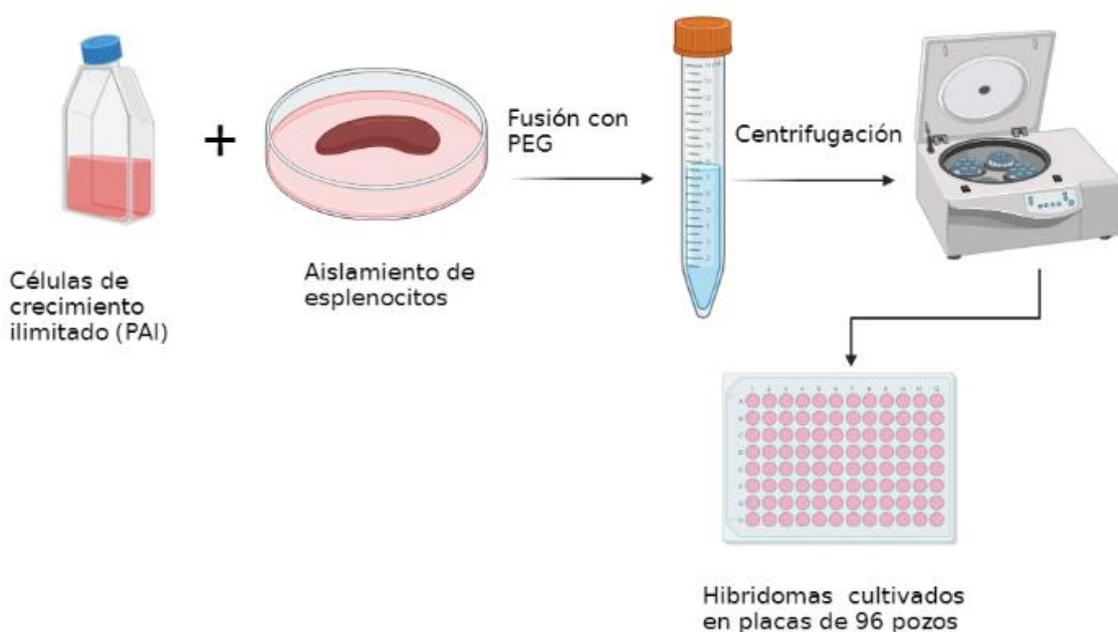


Figura 4. Obtención de los del hibridoma

2.7 Valoración de la inmunogenicidad por Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA):

Antes de realizar la eutanasia para la obtención de los esplenocitos del bazo de los ratones y lograr determinar cual tuvo una mejor respuesta frente al péptido inoculado, se realizaron dos ensayos, el primero fue mediante ELISA para determinar la reactividad frente al péptido, este ensayo se realizó con los sueros pre-inmune, post segunda, donde se emplearon placas Nunc Maxisorp de poliestireno de 96 pozos de fondo plano las cuales fueron recubiertas por los péptidos previamente sintetizados con una proporción de 1 µg/pozo, en cada uno de los pozos se colocó el suero de los ratones bajo una proporción de 1:100 en PBS con leche descremada 5%, las placas fueron incubadas por 2 horas a 22⁰C. Los anticuerpos específicos fueron detectados mediante IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina.

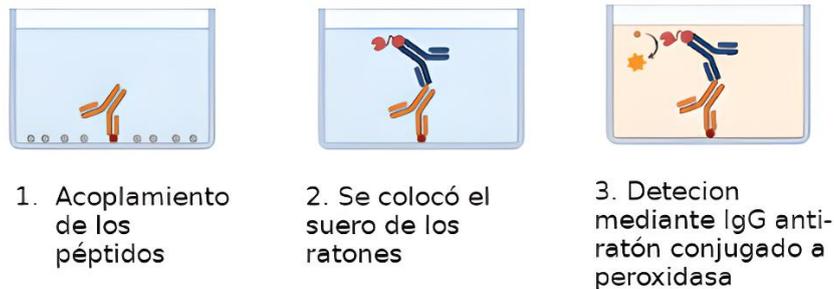


Figura 5. Esquema general de los ensayos de inmunogenicidad (ELISA)

3. Resultados y Discusión

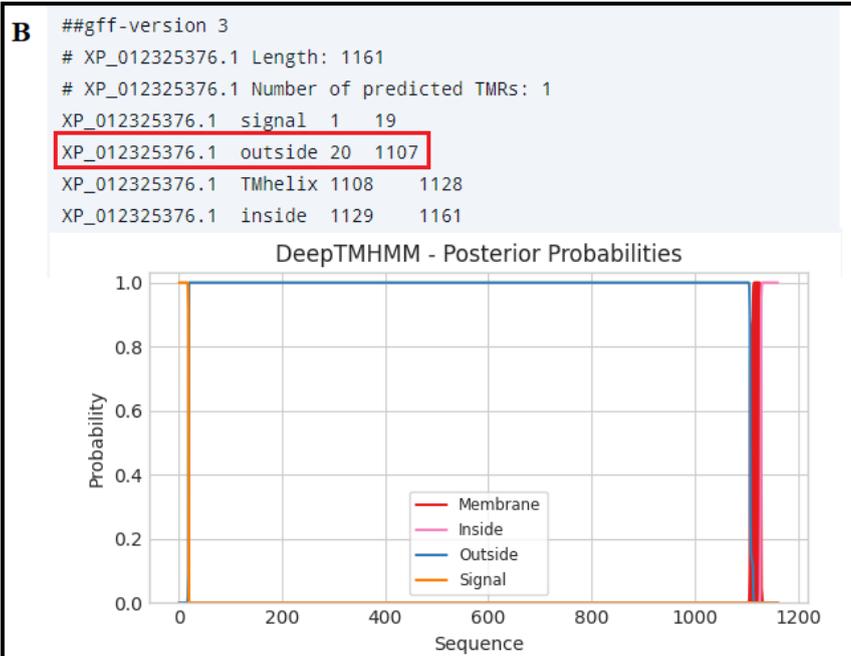
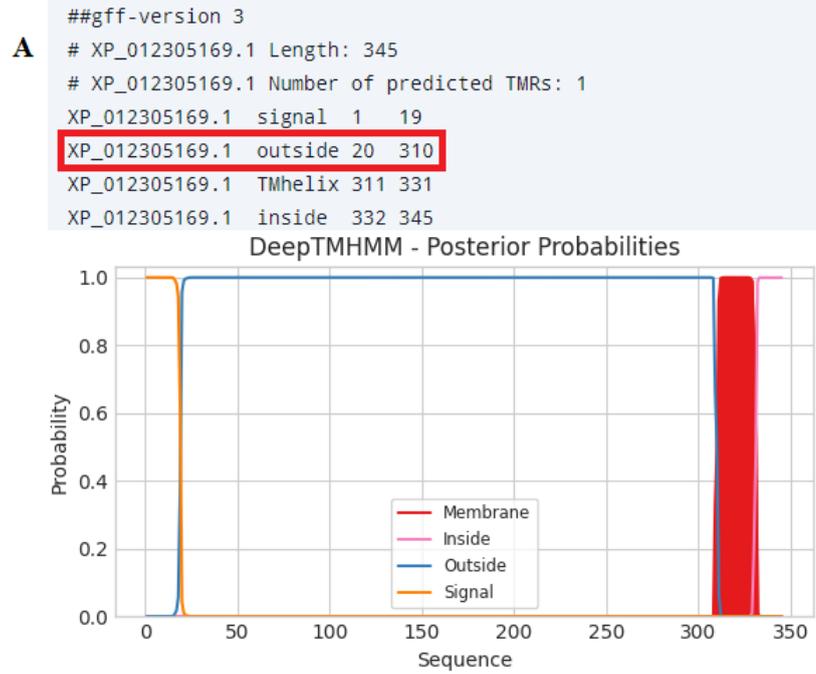
3.1 Predicción “*in silico*” de las secuencias peptídicas y síntesis

Al realizar la predicción “*in silico*” de las secuencias peptídicas que pertenecen a los receptores de membrana de las células que presentan el antígeno, se realizó la búsqueda en la plataforma de NCBI Protein así obtener las secuencias en formato FASTA de las proteínas del modelo animal *Aotus* spp., las cuales se muestran en la tabla 1. Cada una se presenta con su respectiva descripción, abreviatura, código de acceso y longitud en aminoácidos.

Tabla 1. *Receptores de membrana seleccionados para la predicción in silico.*

CÉLULA DE ORIGEN	RECEPTOR DE MEMBRANA	NÚMERO DE ACCESO (NCBI Protein)	LONGITUD (aa)
Célula dendrítica	BDCA-1	XP_12305169.1	345
Célula dendrítica	CD11c	XP_012325376.1	1161
MONOCITO	CD14	XP_012324561.1	375

Con las secuencias en formato FASTA se procedió a realizar la búsqueda de las porciones extracelular, las cuales tienen una alta probabilidad de ser identificadas por los anticuerpos, en la base de datos TMHMM Server, para cada secuencia se obtuvo un Output que a manera general se observa algunas estadísticas y una lista de la ubicación de las hélices transmembranales previstas y la posible ubicación de las regiones de bucle intermedias, en las gráficas se observan en color azul la porción de la proteína que se encuentra extramembranal, de color rosado claro la porción intramembranal, de color naranja está representado el péptido señal (Gutierrez et al., 2022). El resultado que se obtuvo para cada una de las secuencias fue: BDCA-1 se observó que el fragmento extracelular se encuentra en las posiciones 20 y 310, como se evidencia en la figura 6-A, para CD11c se observó en las posiciones 20 y 1107 lo que podemos corroborar en la figura 6-B y para CD14 su porción extracelular es la totalidad del fragmento como se observa en la figura 6-C.



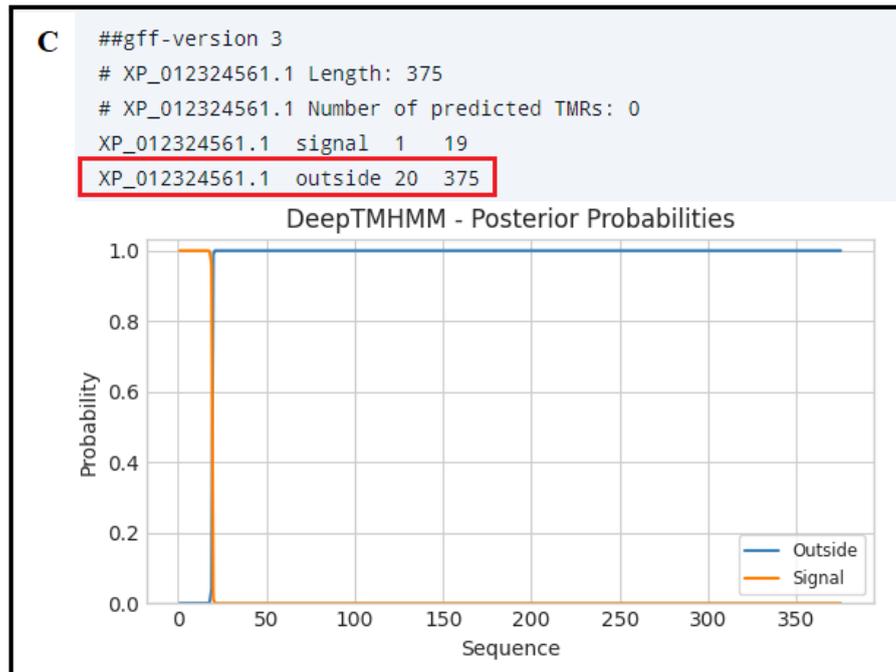
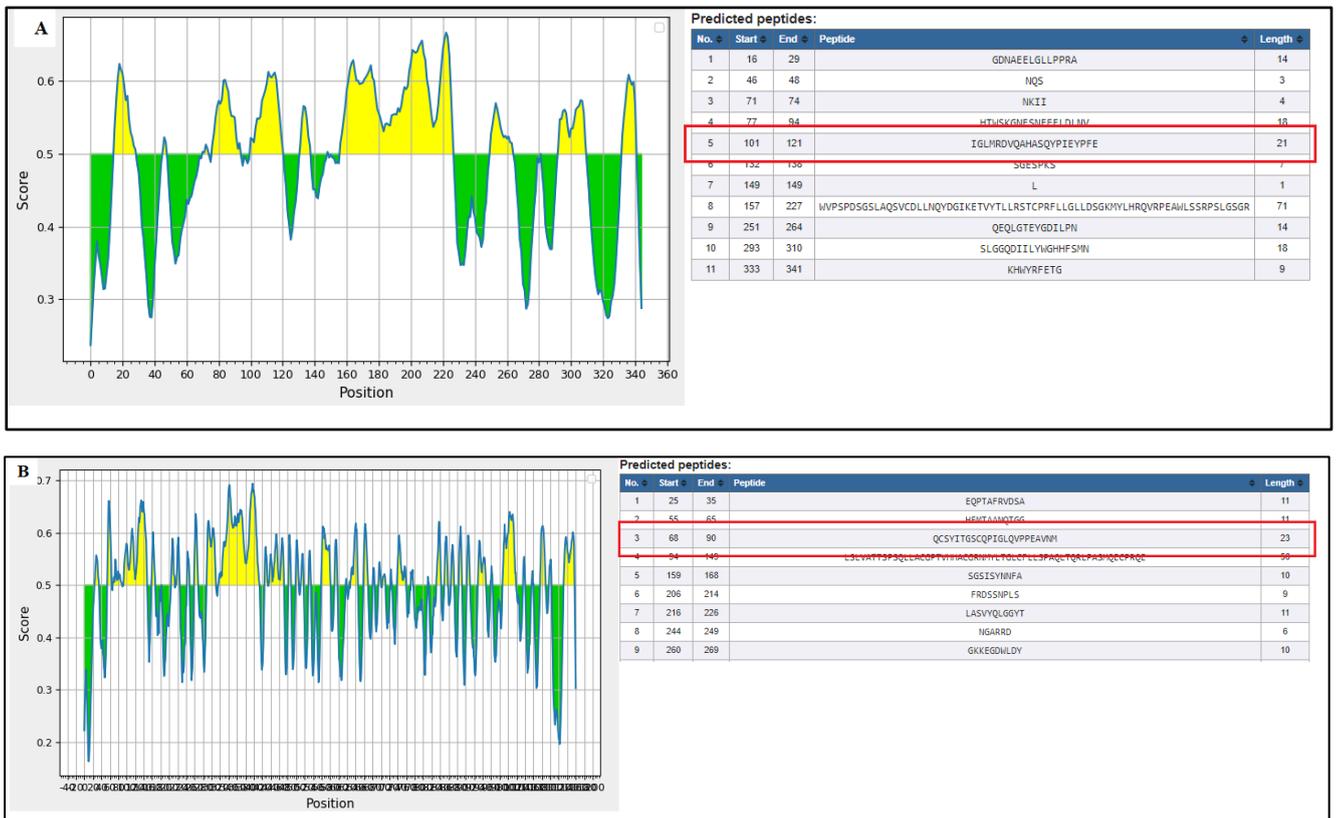


Figura 6. Predicción del fragmento extracelular con las secuencias que se obtuvieron en NCBI Protein para las proteínas BDCA-1 (A), CD11c (B) y CD14 (C).

Para conocer la ubicación del péptido señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas dentro de la región extracelular de las proteínas seleccionadas para ello se empleó el servidor Signal P 6.0 (Teufel et al., 2022), en donde a modo general podemos observar un output en color rojo representa la región n-terminal del péptido señal (Sec/SPI_n), en color naranja la región hidrofóbica central del péptido señal (Sec/SPI_h), en color amarillo la región c-terminal del péptido señal (Sec/SPI_c) y en verde encontramos el punto de corte del péptido señal (cs), como se resultado se observa que para todas las secuencias se encuentra entre las posiciones 1 y 19 con los siguientes puntos de corte: BDCA-1 se encuentran en DNA-EE, en la secuencia CD11c está en SLG-FN y por último para CD14 el péptido señal está presente en VSA-TT, esto lo podemos observar en la figura 7.

de la secuencia y la longitud, todas las búsquedas se realizaron con un límite de 0,5 el cual es el recomendado (Jespersen et al., 2017), la selección de la secuencia se realizó bajo los siguientes parámetros: Tener una longitud de 20 a 25 aminoácidos y no pertenecer al péptido señal previamente identificado. En la proteína BDCA-1 la ubicación de este se encuentra entre los aminoácidos 101 y 121 con una longitud de 20, la secuencia es IGLMRDVQAHASQYPIEYPFE. Para la proteína CD11c su epítipo B se encuentra entre los aminoácidos 68 y 90 con una longitud de 23, la secuencia es la siguiente QCSYITGSCQPIGLQVPPEAVNM y finalmente para la proteína CD14 su epítipo se da entre los aminoácidos 96 y 117 con una longitud de 22, muestra la siguiente secuencia VGAAQVPAQLLVGALSVLAYSR, esto se puede observar en la figura 8.



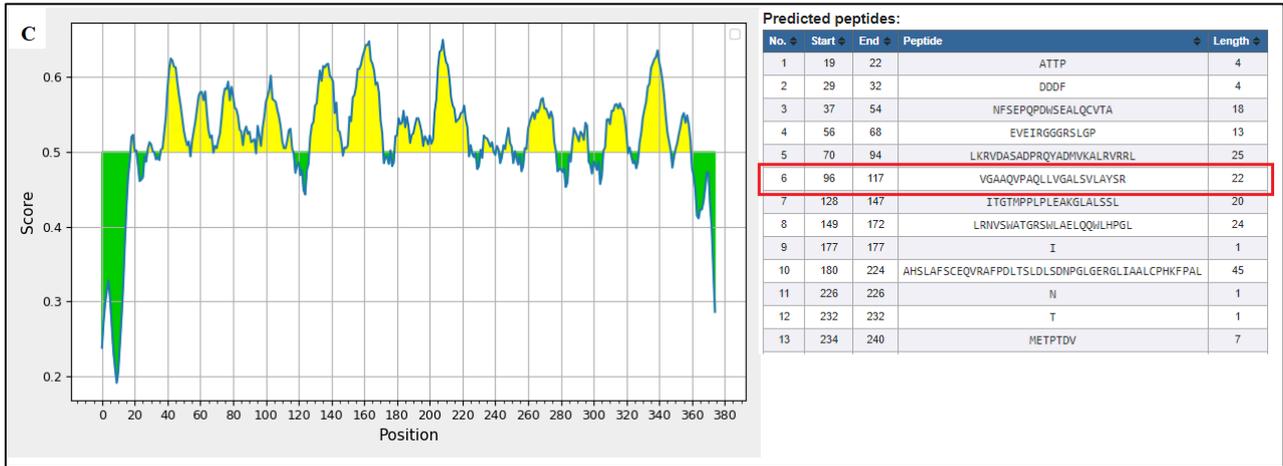


Figura 8. Predicción de los epítopes B mediante BepiPred-2.0 Analysis Resource sobre el fragmento extracelular libre del péptido señal de cada receptor. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c y D: proteína CD14

Posteriormente a la predicción de los epítopes B se procedió a la predicción del epítope T para cada proteína, en donde buscamos una herramienta de predicción a la unión de péptidos a moléculas del CMH de clase II, en donde se escoge la especie ratón, con el alelo para el complejo mayor de histocompatibilidad H2-IEd (Jensen et al., 2018), como se muestra en la figura 9, se ubicaron estos epítopes T justo antes de los epítopes B anteriormente seleccionados, como se observa en la figura 9.

A	Allele	#	Start	End	Length	Method used	Peptide	Percentile Rank	Adjusted rank
	H2-IEd	2	19	33	15	Consensus (smm/nn)	FLDLNVLFRFYITIGL	18.50	18.50
	H2-IEd	2	4	18	15	Consensus (smm/nn)	IFLHTWSKGNFSNEE	19.00	19.00
	H2-IEd	2	27	41	15	Consensus (smm/nn)	RFYITIGLNRDVAQHA	19.00	19.00
	H2-IEd	4	22	36	15	Consensus (smm/nn)	CHVSGFYPKPVWATW	19.50	19.50
	H2-IEd	4	23	37	15	Consensus (smm/nn)	HVSGFYPKPVWATWM	20.00	20.00

B	Allele	#	Start	End	Length	Method used	Peptide	Percentile Rank	Adjusted rank
	H2-IEd	13	21	35	15	Consensus (smm/nn)	TSCRINHILIFREGAQ	40.50	40.50
	H2-IEd	8	23	37	15	Consensus (smm/nn)	EQGHPWGRFGAALTV	41.00	41.00
	H2-IEd	6	64	78	15	Consensus (smm/nn)	GGLYQCSYITGSCQP	41.00	41.00
	H2-IEd	13	25	39	15	Consensus (smm/nn)	INHILIFREGAQISFL	41.00	41.00
	H2-IEd	5	27	41	15	Consensus (smm/nn)	KPSQEHIFKVEDFDA	41.00	41.00

C	Allele	#	Start	End	Length	Method used	Peptide	Percentile Rank	Adjusted rank
	H2-IEd	5	8	22	15	Consensus (smm/nn)	LEQVPKGLPAELSVL	80.00	80.00
	H2-IEd	2	56	70	15	Consensus (smm/nn)	LEITGTMPPLEAK	80.50	80.50
	H2-IEd	2	22	36	15	Consensus (smm/nn)	RRLTVGAAQVPAQLL	80.50	80.50
	H2-IEd	2	55	69	15	Consensus (smm/nn)	DLEITGTMPPLEA	81.00	81.00
	H2-IEd	5	13	27	15	Consensus (smm/nn)	KGLPAELSVLDLSCN	81.00	81.00

Figura 9. Predicción de los epítopes T mediante IEDB Analysis Resource. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD14.

Para finalizar, teniendo en cuenta que los péptidos sintéticos provienen de secuencias de *Aotus* spp. iban a ser administrados en ratones, se hizo un alineamiento entre las secuencias de *Aotus* spp., *Mus musculus* y *Homo sapiens*, como lo muestra la figura 5; este análisis se realizó con la finalidad de evaluar la homología entre las proteínas presentes en este estudio, lo cual garantiza de un lado, que al momento de inocular los ratones se generaría una buena inmunogenicidad en respuesta a los péptidos inoculados (grado de homología menor al 50% entre *Aotus* spp. y *Mus musculus*) y además que a futuro los anticuerpos obtenidos frente a los péptidos de *Aotus* spp. puedan utilizarse en ensayos con muestras humanas (alta homología entre *Aotus* spp. y *Humano*).

El alineamiento entre las secuencias de interés demostró una homología entre *Aotus* spp. y *Mus musculus* menor del 65% para todas las proteínas. Para BDCA-1 la homología fue del 45.81%, en el caso de CD11c fue del 57.80% y por último la homología entre las secuencias de CD14 fue del 63.99%.

En lo que respecta al alineamiento entre las secuencias de *Aotus* spp. y *Homo sapiens*; para todas las proteínas se obtuvo una homología mayor al 70%. En el caso de BDCA-1 fue de 78.88%, para CD11c de 89.91% y, por último, CD14 del 90.91% como se muestra en la figura 10

BDCA-1		
Mus	MRYLPWLLLWTFLQV-----WGQSEVQQNYTFRCLQMSSFANRSWSRTDSVVWLGD	51
Homo	MLFLQFLLLALLLPGGDNA-----ASQEHVSFHVVIQIFSFVNQSWARGQGSGWLDE	52
Aotus	MLFLQFLLAVFLPGGDNAEELGLLPPRAAPEHVVSFHVVIQIASFANQSWAQCGSGWLDE	60
	*:	

CD11c		
Mus	DDLSIITMSAMGLDTLVVGGPQDFNMSVILRNDGEDSYGTQVIVVYFSGISYRKDSASQNP	837
Homo	DNLGISFSFPGKSLLVGSNLELNAEVMVWNDGEDSYGTTITFSHPAGLSYRYVAEGQKQ	838
Aotus	DDLGISFSFPGKTLVGSNLELNAEVMVWNDGEDSYGTTITFSHPAGLSYRHVAEGQKQ	838
	*:	

CD14		
Mus	VLDLSYNRLDRNPSDELQVGNLSLKGPNFLDSE---SHSEKYN SGVVTAGAPSSQAVA	338
Homo	VLDLSCNRLNRAPQDELPEVDNLTLDGNPFLVPGTALHLEGSMNSGVVPACARSTLSVG	360
Aotus	VLDLSCNRLNRAPQDELPKVDNLTLDGNPFLVPGSTLPQEGSTNSGVVPACARSTLSVG	360
	*****:	

Figura 10. Alineamiento entre la secuencia de interés de *Aotus* spp. vrs. las mismas ubicaciones en *Mus musculus* y *Homo sapiens*. A: proteína BDCA-1, B: proteína CD11c, C: proteína CD14.

Se comprobó que cada una de las secuencias de marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de *Aotus* spp. diseñadas cumplieron con los criterios para proceder a su síntesis química; las secuencias completas se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Predicción “*in silico*” de las secuencias a sintetizar de los marcadores de membrana de las células presentadoras de antígeno de monos *Aotus* spp.

Proteína	longitud total (aa)	longitud de la secuencia sintetizada	secuencia sintetizada
BDCA-1	308	24	10-AVFLPGGDNAEELGLLPPRAAPEH-33
CD11c	1105	24	804-EVMVWNDGEDSYGTTITFSHPAGL-827
CD14	375	26	327-DGNPFLVPGSTLPQEGSTNSGVVPAC-352

3.2 Evaluación de la inmunogenicidad de los ratones

La respuesta inmune generada por los ratones frente a los péptidos que se inocularon se evaluó por la reactividad de los sueros tomados durante todo el proceso de inmunización mediante el ensayo ELISA, en donde se puede observar que para el péptido BDCA-1, el cual fue inyectado en el grupo 1, tuvo una reactividad positiva, se evidencia que desde los sueros post primera inmunización hasta los sueros obtenidos por punción cardiaca en la eutanasia de los ratones un aumento en la producción de anticuerpos y que el péptido tuvo una buena respuesta, esto se puede observar en la figura 11, en donde de color gris está el grupo control que son los sueros tomados previamente a la primera inmunización da como resultado una absorbancia de 0,0896 mientras que el suero tomado por punción cardiaca en la eutanasia del ratón y está representado con color morado da como resultado 1,2062, con lo que podemos ver que hubo una mayor producción de glicoproteína de superficie de células T CD1c (BDCA-1).

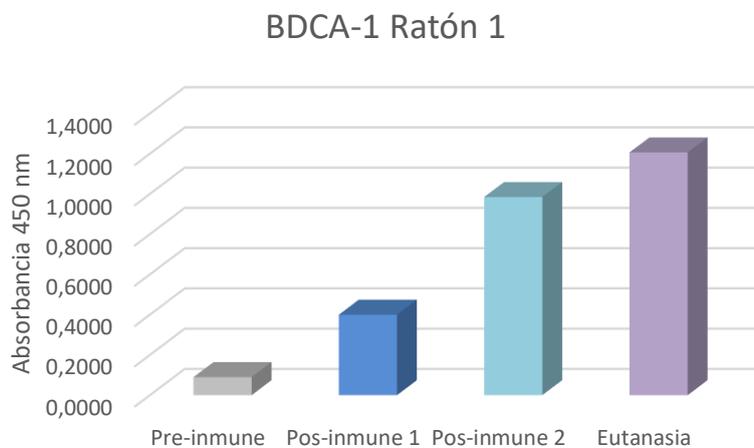


Figura 11. Evaluación de la reactividad dada por la inmunización con el péptido sintético BDCA-1, (ELISA).

Para el péptido sintético CD14 encontramos que la respuesta inmune generada por los ratones del grupo 2 mostró una reactividad positiva, con una intensidad mayor a comparación del grupo uno, como los podemos observar en la figura 12, con ello podemos confirmar que la respuesta mediada por los antígeno de diferenciación de monocitos CD14 se incrementó con respecto al grupo control, en donde se obtuvo un resultado de absorbancia de 0,0567 para los

sueros pre inmunización y de los sueros tomados al realizar la eutanasia del ratón la absorbancia obtenida fue de 0,3211.

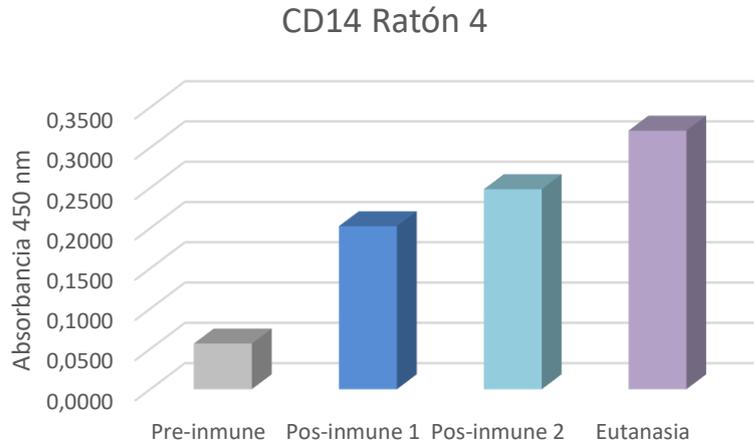


Figura 12. Evaluación de la reactividad dada por la inmunización con el péptido sintético CD14, (ELISA).

Finalmente, para el péptido sintético CD11c que era el grupo 3, al igual que los anteriores se puede observar que se obtuvo una reactividad positiva, esto lo podemos observar con los resultados del ensayo de reactividad en el suero pre-immune se obtuvo una absorbancia de 0,0722 mientras que los valores con sueros tomados por punción cardiaca fueron de 1,0239, esto lo podemos corroborar en la figura 13.

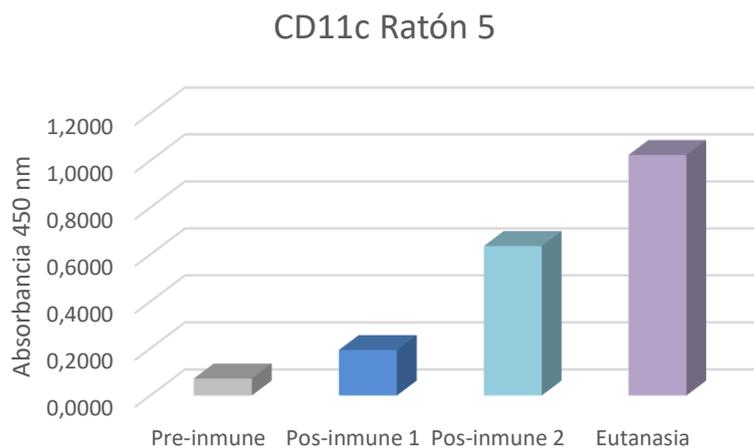


Figura 13. Evaluación de la reactividad dada por la inmunización con el péptido sintético CD14, (ELISA)

Con los anteriores resultados podemos ver que el nuevo diseño de los péptidos “in silico” se realizó de una correcta manera ya que estos lograron generar la respuesta inmune deseada, las

vacunas peptídicas hasta la fecha han demostrado tener un gran potencial ya que el diseño de estas tiene varias ventajas como lo es el diseño “in vitro” con una gran precisión, se pueden realizar con mezclas antigénicas que no se encuentran de forma natural o su producción sintética puede ser controlada teniendo así un alto nivel de calidad (Gómez, 2011; González-Romo & Picazo, 2015), en FIDIC se están desarrollando diversas estrategias con un enfoque en la síntesis de péptidos para el tratamiento de la malaria en donde se selecciona proteínas conservadas del paracito y con ello generar un agente inmunitario exitoso (Patarroyo et al., 2011), en los últimos tiempos en el grupo de inmunología en FIDIC han estudiado la posibilidad de generar anticuerpos monoclonales para tratar esta infección la cual consiste en generar una respuesta promoviendo diferentes proteínas pertenecientes al sistema inmunitario, según los estudios realizados previamente se pueden confirmar los datos obtenidos, en donde con estas nuevas predicciones de los péptidos sintéticos se logra ver un incremento en la producción de anticuerpos al realizar la comparación de los resultados obtenidos previamente por (Cruz Castro & Díaz Barrera, 2019). Se evidencia de esta manera que el estímulo que se da al sistema inmune empleando péptidos sintéticos se logra dar de manera exitosa, y se están generando anticuerpos dirigidos específicamente a los péptidos sintéticos.

El péptido que tuvo una mayor respuesta fue CD14 el cual está presente en la respuesta inflamatoria en la inmunidad innata, actuando así a través de MyD88, TIRAP y TRAF6, lo que conduce a la activación de NF-kappa-B, la secreción de citoquinas y dar una respuesta inflamatoria (Fitzgerald & Kagan, 2020; O'Neill et al., 2013), BDCA-1 obtuvieron una buena respuesta de inmunogenicidad, este está presente en los procesos de inmunidad adaptativa y es una proteína presentadora de antígenos que se une a antígenos lipídicos y glicolípidos propios y no propios y los presenta a los receptores de células (Sugita et al., 2000), por lo que la estimulación de estos se ha visto que pueden mediar el reconocimiento de los lípidos bacterianos o parasitarios por parte de las células T (Briken et al., 2000) haciéndolos de gran importancia a la hora de una infección por el paracito de *Plasmodium* spp., y el péptido CD11c,

es un receptor de fibrinógeno el cual reconoce la secuencia GPR en fibrinógeno e interviene en la interacción célula-célula durante las respuestas inflamatorias el cual es especialmente importante en la adhesión y quimiotaxis de monocitos, por lo descrito anteriormente son de gran interés ya que realizan un papel muy importante en la respuesta del sistema inmune frente a un patógeno, también las diferentes respuestas están mediadas por el posible margen de error a la hora de realizar la inmunización que se le realizo a cada ratón y la propia respuesta generada por cada individuo también dependerá sobre el sistema inmunitario de cada ratón en el presente estudio.

3.3 Fusión celular

Posterior a la realización de los ensayos de evaluación de la inmunogenicidad de los péptidos se procedió a la realización de la fusión celular con lo cual se seleccionó un ratón de cada grupo para realizar la eutanasia y con ello la obtención de los esplenocitos para así realizar la fusión con células PAI, estas células pertenecen a una línea celular de mieloma tiene una capacidad expansiva muy buena como lo reportan en estudios previos (Dreyer et al., 2010), en donde se realizaron observaciones los días cero, doce y dieciséis.

En el día 0 se puede observar formas celulares de gran tamaño con una membrana definida las cuales corresponden a las células PAI y otras células de un tamaño mas pequeño las cuales corresponden a los esplenocitos del bazo de ratón, esto lo podemos evidencia en la figura 9. Pasados los 12 días ya se puede observar las formaciones del hibridoma se pueden percibir grupos celulares que se encuentran en crecimiento en donde la morfología va cambiando y la proximidad entre las células se va disminuyendo, esto los que nos esta indicando es la formación de células clonales, esto lo podemos observar en la figura 10. En la observación final en el día 16 se corrobora la presencia de células clonales las cuales producen anticuerpos, en este día se pueden ver cúmulos de células grandes uniformes.



Figura 14. Cultivo al día 0 de la fusión celular en objetivo de 40x, en microscopio de contraste, en círculos verdes se observan las células PAI y en círculos naranja los esplenocitos de ratón.



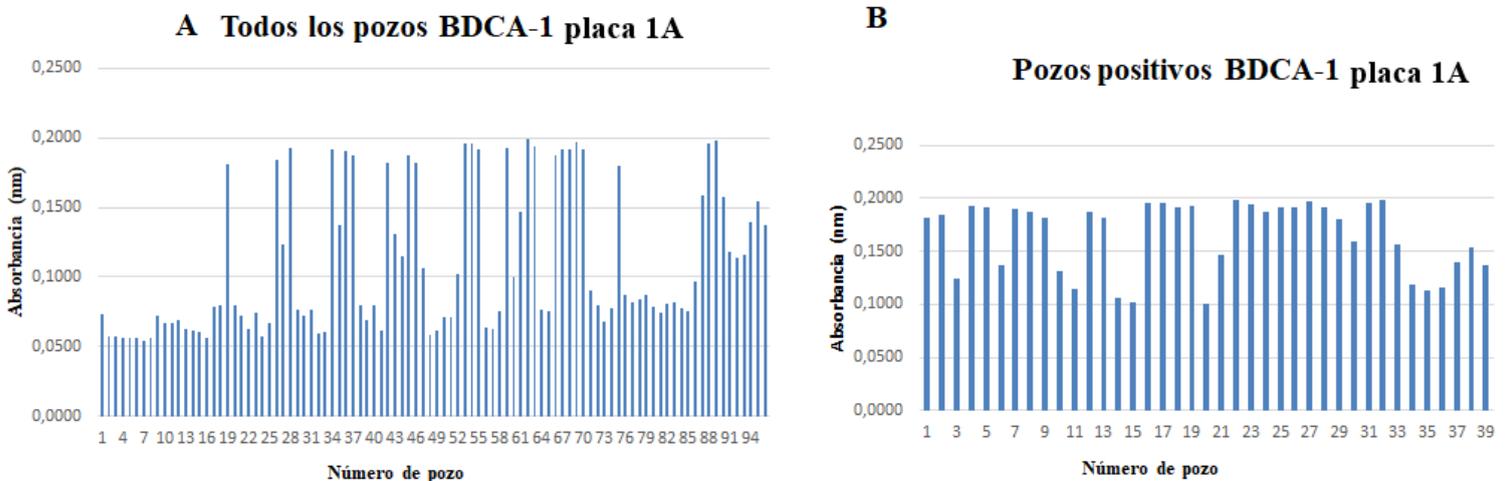
Figura 15. Cultivo al día 12 de la fusión celular, en objetivo de 40x en microscopio de contraste, en círculos rojos se observan.



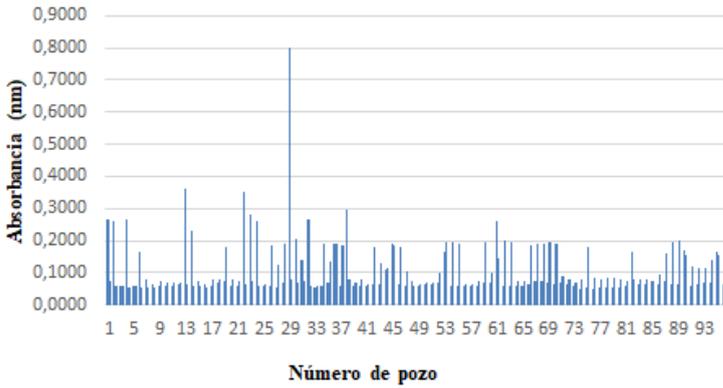
Figura 16. Cultivo al día 16 de la fusión celular, en objetivo de 40x en microscopio de contraste, en círculos rojos se observan células clonales bien definidas.

3.4 Evaluación de inmunogenicidad de los clones

Para la evaluación de inmunogenicidad de los clones se realizó una ELISA indirecta con los sobrenadantes posteriores a los 16 en donde ya se observan la presencia de formación de células clonales, en donde por cada fusión celular se obtuvieron 3 placas de 96 pozos, en donde se analizaron 2 placas por grupo para realizar la detección, para BDCA-1 se obtuvieron 39 pozos en la placa A1 con una absorbancia mayor de 0,1004 y un máximo de 0,1991 y para la placa 1.1 se obtuvo una reactividad mayor de 0,1106 con un máximo de absorbancia de 0,7992, esto lo podemos observar en la figura 17 y para CD14 se obtuvieron 13 pozos para la placa 4A en donde la absorbancia está en un rango de 0,1433 a 0,4875, con lo cual podemos detectar una buena reactividad frente al péptido y para la placa 4.2 las absorbancias se encuentran en el rango de 0,1435 a 0,3498, como se pueden observar en las figuras 18, los ratones del grupo 3 no se lograron sacrificar ya que a la hora de realizar el cultivo de las células de mieloma no se logró debido a varios factores que afectaron el correcto crecimiento de estas células.



C Todos los pozos BDCA-1, placa 1.1



D Pozos positivos BDCA-1, placa 1.1

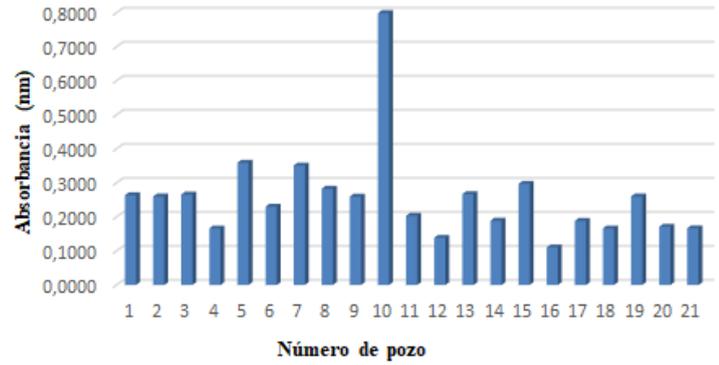
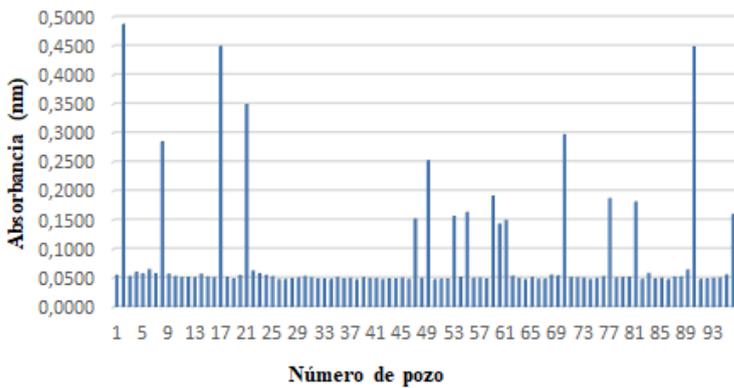
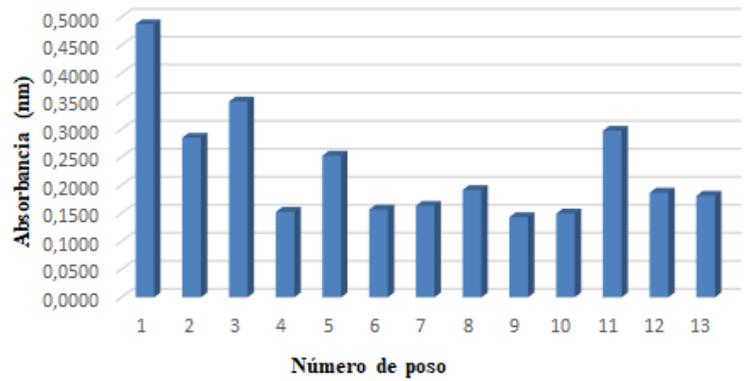


Figura 17. ELISA indirecta de los sobrenadantes de la fusión celular **A:** Resultados placa A1 de 96 posos **B:** Resultados de los pozos positivos de la placa A1 **C:** Resultados placa 1.1 de 96 posos **D:** Resultados de los pozos positivos de la placa 1.1

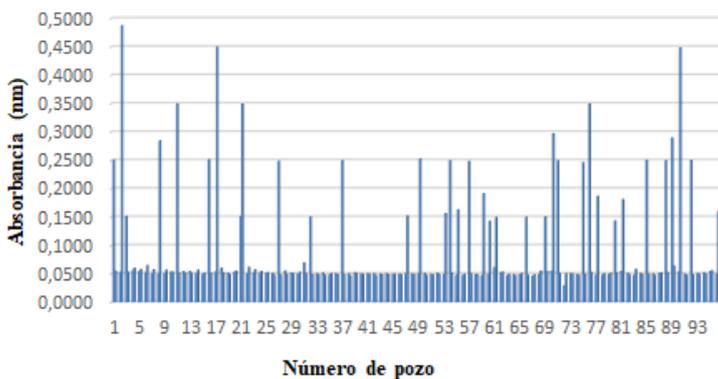
Todos los pozos CD14, placa 4A



Posos positivos CD14, placa 4A



Todos los pozos CD14, placa 4.2



Posos positivos CD14, placa 4.2

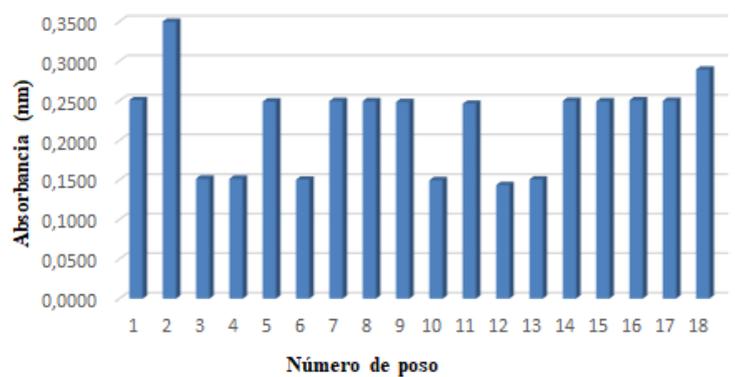


Figura 18. ELISA indirecta de los sobrenadantes de la fusión celular **A:** Resultados placa A4 de 96 posos **B:** Resultados de los pozos positivos de la placa A4 **C:** Resultados placa 4.2 de 96 posos **D:** Resultados de los pozos positivos de la placa 4.2

4. Conclusiones

En este trabajo se realizó un análisis “*in silico*” de los marcadores de membrana de células presentadoras de antígeno de monos *Aotus* spp., de las proteínas BDCA-1, CD11c y CD14, permitió predecir las regiones más inmunogénicas (Epítopes T y B) y con péptidos sintéticos lograr generar una respuesta inmunogénica comprobada por ELISA, en donde el péptido que tuvo mayor reactividad inmunogénica fue BDCA-1.

La fusión celular de entre las células de mieloma (PAI) y los esplenocitos de ratón se logró de manera exitosa, en donde el cultivo celular fue estable desde los 16 días generando así células inmortalizadas específicas contra una molécula en especial por lo que los convierte en herramientas exitosas en estudios vacunales contra la malaria.

La técnica ELISA se estableció como una herramienta sencilla y apropiada para lograr evaluar la reactividad de los sueros de los ratones y los sobrenadantes del cultivo celular debido a la alta especificidad y sensibilidad.

5. Perspectivas:

Realizar microscopia de fluorescencia para evaluar la afinidad de estos anticuerpos sobre las células dendríticas y monocitos para los modelos *Aotus* spp. y *Homo sapiens*.

Realizar ensayos en citometría de flujo ya que el potencial de esta técnica analítica nos permite medir diversos parámetros en decenas de millares de células individuales en pocos segundos, se medirá la absorción y dispersión por las células y así poder evaluar cómo se dieron las interacciones entre las células dendríticas y los anticuerpos monoclonales.

Para la producción de anticuerpos monoclonales usar otro tipo de célula de mieloma como lo sería la línea celular NS0 y la línea celular SP2/0 y con esto comparar los resultados.

6. Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Antonio Nariño por su formación académica y al grupo de investigación en inmunología de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por brindarme cada uno de los elementos para el desarrollo del proyecto. A la doctora Diana Díaz Arévalo por enseñarme, guiarme y ser un gran apoyo en este proceso y a la profesora Yuly Elien Bernal por recibirme y darme su consejo a la hora de realizar esta investigación. Finalmente quiero agradecer a mis padres, a mi hermano, a mis tíos y amigos por hacer parte de este proceso y siempre aconsejarme y acompañarme.

7. Referencias:

- Amorim, K. N. S., Chagas, D. C. G., Sulczewski, F. B., & Boscardin, S. B. (2016). Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. *Journal of Immunology Research*, 2016, e2926436. <https://doi.org/10.1155/2016/2926436>
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews. Immunology*, 10(5), 345-352. <https://doi.org/10.1038/nri2747>
- Briken, V., Jackman, R. M., Watts, G. F., Rogers, R. A., & Porcelli, S. A. (2000). Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 281-288. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.281>
- Canales, C. P., & Walz, K. (2019). Chapter 6—The Mouse, a Model Organism for Biomedical Research. En K. Walz & J. I. Young (Eds.), *Cellular and Animal Models in Human Genomics Research* (pp. 119-140). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816573-7.00006-7>
- Castillo, L. V. (2015). PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES. *Univ Alcala*, 1-12.
- CDC, C. for D. C. and P. (2020, julio 16). *CDC - Malaria—About Malaria—Biology*. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- Contacos, P. G., & Collins, W. E. (1968). Falciparum Malaria Transmissible from Monkey to Man by Mosquito Bite. *Science*, 161(3836), 56-56. <https://doi.org/10.1126/science.161.3836.56>
- Cruz Castro, J. M., & Díaz Barrera, M. J. (2019). *Producción de anticuerpos monoclonales para la identificación de células presentadoras de antígeno de monos aotus spp.* <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/310>
- Cubides Amézquita, J. R. (2019). Producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan proteínas de membrana en células de memoria en aotus spp [MasterThesis, Universidad del Rosario]. En Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C., Janossy, G., Akbar, A. N., ... Janossy, G.

- (2017). *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. The Journal of Immunology*, 140(7), 2171–2178. https://doi.org/10.48713/10336_20148
- Danel, I. (2018). Intercambio de conocimientos para mejorar la salud en la Región de las Américas. *American Journal of Public Health*, 108(S6), S412-S413. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304448s>
- Dhiman, S. (2019). Are malaria elimination efforts on right track? An analysis of gains achieved and challenges ahead. *Infectious Diseases of Poverty*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0524-x>
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe*, 24(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
- Dreyer, A. M., Beauchamp, J., Matile, H., & Pluschke, G. (2010). An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 10(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-87>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044-1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Geng, X., Kong, X., Hu, H., Chen, J., Yang, F., Liang, H., Chen, X., & Hu, Y. (2015). Research and development of therapeutic mAbs: An analysis based on pipeline projects. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(12), 2769-2776. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1074362>
- Gómez, A. (2011). De monos y humanos: La búsqueda de una estrategia de vacunación antipalúdica basada en péptidos sintéticos. *Infectio*, 15(2), 75-83.
- González-Romo, F., & Picazo, J. J. (2015). El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(8), 557-568. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.013>

- Gutierrez, S., Tyczynski, W. G., Boomsma, W., Teufel, F., & Winther, O. (2022). *MembraneFold: Visualising transmembrane protein structure and topology* (p. 2022.12.06.518085). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.12.06.518085>
- Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(15), 5131-5135. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5131>
- INS. (2022). *Boletín Epidemiológico Semanal (BES)* (Boletín Epidemiológico N.º 43; p. 14). Instituto Nacional de Salud. <https://doi.org/10.33610/23576189.2022.43>
- Jensen, K. K., Andreatta, M., Marcatili, P., Buus, S., Greenbaum, J. A., Yan, Z., Sette, A., Peters, B., & Nielsen, M. (2018). Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*, 154(3), 394-406. <https://doi.org/10.1111/imm.12889>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24-W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Josling, G. A., & Llinás, M. (2015). Sexual development in Plasmodium parasites: Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>
- Khanna, R., & Burrows, S. R. (2011). Human immunology: A case for the ascent of non-furry immunology. *Immunology and Cell Biology*, 89(3), 330-331. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.173>
- Laurens, M. B. (2018). The Promise of a Malaria Vaccine-Are We Closer? *Annual Review of Microbiology*, 72, 273-292. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062427>
- López, C., Yepes-Pérez, Y., Hincapié-Escobar, N., Díaz-Arévalo, D., & Patarroyo, M. A. (2017). What Is Known about the Immune Response Induced by Plasmodium vivax Malaria Vaccine

Candidates? *Frontiers in Immunology*, 8.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00126>

Machado, N. P., Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2006). Anticuerpos monoclonales: Desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, *10*(3), 186-197.

OMS. (2022, abril 6). *Paludismo*. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/malaria>

O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors—Redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nri3446>

Patarroyo, M. E., Bermúdez, A., & Patarroyo, M. A. (2011). Structural and Immunological Principles Leading to Chemically Synthesized, Multiantigenic, Multistage, Minimal Subunit-Based Vaccine Development. *Chemical Reviews*, *111*(5), 3459-3507. <https://doi.org/10.1021/cr100223m>

PATH. (2015, noviembre 19). *Malaria parasite life cycle*. PATH's Malaria Vaccine Initiative. <https://www.malaria-vaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development/life-cycle-malaria-parasite>

Posner, J., Barrington, P., Brier, T., & Datta-Mannan, A. (2019). Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *260*, 81-141. https://doi.org/10.1007/164_2019_323

Riccio, E. K., Pratt-Riccio, L. R., Bianco-Júnior, C., Sanchez, V., Totino, P. R., Carvalho, L. J., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2015). Molecular and immunological tools for the evaluation of the cellular immune response in the neotropical monkey *Saimiri sciureus*, a non-human primate model for malaria research. *Malaria Journal*, *14*(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0688-1>

- Rieckmann, K. H., Mrema, J. E. K., & Marshal, P. H. (1981). LA CRIA DE LOS MONOS AOTUS PARA LAS INVESTIGACIONES SOBRE LA MALARIA EN EL HOMBRE'. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/16042>
- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., & Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12179-12184. <https://doi.org/10.1073/pnas.182199699>
- Rojas, E. (2017). *Inmunología. (De memoria)* (4.^a ed.). Medica Panamericana.
- Soulard, V., Bosson-Vanga, H., Lorthiois, A., Roucher, C., Franetich, J.-F., Zanghi, G., Bordessoulles, M., Tefit, M., Thellier, M., Morosan, S., Le Naour, G., Capron, F., Suemizu, H., Snounou, G., Moreno-Sabater, A., & Mazier, D. (2015). Plasmodium falciparum full life cycle and Plasmodium ovale liver stages in humanized mice. *Nature Communications*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms8690>
- Sugita, M., van Der Wel, N., Rogers, R. A., Peters, P. J., & Brenner, M. B. (2000). CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8445-8450. <https://doi.org/10.1073/pnas.150236797>
- Talapko, J., Škrlec, I., Alebić, T., Jukić, M., & Včev, A. (2019). Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*, 7(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060179>
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>
- Vanhooren, V., & Libert, C. (2013). The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>

- Vuk, I., Rajic, Z., & Zorc, B. (2008). Malaria and antimalarial drugs. *FARMACEUTSKI GLASNIK*, 64(2), 51.
- WHO. (2017, abril). *Dengue and severe dengue*. World Health Organization (WHO); World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Documento realizado por: Alicia Romero

Modificado por: Diana Martínez Pachón

Actualizado por: Alejandra Baena

2021-II