

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOZCAN
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE MEMORIA EN *Aotus* spp.**

JENNER RODRIGO CUBIDES AMÉZQUITA

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2019**

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOZCAN
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE MEMORIA EN *Aotus*.**

JENNER RODRIGO CUBIDES AMÉZQUITA

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
para optar al título de**

MAGÍSTER EN GENÉTICA HUMANA

**DIRECTORA
DIANA DÍAZ ARÉVALO PhD.**

**CO-DIRECTOR
MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ M.D., Dr.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2019**

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo general	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4	FORMULACIÓN DE HIPOTESIS	16
4.1	Hipótesis	16
5	MARCO TEORICO.....	17
5.1	Epidemiología de la malaria	17
5.2	Modelo de primates no humanos	19
5.2.1	Ventajas del uso de los modelos de primates no humanos sobre el modelo de ratón para el estudio de la biología del parásito	22
5.3	Producción de anticuerpos monoclonales	24
5.3.1	Clonaje y producción de hibridomas	26
5.4	Marcadores de Memoria Inmunológica.....	31
5.5	Predicciones <i>in silico</i> de epítopes.....	39
6	MÉTODOS Y RESULTADOS.....	44
6.1	Objetivo 1: “Predecir <i>in silico</i> epítopes B de las proteínas para diferenciar poblaciones de células T y B de memoria en <i>Aotus spp.</i> ”	44
6.1.1	Predicción <i>in silico</i> de las secuencias de los péptidos	44
6.2	Objetivo 2: “Determinar la capacidad inmunogénica de los péptidos seleccionados”	51
6.2.1	Síntesis de las secuencias peptídicas.....	51
6.2.2	Acople de los péptidos a las proteínas “Carrier”.	52
6.2.3	Protocolo de Inmunización de los ratones	52
6.2.4	Valoración de la Inmunogenicidad	53
6.3	Objetivo 3: “Producir anticuerpos monoclonales que reconozcan las células de memoria de <i>Aotus spp.</i> ”	56
6.3.1	Producción de Anticuerpos Monoclonales (mAbs)	56

6.3.2 Marcaje y determinación de las concentraciones óptimas de los anticuerpos Monoclonales	60
6.4 Objetivo 4: Determinar la reactogenicidad de los anticuerpos monoclonales producidos	64
6.4.1 Reactividad de los anticuerpos producidos contra las proteínas de Aotus spp. y de humano.	64
6.4.2 Identificación de la proteína de interés reconocida por el anticuerpo monoclonal.	66
6.5 Consideraciones éticas	69
7 DISCUSIÓN	70
8 CONCLUSIONES.....	73
9 PERSPECTIVAS.....	74
10 AGRADECIMIENTOS.....	75
11 BIBLIOGRAFÍA.....	76
12 ANEXOS	85
Anexo 1 : Comité de ética.....	85
Anexo 2: Propuesta de artículo para sometimiento a la revista.....	86

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Técnica de dilución límite.	27
Figura 2: Esquema de la técnica de la clonación por hibridoma.	29
Figura 3: Esquema de activación de las células B en el nódulo linfático.....	32
Figura 4: Reconocimiento de epítopes lineares y conformacionales	41
Figura 5: Predicción de la topología de la proteína CD45RO.	46
Figura 6: Predicción de epítopes B.....	47
Figura 7: Alineamiento de CD27.....	48
Figura 8: Alineamiento de CD4.	49
Figura 9: Alineamiento de CD19.....	49
Figura 10: Alineamiento de CD45RO.	50
Figura 11: Protocolo de inmunización.	53
Figura 12: Resultados por ELISAS de la reactividad a la inmunización.	55
Figura 13 : Resultados por Citometría de flujo de la reactividad a la inmunización.....	55
Figura 14: Fusión de los hibridomas.....	57
Figura 15: Identificación de Clonos.	57
Figura 16: Evaluación de la reactividad inicial de los monoclonales.	59
Figura 17: Evaluación de la reactividad de los monoclonales producidos con anticuerpos comerciales	60
Figura 18: Marcaje de anticuerpos monoclonales producidos	61
Figura 19: Utilización de anticuerpos monoclonales comerciales como controles.	62
Figura 20: Concentración óptima para CD45.....	62
Figura 21: Concentración óptima para CD19.....	62
Figura 22: Doble marcaje de anticuerpo en células de <i>Aotus</i>	63
Figura 23: Confirmación indirecta de la reactividad del anticuerpo monoclonal en el reconocimiento de los marcadores celulares.....	65
Figura 24: Esquema completo para la obtención de la banda por inmunoprecipitación en gel.	66
Figura 25: Obtención de las proteínas de interés por IP.....	67

Figura 26: Obtención de otras proteínas de interés para confirmar reconocimiento de los anticuerpos.....	68
Figura 27: Resultado predicción por Espectrometría de masas.....	69

INDICE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de epítopes predichos y seleccionados por cada proteína. 50

Tabla 2: Secuencia de péptidos sintetizados por cada proteína. 52

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 : Comité de ética.....	85
Anexo 2: Propuesta de artículo para sometimiento a la revista.....	86

1 INTRODUCCIÓN

La malaria es responsable de una alta morbimortalidad y es una carga socioeconómica para cerca de 100 países a nivel del mundial, en donde a pesar de los esfuerzos de los sistemas de salud, la enfermedad continúa cobrando millones de vidas. Pese a la gran cantidad de información disponible acerca del ciclo biológico del parásito de la malaria y de su interacción con el hospedero, a la fecha la infección no ha podido ser controlada. Aunque actualmente se están estudiando varios candidatos a vacuna siendo el más avanzado la RTS,S (vacuna basada en una proteína recombinante de circumsporozoito de *Plasmodium falciparum*), al realizar el seguimiento a los niños vacunados con dicho candidato, 7 años después de la inmunización, se encontró que la eficacia de la vacuna bajó a un 4,4%, con 16,6% de eficacia contra todos los episodios de malaria clínica en sitios de baja exposición al parásito y mostró una reducción a -2,4% en regiones de alta exposición, por lo que no ha mostrado la efectividad requerida a largo plazo (Gosling & von Seidlein, 2016). Una de las dificultades que se mencionan en el desarrollo de vacunas o candidatos a vacunas es la caracterización de la respuesta inmune debido a la falta de un modelo animal adecuado, que reproduzca de manera exacta las características de la enfermedad en humanos y que permita dilucidar de manera precisa los mecanismos de invasión y las dianas del parásito malárico que reconoce el sistema inmune. Además, para los modelos animales que actualmente se trabajan, no están completamente claros todos los elementos de la respuesta inmune protectora (Hviid & Barfod, 2008). En malaria, los modelos animales han contribuido de manera importante al entendimiento de las interacciones patógeno-hospedero y de la respuesta inmunológica, así como en el desarrollo de fármacos antimaláricos y candidatos a vacunas. Los modelos primates no humanos han sido propuestos como modelos preclínicos robustos, dado que comparten muchos de los patógenos que afectan al humano, lo mismo que debido a su cercanía filogenética; de este último apartado en particular, podemos citar cómo algunos parásitos de simios están

cercanamente relacionados a los que infectan humanos, compartiendo un ancestro común, además de mostrar signos anatomopatológicos similares a los que presentan los humanos infectados (Beignon, Le Grand, & Chapon, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Identificar células T y B de memoria de monos *Aotus* spp. mediante la generación de anticuerpos monoclonales.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Predecir *in silico* epítopes B de las proteínas para diferenciar poblaciones de células T y B de memoria en *Aotus* spp.

2.2.2. Determinar la capacidad inmunogénica de los péptidos seleccionados.

2.2.3. Producir anticuerpos monoclonales que reconozcan las células de memoria de *Aotus* spp.

2.2.4. Determinar la reactogenicidad de los anticuerpos monoclonales producidos.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las vacunas han probado ser la medida de control más costo-efectiva para las enfermedades de tipo transmisibles; en este sentido, se ha demostrado que la malaria puede prevenirse mediante vacunación. La necesidad del desarrollo de una vacuna que sea altamente efectiva contra la malaria es una prioridad, debido a la alta incidencia de morbimortalidad por la enfermedad causada principalmente por *P. falciparum* en infantes y mujeres embarazadas en áreas endémicas de África, siendo también población de riesgo los turistas, el personal militar y los trabajadores que migran a áreas endémicas de malaria (Herrera, Perlaza, & Bonelo, 2002). A pesar de que los modelos primates no humanos ofrecen muchas ventajas en el estudio de la malaria, una importante limitante es la falta de reactivos específicos y herramientas inmunológicas para la evaluación de la respuesta inmune del primate, aunque en algunos casos, se pueden usar reactivos desarrollados para la identificación de marcadores de células humanas, no obstante, la sensibilidad suele ser baja. Aunque, como ya se ha mencionado, los modelos de primates no humanos han sido ampliamente usados, solo unos pocos estudios tendientes a cuantificar la magnitud de la respuesta inmune han sido desarrollados, donde algunos investigadores se han esforzado en la secuenciación de los genes individuales de las citoquinas, mientras otros han desarrollado herramientas moleculares para la medición de la expresión del ARN mensajero de interleuquina-2, interleuquina-5, interleuquina-6, interleuquina-10, interleuquina-12, factor de necrosis tumoral e interferón gamma (Riccio et al., 2015). En este sentido, la situación con el modelo de *Aotus* spp. en investigación en malaria no es diferente, siendo un modelo ideal en la reproducción de la parasitemia, así como su similitud con el sistema inmune del humano y la posibilidad de adaptarse a los ambientes de laboratorio por su tamaño y reproducibilidad de la enfermedad. Se han realizado esfuerzos para determinar la reactividad cruzada de anticuerpos anti-

humano frente a proteínas de *Aotus* spp., así como para la caracterización molecular de componentes de la respuesta inmune efectora. Es así como, por ejemplo, anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas marcados, han sido usados para evaluar la respuesta inmune humoral de monos inmunizados (Daubenberger, Spirig, Patarroyo, & Pluschke, 2007). Aunque, las inmunoglobulinas anti-*Aotus* pueden ser fáciles de producir en otras especies (como por ejemplo en murinos y conejos), los reactivos para los isotipos de IgG de *Aotus* no están comercialmente disponibles, existiendo menor disponibilidad de información acerca de la respuesta inmune celular en el modelo de monos *Aotus* spp. A la fecha, lo que más se acerca a la aproximación requerida, es la producción de algunos reactivos probados en otros modelos primates no humanos como son el chimpancé, *macaque rhesus* y los monos *squirrel* (Herrera et al., 2002).

La inmunidad de tipo protectora en el desarrollo de vacunas, usualmente depende de la selección de una formulación de proteínas, que podrían inducir reacciones alérgicas y respuestas reactogénicas, por lo que se enfatiza en la eliminación de estas fórmulas complejas en candidatos a vacunas (Kumai, Kobayashi, Harabuchi, & Celis, 2017). Esta condición ha llevado al uso de subunidades de proteínas o un grupo selecto de las mismas en el desarrollo de formulaciones que induzcan a una inmunidad adecuada. Ese tipo de raciocinio asociado al hecho que estas subunidades de proteínas están acompañadas de cientos de epítopes antigénicos ha creado un interés por el desarrollo de “vacunas peptídicas”, las cuales se diseñan solo con los epítopes capaces de inducir una respuesta deseable tanto celular como humoral. El desarrollo de vacunas peptídicas es generalmente considerada segura y costo-efectiva cuando se comparan con las vacunas convencionales (Li, Joshi, Singhanian, Ramsey, & Murthy, 2014). El desarrollo de una segunda generación de estas vacunas peptídicas, ha llevado al uso de múltiples péptidos antigénicos (MAPs), que se fundamenta en el uso de constructos sintéticos como matriz, que son usados por los grupos aminos de la lisina en la formación de estructuras adyacentes, donde pueden ser sintetizados los epítopes que acompañan a la subunidad proteica (Nardin et al., 2002).

Durante los últimos años, el grupo de investigaciones de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), con el fin de contribuir en el mejoramiento y disminución de la brecha en el desarrollo de vacunas, se ha enfocado en la producción de una segunda generación de vacuna frente a *P. falciparum* con el fin de prevenir el desarrollo de malaria (Patarroyo, Patarroyo, Pabón, Curtidor, & Poloche, 2015). Uno de los principales cuellos de botella en la caracterización fina de la respuesta inmunológica generada ante la vacunación, ha sido la falta de reactivos específicos que permitan el seguimiento de las células de memoria de *Aotus spp.*, ya sea infectados con el parásito productor de la enfermedad o inmunizados con el candidato a vacuna sintética. Uno de estos reactivos son los anticuerpos monoclonales que reconozcan marcadores sugestivos de respuesta inmunológica duradera, es por esto que en este trabajo se propone la elaboración de anticuerpos monoclonales que nos permitan evaluar la respuesta inmune a largo plazo de las células T y B de memoria en monos *Aotus spp.* posterior a la inmunización de este modelo con candidatos a vacunas contra la malaria.

4 FORMULACIÓN DE HIPOTESIS

4.1 Hipótesis

Los anticuerpos monoclonales anti-CD19, anti-CD27, anti-CD45 y anti-CD4 de *Aotus* spp. producidos, reconocen linfocitos T y B de memoria, además de presentar reactividad cruzada con dichas moléculas en humanos.

5 MARCO TEORICO

5.1 Epidemiología de la malaria

La malaria o paludismo es el mayor problema de salud pública en países en vías de desarrollo y se ubica como la primera enfermedad tropical priorizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que causa un sinnúmero de muertes en menores de 5 años, mujeres embarazadas, inmigrantes y viajeros no inmunes (Menezes et al., 2012). El agente causal de la enfermedad es el parásito protista del género *Plasmodium*, el cual tiene un ciclo de vida complejo, que incluye hospederos tanto vertebrados como invertebrados. Es transmitido por la picadura del mosquito hembra infectado del género *Anopheles*. Se conocen 5 especies del parásito que causan la infección en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. Después de infectar a los mamíferos susceptibles, se desarrolla silenciosamente en el hígado y posteriormente ingresa al torrente sanguíneo, causando los síntomas clínicos y la fisiopatología asociados con la enfermedad (Joyner, Barnwell, & Galinski, 2015). El ciclo de vida del *Plasmodium* consiste en un estadio extra-eritrocítico (asintomático) y otro intra-eritrocítico (sintomático).

En el 2017, se estimaron 219 millones de casos de paludismo en todo el mundo, de los cuales la mayoría se registraron en el continente africano (con 200 millones de casos, que corresponden al 92%), seguido por la región de Asia sudoriental (con el 5% de los casos) y la región del mediterráneo oriental (con el 2% de los casos). Quince países del África subsahariana y la India soportan casi el 80% de la carga mundial de la enfermedad (World Health Organization, 2018). Casi la mitad de los casos de malaria en todo el mundo se encuentran concentrados en cinco países: Nigeria (25%), República democrática del Congo (11%), Mozambique (5%), India (4%) y Uganda (4%). Entre 2010 y 2017, todas las regiones con vigilancia epidemiológica por la OMS

registraron poco progreso en la disminución de los casos o, por el contrario, un aumento en la tasa de incidencia, excepto de la región de Asia Sudoriental, en donde se vio disminuir la tasa de incidencia de 17 casos de la enfermedad por cada 1.000 personas en riesgo en el 2010, a 7 en el 2017 (Manego et al., 2017). En la región de las Américas, según la OMS se observó un aumento de los casos, en gran parte debido al aumento en la transmisión de la malaria en Brasil, Nicaragua y Venezuela. En África, *P. falciparum* es el parásito causante de la malaria más prevalente representando el 99,7% de los casos estimados en el 2017, así como en las regiones del sudeste asiático (62,8%), mediterráneo oriental (69%) y el pacífico occidental (71,9%). Entre tanto, *P. vivax* es el parásito predominante en la región de las Américas, representando el 74% de los casos de malaria. En 2017, se presentó un estimado de 435.000 muertes por malaria en todo el mundo. Los niños menores de cinco años son el grupo más vulnerable a la malaria, representando para 2017, el 61% de todas las muertes por malaria globalmente (266.000 casos). En relación con la mortalidad, todas las regiones excepto las Américas, registraron reducciones en el 2017 en comparación al 2010 (Amek et al., 2018).

Dentro de las medidas de prevención en salud para combatir la malaria entre el 2015 y el 2017, un total de 624 millones de mosquiteros tratados con insecticida fueron reportados por los fabricantes como entregados a nivel mundial. La mayoría fueron destinados para la región del África subsahariana, de los cuales el 85% se distribuyeron a través de campañas gratuitas de distribución masiva, el 8% en instalaciones de atención prenatal y el 4% como parte de programas de inmunización. Menos personas en riesgo de contraer malaria están siendo protegidas por el rociado residual intra-domiciliario, que es un método de prevención que consiste en rociar paredes internas de vivienda con insecticida. Para proteger a mujeres embarazadas en áreas de alta a moderada transmisión en África, la OMS recomienda el “tratamiento preventivo intermitente en el embarazo” con el medicamento antimalárico sulfadoxina-pirimetamina; presentando en el 2017, 15,7 millones de niños protegidos contra la enfermedad, en 12 países de la región del Sahara en África. Para 2017 se estimó que 276 millones de pruebas para diagnóstico rápido se vendieron a nivel mundial. En el África subsahariana las pruebas rápidas de detección se están convirtiendo en el

método más utilizado para diagnosticar malaria entre pacientes con sospecha de malaria en los centros de salud pública (World Health Organization, 2018).

5.2 Modelo de primates no humanos

Los parásitos de la malaria infectan a una gran variedad de vertebrados incluyendo reptiles, aves, roedores, primates no humanos y humanos. En cuanto a su biología, inmunología y respuesta quimioterapéutica, los hospederos más comúnmente estudiados son los roedores y los primates no humanos (Doolan & Beier, 2002). Los modelos de primates no humanos han sido instrumentalizados para investigación en malaria por décadas, buscando comprender los procesos básicos de la biología y patogénesis de la malaria en investigaciones preclínicas orientadas al desarrollo de nuevas intervenciones. La identificación de las formas de hipnozoítos en el hígado fue inicialmente descubierta en macacos Rhesus (*Macacca mulatta*) experimentalmente infectados con *P. cynomolgi* y posteriormente, en chimpancés infectados con *P. vivax* (Joyner et al., 2015). El ciclo de vida y en general la morfología de los parásitos de la malaria en los primates no humanos son muy parecidos a los parásitos relacionados con humanos. El ciclo de vida del parasito en el primate comienza cuando el mosquito inyecta los esporozoitos en la célula huésped del primate y en un periodo posterior a los 5 a 15 días se presenta la infección de los eritrocitos. El periodo pre-eritrocítico permanece aún en misterio, sin embargo, se ha demostrado que la fase exoeritrocítica de merogonia en *P. cynomolgi* ocurre en el hígado de los monos *Macaca mulatta*. De este descubrimiento siguió el de las formas similares que fueron producidos por los parásitos que infectan a humanos (*P. vivax*) (Shinta, 2012). Los esporozoitos entran al torrente sanguíneo al mismo tiempo que es alimentado y conducido por la sangre al hígado en donde entran a las células parenquimatosas, lugar donde el parasito crece en los hepatocitos adquiriendo formas ovales, redondeadas y lobulares. Las formas exoeritrocíticas son distinguibles dependiendo el tipo de parasito (*P. cynomolgi*, *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. simiovale*, *P. fieldi*, *P. inui*, *P. coatneyi*, *P. fragile*). Tres tipos de organelos apicales están involucrados en la invasión llamados rhoptria,

micronemas y gránulos densos. Después del ingreso a la célula huésped el merozoito es localizado dentro de la vacuola parasitófora. Una vez el merozoito infecta la célula hospedera se desarrolla tomando la forma de trofozoito joven uninuclear con retículo endoplásmico, ribosomas, vacuolas alimenticias y cuerpos mitocondriales. En la fase de merogonia se presenta los mayores eventos de división nuclear y diferenciación de los organelos citoplasmáticos. En monos *Rhesus* infectados con *P. coatneyi*, eritrocitos parasitados son secuestrados en varios órganos como corazón, cerebro, riñón, pulmón, tracto gastrointestinal y páncreas lo que permite su uso en el estudio de los fenómenos que ocurren en humanos infectados con *P. falciparum*. El ciclo de esporogonia de los primates infectados con malaria es muy similar al de la malaria en humanos. El tiempo requerido para completar el ciclo de esporogonia varía de especie a especie, lo mismo que en el tamaño de los ooquistes (Nunn, Altizer, & Altizer, 2006). Para muchas enfermedades infecciosas, el modelo primate no humano es la única especie de animal susceptible a los agentes infecciosos que padece la población humana, lo que hace que los candidatos a vacuna solo puedan ser evaluados en dicho modelo experimental. La escogencia del modelo primate no humano depende de la naturaleza del patógeno que se quiera trabajar (Ricchio et al., 2015). Parásitos del género *Plasmodium* han mostrado una gran facilidad de “saltar” desde el modelo de primates no humanos a humanos y viceversa, hecho que es demostrado en estudios por Otto Thomas y cols en 2014, en donde exploraron las bases genómicas del *P. falciparum* adaptadas a las células en humanos mediante la secuenciación del genoma completo y las comparan con la de parásitos cercanamente relacionados en chimpancés (*P. reichenowi*), obteniendo secuencias similares del parásito que afecta al chimpancé (*P. gaboni*) (Beignon et al., 2014). La adaptación de *Plasmodium* spp. a los primates del nuevo mundo ha permitido obtener nuevos modelos experimentales para varios de los parásitos productores de malaria en humanos, como lo son *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*; estas especies han podido adaptarse a primates de los géneros *Aotus* y *Saimiri*. A través del paso de las cepas de parásito en estos monos, las especies pueden ser seleccionadas para producir parasitemias altas en sus formas asexuales y gametocitos infectivos. De otra parte, debido al fenómeno de reactividad cruzada que se presenta entre las cepas en humanos y las propias de los

primates no humanos, en algunas ocasiones debido a esa reactividad, se puede presentar mecanismo de respuesta inmune que no permite el desarrollo de la enfermedad o parasitemias demasiado bajas. Los monos del nuevo mundo ofrecen una excelente oportunidad para el estudio de los procesos inmunológicos básicos que ocurren posteriormente a la inmunización e infección con cepas de *Plasmodium* que infectan al humano. El modelo de primates no humanos es esencial para la determinación de la respuesta inmune protectora de tipo innata, además de las implicaciones para el uso en el campo de la inmunización con vacunas (Lanka et al., 1988).

Los primates que existen actualmente son clasificados dentro de dos grandes grupos: los del nuevo mundo (*Platyrrhini*) y los del viejo mundo (*Catarrhini*). Los monos *Aotus*, pertenecientes al nuevo mundo, siendo animales pequeños, monógamos, que se distribuyen a lo largo de todo el continente suramericano, cuyo peso estimado alcanza alrededor del 1 kilogramo y con una envergadura de 35 cm de largo. Las especies pertenecientes a este género son frugívoras, consumiendo también insectos y hojas; sus hábitos de alimentación son primordialmente nocturnos (Daubenberger et al., 2007). Con respecto a los primates del viejo mundo, estos poseen características diversas cuyos tamaños oscilan dependiendo de la especie en medianos como los arbóreos monos *C. colobus* hasta de gran tamaño como las formas terrestres de los babuinos. Los de tamaño pequeño como el *C. talapoin* poseen una altura de 34 a 37 cm de longitud y peso entre 0,7 y 1.3 kg, mientras que el más grande de los primates como el *madrill* mide alrededor de 70 cm de altura y pesa hasta 50 kg. La mayoría de los monos del viejo mundo tienen colas (Familia “tailed ape”); de las cuales la mayoría no son prensiles a diferencia de los monos del nuevo mundo. La distinción entre catirinos y platirinos depende de la estructura del rhinarium del macizo facial y la forma de la dentición (Fleagle, 2013).

El origen de *P. falciparum* fue recientemente determinado y se sabe que los simios africanos de la región subsahariana como gorilas, bonobos y chimpancés son el reservorio del parásito (Oboh et al., 2018). En el caso de *P. vivax* y *P. malariae*, estas especies de parásito están estrechamente relacionadas con *P. simium* y *P. brasilianum*, respectivamente, las cuales infectan primates neo-tropicales (Costa et al.,

2015). El mecanismo de cambio de hospedero desde los primates del nuevo mundo al humano (zoonosis) o viceversa (antroponosis) todavía no ha sido completamente determinado (Beignon et al., 2014).

Cabe mencionar que algunos monos del nuevo mundo son susceptibles a la infección por *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*. Actualmente, se sabe que especies de *Plasmodium* de simios (además de *P. knowlesi*), infectan naturalmente humanos, aunque de manera muy esporádica, como *P. simium* y *P. brasilianum* en Suramérica (Tazi & Ayala, 2011), y *P. cynomolgi* en Asia (Imwong et al., 2019). Debido a esta relación cercana entre los primates no humanos y los humanos como hospederos, así como entre las especies de *Plasmodium* que infectan simios y humanos, los primates no humanos se convierten en una opción ideal para el estudio de la malaria en el desarrollo de la investigación biomédica (Beignon et al., 2014).

5.2.1 Ventajas del uso de los modelos de primates no humanos sobre el modelo de ratón para el estudio de la biología del parásito

El modelo de primates no humanos a pesar de una excelente alternativa, no es ampliamente utilizado ya que sólo puede implementarse en regiones geográficas específicas, además de los requerimientos éticos cada vez más rigurosos, en la medida en que los animales se van acercando evolutivamente a los humanos. Este modelo requiere de un trabajo colaborativo entre veterinarios, investigadores en malaria y personal entrenado para su cuidado, además de contar con locaciones de seguridad especial en bioterios tipo BSL2 o BSL3 (para manipulación de microorganismos infecciosos de riesgo individual moderado y riesgo poblacional bajo), en donde preferiblemente se tenga la disponibilidad de los mosquitos que transmitan la infección en humanos. De acuerdo con la escala de tiempo molecular en la evolución de los vertebrados, el ratón y el humano están separados por 40 millones de años. En este periodo de tiempo, sus sistemas inmunes han sido sujetos de muy variadas presiones de selección, que han generado adaptaciones divergentes frente a patógenos diferentes. El género *Macaca* spp. está más cercanamente relacionado con el humano, datando el más reciente ancestro común en 25 millones de años. La

proximidad filogenética de humanos y primates no humanos está asociada con subgrupos de células dendríticas comparables y similitudes en los patrones de reconocimiento en receptores que son muy importantes en el estudio de la inmunología y en el desarrollo de candidatos de vacuna (Loré, 2004).

El estudio *in vivo* de los estadios hepáticos del parásito productor de la malaria en humanos por condiciones de tipo ético es casi imposible, mientras que, en modelos primates no humanos permite el acceso a los estadios asintomáticos, incluyendo el paso de los esporozoítos desde la piel hasta el hígado, así como el estudio de los hipnozoítos (formas hepáticas durmientes de *P. vivax* y *P. cynomolgi*). Además, se ha demostrado en estudios recientes que varios genes se han mantenido conservados en varios de los parásitos que infectan primates (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*), pero están ausentes en los parásitos que afectan al ratón (*P. yoelii* y *P. berghei*) (Beignon et al., 2014).

El desarrollo de una vacuna eficaz y segura contra la malaria, se mantiene como una necesidad urgente para las poblaciones que viven en regiones endémicas de malaria. El mono *Aotus nancymae* es uno de los pocos hospederos de las formas sanguíneas asexuales de los dos grandes grupos de parásitos que afectan al humano (*P. falciparum* y *P. vivax*, lo que permite estudiar todas las formas del parásito inclusive las de hipnozoítos para el caso de *P. vivax*). Se han propuesto muchas ventajas en el estudio de candidatos a vacunas en modelos primates no humanos, entre las cuales se encuentra la alta correlación en la eficacia protectora obtenida, cuando los estudios de inmunización se hacen inicialmente en primates, con los que luego se obtienen al vacunar humanos con el mismo inmunógeno (Patarroyo et al., 1988, Patarroyo et al., 1988). Un sólido conocimiento y herramientas suficientes para la investigación del sistema inmune de estos modelos animales es necesario con el fin de evaluar la respuesta ante candidatos a vacunas, incluyendo un análisis sistemático del repertorio genético e inmunológico, así como la distribución de varios mediadores y vías metabólicas claves, involucradas en el sistema inmune adaptativo de *A. nancymae* (Daubenberger et al., 2007).

5.3 Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son una herramienta esencial en muchas aplicaciones diagnósticas y de investigación. Adicionalmente, se han convertido en una herramienta terapéutica ideal para muchas enfermedades, incluyendo diferentes cánceres, desórdenes autoinmunes y enfermedades infecciosas (Marasco & Sui, 2007). Muchas tecnologías han sido desarrolladas para la optimización de la producción de estos anticuerpos que, por lo general, son utilizados con fines de investigación (ya que nos permiten la identificación y/o bloqueo de las vías de determinadas proteínas dentro de su función biológica). Entre ellas, se incluyen tecnologías combinadas como “phage display” (consiste en la expresión de polipéptidos exógenos en la superficie de partículas de fagos, los cuales llevan a la selección de los polipéptidos con gran afinidad y especificidad de cualquier tipo de anticuerpo deseado de una librería determinada) “yeast display” (usa la expresión de proteínas recombinantes incorporadas en la pared celular de la levadura para el aislamiento y elaboración de anticuerpos) y el “mammalian cell display” (el cual usa la expresión de proteínas en la superficie de células de mamíferos “*in vivo*” en la obtención de anticuerpos con una alta afinidad) (Sall et al., 2016). El “phage display” se ha empleado con éxito en la selección de grandes repertorios de anticuerpos y el aislamiento de anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno de interés. Las tecnologías de visualización combinada también permiten la maduración de la afinidad *in vitro* de los anticuerpos seleccionados, sin embargo, un inconveniente es que, por lo general, dependen de combinaciones aleatorias y, por lo tanto, lo más probable es que aparezcan segmentos de varias cadenas pesadas y livianas mezcladas (Hoogenboom, 2005).

La metodología tradicional se fundamenta en la obtención de anticuerpos mediante la tecnología de hibridoma, que es basada en la fusión de células de mieloma (tipo de neoplasia de células B de ratón, que le confiere ciertas características como la rápida multiplicación y la inmortalización de la línea celular en condiciones adecuadas), con células B productoras de anticuerpos derivadas de la inmunización de ratones

(Shulman, Wilde, & Köhler, 1978). Mediante procesos de subclonaje, se obtienen híbridos productores de anticuerpos que pueden crecer y producir los anticuerpos deseados. De esta manera, pueden generarse anticuerpos monoclonales contra cualquier tipo de antígeno. Al día de hoy, esta técnica original de producción de los anticuerpos monoclonales (hibridoma) es de gran ayuda, sin embargo, el uso directo de esta tecnología, está limitada para uso terapéutico en humanos, debido a la alta incidencia de respuestas inmunes deletéreas contra los anticuerpos de ratón y la falta de función efectora de los anticuerpos en el reconocimiento o bloqueo de los antígenos de interés debido a las diferencias propias entre los modelos. Para superar estas limitaciones, los anticuerpos murinos han sido modificados por ingeniería genética mediante quimerización (que mediante tecnologías de ADN recombinante y el uso de vectores, se centra en combinar genes que codifican para la región constante de Igs humanas con genes que codifican para la región variable de los ratones, logrando conseguir anticuerpos con una porción humana que se corresponde con la porción constante (Fc) y la porción variable que es animal y la humanización que mediante ingeniería de proteínas transfiere las CDR (región determinante de la complementariedad) de las Inmunoglobulinas del ratón a las regiones variables de la cadena pesada y ligera de las Inmunoglobulinas humanas (Tiller, 2011).

Ante muestras que contengan una gran cantidad de antígenos, los anticuerpos juegan un papel importante no solo *in vivo* sino también *in vitro*, ya que representan elementos de reconocimiento específico en la identificación de proteínas de manera selectiva. Los anticuerpos tienen una variedad de aplicaciones en métodos de laboratorio que van desde la cromatografía y electroforesis, hasta los clásicos métodos de inmunoensayo como el ELISA, dot blot, electroquimioluminiscencia, fluorescencia y técnicas de microscopía. Existe una amplia aplicación de la citometría de flujo, que es un método disponible para la cuantificación de la respuesta inmune asociada a grupos celulares específicos de un grupo poblacional. También, con esta técnica, se puede obtener información a partir de la selección de poblaciones, con múltiples marcadores antigénicos utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos como FITC, PE, PerCP, APC y Pacific blue) (Shukla, Wolfe, Mostafa, & Norman, 2017), (Chan, Badh, Berry, Grauer, & King, 2018).

Algunas propiedades de los anticuerpos como la sensibilidad, la reactividad cruzada y la especificidad son importantes ya que reducen la posibilidad tanto de falsos negativos como falsos positivos en los resultados del reconocimiento del antígeno. La sensibilidad de un inmunoensayo es probablemente el parámetro más importante dependiendo de las características propias del anticuerpo. Una mejor sensibilidad lógicamente es lograda con una mayor afinidad de los anticuerpos. La reactividad cruzada es la interacción entre el paratópe (lugar específico de unión del anticuerpo al epítope de su antígeno) de un anticuerpo y un epítope similar o epítopes idénticos presentados por antígenos diferentes, y esta juega un papel cualitativo en los inmunoensayos. La especificidad, que está en función de la afinidad, así como la reactividad cruzada, es un parámetro importante, ya que, la falta de especificidad puede llevar a resultados como falsos negativos, afectando los rendimientos de los ensayos. El anticuerpo ideal es el que exhibe una reactividad cruzada mínima y una sensibilidad máxima (Pohanka, 2009).

La habilidad de aislar eficientemente los anticuerpos monoclonales antígeno-específicos mediante la técnica del hibridoma, causó un crecimiento exponencial en el entendimiento del anticuerpo que media la inmunidad y ha permitido la generación rápida de nuevas terapias y herramientas diagnósticas ayudadas por los sistemas de reingeniería de las secuencias de los anticuerpos recombinantes a grandes escalas de producción. Pero una de las ventajas de la técnica de producción de anticuerpos monoclonales por hibridoma a diferencia de las nuevas tecnologías, es que, una vez aislado el clon celular específico para la producción del anticuerpo de interés, puede ser usado para producir el anticuerpo directamente y posteriormente, puede ser criopreservado indefinidamente para usos futuros (Carbonetti et al., 2017).

5.3.1 Clonaje y producción de hibridomas

El clonaje (expansión de una población celular a partir de una célula progenitora inicial), es uno de los pasos más importantes en la producción de los anticuerpos monoclonales; esto asegura que las inmunoglobulinas secretadas por el cultivo sean idénticas, ya que toda la población se originó a partir de una sola célula progenitora.

Las condiciones de aislamiento en que debe ocurrir el crecimiento clonal limitan fuertemente la viabilidad celular. Se sabe por ejemplo, que el contacto celular y la transferencia de nutrientes y otros productos son esenciales para una adecuada proliferación de las células en el cultivo (Groth & Scheidegger, 1980). Las células de mieloma de ratón (PAI) empleadas en las fusiones han sido seleccionadas por su alta eficiencia de clonaje y su capacidad para heredar esta característica. La etapa inicial de formación de hibridomas es en sí, un proceso de crecimiento a una muy baja densidad, pues la cantidad de hibridomas en crecimiento por pozo sembrado luego de la fusión oscila entre 1 y 5 habitualmente (en una fusión típica son 110 millones de células fusionadas que se distribuyen en unos 1.000 pozos) y la frecuencia estimada de hibridación exitosa es de 1 por cada 10^4 células fusionadas. Para favorecer la eficacia en el clonaje de los hibridomas, se añaden al medio de cultivo altos porcentajes de suero fetal bovino (15%-20%) y sobrenadantes que sean ricos en factores de crecimiento (Galfre & Milstein, 1981). La técnica usada con el fin de obtener el número de células por pozo deseada es la llamada dilución límite. El principio básico de la misma, es la preparación de diluciones a partir de una suspensión celular inicial, de tal manera que la probabilidad de que dos células caigan en el mismo pozo de una placa de microtitulación al distribuir la misma se haga despreciable (Figura 1). La clonalidad del hibridoma se asegura con dos clonajes sucesivos; la probabilidad final de que existan mezclas de dos hibridomas en una colonia es prácticamente nula.

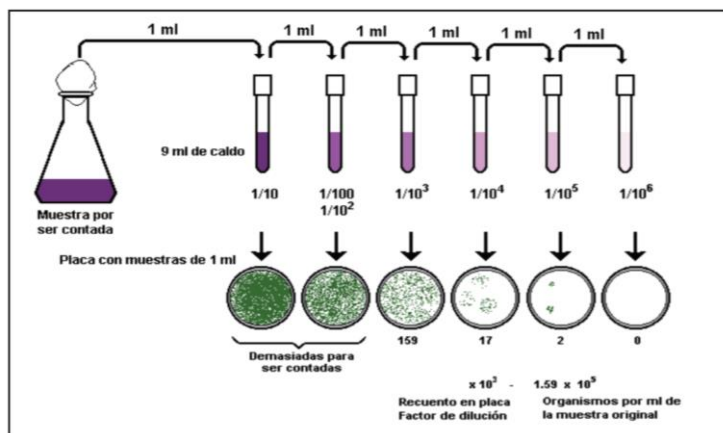


Figura 1: Técnica de dilución límite. Técnica basada en la realización de diluciones sucesivas de una suspensión celular hasta conseguir una alícuota que contenga una sola célula. Técnica usada para la fabricación de anticuerpos monoclonales. (Diagrama tomado de la página web <http://funes.uniandes.edu.co/5065/1/ArrietaUnestudioAlme2009.pdf>).

El paso que asegura el carácter monoespecífico de las inmunoglobulinas secretadas por un cultivo de hibridomas es su clonaje., es decir la creación de una población celular a partir de una célula única inicial. La importancia de este paso es tal que es necesario clonar repetidamente (entre dos y tres veces) un hibridoma, antes de considerar los anticuerpos producidos como monoclonales. El segundo clonaje se inicia de una de las colonias del primero, que fue seleccionado como positiva para el anticuerpo deseado y con características de secreción y crecimiento adecuadas. Los clonajes de hibridomas deben continuarse hasta que más del 90% de todas las colonias ensayadas den resultados positivos en términos del anticuerpo específico. Ello indica que la célula progenitora tuvo un grado de estabilidad aceptable en el tiempo para ese fenotipo. Una vez seleccionado el clono final, la población celular se expande en cultivo y como una forma de preservar una célula primaria lo más cercana al origen, se realiza criopreservación lo antes posible. Esta conservación se realiza por congelación en nitrógeno líquido (Kozbor & Roder, 1983).

Los protocolos usados para la generación del hibridoma son muy variados, pero en general el protocolo básico de la técnica consta de los siguientes pasos:

1. Selección de la cepa y condiciones del ratón a inmunizar.
2. Definición del esquema de inmunización.
3. Desarrollo de un método para el tamizaje de los anticuerpos específicos producidos en el modelo murino.
4. Inmunización, titulación y selección de los animales donantes (esplenectomía)
5. En condiciones estériles, extracción quirúrgica del bazo del animal inmunizado y la recolección de las células esplénicas (o resuspensión de los linfocitos activados *in vitro*) (Figura 2).
6. Resuspensión de las células de mieloma en cultivo y lavado repetido con medios sin aditivos.
7. Mezcla de células esplénicas y de mieloma en proporciones que van desde 1:1 a 10:1. Centrifugación y conformación del "pellet" celular.
8. Separación del pellet y adición lenta del agente que media la fusión (polietilenglicol-PEG) con posterior incubación corta en agitación.

9. Dilución de la mezcla de fusión con medio de cultivo y posterior centrifugación para eliminar el PEG.
10. Resuspensión de la fusión en medio de cultivo completo selectivo (HAT) y distribución en placas de 96 pozos.
11. Tamizaje de los anticuerpos y selección de ellos hibridomas mediante citometría de flujo (para este estudio)
12. Clonación de hibridomas por técnica de dilución límite, retamizaje, ampliación en cultivo de las células híbridas madre.
13. Congelación de los clones seleccionados.

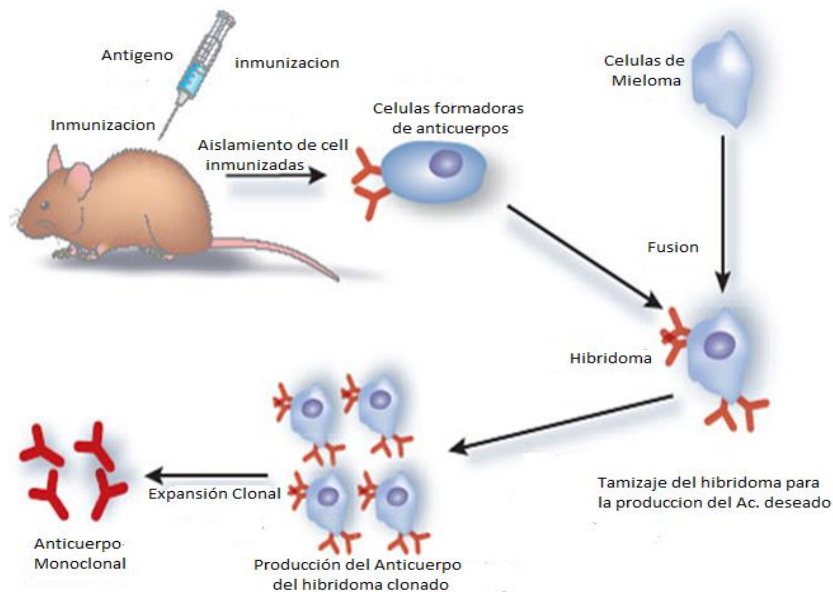


Figura 2: Esquema de la técnica de la clonación por hibridoma. Esquema de la inmunización del modelo murino con el antígeno elegido para producir el anticuerpo de interés. Posterior a ella, se hace la fusión de los esplenocitos productores del anticuerpo con una línea inmortalizada de mieloma de ratón (células PAI) y se realiza el tamizaje del hibridoma productor del anticuerpo deseado para realizar la expansión clonal y recuperar el anticuerpo monoclonal (Diagrama tomado de Michnick W and Sidhu S, 2008).

El agente que media la fusión más usado es el polietilenglicol, cuya característica más importante deber ser el peso molecular entre 1.300 y 4.000 Da; hay que tener en cuenta que en concentraciones por debajo del 30%, la formación de híbridomas es pobre, en tanto que, por encima del 50%, la toxicidad es muy alta, por lo que se recomienda concentraciones entre el 40 y el 50% en un medio de cultivo sin suero

fetal bovino. Se debe tener en cuenta que, aunque el aumento en el tiempo de exposición al PEG aumenta la frecuencia de fusión, también aumenta la toxicidad. El tiempo de exposición al PEG no debe sobrepasar los dos minutos, luego de lo cual se debe proceder a la dilución con medio de cultivo. La agitación durante la exposición es importante para homogenizar su acción e impedir un exceso de toxicidad para la población de células a fusionar. El rendimiento de la fusión es pH dependiente, con un rendimiento mayor a pH alcalino (pH=8) (Kennett & MacKearn, 1982).

El medio selectivo en donde crecen los hibridomas se deriva del sistema desarrollado por Littlefield en los años 60 y se ha denominado HAT, por contar dentro de sus componentes con hipoxantina, aminopterina y timidina (Foung, Sasaki, Grumet, & Engleman, 1982). La hipoxantina y la timidina son precursores de las bases púricas y pirimidínicas, respectivamente, mientras que la aminopterina es un agente bloqueador de la vía anabólica fundamental para guanósina denominada "vía endógena" o "síntesis de *novo*". En las células de los mamíferos existen dos grandes vías para la biosíntesis de las purinas y las pirimidinas, la ya mencionada vía endógena y la vía exógena o de salvación. La vía endógena es utilizada preferentemente por las células, sintetizándose el ADN a partir de los precursores internos; la vía exógena es usada alternativamente, empleándose precursores presentes en el medio extracelular y enzimas celulares específicas como la hipoxantina-guaninafosforibosil transferasa (HGPRT) y la timidina kinasa (TK). Los mielomas empleados para esta técnica son mutantes deficientes para la HGPRT. De esta manera, los mielomas no fusionados son incapaces de sobrevivir en el medio de cultivo HAT, debido a la acción bloqueadora de la aminopterina sobre la síntesis *de novo*. Los híbridos con una adecuada complementación de ambos genomas producen la HGPRT codificada por el linfocito y esto les permite sobrevivir. De otra parte, los linfocitos no fusionados no son capaces de reproducirse en cultivo debido a la ausencia de los factores celulares, que lleven a la supervivencia y proliferación de estas células en el organismo (Gavilondo, 1995).

5.4 Marcadores de Memoria Inmunológica

Las células B de memoria y las células plasmáticas de larga vida son los constituyentes celulares que dan origen a la memoria inmunológica. La génesis de estas poblaciones comienza con el ingreso del antígeno y el reconocimiento e internalización de éste por parte de la célula dendrítica y posterior presentación a las células T y B vírgenes. La interacción de reconocimiento con la ayuda de las células T ayudadoras, más la producción de citoquinas, se traduce en el desarrollo de una respuesta inmune humoral primaria y la activación del centro germinal del órgano linfoide secundario (Figura 3). Factores como la afinidad del antígeno, la dosis del mismo, la calidad de la interacción con la célula T ayudadora y otros determinantes de la inflamación, contribuyen marcadamente a la expansión clonal y la activación de la célula B unida al antígeno, llevando a un fino balance entre la generación de células B de memoria y la diferenciación de células plasmáticas de larga y corta vida. Las células B de memoria y las células plasmáticas de larga vida son el sustento de una protección a largo plazo contra enfermedades infecciosas como la malaria (Wipasa et al., 2010). Las células plasmáticas de larga vida generadas por la exposición inicial al patógeno o a través de vacunación profiláctica, mantienen un amplio nivel de protección con la producción de anticuerpos de alta afinidad que persisten por décadas (Elgueta, Vries, Noelle, & Noelle, 2010).

Al reencontrarse con el patógeno, las células B de memoria responden rápidamente de manera dependiente de CD154 para diferenciarse en células plasmáticas de corta y larga duración, para mejorar los títulos de anticuerpos persistentes (Grammer, Heaney, Lipsky, McFarland, & Darnell, 1999). Aún está sin resolver cómo las células B de memoria y las células plasmáticas del organismo, son efectivas durante períodos de tiempo notablemente largos. En los últimos años, se han realizado grandes avances en la comprensión de los factores de supervivencia que gobiernan la persistencia de las células plasmáticas. La identificación de BAFF (factor activador de células B, perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)) y APRIL (un ligando que induce la proliferación) ha revolucionado el concepto de cómo se mantiene

el linaje B y resolvió los factores esenciales de la supervivencia de la células plasmáticas (Rahman, Rao, Kalled, & Manser, 2003).

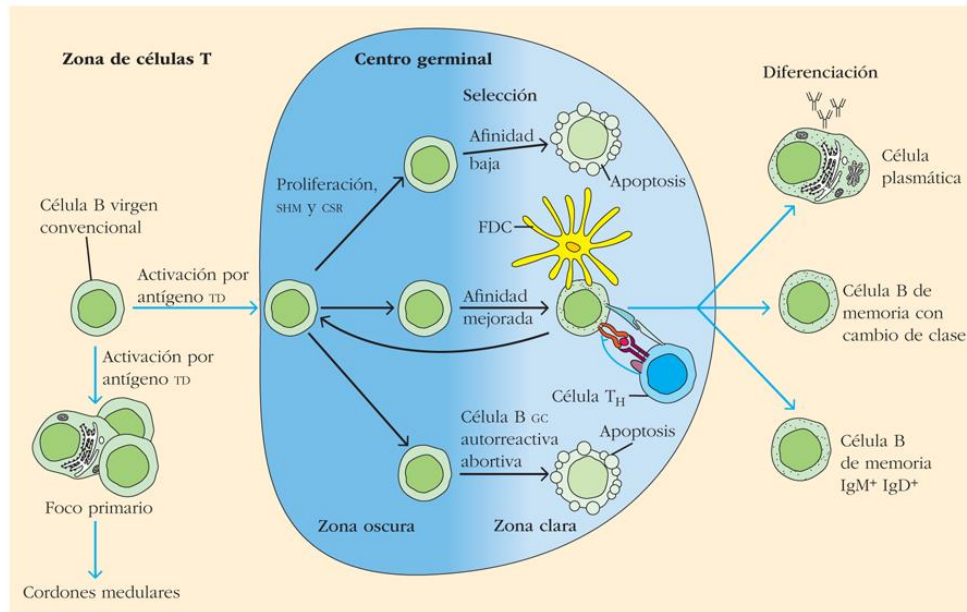


Figura 3: Esquema de activación de las células B en el nódulo linfático. *Proceso de maduración de los linfocitos B que se originan en los cordones medulares de la médula ósea y posteriormente son activados por antígenos en su migración al centro germinal del ganglio linfático (zona oscura). En su proceso de activación migran hacia la zona clara donde se localizan las células dendríticas foliculares, quienes por acción de las células T ayudadoras y factores estimuladores (CD40, IL2) llevan a la diferenciación de la célula B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, células B de memoria con cambio de clase o a apoptosis celular (células auto-reactivas).* (Tomado de Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon Satnford: *Kubi, Immunology*, 7 edición)

El contacto inicial con el antígeno es un paso determinante en la generación de células B de memoria, así como de células plasmáticas (CP) de corta y larga duración. La manera de cómo las células B foliculares vírgenes inicialmente se encuentran con el antígeno se ha dilucidado; es así como ahora se sabe que las células B probablemente se encuentran con el antígeno en una variedad de forma (Becker, Shimabukuro-Vornhagen, Theurich, von Bergwelt-Baildon, & Kondo, 2016). Los antígenos de bajo peso molecular (<70 kDa) se canalizan rápidamente hacia los folículos a través de conductos creados por los fibroblastos reticulares. Alternativamente, los antígenos pequeños pueden ingresar a los folículos a través de pequeños espacios de la membrana basal de los ganglios linfáticos, donde están unidos por células B reactivas al antígeno en el seno subcapsular del ganglio linfático (Pape, Catron, Itano, & Jenkins, 2007).

Una manera de exposición más larga del antígeno puede ser a través de la presentación de antígeno nativo en forma de complejos inmunes o de mayor peso molecular, por parte de las células dendríticas foliculares del nódulo linfóide, los cuales adquieren el antígeno dentro del seno subcapsular. En contraste con el drenaje directo de antígenos, se puede pensar fácilmente que la presentación del antígeno nativo por una línea celular, como los macrófagos del seno subcapsular, implica un papel potencial de muchos coligandos y cofactores que podrían localizarse en la superficie de las células B y alterar la naturaleza de la respuesta de las células B al antígeno. Además de los macrófagos del seno subcapsular, también se ha sugerido que las células dendríticas periféricas transportan antígenos proteicos a órganos linfoides secundarios y desencadenan la activación de células B vírgenes afines, a través de la presentación de antígeno (Guermonprez, Valladeau, Zitvogel, Théry, & Amigorena, 2002). No se sabe cómo el suministro de antígeno por las distintas rutas controla el destino de las células B, sin embargo, lo que se sabe es que las diferencias cuantitativas en el reconocimiento de antígenos entre las células B reactivas al antígeno, es un factor que controla su destino para convertirse en células B de memoria o CP de corta o larga duración. Las células B vírgenes foliculares que expresan el receptor de células B de la línea germinal (BCR) de mayor afinidad, tienen la mayor propensión a diferenciarse a CP de corta duración en el encuentro con antígenos. Las CP de corta duración que se inducen producen predominantemente IgM, con una pequeña subpoblación de CP que producen anticuerpos IgG. Las Ig producidas por las CP de corta duración acumulan mínimas mutaciones somáticas. A pesar de que estas células B se seleccionan de la línea germinal de afinidad más alta que expresa las células B, la afinidad global es muy inferior a la producida en un momento posterior de las células B, que eventualmente ingresarán al centro germinal y mutarán somáticamente en respuesta al antígeno (Pape et al., 2007).

Otro componente limitante de esta respuesta temprana es su duración. La respuesta temprana aparece típicamente 3 a 6 días después de la inmunización y desaparece después de 2 semanas. En el bazo, la magnitud de la respuesta de la CP de corta duración está limitada por los nichos celulares de apoyo que se encuentran en la pulpa roja (Porto, Haberman, Kelsoe, & Shlomchik, 2002). La introducción inicial de antígeno

elimina las células B de afinidad más altas para brindar una respuesta rápida y protectora para el hospedador, lo que deja un repertorio de afinidad más bajo para responder, motivo por el cual la afinidad madura y proporciona inmunidad de larga duración. Es a partir de este repertorio de células B residual que surgen las células B de memoria y las células plasmáticas de larga duración. Estas poblaciones de células B capturan el antígeno, median su procesamiento y presentación, e inician la interacción relacionada con las células T en la periferia del folículo. La inducción de la expansión de las células B transforma el folículo en un centro germinal con un sólido crecimiento y diferenciación de células B dependientes de células T. Se sabe que las respuestas del centro germinal (CG) son bastante permisivas y se originan a partir de varias células B oligoclonales. Estudios demuestran que las células B de baja afinidad pueden formar un centro germinal, es decir, no parece haber un umbral de afinidad para ingresar al centro germinal (Kennett & MacKearn, 1982). Dentro del CG, las células B están sujetas a una selección de afinidad y, en última instancia, sobreviven o no en función de su afinidad intrínseca por el antígeno. Aquellos que demuestren una mayor afinidad en relación con sus contrapartes de menor afinidad se diferenciarán finalmente en células B de memoria y células plasmáticas. Dentro de esta población seleccionada de alta afinidad, la población que presenta mayor afinidad se recluta activamente en el grupo de células plasmáticas, mientras que las células B de memoria normalmente presenta afinidades de moderadas a altas (Gray et al., 1996).

Lo que controla las decisiones sobre el destino de las células B no depende únicamente de la afinidad del BCR. Otros elementos de señalización que controlan el destino de las células B incluyen los receptores del complemento y CD40. En ausencia de CD21/CD35, el umbral de señal BCR para desencadenar la ruta transcripcional de las células plasmáticas probablemente se vea afectado, por lo tanto, incluso una interacción BCR-antígeno de alta afinidad nunca logra una intensidad de señal adecuada en ausencia de CD21/CD35 para impulsar el desarrollo de CP. Si bien la señalización de CD40 es crítica para desencadenar la inmunidad dependiente de células T (TD), la señalización mejorada a través de CD40 puede atenuar la inmunidad de larga duración mediante la inducción de células B específicas de antígeno para

diferenciarse de CP de corta duración a expensas de la formación de los centros germinales y la inducción de células B de memoria. Además de la señalización de CD40, es probable que haya muchos otros factores que impacten la señal acumulativa que detecta la célula B, incluidos BAFF, APRIL, CD19, receptores tipo Toll (TLR), etc., los cuales pueden atenuar o exacerbar la potencia total de la señal a las células B del centro germinal y por lo tanto, influyen en la diferenciación de las células B terminales (Rahman et al., 2003).

Una proteína especialmente expresada en células B desde sus progenitores iniciales en la médula ósea hasta en las células de memoria, con excepción de células plasmáticas formadoras de anticuerpos, es CD19; ésta es una proteína transmembranal de 95-kD perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD19 exhibe una estructura altamente conservada con dos dominios de Ig extracelular y una larga cola intracitoplasmática de 243 aminoácidos con nueve residuos de tirosina como posibles sitios de fosforilación. Las características estructurales contribuyen a su conocida habilidad para regular vías de señalización, tras su hidrólisis, está asociada con proteínas tirosina quinasa como lyn y fyn, activando la vía de señalización de vav/ras/mitógeno proteinquinasa y la vía fosfatidilinositol 3 quinasa con la consecuente movilización de calcio (Xu, Beavitt, Harder, Hibbs, & Tarlinton, 2002). En células B de memoria, CD19 está asociada *in vitro* e *in vivo*, con tres moléculas diferentes que forman un complejo tetramérico: CD21(CR2), CD81 (diana de anticuerpos anti-proliferativos) y leu-13. En linfocitos B maduros, media la agregación homotípica y funciona como un co-estimulador en la maduración de la célula B (Fehr et al., 1998).

Una amplia gama de mediadores (citoquinas, quimiocinas, productos microbianos, etc.) y células (células estromales, osteoblastos, etc.) crean un microambiente en los que residen células B de memoria y células plasmáticas que desempeñan un papel fundamental en su diferenciación, función y supervivencia a largo plazo. La familia TNF es una gran familia de ligandos y receptores que juegan un papel prominente en la regulación de la inflamación. Los miembros de la familia TNFR (receptores de la familia del factor de necrosis tumoral) están involucrados en desencadenar la apoptosis, supervivencia, proliferación y diferenciación de células leucocitarias y no

hematopoyéticas. Las células B expresan muchos miembros de esta familia de receptores, dependiendo de la etapa de desarrollo de las células B. Los TNFR expresados en células B desempeñan un papel crítico en el destino de las células B al controlar el número total de células B inmaduras y diferenciadas, su diferenciación y su distribución. CD27 es un TNFR que se une a CD70 y se expresa en todas las células B activadas por antígeno, pero también en la mayoría de las células B de memoria humanas, aunque no en las células murinas. Debido a su importancia como marcador en células B de memoria en humanos, se ha estudiado la expresión de CD27 en células B murinas. En ratones, CD27 se encuentra en las células B localizadas en el centroblasto, encontrándose predominantemente en las células de los centros germinales y en la zona marginal. Sin embargo, durante la maduración, su expresión se pierde, por lo tanto, CD27 no puede usarse en sistemas murinos como un marcador de células B de memoria. La unión de CD27 con CD70 mejora la generación de células plasmáticas. Además, se ha demostrado que la falta de expresión de CD27 en las células B, altera la formación de CG en las infecciones virales, aunque esto no tiene un impacto significativo en la producción de anticuerpos, la hipermutación somática o el cambio de isotipos (Xiao, Hendriks, Langerak, & Jacobs, 2019). Estudios realizados en ratones con sobreexpresión crónica de CD27, encontraron que la participación de CD27 en las células B puede terminar con las respuestas inmunes humorales (Han, Olsen, & Bottaro, 2019). Estudios más recientes han implicado a CD27 como un factor que funciona con IL-10 para mejorar la generación de CP. Con respecto a la necesidad de la señalización de CD70 para la inmunidad humoral, los anticuerpos de bloqueo contra CD27 *in vitro* no mostraron ningún impacto en la supervivencia o capacidad proliferativa de las células B, pero sí en la progresión a CP (Raman, Bal, & Rath, 2019), lo que sugiere que CD27 está involucrado en la diferenciación terminal a CP. Se ha demostrado que la señalización de CD27 altera la expresión de los miembros de las moléculas de la familia Bcl-2 (proteínas evolutivamente conservadas cuyos miembros promueven o inhiben la apoptosis mediante mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial – MOMP- la cual es un punto de regulación intrínseco de la apoptosis), combinado con cambios en el potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c, fosforilación y translocación nuclear

de p53. Además, algunos autores demostraron que tanto CD40 como CD27 podrían suprimir la apoptosis inducida por el BCR. Aunque parece que la función principal de CD27 involucra la diferenciación terminal de las células B a las CP, podría tener una función adicional, contribuyendo a la supervivencia de las células B por los supresores (Hase et al., 2002).

En la respuesta de tipo celular ante una infección, ambos grupos celulares, linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺, son tanto funcional como fenotípicamente divididos en dos subpoblaciones que se distinguen por la diferenciación en la expresión del isotipo de CD45 en su superficie. Las células de memoria expresan la isoforma de bajo peso molecular RO, la cual después de la primera exposición al antígeno, adquiere el potencial para acelerar la respuesta inmune posterior a una exposición repetitiva (Hotta et al., 2011). Los linfocitos T inmaduros expresan la isoforma de alto peso molecular RA. CD45 se conoce como el antígeno común de los leucocitos y funciona como una tirosina fosfatasa en la señalización de los leucocitos. La expresión de diferentes isoformas de CD45 es específica del tipo celular y depende de la etapa de diferenciación y del estado de activación de las células (Akbar et al., 2017). Las células T de memoria se generan durante las respuestas de inmunidad mediadas por células y sobreviven de muchos meses a años después de que se elimina el antígeno. Estas células T de memoria son responsables de respuestas más rápidas y amplificadas a la segunda y posteriores exposiciones a antígenos. Las células T de memoria tienen un papel crítico en la defensa del hospedero, por ejemplo, en inmunidad tumoral, estudios recientes sobre cáncer colorrectal y gástrico han demostrado que la alta densidad de linfocitos infiltrantes de tumores CD45RO⁺ (TIL) se correlaciona con una mayor supervivencia, y CD45RO⁺ TIL es un factor pronóstico independiente (Pages et al, 2005, 2009; Galon et al, 2006; Lee et al, 2008).

Al convertirse en células de memoria, las células T experimentan etapas de dramática expansión y contracción que dependen de la muerte celular programada y posteriormente, se mantienen por señales de supervivencia de su entorno. La sobrevivencia de las células T durante una respuesta puede ser profundamente afectada por la disponibilidad de moléculas coestimuladoras y citoquinas que modulan la participación en las vías de muerte celular programada. Una vez que la respuesta

disminuye, citoquinas de cadenas gamma, como la interleucina-7 (IL-7) e IL-15, son esenciales para el control homeostático de las células T de memoria (Surh & Sprent, 2008). Sin embargo, como poblaciones móviles predominantes, tanto las células T efectoras como las de memoria tienen la capacidad para recibir señales adicionales a través de interacciones adhesivas con la matriz extracelular (MEC) u otras células (Lesley, Hyman, & Kincade, 1993). CD44 es una molécula de adhesión que se expresa por la mayoría de las células y media la unión a la MEC y otras células a través de su único ligando *in vivo* conocido, el ácido hialurónico glicosaminoglicano. La expresión de CD44 está regulada en células T vírgenes después de la activación a través del receptor de células T (TCR) y su alta expresión es mantenida indefinidamente en las células de memoria (Puré Ellen, 2018). Como consecuencia, una expresión elevada de CD44 es generalmente usada para identificar células T que han experimentado su unión con el antígeno. CD44 está asociado con la migración celular, junto con el ácido hialurónico (HA), ha sido implicado en numerosos procesos biológicos que son regulados por células migratorias. La función de CD44 difiere para diferentes tipos de células y se han descrito roles adicionales en la regulación de la proliferación y en la apoptosis. CD44 es el producto de un único gen que da origen a una familia de moléculas de unión a HA por empalme alternativo del exón (Lynch, 2004). De la forma estándar de CD44, se generan al menos cinco isoformas a través de cambios post-traduccionales de varias combinaciones de 10 exones variables, que se insertan en un solo sitio en la región proximal de la membrana del dominio extracelular. Mientras que CD44 tiene el potencial de participar en varios procesos asociados a las respuestas inmunes, la función fisiológica de CD44 en las células T *in vivo* permanece mal definida. Se ha establecido que las células T se unen a HA, y que la unión de HA o la señalización de TCR puede aumentar la función adhesiva y la expresión de CD44. CD44 junto con VLA-4 (integrina $\alpha 4$) puede regular la migración de células T a sitios de inflamación; la asociación con estos receptores se correlaciona con el aumento de la motilidad de células T y supervivencia después de la estimulación *in vitro* del TCR. La unión de CD44 expresada en células T a HA en la superficie de las células dendríticas (CD) puede promover la expansión clonal de células (Baaten et al., 2010).

La respuesta efectiva de las células B ante las infecciones o inmunizaciones requiere la asistencia de las células T ayudadoras CD4+. Un grupo especializado de células TCD4 llamadas células T ayudadoras foliculares (Tfh) son necesarias para ayudar en la activación de las células B antígeno-específicas. Sin la participación de las células Tfh, las células B son incapaces de generar y mantener la respuesta en los centros germinales que son requeridas para la eficiencia de los genes de las inmunoglobulinas, en el proceso de hipermutación somática y los procesos selectivos que facilitan la afinidad en la maduración de los anticuerpos. De otra parte, la activación del centro germinal da origen de las células B de memoria de larga vida, lo mismo que a las células plasmáticas de larga vida. Por todo lo anterior, las células Tfh juegan un papel fundamental en la generación efectiva de la respuesta inmune humoral de larga vida a diferentes antígenos (Crotty, 2011). Inicialmente, las células T ayudadoras foliculares fueron identificadas como una subpoblación de las células CD4+ aisladas de las amígdalas. Este tipo de células expresan el receptor de quimioquina de células B foliculares (CXCR5) y el coestimulador inducible (ICOS), los cuales promueven eficientemente los cambios de clases de las inmunoglobulinas en particular IgG y IgA. La activación, proliferación y diferenciación de los linajes de CD4 *in vivo* está acompañada de la progresión en la diferenciación de las células de memoria (Hale & Ahmed, 2015).

5.5 Predicciones *in silico* de epítopes

La bioinformática es un campo de la ciencia donde convergen diferentes disciplinas como la biología y las ciencias informáticas y computacionales, así como la tecnología de la información, con el fin de organizar y almacenar una gran cantidad de datos biológicos condicionados por los avances que se originan de otras ramas del saber como la genética, inmunología, biología molecular y biotecnología. El objetivo principal de la bioinformática es conducir e interpretar efectivamente en un corto periodo de tiempo la información que, desde el genoma, transcriptoma, proteoma y demás ciencias “ómicas” se produce. En el desarrollo de herramientas bioinformáticas, es importante el conocimiento de los mecanismos con los que se da una respuesta

inmune generada por el hospedero ante el ataque de un patógeno, además del conocimiento del andamiaje genético del patógeno (Schneider & Orchard, 2011). El desarrollo de bases de datos robustas con herramientas versátiles que permitan curar los datos, son condiciones que conducen a diseñar modelos más seguros, eficaces y menos costosos que las formas tradicionales de la experimentación *in vivo*. Mientras que la posibilidad de secuenciar el genoma completo permite la identificación de todos los potenciales productos proteicos, esta información puede no ser lo suficientemente relevante en la consecución de la identificación del grupo de proteínas que en efecto se expresan en cualquiera de los ciclos de vida de algún tipo de célula o patógeno. La proteómica juega un papel importante en este campo, ya que nos sirve como estrategia complementaria para una aproximación basada en la genómica, mediante la utilización de técnicas inmunológicas para la identificación y caracterización inmunogénica de las proteínas (Soria-guerra, Nieto-gomez, Govea-alonso, & Rosales-mendoza, 2015). De otra parte, la transcriptómica nos permite establecer patrones de regulación génica coordinada lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también identificar elementos promotores comunes a varios genes (Hegde, White, & Debouck, 2003). La inmunoinformática es la disciplina que tiene por objetivo procesar una gran cantidad de datos inmunológicos mediante el uso de aproximaciones matemáticas y computacionales para el entendimiento y organización de una larga escala de datos, con el fin de obtener interpretación de las predicciones inmunológicas. Las herramientas en este campo están basadas en sistemas estadísticos y modelamiento de algoritmos, que son usadas para el estudio de las interacciones moleculares (de cómo se hace la presentación y procesamiento del antígeno), que juega un rol fundamental en la definición de nuevas hipótesis relacionadas con el entendimiento de los mecanismos biológicos del sistema inmune (Tomar & De, 2010).

Los epítopes son una porción o fragmentos de una macromolécula reconocida por el sistema inmune, con un alta especificad de unión a la secuencia a la que se unen a en los anticuerpos (paratopes). Estos epítopes son de particular interés, tanto para investigadores en el área clínica, como en el de ciencias básicas, siendo una fuente de potenciales herramientas en la prevención, diagnóstico y tratamiento de

enfermedades, así como en el desarrollo de candidatos a vacunas. Dentro de la diversidad de epítopes en las proteínas de un patógeno o célula hospedadora, no todos los epítopes, incluso aquellos que parecen ser dominantes, tienen la habilidad para estimular la producción de anticuerpos (Oyarzun & Kobe, 2015). La respuesta inmunológica de tipo humoral (producción de anticuerpos) está dada por el reconocimiento de los epítopes tanto lineales como conformacionales (Figura 4).

Las proteínas que contienen una gran cantidad de epítopes reconocidos por los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) son conocidas como proteínas de uniones promiscuas. El primer paso en la aplicación de las herramientas bioinformáticas para la predicción de epítopes consiste en la discriminación de los epítopes que son potencialmente inmunoprotectores de aquellos que no lo son. Desde que los epítopes se unen de manera lineal a su MHC, esa unión entre el ligando y la célula efectora puede ser modelada y predicha con exactitud. Actualmente se sabe que un epítopo se une al surco del MHC clase I y clase II a través de interacciones de las cadenas laterales de los grupos R y los bolsillos localizados en la base del complejo mayor de histocompatibilidad. Con base en este conocimiento, una larga lista de epítopes son determinados mediante mapas algorítmicos que han sido establecidos y se han usado en el desarrollo de herramientas que, de manera rápida y precisa, identifican los epítopes alternativos en la interacción antígeno-célula efectora (Delisi & Berzofsky, 1985).

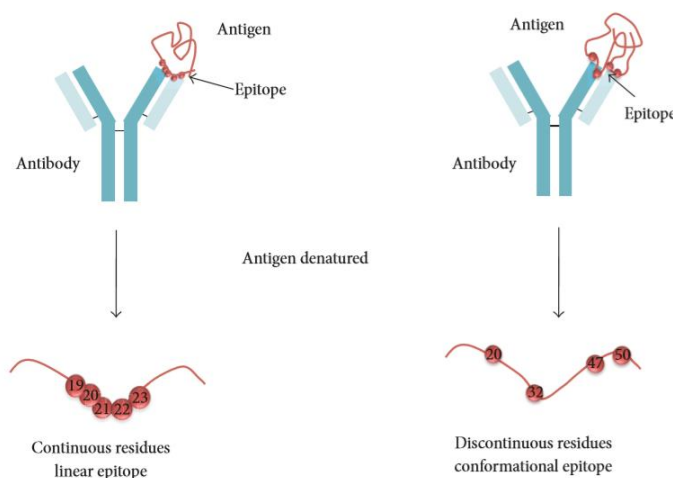


Figura 4: Reconocimiento de epítopes lineales y conformacionales. Representación esquemática de las formas de reconocimiento por parte de los CDR de los anticuerpos de los epítopes lineales y

Las plataformas que se usan en la predicción de epítopes de unión al MHC-I actualmente son muy eficientes y tienen un amplio cubrimiento alélico (capacidad para detectar la proporción observada de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en una población) con una exactitud del 90 al 95% de valores de predicciones positivas estimadas por la herramienta bioinformática. Una gran cantidad de servidores para alelos de MHC-I están incluidos en RENKPEP (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>), el cual predice péptidos de unión a moléculas de MHC-I y MHC-II, lo mismo que permite predecir los ligandos tipo MHC-I con C terminal, que son el resultado del clivaje por parte del proteasoma, para lo cual usan matrices de evaluación de posición específica (PSSMs- Position Specific Scoring Matrices). La plataforma IEDB Analysis Resource (<https://www.iedb.org>), usa NetMHCpan como método de predicción de afinidad de interacción entre cualquier péptido presentado por MHC clase I, cubriendo tanto HLA-A como HLA-B, en humanos, chimpancés, macacos, gorilas, vaca, cerdo y ratón. Esta base de datos constituye una de las pocas que incluyen una amplia diversidad de organismos (Sette & Nielsen, 2012).

Los epítopes B son reconocidos por los receptores de células B o por los anticuerpos en su estructura nativa. La predicción de los epítopes B continuos es similar a la predicción de epítopes T, la cual ha sido principalmente basada en las propiedades de los aminoácidos como la hidrofiliidad, carga, superficie de exposición y estructura secundaria. Los epítopes B discontinuos (los cuales son reconocidos por los anticuerpos como estructura conformacional que es la estructura tridimensional de la proteína) requieren predicciones de la estructura tridimensional del antígeno. Para predecir epítopes B lineales (que es un epítope que es reconocido por el anticuerpo como una secuencia lineal de aminoácidos o en su estructura primaria), BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>) es una herramienta basada en las propiedades fisicoquímicas, como la hidrofiliidad, flexibilidad, polaridad y superficie de exposición, en una base de datos no redundante. Esta herramienta usa una combinación de un modelo estadístico como los modelos ocultos de Markov y el

método de pareamiento por puntaje de propensión (Jespersen, Peters, Nielsen, & Marcatili, 2017). Una de las herramientas más completas en la predicción de epítopes continuos o discontinuos en este campo es ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro>). Este servidor predice epítopes lineales y discontinuos con base en la estructura tridimensional de una proteína antigénica. ElliPro asocia cada predicción de un epítope con un puntaje que es definido como PI. La ventaja de esta plataforma es la predicción de epítopes lineales y discontinuos a partir de una estructura proteica previamente identificada (Erik, Larsen, Lund, & Nielsen, 2006).

6 MÉTODOS Y RESULTADOS

6.1 Objetivo 1: “Predecir *in silico* epítopes B de las proteínas para diferenciar poblaciones de células T y B de memoria en *Aotus spp.*”

6.1.1 Predicción *in silico* de las secuencias de los péptidos

En el proceso de elaboración de los anticuerpos monoclonales se necesita determinar cuáles son los epítopes de los clústeres de diferenciación (marcadoras de superficie celular reconocidas por los anticuerpos producidos) que sirven para identificar la línea celular de interés (linfocitos T y B de memoria). Durante su maduración y diferenciación los linfocitos van recibiendo en su superficie una serie de receptores inmunitarios que van apareciendo a modo secuencial conforme progresa la maduración y diferenciación de linfocitos. Dentro de los marcadores de membrana en la diferenciación de linfocitos B de memoria se menciona a CD19 que es una proteína de 95 kD, de la superfamilia de las inmunoglobulinas, su función biológica es la de formar un complejo con CD21 (CR2), CD81 (TAPA-1) y de esa manera actúa como correceptor de las células B, activando la vía de señalización vav/ras/mitógeno proteinquinasa con la movilización de calcio. En linfocitos B maduros, CD19 media la agregación homotípica y funciona como co-estimulador de la maduración de células B. Otro marcador de memoria para linfocitos B es la proteína CD27 que es un miembro de la superfamilia de los receptores de necrosis tumoral y es un coestimulador como molécula de punto de chequeo al controlar el número total de linfocitos B inmaduros y diferenciados. Esta proteína se une a CD70 y se expresa en todas las células B activadas por el antígeno. Como marcadores de memoria central (T_c) en linfocitos T, se escogió al clúster de diferenciación de CD4, que es una proteína que se expresa en células T y en células dendríticas. Esta glucoproteína monomérica pesa 59 kDa y contiene 4 dominios de tipo inmunoglobulina, que participa en la adhesión celular, lo mismo que en la

maduración tímica y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA II. Confiere a la célula papel de colaborador en respuesta a antígenos solubles o células autólogas no T, provoca la proliferación de células T, lo que permite una señalización adecuada para proliferación y diferenciación de las células B en células secretoras de inmunoglobulinas. Por último, esta CD45RO que se conoce como el antígeno común de los leucocitos cuyo peso es de 180 kDa, se expresa en el 48% de los linfocitos T, los cuales corresponden a células de memoria y funciona como una tirosina fosfatasa en las vías de señalización de los leucocitos. Debido a las consideraciones anteriores, se hace la elección de las proteínas de membranas CD19, CD27, CD4 y CD45RO como marcadores de memoria inmunológica en linfocitos T y B para la predicción de los péptidos con los que se inmuniza el modelo murino.

Para la designación de los péptidos necesarios en la inmunización del modelo murino, se tomaron secuencias depositadas en el GenBank de las proteínas CD4, CD45RO, CD19 y CD27 de *Aotus nancymae*. CD4 (AKM_95886.1) y CD45RO (XP_012315003.1) se escogieron como marcadores de células T de memoria, mientras que CD19 (XP_012320028.1) y CD27 (XP_012328288.1), se seleccionaron como marcadores de memoria de células B. Posteriormente, mediante la herramienta TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) se predijo la localización de la(s) región(es) transmembranal(es) de estas proteínas, a través del método estadístico de modelos ocultos de Markov (Sonnhammer, von Heijne, & Krogh, 1998). Esta predicción permitió identificar las regiones de cada una de las proteínas que se encontraban expuestas extracelularmente y, por ende, podrían ser potencialmente identificadas por los anticuerpos a generar.

Posteriormente, se realizó la predicción de la presencia y localización del péptido señal con la herramienta bioinformática Signal IP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Figura 5).

A.

B.

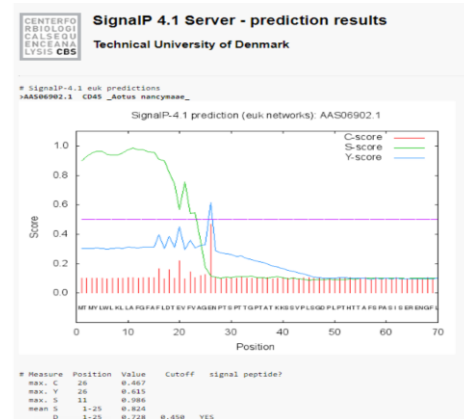
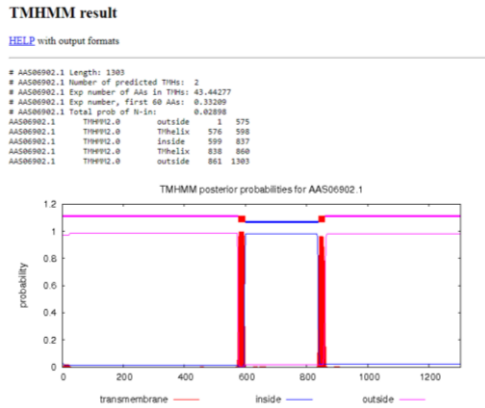
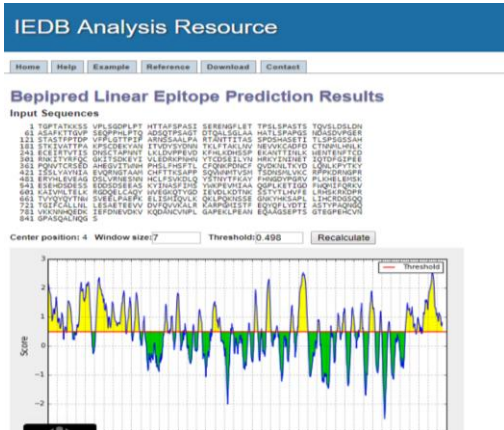


Figura 5: Predicción de la topología de la proteína CD45RO. Predicción *in silico* de la topología de la proteína. En el panel A, se observa la predicción de la región extramembranal de la proteína de interés. En el Panel B, se observa la predicción de la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal mediante la herramienta bioinformática Signal IP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>)

Una vez determinadas las regiones extracelulares y luego de retirar el péptido señal, se realizó la predicción de epítopes B mediante el software IEDB Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/bcell/>) usando la herramienta Bepipred linear Epitope Prediction model (Figura 6). Cada secuencia peptídica predicha como epítipo B, se alineó con las secuencias de proteínas homólogas de *Mus musculus* y de *Homo sapiens* descritas en Genbank, con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Figura 7,8,9,10). Las secuencias de los epítopes predichos que presentaron una identidad menor al 50% con *Mus musculus*, fueron seleccionadas para ser sintetizados y así posteriormente inmunizar los ratones (se parte del principio que, a mayor identidad con la proteína propia del modelo a inmunizar (en este caso el ratón), la probabilidad de generar anticuerpos decrece, ya que se estaría generando respuesta contra algo que se reconoce como propio). De otra parte, se realizó el alineamiento con las secuencias en humano con el fin de producir anticuerpos monoclonales que no solo reconozcan los linfocitos T y B de memoria en *Aotus spp.* sino también en humano.

A.

B.



Average: 0.488 Minimum: 0.024 Maximum: 2.837

Predicted peptides:

No.	Seq.	Start	End	Position	Length
1	IS	1	1	1	1
2	IS	102	212	102	111
3	IS	228	228	228	1
4	IS	246	272	246	27
5	IS	274	286	274	13
6	IS	290	300	290	11
7	IS	302	305	302	4
8	IS	310	317	310	8
9	IS	324	333	324	10
10	IS	330	370	330	41
11	IS	380	401	380	22
12	IS	408	408	408	1
13	IS	408	408	408	1
14	IS	411	418	411	8
15	IS	441	418	418	1
16	IS	448	455	448	8
17	IS	458	460	458	3
18	IS	472	484	472	13
19	IS	487	488	487	2
20	IS	528	512	528	16
21	IS	514	515	514	2
22	IS	522	522	522	1
23	IS	537	602	537	66
24	IS	577	579	577	3
25	IS	581	586	581	6
26	IS	592	598	592	7
27	IS	622	643	622	22
28	IS	654	655	654	2
29	IS	657	657	657	1
30	IS	662	708	662	47
31	IS	718	721	718	4
32	IS	728	738	728	11
33	IS	751	758	751	8

Figura 6: Predicción de epítopes B. *Panel A*, Predicción de las secuencias de aminoácidos de los epítopes B de CD45RO, mediante el uso de la herramienta BepiPred en donde las secuencias que tienen un puntaje mayor a 0,5 (color amarillo) permiten predecir los mejores epítopes. En el panel B se observa las 32 predicciones de epítopes para la proteína de estudio, de las cuales se escogerán dos según su homología e identidad con las secuencias de humano y *Mus musculus* para la síntesis de los péptidos.

La secuencia del marcador CD27 de *Aotus nancymae* (número de acceso XP_012328288.1), tiene 260 aminoácidos (aa). Luego de la predicción de la secuencia extracelular y el retiro de la secuencia del péptido señal, con el análisis *in silico* se predijo un epítope B conformado por 21 aa. Este epítope se encuentra localizado desde la posición 168 hasta la 188 de la proteína (Figura 7) (**QLPAPTPTSTHWPQAQRSLC SSD**).

En relación con CD19 (número de acceso XP_012320028.1), se obtuvo la secuencia de 559 aminoácidos, que posterior a la predicción de la secuencia extracelular y al retiro del péptido señal, se redujo a una secuencia de 227 aa. Con la posterior predicción del epítope B, se seleccionó un péptido de 22 aa. el cual se encuentra ubicado entre las posiciones 98 y 119 de la proteína (Figura 9) (**CQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGS**).

En el caso de CD4 (número de acceso AKM_95886.1), se tomó la extensión total de la secuencia de la proteína de 457 aa. de longitud y una vez predicha la secuencia extracelular y el retiro el péptido señal, se obtuvo una secuencia de 371 aa.; a esta secuencia se le predijo el epítope B obteniendo un péptido de 32 aminoácidos ubicado desde la posición 144 a la 175 (Figura 8) (**ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQL E**).

Por último, se tomó la secuencia de CD45RO (receptor type tyrosin protein Phosphatase C Isoform Precursor 2) (número de acceso XP_012315003.1) de 1.138 aa.; luego de predecir la región extracelular y de retirar el péptido señal, se obtuvo una secuencia de 385 aa., con un epítipo B predicho de 26 aa. ubicado desde la posición 26 a la 50 de la proteína (Figura 10) (**ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTAHS**). Ya que la secuencia de CD45RO no se encontraba disponible en el GenBank en el momento del diseño del péptido, esta proteína fue analizada partiendo de la secuencia del ADN, el gen que codifica la molécula de Cd45 se localiza en 1q31-q32. Esta molécula presenta al menos 8 isoformas producidas por splicing alternativo de 3 de sus 34 exones, los exones 4,5 y 6 que codifican múltiples sitios de glicosilación en su dominio extracelular. Las dos isoformas de CD45 de mayor importancia son CD45RO y CD45RA. La isoforma CD45RO es la forma de menor peso molecular ya que carece de los 3 exones y es menos glicosilada. Teniendo en cuenta que en estudio previos se demostró que CD45RO es una variante peptídica de CD45 debida al splicing alternativo con la escisión de los exones 4, 5 y 6, al momento del obtener la secuencia aminoacídica extracelular de la proteína, estos exones fueron removidos de la secuencia de ARN (Birkeland, Johnson, Trowbridge, & Pure, 1989).

Como resultado de esta predicción se obtuvieron dos secuencias peptídicas por cada clúster de diferenciación, con el fin de inmunizar los ratones en la producción de los esplenocitos productores de anticuerpos (Tabla 1).

CD27		
AAI39126.1 M	-LAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRATAAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPH	59
XP_012328288.1 A	TPAPKICPERHYWAQGKLCQMCAPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCMPGVSFSPDHHTRPH	60
XP_016875721.1 H	TPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPH	60
	: **::: * **::** *****:****:* .*****:***.*****:*****	
AAI39126.1	CESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQP	119
XP_012328288.1	CESCRHCNSGLLIRNCTITANAECACPKGWQCRDKECTECDPPDPLLTTQLSKALDPLH	120
XP_016875721.1	CESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP	120
	*****:*.***:*****:* :.*****:***** : ** : *:: .*:	
AAI39126.1	PPTHLPHGTEKPS-----WPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIR	161
XP_012328288.1	QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLAGFHQLPAPTSTHWPQRSLCSSD---	168
XP_016875721.1	QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPQRSLCSSD---	168
	*****: :* . .***** * :: :* *****	

Figura 7: Alineamiento de CD27. Alineamiento de la secuencia predicha para uno de los dos epítopos de la proteína CD27 de *Aotus nancymae* (segunda fila), comparándola con la secuencia en *Mus musculus* (primera fila) y *Homo sapiens* (tercera fila), buscando el grado de homología e identidad (47%)

para el diseño de la secuencia peptídica. En el recuadro se observa la secuencia de uno de los epítopes predichos para la proteína.

CD4		
AAA37402.1	VTQEKTLVLGKEGESAEELPCESSQKKITVFTWKFSQQRKILGQHGKGVLIIRGGSPSQFDR 60	
AAB51309.1	-----KVLGKKGDTVELTCTASQKKSIQFHWKNSNQIKILGNQGS--FLTKGSPSKLNDR 53	
AKM95886.1	----KTVVLGKEGETVELPCETSLKKNVQFHWKTSQIKILGNQGS--FLTRGQSKLADR 54	
AAA37402.1	FDSKKGAWEKGSFPLIINKLKMEDSQTYICELENRKEEVELWVFKVTFSPGTSLLQGQSL 120	
AAB51309.1	ADSRRLSDQGNFPLIINKLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSL 113	
AKM95886.1	IDSKKSSWDRGSFPLIINKVQVEDSETTYICEVERKKEEVELQVFGLTASPDNLLQGQSL 114	
AAA37402.1	TLTLDNSKVSNNPLTECKHKKGVVSGSKVLSMSNLRVQDSDFWNCTVTLTDQKKNVFGMT 180	
AAB51309.1	TLTLESPPG--SSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLSSVSQLELQDSGTWTCTVLQNKQKVEFKID 172	
AKM95886.1	TLTLESPPG--SSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQLELQDSGTWKCTVSQR--PELLFKIN 172	
AAA37402.1	LSVLGFQSTAITAYKSEGESAEFSFPLNFAEE--NGWELMWAKEKDSFFQPWISFSIKN 238	
AAB51309.1	IVVLAFLQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAEARASSKSWITFDLKN 232	
AKM95886.1	VVLAFLQKASSTVYKKEGEQVEFSFPLAFAAEKLTGSGELWQAEKASSKSWISFNLS 232	
AAA37402.1	KEVSVQKSTKDLKQLKETPLTLTKIPQVSLQFAGSGNLTTLTD--KGLTHQEVNLVVMK 296	
AAB51309.1	KEVSVKRVTDQPKLQMGKPLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLEAKTGLKHQEVNLVVMR 292	
AKM95886.1	QEVCVKVVTDQPKLRMGKPLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTLEAKTGLKHQEVNLVVMR 292	
AAA37402.1	VAQLNNTLTCEVMGPTSPKMRLLTKQENQEARVSEEQKVVQVAPETGLWQCLLSEGDQV 356	
AAB51309.1	ATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAKVSKREKAVVWLNPEAGMWQCLLSDSGQV 352	
AKM95886.1	ATQLQNNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENQEAQVSKQEKAVVWLNPEAGVWQCLLSDSGQV 352	
AAA37402.1	KMDSRIQVLSRGNQ----- 371	
AAB51309.1	LLESNIKVLPTWSTVQPM- 371	
AKM95886.1	LLESKVEVLPWTWSPVQFMA 372	

Figura 8: Alineamiento de CD4. Alineamiento de la secuencia predicha para uno de los dos epítopes de la proteína CD4 de *Aotus nancymae* (segunda fila), comparándola con la secuencia en *Mus musculus* (primera fila) y *Homo sapiens* (tercera fila), buscando el grado de homología e identidad (37%) para el diseño de la secuencia peptídica. En el recuadro se observa la secuencia de uno de los epítopes predichos para la proteína.

CD19		
EDL17351.1	RPQKSLLEVEEGNVVLPCLPDSSPVSSEKLAWYRG-NQSTPFLELSPGSPGLGLHVGS 59	
XP_012320028.1	---EPLRVKVEEGDDAVLLCLEETSHDPAQQLVWVWRESSLEPFLKLTGLPGLGIHVGP 57	
NP_001171569.1	--EPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE-SPLKPFKLKLSLGLPGLGIHMRP 57	
EDL17351.1	LGILLVIVNVSDHMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLR 119	
XP_012320028.1	WGIWLFIFNVSHQMGGFYLCQGPFPSEKFPWQPGWTVSVEGSGELFRWNASDLGGRCGLE 117	
NP_001171569.1	LAIWLFIFNVSQMGGFYLCQGPFPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNASDLGLGCGGLK 117	
EDL17351.1	NRSSGSHRSTSG---SPLYVWAKDHPKVWGTPKPCAPRGSSLNQSLINQDLTVAPGSTL 175	
XP_012320028.1	NRSSEGPSSPSGNLMSSQLYIWAADRPKIWEGEPPCGPLRDSLNTL-SQDLTMAPGSTL 176	
NP_001171569.1	NRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNTL-SQDLTMAPGSTL 176	
EDL17351.1	WLSGCVPPVPVAKGISWTHVHPRRPNVSLLSLSLGEHPVREMWWGSLLLLPQATAID 235	
XP_012320028.1	WLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKETNFSLLSLELKDHPARDMWVMEKGLLLPQATAQD 236	
NP_001171569.1	WLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP-KSLLSLELKDHPARDMWVMEKGLLLPQATAQD 235	
EDL17351.1	EGTYICLRGNLTIERHVKVIARSVWVWLLRTGG----- 269	
XP_012320028.1	AGKYICHRGNLTISWHLEITARSALWHVWVWVWLLRTGGWVPAVT 277	
NP_001171569.1	AGKYICHRGNLTMSFHLEITARPVWVWVWVWLLRTGGWVSA-- 274	

Figura 9: Alineamiento de CD19. Alineamiento de la secuencia predicha para uno de los dos epítopes de la proteína CD19 de *Aotus nancymae* (segunda fila), comparándola con la secuencia en *Mus musculus* (primera fila) y *Homo sapiens* (tercera fila), buscando el grado de homología e identidad (59%) para el diseño de la secuencia peptídica. En el recuadro se observa la secuencia de uno de los epítopes predichos para la proteína.

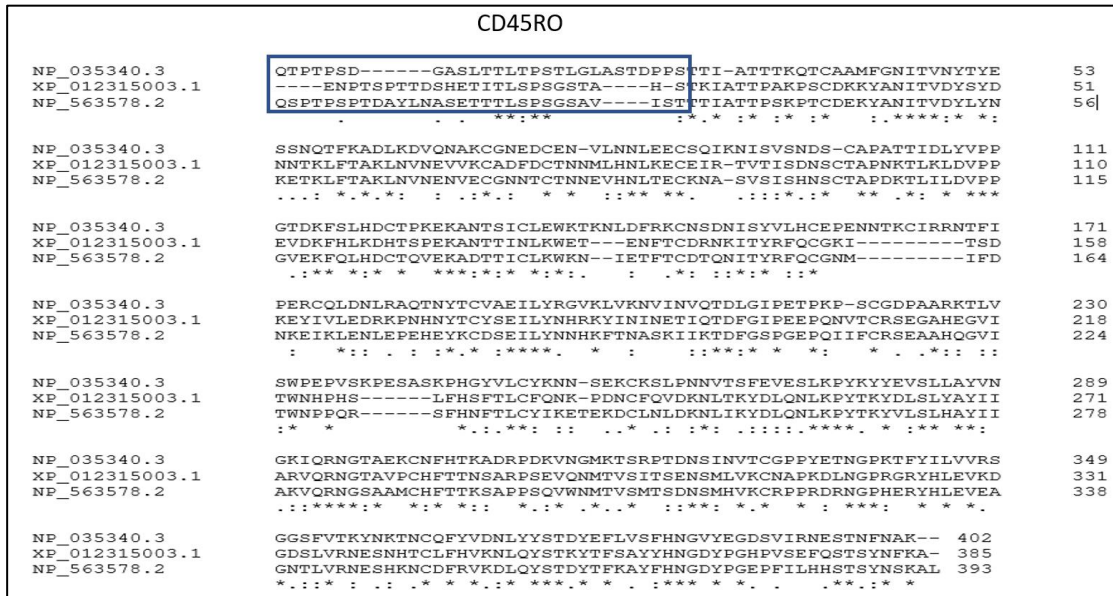


Figura 10: Alineamiento de CD45RO. Alineamiento de la secuencia predicha para uno de los dos epítopes de la proteína CD45RO de *Aotus nancymae* (segunda fila), comparándola con la secuencia en *Mus musculus* (primera fila) y *Homo sapiens* (tercera fila), buscando el grado de homología e identidad (14%) para el diseño de la secuencia peptídica. En el recuadro se observa la secuencia de uno de los epítopes predichos para la proteína.

Tabla 1: Secuencia de epítopes predichos y seleccionados por cada proteína.

Proteína	Secuencia
CD27A	KECTECDPPPDTLLTTQLSKALDPLHLQ
CD27	QLPAPTSTHHPAQRSLCSSD
CD19A	CGLENRSSEGPSSPSGNLMSSQLYIWAKDRPK
CD19	CQPGPPSEKPWQPGWTVSVEGS
CD4A	ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKTLVSQLE
CD4	VVVLAFQQASSTVYKKEGEQV
CD45RO	ENPTSPTDSHASETITLSPSGSSAHS

Epítopes predichos *in silico* de cada una de las proteínas de membrana en el reconocimiento de las células de memoria (dos por cada una de las proteínas, con excepción de CD45RO).

6.2 Objetivo 2: “Determinar la capacidad inmunogénica de los péptidos seleccionados”

6.2.1 Síntesis de las secuencias peptídicas

Las secuencias de epítopes seleccionados (Tabla 2) se sintetizaron químicamente por el grupo funcional síntesis química de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), mediante el sistema de fase sólida múltiple usando la aproximación de ter-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, Colombo, Fioroni, & Mark, 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 la secuencia peptídica de los epítopes de interés, fueron entregados dos péptidos en estado liofilizado (lo que nos permite inmunizar con dos epítopes diferentes, mejorando las probabilidades de obtener una respuesta adecuada) por proteína de membrana (CD27, CD27A, CD19, CD19A, CD4, CD4A), con excepción de CD45RO, para el cual se recibió un solo péptido.

Proteína	Péptido	Secuencia
CD27AAona	39852	KECTECDPPPDLLLTTQLSKALDPHLQ
CD27Aona	39853	QLPAPTPTSTHWPQRSLCSSD
CD19AAona	39854	CGLENRSSEGPSSPSGNLMSSQLYIWAKDRPK
CD19Aona	39855	CQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGS
CD4AAona	39856	ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKTLVSQLE

CD4Aona	39857	VVVLAFQQASSTVYKKEGEQV
CD45ROAona	39858	ENPTSPTDSHASETITLSPSGSSAHS*

Tabla 2: Secuencia de péptidos sintetizados por cada proteína. Secuencia final del diseño de péptidos “*in silico*” mediante el uso de las herramientas bioinformáticas TMHMM, SignalP e IED. Estos péptidos fueron sintetizados para la inmunización de los ratones.

6.2.2 Acople de los péptidos a las proteínas “Carrier”.

Teniendo en cuenta que los péptidos, debido a su menor peso molecular, son pobres inmunógenos, es necesario acoplarlos a proteínas portadoras para una adecuada respuesta de anticuerpos específicos en el animal. Por ello, previo a la inmunización del modelo murino con las secuencias de epítopes sintetizadas químicamente, se realizó el acople de las secuencias obtenidas, con la proteína “carrier” KLH (keyhole limpet hemocyanin) (Sigma Aldrich cat: H7017) usando glutaraldehído como agente acoplante. Los péptidos fueron resuspendidos en PBS a una concentración de 5 mg/mL, luego se le adicionó KLH en adecuada relación molar. La mezcla se colocó en agitación constante en rotor vertical, posteriormente se incubó por una hora a temperatura ambiente con la adición de glicina 1M para obtener una concentración final de 200mM (pH 7,2), seguido de agitación por una hora. La separación del conjugado péptido-proteína “carrier” del péptido libre se realizó mediante diálisis por membrana en PBS a 4°C durante toda la noche en agitación constante. La suspensión producto de la diálisis con cada una de las secuencias peptídicas acopladas al KLH se almacenó en viales de 2 mL para su utilización en la inmunización de los ratones.

6.2.3 Protocolo de Inmunización de los ratones

Para este estudio, se utilizaron 21 ratones BALBc hembras destetas (3 por cada péptido). Con el fin de obtener el suero pre-inmune, mediante punción de la vena facial, se realizó una sangría previa a la primera inmunización. La formulación se preparó en una proporción de 30 µg/50 µL de conjugado en PBS más 50 µL de Sigma Adjuvant System® (Monophosphoryl Lipid A y Trehalose Dicorynomycolate - squalene) (Sigma Aldrich cat: S6322). Cada ratón se inmunizó en una oportunidad inicial vía subcutánea

y las dos posteriores por vía intraperitoneal con un intervalo de 14 días (Figura 11). Para obtener los esplenocitos necesarios para la fusión de células, un mes después de la última inmunización, los ratones fueron inmunizados con el péptido sin adyuvante en los días -5 y -4 antes de la eutanasia, para lo cual los ratones fueron anestesiados con Ketamina + Xilacina® y posteriormente eutanasiados mediante dislocación cervical.

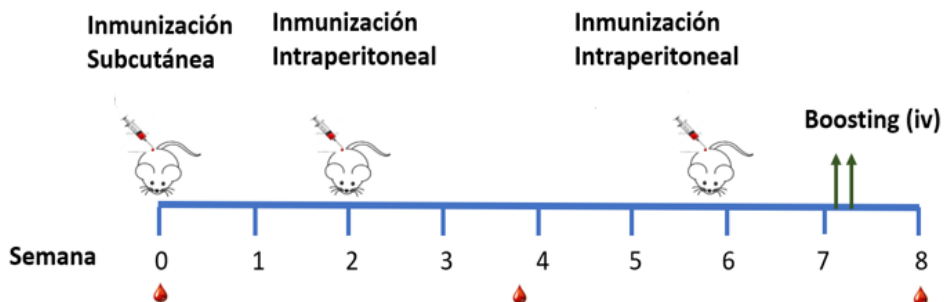


Figura 11: Protocolo de inmunización.

Protocolo de inmunización de los ratones con las secuencias de epítopes acopladas a KLH (3 ratones por cada secuencia peptídica) durante la semana 0,2,6 con un boosting 5 días antes de la eutanasia para la esplenectomía.

6.2.4 Valoración de la Inmunogenicidad

Para escoger el ratón con mejor respuesta con el fin de hacer la fusión para la obtención del hibridoma, la reactividad de cada uno de los sueros generados frente a cada uno de los epítopes de los Cluster de Diferenciación (CD), fue analizada después del día catorce de la segunda inmunización mediante ensayos de ELISA, usando placas Nunc Maxisorp (BioLegend, Cat: 423501) de poliestireno de 96 pozos de fondo plano. Las placas fueron cubiertas con los péptidos sintetizados a razón de 1 μ g/pozo. En cada pozo se colocó el suero de los ratones (1:100 en PBS con leche descremada 5%), las placas fueron incubadas por dos horas a 22°C. Los anticuerpos específicos fueron detectados usando IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich, Cat: SAB3701085) como segundo anticuerpo, la reacción fue revelada

utilizando como sustrato fosfatasa alcalina (P-nitrofenil fosfato). Se consideraron como positivos aquellos valores superiores al promedio de la reactividad del suero pre-inmune, más dos desviaciones estándar.

Para el análisis por citometría de flujo (FACS), se usaron los anticuerpos obtenidos contra las proteínas marcadoras (CD) de células de memoria de *Aotus spp.* Para ello, los sueros de los ratones fueron incubados por dos horas a temperatura ambiente con las células de *Aotus spp.*, seguido de la incubación con anticuerpos anti-ratón producidos en cabra conjugados a fluoresceína isotiocianato (FITC) (Thermo Fisher, Cat:62-6511), como anticuerpo secundario para revelar la reacción. El anticuerpo ya marcado fue incubado por treinta minutos a 4°C y la población que fue reconocida por el anticuerpo (desplazamiento de la población con respecto al isotipo y un reconocimiento de la población marcada –doble pico- en el histograma) fue analizada usando el equipo de citometría FACSCanto II (BD, Biosciences) y el software FlowJo V10.

Los resultados de los ensayos de ELISA y de citometría de flujo realizados con los sueros obtenidos luego de la segunda inmunización revelaron una respuesta inmune compleja con producción de anticuerpos ante la exposición a los péptidos sintéticos cuyos títulos para CD27A, CD19, CD4, CD27, CD4A y CD45RO se presentan en la Figura 12. La reactividad (desplazamiento de la población en el histograma, a la derecha del punto de corte de 10^3) determinada por citometría de flujo cuando el suero del ratón se enfrentó a los leucocitos de *Aotus spp.* fue de 36,1% para CD27A, 35,7% para CD27, 12,6% para CD19A, 43,6% para CD19, 26,6% para CD4A, 38,7% para CD4, y 28,8% para CD45RO (Figura 13).

Para la fusión de las células del bazo con las células de mieloma (PAI), con base a las mejores reactividades alcanzadas por citometría, se seleccionaron los ratones CD27.6, CD19.12, CD4.16 y CD45RO.21.

A.

	Péptidos			
	Pre-inmun.	StDv	P2	StDv
852 CD27A M3 1	0,1133	7,0711E-05	2,4369	0,0543058
852 CD27A M4 1	0,1118	0,00021213	2,8824	0,10125769
852 CD27A M0 2	0,1230	0,00148492	2,9101	0,00601041
853 CD27 M1 2	0,1233	0,0106066	0,35585	7,0711E-05
853 CD27 M2 2	0,10895	0,00275772	0,5797	0,0019799
853 CD27 M3 2	0,10885	0,00615183	0,61005	0,03061772
854 CD19A M4 2	0,1359	0,0019799	1,5224	0,04681047
854 CD19A M0 3	0,1171	0,00296985	2,82195	0,0013435
854 CD19A M1 3	0,12305	0,01619275	1,6864	0,01272792
855 CD19 M2 3	0,0979	0,00381838	0,2865	0,01018234
855 CD19 M3 3	0,10385	0,00120208	0,66155	0,01350574
855 CD19 M4 3	0,113	0,00509117	0,96705	0,01449569
856 CD4A M0 4	0,1004	0,00410122	0,81385	0,14149207
856 CD4A M1 4	0,10905	0,00346482	0,78405	0,0403758
856 CD4A M2 4	0,1066	0,00325269	0,44665	0,05168951
857 CD4 M3 4	0,09485	0,00176777	2,97825	0,02722361
857 CD4 M4 4	0,105	0,00098995	3,4087	0,0436992
857 CD4 M0 5	0,11015	0,0033234	1,89295	0,03033488
858 CD45 M1 5	0,1096	0,00381838	0,1763	0,0046669
858 CD45 M2 5	0,1256	0,02418305	0,14635	0,04094148
858 CD45 M3 5	0,1495	0,00113137	0,34905	0,00091924

B.

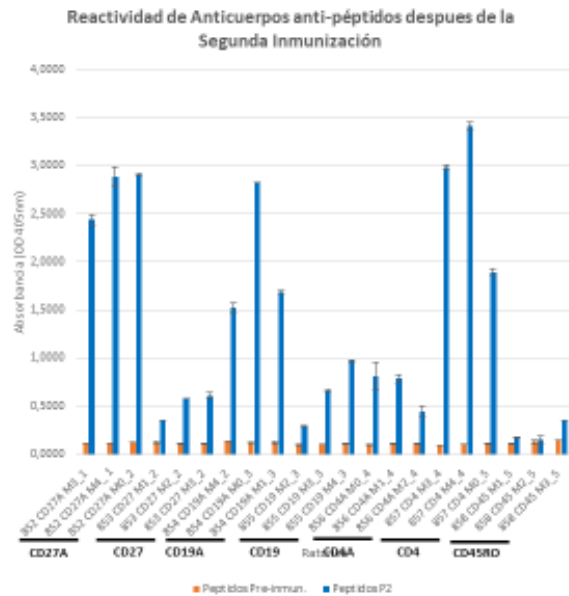


Figura 12: Resultados por ELISAS de la reactividad a la inmunización. Panel A, resultados de las absorbancias ópticas (405 nm), en el tamizaje por ELISA Indirecto de la producción de anticuerpos anti-péptidos en los ratones inmunizados (3 ratones por cada secuencia peptídica). Panel B, representación gráfica de los resultados de cada una de las inmunizaciones comparados con los valores obtenidos de los sueros preinmunes.

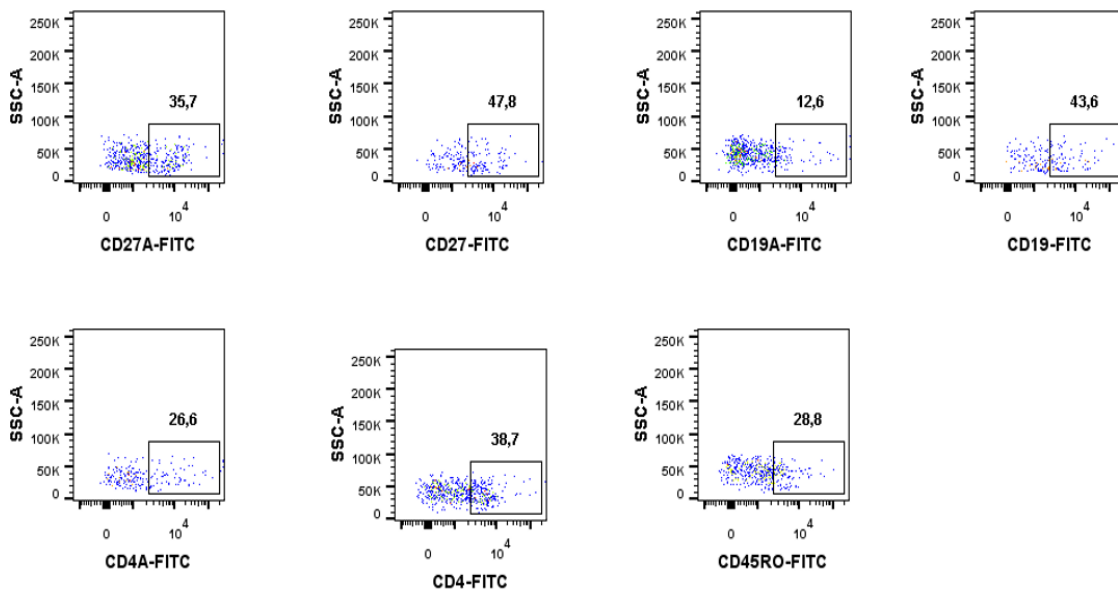


Figura 13 : Resultados por Citometría de flujo de la reactividad a la inmunización. Reconocimiento de las células mononucleares de *Aotus spp.* con los sueros de ratón inmunizados ante las diferentes secuencias peptídicas posterior a la segunda inmunización (CD27A (ratón 2), CD27 (ratón 6), CD19A (ratón 12), CD19 (ratón 9), CD4A (ratón 16), CD4 (ratón 18), CD45RO (ratón 21)). SSC-A (complejidad), FIT-C (Isotiocianato de fluoresceína).

6.3 Objetivo 3: “Producir anticuerpos monoclonales que reconozcan las células de memoria de *Aotus spp.*”

6.3.1 Producción de Anticuerpos Monoclonales (mAbs)

Se cultivaron células de mieloma (PAI, que no produce anticuerpos), donadas por el Doctor Gerd Pluschke del Swiss Tropical Institute, hasta alcanzar una concentración de veinte millones. Para la fusión, las células se mezclaron en una proporción de 1 célula de mieloma por cada 5 de bazo mediante el uso de polietilenglicol (peso molecular 1.400-1.800, Sigma Aldrich cat: 10783641001). En placas de 96 pozos, los hibridomas fueron cultivados con medio de Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT) con suero fetal bovino (FBS) 20% a una concentración de 1'000.000 de células/ml, las células fueron incubadas durante 16 días a 37° en una atmósfera con CO₂ 5%. El primer día de la fusión se pueden ver al microscopio de luz las células híbridas con citoplasma grande acompañada de células localizadas adyacentes a la membrana celular. Aproximadamente en el décimo día posterior de la fusión, se observan gran cantidad de detritos celulares producto de la incapacidad de las células de mieloma y esplenocitos de sobrevivir en el medio selectivo (HAT). Ya posterior al día 15 se empiezan a observar tanto microscópica como macroscopicamente la formación de las líneas clonales en el fondo de las placas (Figura 14 y 15).

La selección de los clones, se realizó por citometría de flujo analizando los sobrenadantes de los hibridomas contra células de *Aotus spp* y aquellos que presentaron un reconocimiento de la población con el anticuerpo, evidenciado en el histograma como un doble pico bien diferenciado de la población control con desplazamiento de la población mayor a 10³, fueron seleccionados. Los hibridomas positivos, fueron clonados por la técnica de dilución límite y su reactividad se volvió a valorar por citometría bajo los mismos criterios anteriores. Aquellos que presentaron alta especificidad y alta afinidad, se escogieron para ser marcados con fluorocromos. Este procedimiento fue implementado para cada una de las secuencias peptídicas sintetizadas para CD19, CD27, CD4 y CD45RO.

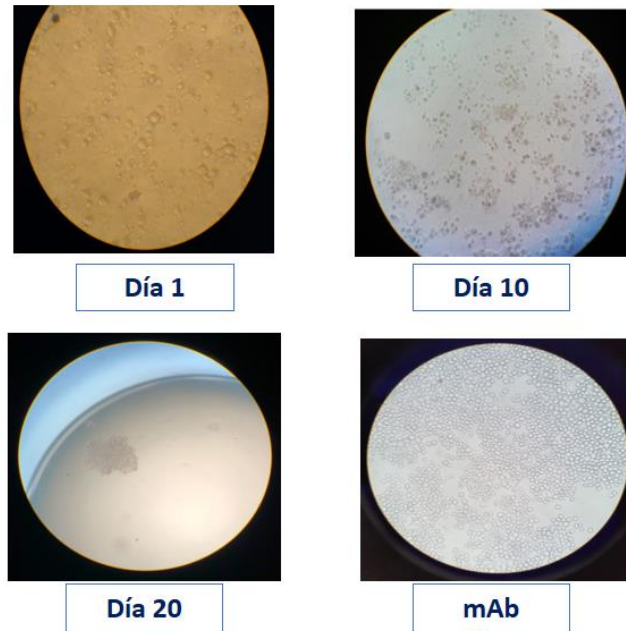


Figura 14: Fusión de los hibridomas. Fotografía de las células de mieloma fusionadas con los linfocitos B del bazo de ratón (hibridoma), durante su 1°, 10° y 20° día hasta la formación clonal y proliferación celular para la producción de anticuerpos.

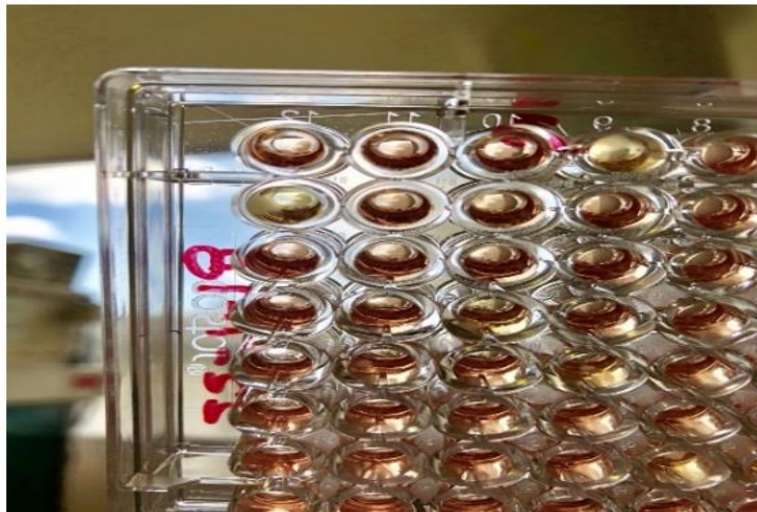


Figura 15: Identificación de Clonos. Identificación macroscópica en placa de 96 de los grupos celulares con expansión clonal que son productores de anticuerpos, donde se observa cambio en la coloración del medio y el clon proliferando en el fondo del pozo.

Luego de la fusión y selección de los clonos, se obtuvo para la proteína de CD19 un total de 417 clonos probados mediante FACS, de los cuales, los que presentaron mayor reactividad fueron CD194G12A3G3, CD193C7C11B2, CD193C763H4F4 y CD194G12G2D5, donde por pruebas de reconocimiento de poblaciones celulares por

citometría de flujo, se seleccionó el clon 4G12A3E3. El cultivo celular se amplió con el fin de obtener más de dos litros de sobrenadante que contuviesen este anticuerpo. El anticuerpo de interés contenido en el sobrenadante, fue purificado por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G Hi Trap (GE Healthcare Life Science; cat: 17040401) marcado según la recomendación de la casa comercial y concentrado con Amicon® Ultra-4 (Sigma-Aldrich, Cat: Z740186) de 100.0000 KDa, llegando a obtener concentraciones de 2mg/mL.

En la producción de clones anti-CD4 se probaron 354 líneas celulares de las cuales, la de mejor respuesta fue CD45H3D10; éste fue purificado marcado y concentrado para ser posteriormente marcado.

Para la proteína de CD27 se obtuvieron 760 clones, de los cuales los que mostraron mejor reconocimiento de las células B de memoria fueron CD275F11C11, CD275E9D4, CD272F7F9 y CD272F7F1. De todos ellos, el que demostró mejor reconocimiento de la población de interés fue CD275F11C11, el cual se purificó y concentró.

Para la obtención de los anticuerpos que reconocieran los epítopes de las proteínas de CD45RO, se evaluaron en total 213 clones, de los cuales posterior a varios ensayos de clonación repetida se seleccionó la línea celular madre 5H3 con un reconocimiento del 19% de la población de interés, el anticuerpo monoclonal CD45RO3A8G1 presentó mejor reconocimiento por lo cual se produjo en cultivo celular, se purificó y concentró (Figura: 16).

En total, tras la inmunización de los ratones, se produjeron 1.746 anticuerpos monoclonales, de los cuales, por cada una de las proteínas, sólo un anticuerpo fue seleccionado para continuar con la caracterización de las poblaciones celulares de linfocitos.

Los anticuerpos monoclonales producidos fueron probados con células de *Aotus* spp. (A) y de humanos (B) (Figura 17). En la evaluación del anticuerpo CD275f11C11 no reconoció adecuadamente las células de humano (4,61% de la población), mientras que CD194G12A3G3 las reconoció en un 31,5%, CD45H3D10 en un 24,1% y CD45RO3A8G1 en un 22%. Como control positivo en este experimento se usaron anticuerpos monoclonales comerciales, los cuales no lograron reconocer las células

de *Aotus* spp. para CD27 (2,45% de la población), CD19 (0,11% de la población) y CD45RO (2,67% de la población). Esto confirmó que los anticuerpos anti-humano comerciales no tienen la capacidad de reconocer las poblaciones de células con los marcadores CD27, CD19 y CD45RO en *Aotus* spp.

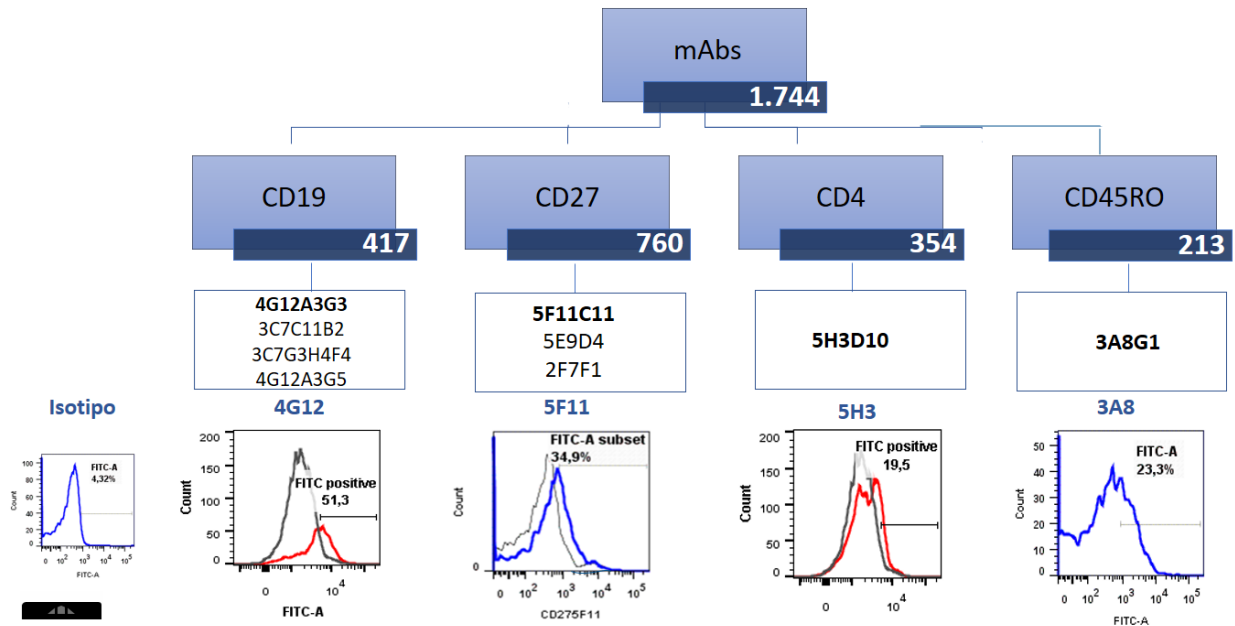


Figura 16: Evaluación de la reactividad inicial de los monoclonales. Reactividad en el reconocimiento de las poblaciones de células mononucleares de *Aotus* con los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpos deseados (CD27, CD19, CD4, CD45RO), FIT-C (Isotiocianato de fluoresceína). En la parte inferior de la figura se identifica el reconocimiento de las poblaciones de interés con cada uno de los anticuerpos monoclonales producidos para cada clúster de diferenciación. En el lado izquierdo de la gráfica se identifica el isotipo, contra el cual se comparó la identificación de las poblaciones.

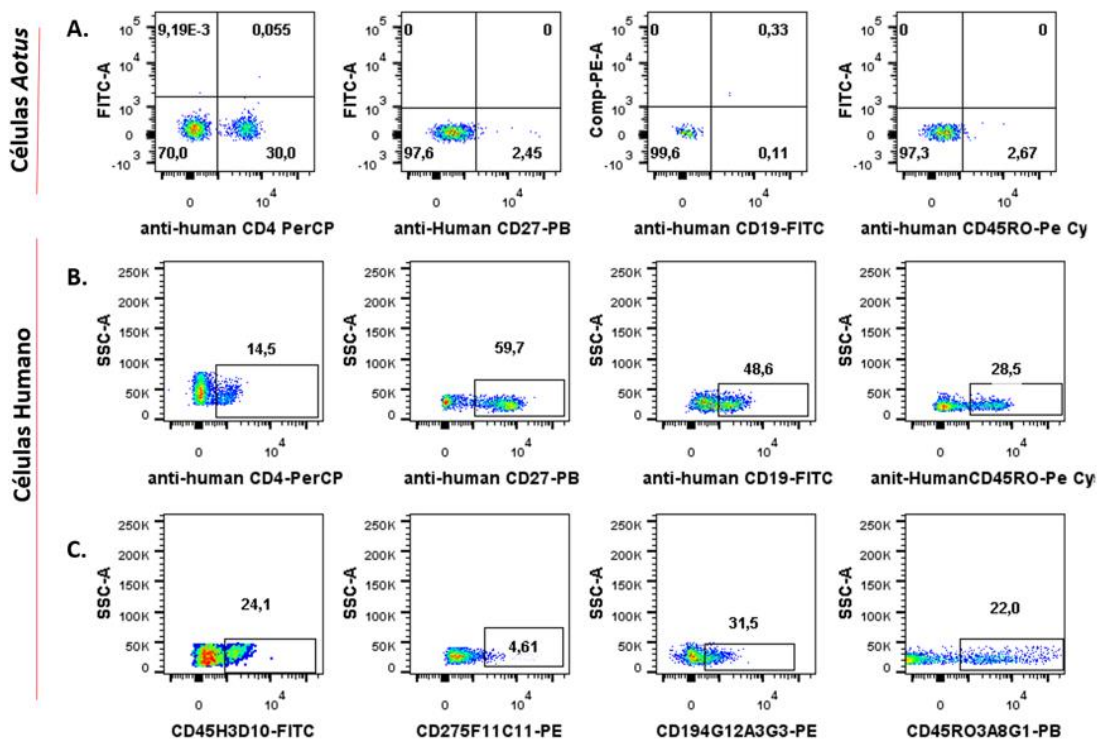


Figura 17: Evaluación de la reactividad de los monoclonales producidos con anticuerpos comerciales. Se evaluó la reactividad de anticuerpos comerciales anti-humano contra células de *Aotus spp.* y células de humano (control positivo). En el panel B, se evidencia el reconocimiento de las poblaciones celulares al ser usados anticuerpos monoclonales comerciales en células de humanos. En el panel A, se evidencia el reconocimiento de esas mismas poblaciones, pero en células de *Aotus spp.* con el uso de anticuerpos comerciales. En el panel C, se observa el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales CD45H3D10, CD275F11C11, CD45RO3A8G1y CD194G12A3G3 en células humanas. CD19 y CD27 anti-humano no presentaron un reconocimiento de las poblaciones de interés en células de *Aotus*.

6.3.2 Marcaje y determinación de las concentraciones óptimas de los anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales 5F11C11 (CD27) y 3A8G1 (CD45RO) fueron marcados con Pacific Blue Succinimidyl Ester (Thermo Fisher Scientific; Cat: P10163), 5H3D10 (CD4) con isotiocianato de fluoresceína isomero I (FITC) (Sigma Aldrich, Cat: F7250) y 4G12A3G3 con rodamina B (Sigma Aldrich, Cat: 283924), siguiendo las instrucciones dadas por cada una de las casas comerciales. En algunos casos se

marcó el anticuerpo monoclonal producido con dos tipos diferentes de fluorocromos con el fin de tener la posibilidad de hacer los ensayos de doble marcaje para comprobar el reconocimiento poblacional (Figura 18).

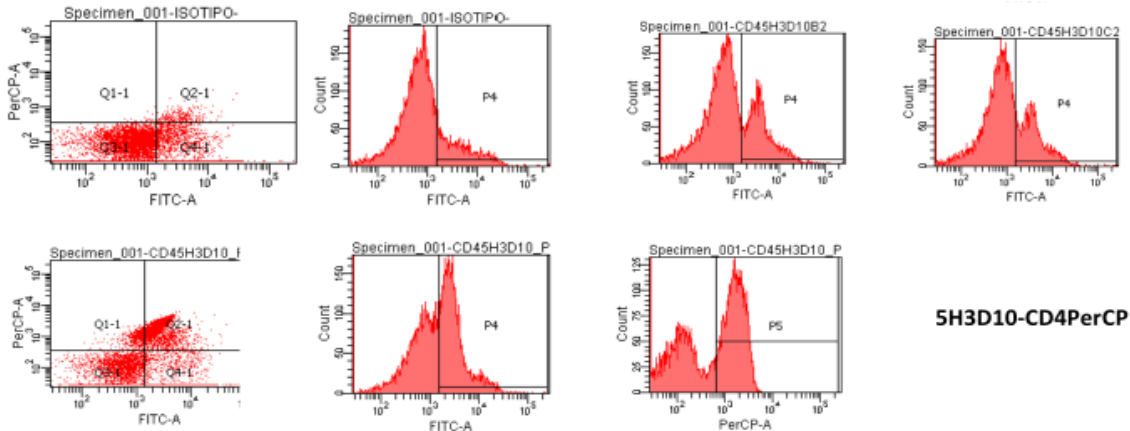


Figura 18: Marcaje de anticuerpos monoclonales producidos. Se marcó el anticuerpo monoclonal CD45H3D10 con dos fluorocromos diferentes (PerCP y FITC), mostrando un adecuado reconocimiento de la población celular de interés, ya sea en el dispersograma (Q2-1) o por histograma donde se evidencia la formación de una doble población, (desviación de la población a la derecha mayor de 10^{-3}). También se puede apreciar la evaluación de la reactividad de las líneas celulares derivadas del clon original (CD45H3D10B2 Y 5H5H3D10C2).

Una vez los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos se marcaron con los diferentes fluorocromos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de *Aotus spp* sanos, fueron separados mediante gradiente de densidad (Ficoll-Paque) y luego evaluados por citometría de flujo para realizar la titulación de los anticuerpos. Como controles positivos se usaron los anticuerpos comerciales anti-CD19 FITC, anti-CD14 PE y anti-CD4 PerCP, como control negativo se tomaron las PBMCs de los *Aotus spp*. sin ningún anticuerpo (Figura 19).

En la titulación del anticuerpo monoclonal anti-CD45H3D10 marcado con FITC, se determinó como concentración óptima 1,5 $\mu\text{g/mL}$, ya que como se observa en el histograma (ventana P3), hay una adecuada identificación de una segunda población bien definida (doble pico), que corresponde a los linfocitos que fueron reconocidos para la proteína de interés por el anticuerpo monoclonal (Figura 20). Así mismo, se determinó que la concentración óptima del anticuerpo anti-CD194G12G2D5 fue de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21).

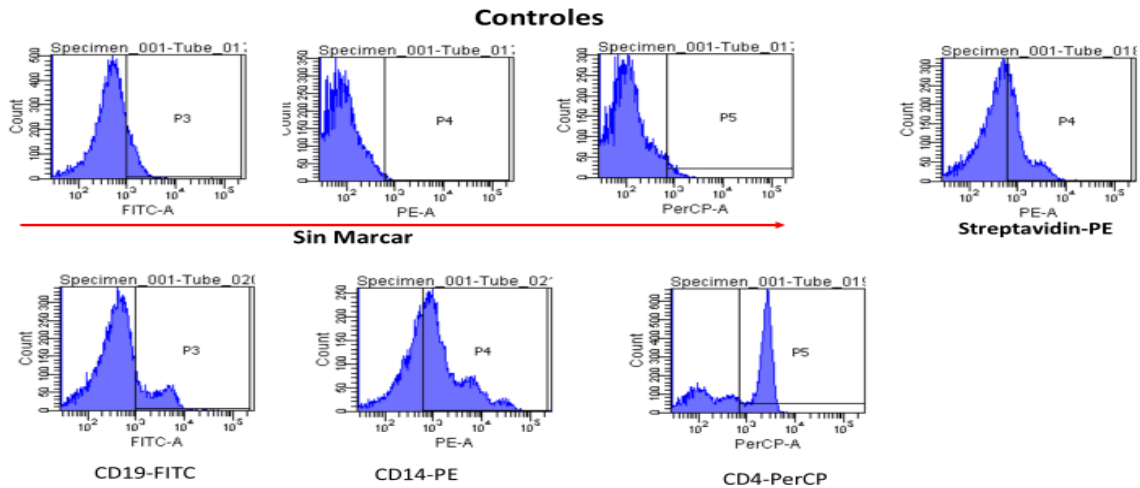


Figura 19: Utilización de anticuerpos monoclonales comerciales como controles. Controles positivos con anticuerpos monoclonales antihumano (anti-CD19, anti-CD14, anti-CD4), lo mismo que controles negativos con los leucocitos de *Aotus Spp*, en la determinación de las concentraciones óptimas de los anticuerpos producidos y marcados para identificar células de memoria de *Aotus*.

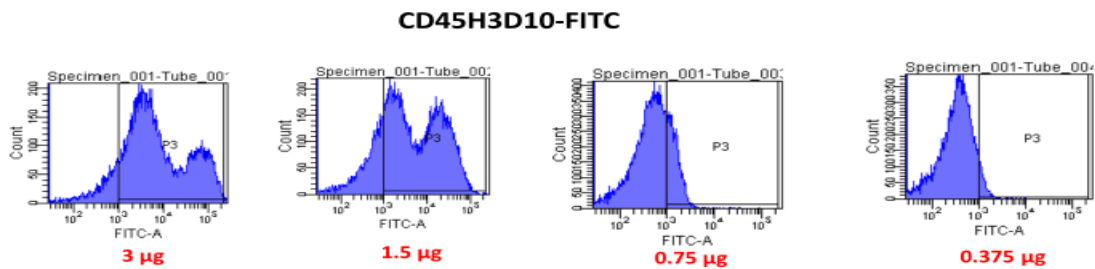


Figura 20: Concentración óptima para CD45. Determinación de la concentración óptima de reconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-CD45H3D10 marcado con FITC.

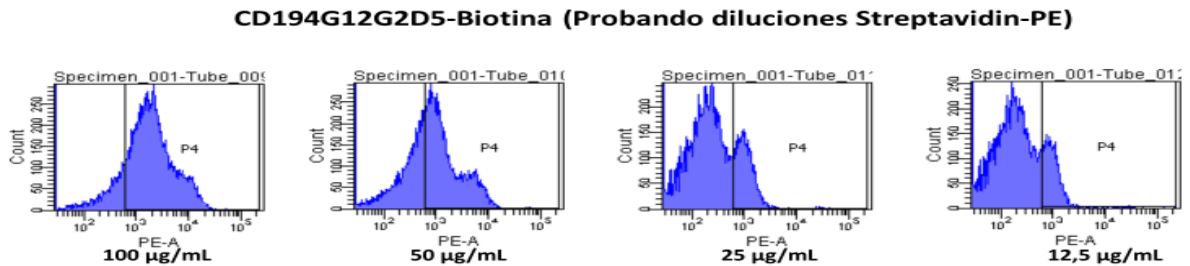


Figura 21: Concentración óptima para CD19. Determinación de la concentración óptima de reconocimiento del anticuerpo monoclonal anti-CD194G12G2D5 marcado con Biotina.

Con el fin de diferenciar las líneas celulares, las PBMCs de *Aotus spp*. fueron doblemente marcadas con anticuerpos que reconocieran linfocitos de memoria, por lo

que se usaron los anticuerpos marcados con Pacific-Blue (CD45RO⁺) simultáneamente con FITC (CD4⁺); esto llevo al reconocimiento del 36.4% de la población de CD4⁺ de la población total de linfocitos y del 45.7% en el reconocimiento de los linfocitos CD45RO⁺, también se pudo determinar la población doblemente marcada tanto para CD4⁺ como para CD45RO⁺, la cual correspondió al 16.3% del total de la población.

En el caso de los linfocitos B de memoria, también se realizó el doble marcaje determinando que los anticuerpos marcados con Pacific Blue (CD27⁺) identificaron un 28,3% de la población de PBMCs de *Aotus* spp. y para CD19⁺ (marcado con PE), un reconocimiento del 18,9% de la población de linfocitos. El doble marcaje (CD27⁺ con CD19⁺) identificó un 16% del total de la población de los linfocitos (Figura 22).

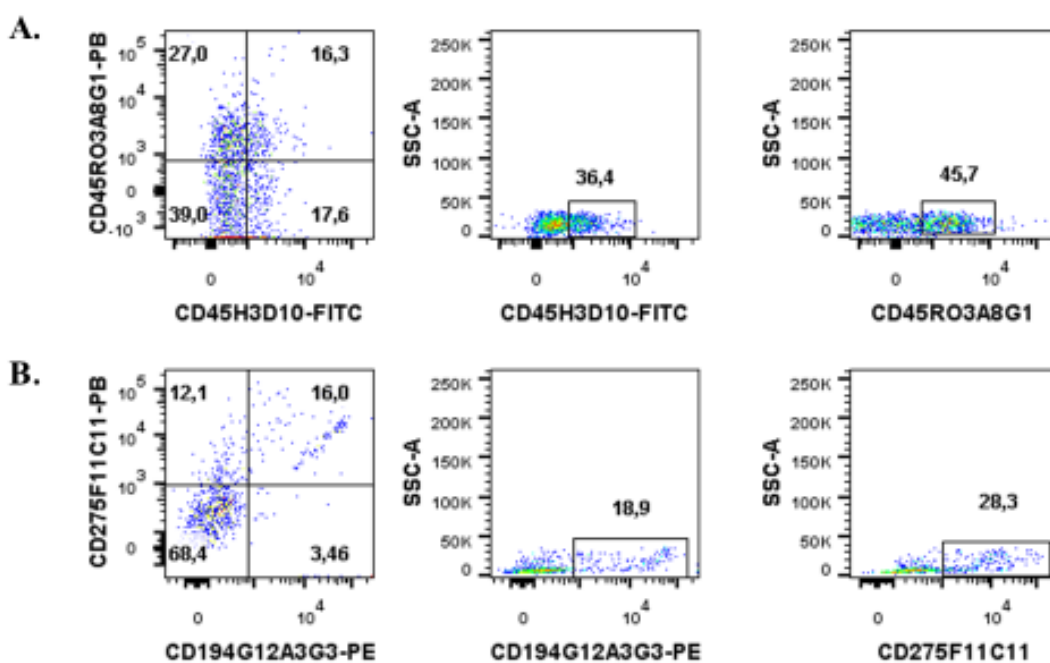


Figura 22: Doble marcaje de anticuerpo en células de *Aotus*. En el panel A, las células T CD4⁺ son marcadas con CD45H3D10-FITC y CD45RO3A8G1-Pacific Blue. En el panel B, las células B son marcadas con CD194G12A3G3-PE y CD275F11C11-Pacific Blue. La columna de la izquierda muestra el análisis con el doble marcaje; la columna del medio y de la derecha muestra el reconocimiento de los marcadores de manera separada.

6.4 Objetivo 4: Determinar la reactogenicidad de los anticuerpos monoclonales producidos

6.4.1 Reactividad de los anticuerpos producidos contra las proteínas de *Aotus* spp. y de humano.

Con el fin de confirmar la reactividad de los anticuerpos producidos contra cada uno de los clúster de diferenciación (CD27, CD19, CD4 y CD45RO), las células de humanos, así como las de *Aotus* spp. se incubaron con los anticuerpos monoclonales producidos y con anticuerpos comerciales (anti-human CD27-Pacific Blue (BioLegend, Cat: O323); anti-human CD4-PerCP (BD Biosciences, Cat:347324); anti-human CD45RO-PerCP (BD Biosciences, Cat: 555494; y anti-human CD19-FITC (BD Biosciences, Cat: 340864)). Para ello, tanto los anticuerpos monoclonales producidos como los comerciales fueron incubados durante 30 minutos por separado con las células a 4°C; la lectura se realizó por citometría y los datos fueron analizados usando el software FlowJo versión 10.

Para determinar si el anticuerpo monoclonal reconocía adecuadamente su proteína diana, las células de *Aotus* spp. fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal CD45H3D10 y con el anticuerpo comercial anti-CD4 humano, el cual reconoció el 28% (doblemente positivo), el monoclonal CD45H3D10 reconoció el 4% del total de la población no reconocida por el anticuerpo anti-humano. Dicha reactividad puede haberse debido a que algunos monocitos tienen receptores que se unen a la región cristalizante (Fc) del fragmento de los anticuerpos.

Las células humanas fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal CD194G12A3G3 y CD19 comercial (anti-humano), así como con el monoclonal CD45RO3A8G1 y CD45RO (anti-humano). En el caso de CD19, la subpoblación celular de linfocitos fue identificada por ambos anticuerpos (30,8%), y al colocar el anticuerpo comercial en la identificación de la población logró reconocer un 48,6 de la misma; de otra parte el CD19 producido reconoció un 31,5% de la población de linfocitos. El anticuerpo monoclonal CD45RO3A8G1 reconoció el 22% de la población de linfocitos humanos, sin embargo, la reactividad del anticuerpo disminuyó al 8,73% cuando el anticuerpo

fue usado en combinación con el anticuerpo comercial CD45 anti-humano (Figura 23). Esta situación podría explicarse ya que el anticuerpo comercial puede tener un mayor nivel de afinidad por el CD45RO que el anticuerpo CD45RO3A8G1. Es sabido que el anticuerpo comercial UCHL1 se une al CD45RO de manera dependiente de la glicosilación de los aminoácidos, especialmente de la asparagina 174 y la serina 176 codificadas cerca de la unión del exón 3 y el exón 7. El ácido siálico también es necesario para la reactividad de este mAb comercial (Pulido, Schlossman, Saito, & Streuli, 1994).

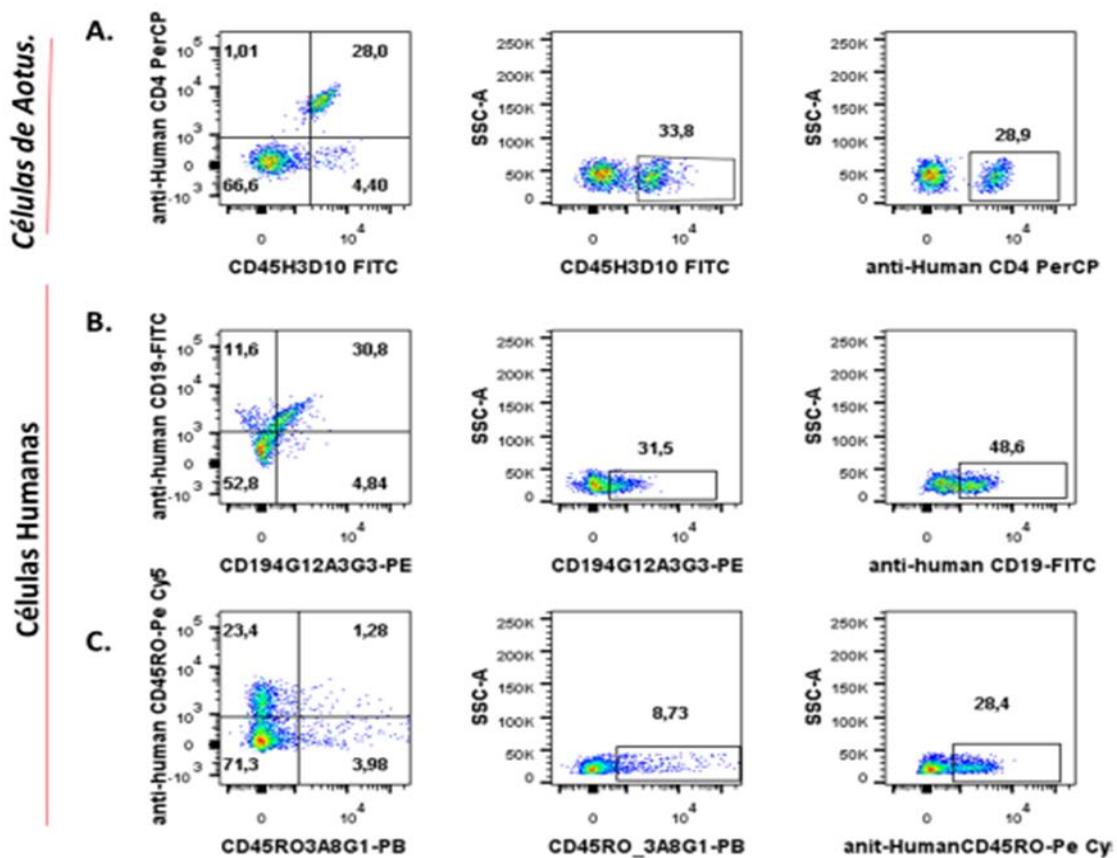


Figura 23: Confirmación indirecta de la reactividad del anticuerpo monoclonal en el reconocimiento de los marcadores celulares. En el panel A se muestran células de *Aotus* doblemente marcada con CD45H3D10-FITC y un anticuerpo comercial Anti-CD4-PerCP. En el panel B se muestran células humanas doblemente marcadas con CD4G12A3G3-PE y un anticuerpo comercial anti-CD19-FITC; por último, en el panel C se muestran células de humano marcadas con CD45RO3A8G1-Pacific Blue y el anticuerpo comercial anti-humano CD45RO-PE Cy5. La columna de la izquierda corresponde a las células doblemente marcadas, mientras que las columnas del medio y de la derecha muestran el reconocimiento de los marcadores de manera separada.

6.4.2 Identificación de la proteína de interés reconocida por el anticuerpo monoclonal.

Un miligramo de cada uno de los anticuerpos monoclonales producidos fue purificado para realizar inmunoprecipitación y así identificar el reconocimiento de la proteína de interés por parte del anticuerpo monoclonal. Para esto, el anticuerpo fue covalentemente unido con perlas de cyanogen-bromide (CNBr)- Sefarosa activada siguiendo las indicaciones de la casa comercial (GE Healthcare). Mediante gradiente de densidad usando Ficoll-Hypaque®, 67 millones de PBMCs de *Aotus* spp. fueron aisladas y posteriormente lisadas usando el buffer de extracción y lisis RIPA (Sigma-Aldrich, Cat. R0278). Las proteínas de membrana obtenidas en el sobrenadante fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo acoplado a las perlas de Sefarosa. La proteína que fue reconocida por el anticuerpo monoclonal se eluyó con TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%. La elución de la lisis de proteínas se corrió en un gel de poliacrilamida al 8% con el fin de identificar la banda de la proteína de interés a la altura deseada (peso en KDa) (Figuras 25 y 26). El gel fue teñido con Coomassie Coloidal (Sigma-aldrich, Cat: B0770), la banda fue cortada y enviada para secuenciación por espectrometría de masas Ms/Ms (Figura 24).

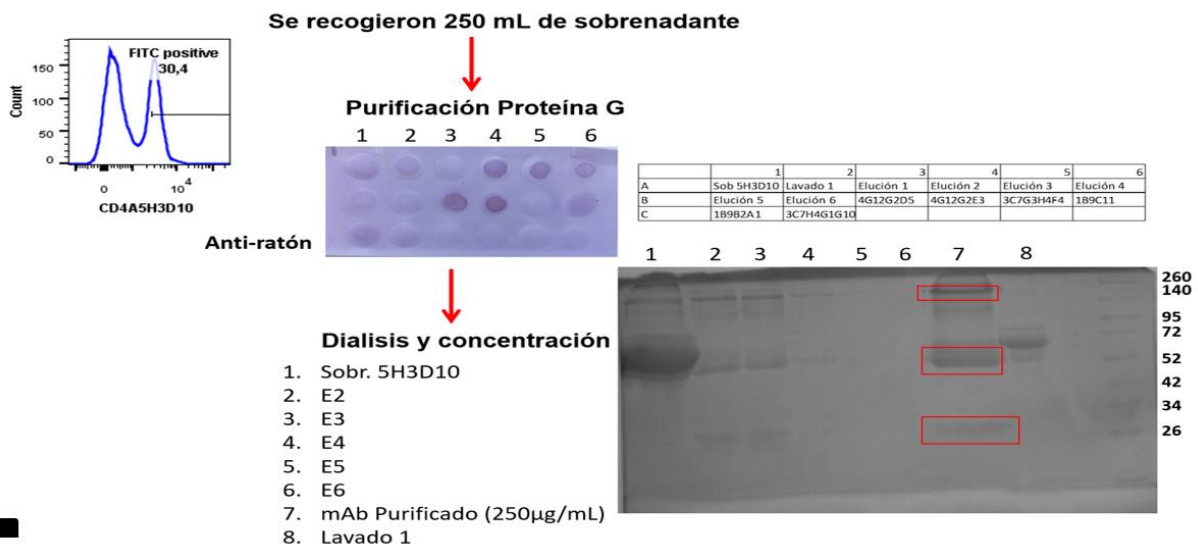


Figura 24: Esquema completo para la obtención de la banda por inmunoprecipitación en gel. Inicia con el reconocimiento por citometría del anticuerpo monoclonal de interés, luego se procede a obtener del sobrenadante de cultivo, la concentración del anticuerpo requerido, por lo que se recupera por cromatografía por afinidad (proteína G). El anticuerpo es concentrado y acoplado a perlas de proteína

A para inmovilizar la proteína de interés (lisado de proteínas de membrana de *Aotus*) y poder ser eluida e inmunoprecipitada en un gel de poliacrilamida. Se obtiene la banda al peso esperado de la proteína para ser enviado a secuenciar por espectrometría de masas.

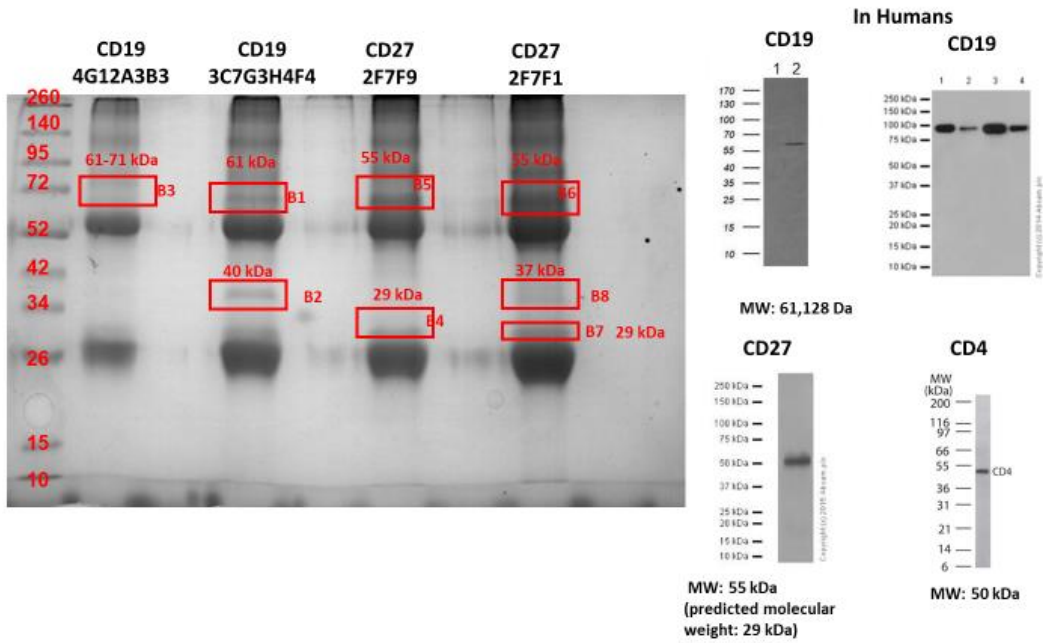


Figura 25: Obtención de las proteínas de interés por IP.

Inmunoprecipitación y determinación de las bandas de interés, de acuerdo a su peso molecular para los mAbs CD194G12A3B3, CD193C7G3H4F4, CD272F79, CD272F7F11. Al lado derecho de la imagen se observan los marcadores de peso molecular para cada una de las proteínas de interés.

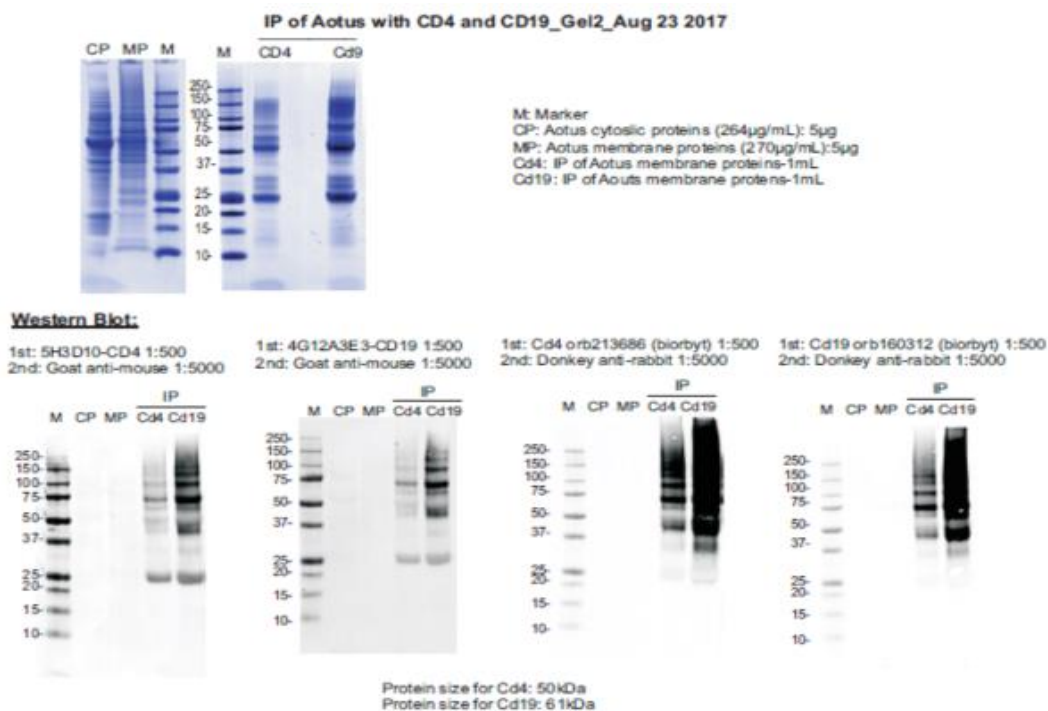


Figura 26: Obtención de otras proteínas de interés para confirmar reconocimiento de los anticuerpos. Inmunoprecipitación de las proteínas que reconocen los anticuerpos CD45H3D10 y CD194G12A3G3, con un kit comercial que permite la separación específica de las proteínas de membrana de las citosólicas y su conformación por Western blot (trabajo realizado por el grupo de espectrometría de masas en City of hope - Beckman Research Institute).

Para conocer la secuencia de la proteína que está identificando cada anticuerpo, se siguió el protocolo de preparación de muestras para MALDI por proteólisis en gel (Beckman Research Institute- City of Hope, Dr. Kalkum), por lo que se procedió a eliminar del gel el azul de Coomassie adicionando 50-100 μ L de acetonitrilo (CH_3CN) / 100 mM de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) y puestos en agitación constante a 4°C por al menos 2 horas, con posterior eliminación del sobrenadante. Luego, se procedió a la reducción adicionando 15 μ L de 10 mM de tris (2-carboxietinil) fosfina (TCE- Sigman Aldrich, Cat: C4706) con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) a pH entre 7,5 y 8,0 a temperatura de 37° por al menos 30 minutos. Posteriormente, se realizó la alquilación de las bandas adicionando 20 μ L de Iodoacetamida en 100 mM de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), esperando por una hora la reacción en cuarto oscuro a temperatura ambiente. Como último paso, se realizó la digestión con tripsina previa fragmentación del gel en segmentos y adición de 45 μ L de H_2O + 50 μ L de 100mM de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) + 1-2 μ L de solución de tripsina activada

(50-100 ng de tripsina) y se incubó a 37° toda la noche en un rack de metal. Para su extracción, se adicionó 10 µL de ácido fórmico y se transfirió a un tubo de espectrometría de masas. Para el análisis predictivo de la secuencia de la proteína, se usó el software analizador de datos para proteómica Peaks® 8.

La reactividad de CD45RO3A8G1 con CD45RO fue confirmada por espectrometría de masas. La huella peptídica y los datos de la espectrometría identificaron la isoforma corta de CD45 para *Aotus vociferans* con una cobertura de secuencia de 27 péptidos.

Supplementary Table 2: Sequence coverage of CD45RO [Aotus vociferans]

Prob	%Spec	#Pep	#Unique	%Spec
100%	0.001544	18	27	27
Sequence Coverage: CD45 [Aotus vociferans] Accession number: AA506903.1				

Sequence	Prob	Ionic Score	Peptide LogProb	Delta Score	NTT	Modifications	Observed	Actual Mass	Charge	Delta Da	Delta PPM	Retention	Stop	Intensity	# Other Prote	TIC	Other Protein Start	Spectrum ID	
(K)QLMNVPIHADILLETYK(R)	100%	85.262.115	1.221.288	43.918.945	2		709.7102	2.126.11	3	0.000316	0.1485	1.014.50	627	0	0	0	68.777.10	610	dr181102orf164-4-21887-12561_12561
(R)FLAEFGQPR(V)	100%	7.655.091	14.069.082	53.300.055	2		660.8698	1.319.72	2	0.001079	0.8172	1.033.71	646	0	0	0	124332	636	dr181102orf164-4-22192-12885_12885
(R)VDVLPYINR(V)	100%	5.855.009	9.554.026	44.237.842	2		715.8526	1.429.69	2	0.002778	1.941	995.287	677	0	0	0	127404	667	dr181102orf164-4-19710-11278_11278
(R)VELSEINGDAGSNYNASVYDGFK(E)	100%	60.297.587	78.117.127	45.412.823	2		859.4118	2.575.21	3	0.006613	-2.179	1.049.68	701	0	0	0	30.083.10	678	dr181102orf164-4-23448-13153_13153
(R)VELSEINGDAGSNYNASVYDGFK(E)	100%	317.159	4.451.503	28.389.146	2		1.288.61	2.575.21	2	0.000136	0.05187	1.049.91	701	0	0	0	9.304.19	678	dr181102orf164-4-23442-13157_13157
(K)YAAQGFPR(D)	99%	50.045.575	5.725.604	2.392.417	2		438.2402	874.4658	2	-0.000376	-0.4294	479.049	713	0	0	0	303923	706	dr181102orf164-4-59944-3831_3831
(R)EYETFDVWR(V)	100%	5.895.752	8.097.848	36.216.189	2		591.7571	1.191.50	2	0.0005375	0.4546	961.708	722	0	0	0	95.810.40	714	dr181102orf164-4-20073-11674_11674
(K)QVYVMYK(R)	100%	5.962.326	7.921.624	22.789.293	2		495.294	988.3795	2	-0.0004489	-0.4536	773.943	727	0	0	0	137057	729	dr181102orf164-4-14200-8563_8563
(R)AFGQVYK(I)	99%	5.398.667	5.439.908	17.924.028	2		417.7397	833.4648	2	0.0004749	0.95691	701.75	766	0	0	0	176051	759	dr181102orf164-4-12163-7412_7412
(K)RFDYIK(L)	100%	455.648	38.984.144	1.808.555	2	Carbamidomethyl (+57)	596.8113	1.191.61	2	0.0007707	0.6462	551.181	780	0	0	0	29.793.30	772	dr181102orf164-4-17956-4962_4962
(R)FDYIK(L)	99%	4.659.742	4.802.515	14.282.962	2	Carbamidomethyl (+57)	518.7604	1.035.51	2	0.0001861	0.1795	648.337	780	0	0	0	78.550.40	773	dr181102orf164-4-11399-6552_6552
(R)EYTHIQFVSPDQVPEPDK(L)	100%	7.863.142	131.797.305	65.007.935	2		699.6099	2.794.41	4	0.002077	0.7431	919.516	817	0	0	0	135764	794	dr181102orf164-4-19410-10950_10950
(R)EYTHIQFVSPDQVPEPDK(L)	100%	41.144.818	66.791.563	41.144.818	2		559.8889	2.794.41	5	-0.0003776	-0.1351	919.127	817	0	0	0	797143	794	dr181102orf164-4-19396-10935_10935
(R)YTGIVDAMLEGLAENK(V)	100%	6.050.271	1.121.288	47.574.103	2		1.013.00	2.023.98	2	0.0009773	0.3937	1.176.49	862	0	0	0	45.817.80	844	dr181102orf164-4-27510-15261_15261
(K)RDPSPFLAEAFQ(R)	100%	5.898.528	104.642.515	5.326.195	2		618.9712	1.853.89	3	0.000775	0.4178	748.307	934	0	0	0	173744	919	dr181102orf164-4-13838-8157_8157
(K)RDPSPFLAEAFQ(R)	100%	43.315.314	74.431.224	4.200.387	2		927.9538	1.853.89	2	0.002027	1.116	751.243	934	0	0	0	18.873.30	919	dr181102orf164-4-13890-8212_8212
(K)ETGDFWQMFQ(R)	100%	30.351.807	68.999.515	3.638.992	2	Oxidation (+16)	962.9369	1.685.79	3	0.001495	0.8624	1.288.93	1037	0	0	0	21.921.40	1025	dr181102orf164-4-30244-17129_17129
(K)ETGDFWQMFQ(R)	100%	49.485.675	6.115.418	32.791.662	2		557.6951	1.669.79	3	0.001028	0.9295	1.329.98	1037	0	0	0	28.954.90	1025	dr181102orf164-4-31791-17825_17825
(K)ETGDFWQMFQ(R)	100%	56.993.695	9.097.039	41.629.623	2	Oxidation (+16)	843.902	1.685.79	2	0.00214	1.268	1.389.96	1037	0	0	0	20.316.80	1025	dr181102orf164-4-30260-17147_17147
(K)ETGDFWQMFQ(R)	100%	38.730.545	5.998.842	29.441.763	2		835.9041	1.669.79	2	0.001083	0.6481	1.327.35	1037	0	0	0	12.643.80	1025	dr181102orf164-4-31772-17803_17803
(K)VMMLTELK(H)	100%	56.489.514	6.435.782	22.790.962	2		523.3203	1.044.63	2	0.0004803	0.4593	942.863	1049	0	0	0	112648	1041	dr181102orf164-4-19766-11341_11341
(K)VMMLTELK(H)	100%	59.666.475	79.351.964	30.223.895	2	Oxidation (+16)	531.3174	1.060.62	2	-0.0004994	-0.04704	849.783	1049	0	0	0	210467	1041	dr181102orf164-4-17405-9857_9857
(K)HSDQSLQVWGGK(Q)	100%	5.437.648	8.235.841	4.057.687	2	Carbamidomethyl (+57)	869.3838	1.776.75	2	0.0003121	0.1757	686.448	1064	0	0	0	18.684.10	1050	dr181102orf164-4-11867-7182_7182
(K)HSDQSLQVWGGK(Q)	100%	48.229.025	64.919.996	4.822.543	2	Carbamidomethyl (+57)	593.2574	1.776.75	3	-0.002529	-2.411	697.195	1064	0	0	0	155981	1050	dr181102orf164-4-11874-7190_7190
(K)QYVDELDVLDK(S)	98%	2.742.463	22.612.212	1.516.613	2		870.4205	1.738.83	2	-0.0001802	-0.1036	774.591	1079	0	0	0	26.226.10	1065	dr181102orf164-4-14211-8875_8875
(R)YVYQYTMVSVLEQFAEK(E)	100%	49.478.146	8.221.952	39.063.422	2		1.222.59	2.443.17	2	0.000546	1.041	969.785	1119	0	0	0	13.235.90	1100	dr181102orf164-4-20197-11808_11808
(R)YVYQYTMVSVLEQFAEK(E)	100%	75.149.225	13.149.729	6.098.153	2		815.3975	2.443.17	3	0.0008936	0.3615	970.936	1119	0	0	0	85.627.30	1100	dr181102orf164-4-20215-11828_11828

Figura 27: Resultado predicción por Espectrometría de masas.

Tabla de resultados de la predicción por el software donde se describe la probabilidad de que corresponda a la proteína de CD45 de *Aotus vociferans*.

6.5 Consideraciones éticas

Este trabajo fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Los ratones fueron mantenidos conforme a lo indicado en la Ley 84 de 1989, a la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud de Colombia y a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio octava edición (2011) del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) (National Research Council, 2011). Además, se tuvo en cuenta lo estipulado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) en el panel de Eutanasia en junio de 2013 (AVMA (American Veterinary Medical Association), 2013).

7 DISCUSIÓN

La enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* sigue siendo un enorme problema de salud pública en países en vías de desarrollo, cobrando un importante número de vidas (sobre todo en población infantil), en donde se estima que cada 30 segundos un infante muere a causa de malaria, lo que se traduce en aproximadamente 3.000 muertes por día (World Health Organization, 2018). Los esfuerzos a nivel mundial en la búsqueda de una vacuna efectiva como mecanismo importante en el control de la enfermedad, se han visto limitados por la gran variabilidad genética del parásito, así como por los mecanismos de evasión a la respuesta inmunológica que exhibe el agente causal. Otra de las limitantes, es el poco acceso a un modelo de experimentación óptimo para la evaluación de los candidatos a vacuna, como paso previo al inicio de estudios en humanos.

Desde los años ochenta, la Organización Mundial de la Salud ha recomendado el uso del *Aotus* spp. dentro de los modelos de elección para estudios de enfermedades como la malaria, sin embargo, la falta de herramientas de diagnóstico inmunológico en la detección, evaluación y cuantificación de la respuesta inmune durante los estudios preclínicos de candidatos a vacuna, han sido una limitante importante al momento de decidir cuáles de los antígenos seleccionados generan una respuesta inmune que amerite el inicio de estudios clínicos. Las citoquinas secretadas desde las células de los sistemas inmunes de cualquier modelo, juegan un papel importante frente a la infección, invasión, desarrollo y transmisión de la enfermedad; es por esto que el desarrollo de herramientas específicas en la detección y cuantificación de dichas moléculas y mediadores inmunológicos da información importante respecto a los cambios fisiopatológicos e inmunológicos que ocurren durante la fase infecciosa en el modelo primate no humano (NHP), lo mismo que en la evaluación de la respuesta inmunitaria derivada de inoculación con candidatos a vacunas en el desarrollo de una respuesta protectora contra la enfermedad .

El desarrollo de reactivos contra antígenos de expresión en la diferenciación de linfocitos en el modelo de *Aotus* spp. ha sido lento si se compara con el progreso en la obtención de reactivos en humanos y en el modelo murino (Carvalho et al., 2003). Debido a esas limitantes, los investigadores se han visto abocados al desarrollo de reactivos específicos que tengan representación en múltiples especies, y es por ello que los estudios de “reactividad cruzada” con anticuerpos monoclonales (mAbs), han tomado ventaja de la homología e identidad de las secuencias de ciertas proteínas entre diferentes especies, convirtiéndose en una alternativa para la detección de dichas moléculas en aquellos modelos experimentales que están menos caracterizados (Haverson et al., 2001).

En 2007, el estudio de Saalmuller y cols, determinó un patrón amplio de reactividad cruzada entre diversos anticuerpos monoclonales y antígenos de los Clusters de Diferenciación (CD) en diferentes especies (NHP, rumiantes, equinos, carnívoros, conejos, conejillos de india, pollos y peces), indicando un alto grado de conservación en los epítopes de superficie de los linfocitos durante la evolución para CD9, CD11, CD14, CD18, CD21, CD29, CD44, CD45, CD49d; CD61, CD86, CD921 y CD172a (Saalmüller & Aasted, 2007). En 2016, Hoglind y cols., realizaron una evaluación sistemática de los anticuerpos monoclonales humanos para la detección de interferón gamma e interleuquina-2 en primates no humanos del viejo (mono rhesus, macaco cangrejero, macaco cola de cerdo, mono verde africano, babuinos) y nuevo mundo (*Aotus* spp., monos ardilla, tití común), encontrando una panreactividad de los anticuerpos monoclonales, con reconocimiento de estas citoquinas en todas las especies de NHP, que fueron posteriormente analizadas en ensayos de captura y citometría de flujo con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Höglind et al., 2017).

En el presente estudio, se están reportando cuatro nuevos anticuerpos monoclonales producidos para el reconocimiento específico de los antígenos de superficie (CD) en la evaluación de memoria inmunológica a largo plazo para linfocitos T (CD4⁺, CD45RO⁺) y linfocitos B (CD19⁺, CD27⁺), a partir de PBMCs de *Aotus nancymaae*. Los anticuerpos monoclonales anti-humano comerciales fueron valorados contra estas proteínas de memoria, pero sólo el anticuerpo comercial SK3 reaccionó frente al CD4

de células de *Aotus nancymaae*; las otras tres proteínas no fueron reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-humano. A pesar que el estudio de Daubenberger y cols. en el 2001, reporta que el anticuerpo anti-humano CD45RO (UCHL1) reconoció las células de *Aotus nancymaae* con una baja afinidad, en el presente estudio no se logró reproducir este resultado. La pérdida de reactividad del anticuerpo monoclonal CD45RO3A8G1 contra células de humano con doble marcaje con el anticuerpo monoclonal comercial UCHL1, se puede atribuir primero que todo a una diferencia en la identidad de la secuencia (sólo un 58% de identidad) y /o a la falta de glicosilaciones del péptido usado para la inmunización. Los anticuerpos producidos con predicción de epítopes B en marcadores de células de *Aotus nancymaae*, presentaron una reactividad intermedia frente a las células de humanos, en el caso de los anticuerpos CD194G12A3G3, CD45H3D10 y CD45RO3A8G1. A pesar que el péptido de CD27 inoculado presentaba una identidad del 86% entre *Aotus nancymaae* y humano, el monoclonal CD275F11C11 no reconoció las células humanas, por lo que se postula que las sustituciones P173R, A175L y A181P pueden ser críticas en el reconocimiento de la región hipervariable del anticuerpo en la unión al CD27 humano.

Uno de los problemas asociados con los candidatos a vacunas es la inducción de células de memoria de larga vida, por lo que son necesarias inmunizaciones repetidas, las cuales llegan a ser un problema para los pacientes de zonas rurales dispersas de países en vías de desarrollo, donde el acceso a los centros de salud y hospitales es difícil. En el desarrollo de vacunas, la evaluación de la memoria inmunológica a largo plazo es poco conocida. El presente trabajo permitió generar cuatro anticuerpos monoclonales que permitirán valorar la respuesta a largo plazo, tanto de células T como células B de memoria, en el modelo experimental de monos *Aotus spp.* Estos nuevos reactivos serán de gran utilidad al momento de seleccionar candidatos a vacuna antimalárica que generen respuestas protectoras de larga duración, permitiendo así tamizar qué candidatos deberían continuar siendo evaluados en posteriores estudios clínicos en humanos.

8 CONCLUSIONES

Con este trabajo de investigación en la producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan células de memoria de *Aotus* spp. (CD275F11C11, CD45H3D100, CD194G12A3G3, Cd45RO3A8G1), se ha avanzado en el desarrollo de herramientas inmunológicas que permitan la evaluación cuantitativa de la respuesta inmune a largo plazo del modelo que es propuesto para el estudio de una gran cantidad de enfermedades que afectan a la especie humana, siendo la malaria una de las más importantes.

Como valor agregado, se pudo comprobar la reactividad cruzada de los anticuerpos elaborados frente a células de memoria en humano, lo que los convierte en una herramienta con doble propósito.

Los anticuerpos monoclonales producidos serán de gran utilidad para completar el “set” de herramientas requerido para la valoración de la memoria inmunológica a largo plazo en el modelo experimental de monos *Aotus* spp.

9 PERSPECTIVAS

Se plantean como perspectivas del presente trabajo, el continuar con la evaluación, estudio y producción de otras herramientas complementarias que permitan la valoración de la respuesta inmune a largo plazo, en particular, merece la pena iniciar la producción de anticuerpos monoclonales para otros marcadores celulares como CD62L y CCR7.

La realización de otro tipo de ensayos funcionales, como la evaluación de la producción de citoquinas *in vitro* mediante ensayos citométricos como los de CBA (cytometric bead array), permitirán obtener información valiosa, no sólo de la duración de la respuesta inmunológica, sino además del tipo de perfil de respuesta inducido como, por ejemplo, la inducción de respuestas proinflamatorias tipo Th1, o de producción de anticuerpos neutralizantes como la mediada por un perfil Th2.

10 AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo quien me abrió las puertas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) para poder llevar a cabo esta iniciativa en investigación. A la Doctora Diana Díaz Arévalo por sus enseñanzas y paciencia, con la cual día a día nos ha conducido en la fundamentación del quehacer investigativo. A todos los que de una u otra manera han apoyado el desarrollo de esta tesis de grado, mis más sinceros reconocimientos y agradecimientos.

11 BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Amek, N. O., Van Eijk, A., Bayoh, N., Smith, T., Vounatsou, P., Lindblade, K. A., ... Slutsker, L. (2018). Infant and child mortality in relation to malaria transmission in KEMRI/CDC HDSS, Western Kenya: Validation of verbal autopsy. *Malaria Journal*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2184-x>
- AVMA (American Veterinary Medical Association). (2013). AVMA guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois. In *American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois*. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50009-1>
- Baaten, B. J. G., Li, C. R., Deiro, M. F., Lin, M. M., Linton, P. J., & Bradley, L. M. (2010). CD44 Regulates Survival and Memory Development in Th1 Cells. *Cell*, *32*(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.011>
- Becker, H. J., Shimabukuro-Vornhagen, A., Theurich, S., von Bergwelt-Baildon, M. S., & Kondo, E. (2016). Processing and MHC class II presentation of exogenous soluble antigen involving a proteasome-dependent cytosolic pathway in CD40-activated B cells. *European Journal of Haematology*, *97*(2), 166–174. <https://doi.org/10.1111/ejh.12699>
- Beignon, A. S., Le Grand, R., & Chapon, C. (2014). In vivo imaging in NHP models of malaria: Challenges, progress and outlooks. *Parasitology International*, *63*(1), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.001>
- Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S., & Pure, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(17), 6734–6738. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6734>
- Carbonetti, S., Oliver, B. G., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Sack, B., Bergl, E., ...

- Sather, D. N. (2017). A method for the isolation and characterization of functional murine monoclonal antibodies by single B cell cloning. *Journal of Immunological Methods*, 448, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.010>
- Chan, B. M., Badh, A., Berry, K. A., Grauer, S. A., & King, C. T. (2018). Flow Cytometry-Based Epitope Binning Using Competitive Binding Profiles for the Characterization of Monoclonal Antibodies against Cellular and Soluble Protein Targets. *SLAS Discovery*, 23(7), 613–623. <https://doi.org/10.1177/2472555218774334>
- Costa, D., Assis, G., Alessandra de Souza Silva, F., Araujo, F., César de Souza Junior, J., Hirano, Z., ... Brito, C. (2015). Plasmodium simium, a Plasmodium vivax-Related Malaria Parasite: Genetic Variability of Duffy Binding Protein II and the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines. *PloS One*, 10, e0131339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131339>
- Daubenberger, C. A., Spirig, R., Patarroyo, M. E., & Pluschke, G. (2007). Flow cytometric analysis on cross-reactivity of human-specific CD monoclonal antibodies with splenocytes of Aotus nancymaae, a non-human primate model for biomedical research. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 119(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.010>
- Delisi, C., & Berzofsky, J. A. Y. A. (1985). T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures j _ k. *Immunology*, 82(October), 7048–7052.
- Doolan, D. L., & Beier, J. C. (2002). Malaria Methods and Protocols. In D. Doolan (Ed.), *Humana Press*. Humana Press.
- Elgueta, R., Vries, V. C. De, Noelle, R. J., & Noelle, R. J. (2010). The immortality of humoral immunity. *Immunological Reviews*, 236, 139–150.
- Erik, J., Larsen, P., Lund, O., & Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>
- Fehr, B. T., Rickert, R. C., Odermatt, B., Roes, J., Rajewsky, K., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1998). Antiviral Protection and Germinal Center Formation, But Impaired B Cell Memory in the Absence of CD19. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(1).
- Fleagle, J. G. (2013). *Primate adaptation and evolution*. Academic press.

- Foung, S. K., Sasaki, D. T., Grumet, F. C., & Engleman, E. G. (1982). Production of functional human TT hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(23), 7484–7488.
- Galfre, G., & Milstein, C. (1981). *Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures*. Elsevier.
- Gavilondo, J. V. (1995). Anticuerpos monoclonales: Teoría y Práctica. In *Biotecnología aplicada. 1ra edición. La Habana*.
- Gosling, R., & von Seidlein, L. (2016). The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. *PLoS Medicine*, *13*(4), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001994>
- Grammer, A. C., Heaney, J., Lipsky, P. E., McFarland, R. D., & Darnell, B. F. (1999). Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers. *Journal of Immunology*, *163*(8), 4150–4159.
- Gray, D., Siepmann, K., Van Essen, D., Poudrier, J., Wykes, M., Jainandunsing, S., ... Dullforce, P. (1996). B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunological Reviews*, *150*(1), 45–61.
- Groth, S. F. de S., & Scheidegger, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods*, *35*(1–2), 1–21.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen Presentation and T Cellstimulation by Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, *20*(1), 621–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
- Han, B. K., Olsen, N. J., & Bottaro, A. (2019). The CD27 – CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, *45*(4), 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.08.001>
- Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Morimoto, C., Okumura, K., & Kobata, T. (2002). CD27 and CD40 inhibit p53-independent mitochondrial pathways in apoptosis of B cells induced by B cell receptor ligation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(49), 46950–46958. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209050200>
- Hegde, P. S., White, I. R., & Debouck, C. (2003). Interplay of transcriptomics and proteomics. *Current Opinion in Biotechnology*, *14*(6), 647–651.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.006>

- Herrera, S., Perlaza, B., & Bonelo, A. (2002). *Aotus monkeys : their great value for anti-malaria vaccines and drug testing*. 32, 1625–1635.
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1105–1116. <https://doi.org/10.1038/nbt1126>
- Hotta, K., Sho, M., Fujimoto, K., Shimada, K., Yamato, I., Anai, S., ... Nonomura, K. (2011). Prognostic significance of CD45RO β memory T cells in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 105(September), 1191–1196. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.368>
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2410914><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC390513>
- Hviid, L., & Barfod, L. (2008). Malaria vaccines: immunity, models and monoclonal antibodies. *Trends in Parasitology*, 24(9), 392–395. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.007>
- Imwong, M., Madmanee, W., Suwannasin, K., Kunasol, C., Peto, T. J., Tripura, R., ... White, N. J. (2019). Asymptomatic Natural Human Infections With the Simian Malaria Parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. *Journal of Infectious Diseases*, 219(5), 695–702. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy519>
- 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.
- Joyner, C., Barnwell, J. W., & Galinski, M. R. (2015). No more monkeying around: Primate malaria model systems are key to understanding *Plasmodium vivax* liver-stage biology, hypnozoites, and relapses. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00145>
- Kennett, R. H., & MacKearn, T. J. (1982). *Monoclonal antibodies*. Springer.
- Kozbor, D., & Roder, J. C. (1983). The production of monoclonal antibodies from

- human lymphocytes. *Immunology Today*, 4(3), 72–79.
- Kumai, T., Kobayashi, H., Harabuchi, Y., & Celis, E. (2017). Peptide vaccines in cancer — old concept revisited. *Current Opinion in Immunology*, 45, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.11.001>
- Lanka, S., City, R., Ridley, G., Siddiqui, W. A., Briggs, S., Chulay, J., ... Held, J. R. (1988). *Role of non-human primates in malaria vaccine development: Memorandum from a WHO Meeting* (Vol. 66).
- Lesley, J., Hyman, R., & Kincade, P. W. (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. In *Advances in immunology* (Vol. 54, pp. 271–335). Elsevier.
- Li, W., Joshi, M., Singhanian, S., Ramsey, K., & Murthy, A. (2014). Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines*, 2(3), 515–536. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>
- Loré, K. (2004). Isolation and Immunophenotyping of Human and Rhesus Macaque Dendritic Cells. In *Methods in cell biology* (Vol. 75, pp. 623–642).
- Manego, R. Z., Mombo-Ngoma, G., Witte, M., Held, J., Gmeiner, M., Gebru, T., ... Matsiegui, P. B. (2017). Demography, maternal health and the epidemiology of malaria and other major infectious diseases in the rural department Tsamba-Magotsi, Ngounie Province, in central African Gabon. *BMC Public Health*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4045-x>
- Marasco, W. A., & Sui, J. (2007). The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nature Biotechnology*, 25(12), 1421.
- Menezes, R. G., Pant, S., Kanchan, T., Senthilkumaran, S., Kharoshah, M. A., Naik, R., ... Fazil, A. (2012). Malaria: An Infection with Global Impact. In *Malaria: Etiology, Pathogenesis and Treatments* (pp. 97–125).
- Nardin, E. H., Oliveira, G. A., Calvo-Calle, J. M., Castro, Z. R., Nussenzweig, R. S., Schmeckpeper, B., ... Edelman, R. (2002). Synthetic Malaria Peptide Vaccine Elicits High Levels of Antibodies in Vaccinees of Defined HLA Genotypes. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(5), 1486–1496. <https://doi.org/10.1086/315871>
- National Research Council. (2011). *Guide For The Care and Use of Laboratory Animals*.

- Nunn, C., Altizer, S., & Altizer, S. M. (2006). *Infectious diseases in primates: behavior, ecology and evolution*. Oxford University Press.
- Oboh, M. A., Ndiaye, D., Badiane, A. S., Singh, U. S., Antony, H. A., Ali, N. A., ... Das, A. (2018). Molecular epidemiology and evolution of drug-resistant genes in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* in southwestern Nigeria. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.007>
- Oyarzun, P., & Kobe, B. (2015). Computer-aided design of T-cell epitope-based vaccines: addressing population coverage. *International Journal of Immunogenetics*, 42, 313–321. <https://doi.org/10.1111/iji.12214>
- Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A., & Jenkins, M. K. (2007). The Humoral Immune Response Is Initiated in Lymph Nodes by B Cells that Acquire Soluble Antigen Directly in the Follicles. *Cell*, 26(April), 491–502. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.011>
- Patarroyo, M. E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., ... Ponton, G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 332(6160), 158.
- Patarroyo, M. E., Patarroyo, M. A., Pabón, L., Curtidor, H., & Poloche, L. A. (2015). Immune protection-inducing protein structures (IMPIPS) against malaria: The weapons needed for beating Odysseus. *Vaccine*, 33(52), 7525–7537. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.109>
- Pohanka, M. (2009). Monoclonal and polyclonal antibodies production-preparation of potent biorecognition element. *Journal of Applied Biomedicina*, 7, 115–121. Retrieved from http://www.zsf.jcu.cz/jab/7_3/pohanka.pdf
- Porto, J. M. D., Haberman, A. M., Kelsoe, G., & Shlomchik, M. J. (2002). Very Low Affinity B Cells Form Germinal Centers, Become Memory B Cells, and Participate in Secondary Immune Responses When Higher Affinity Competition Is Reduced. *J. Exp. Med (c) The Rockefeller University Press*, 195(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20011550>
- Puré Ellen, C. C. (2018). A crucial role for CD44 in inflammation Ellen Pur é and Carolyn A . Cuff. *Trends in Molecular Medicine*, 4914(July), 1–10.

[https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)01963-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)01963-3)

- Rahman, Z. S. M., Rao, S. P., Kalled, S. L., & Manser, T. (2003). Normal Induction but Attenuated Progression of Germinal Center Responses in BAFF and BAFF-R Signaling – Deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 1–13. <https://doi.org/10.1084/jem.20030495>
- Raman, V. S., Bal, V., & Rath, S. (2019). Ligation of CD27 on Murine B Cells Responding to T-Dependent and T-Independent Stimuli Inhibits the Generation of Plasma Cells. *The Journal of Immunology*, 165, 6809–6815. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.6809>
- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0688-1>
- Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., & Mark, A. E. (2002). Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol watermixtures 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.
- Sall, A., Walle, M., Wingren, C., Muller, S., Nyman, T., Vala, A., ... Persson, H. (2016). Generation and analyses of human synthetic antibody libraries and their application for protein microarrays. *Protein Engineering Design & Selection*, 29(10), 427–437. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw042>
- Schneider, M. V, & Orchard, S. (2011). Omics technologies, data and bioinformatics principles. In *Bioinformatics for omics Data* (pp. 3–30). Springer.
- Sette, A., & Nielsen, M. (2012). NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics*, 61(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00251-008-0341-z>
- Shinta, S. (2012). Kemungkinan malaria primata sebagai masalah zoonosis. *Media of Health Research and Development*, 11(3 Sept). Retrieved from <https://doaj.org/article/8c628780208b4536a420200121f2801a>
- Shukla, A. A., Wolfe, L. S., Mostafa, S. S., & Norman, C. (2017). Evolving trends in

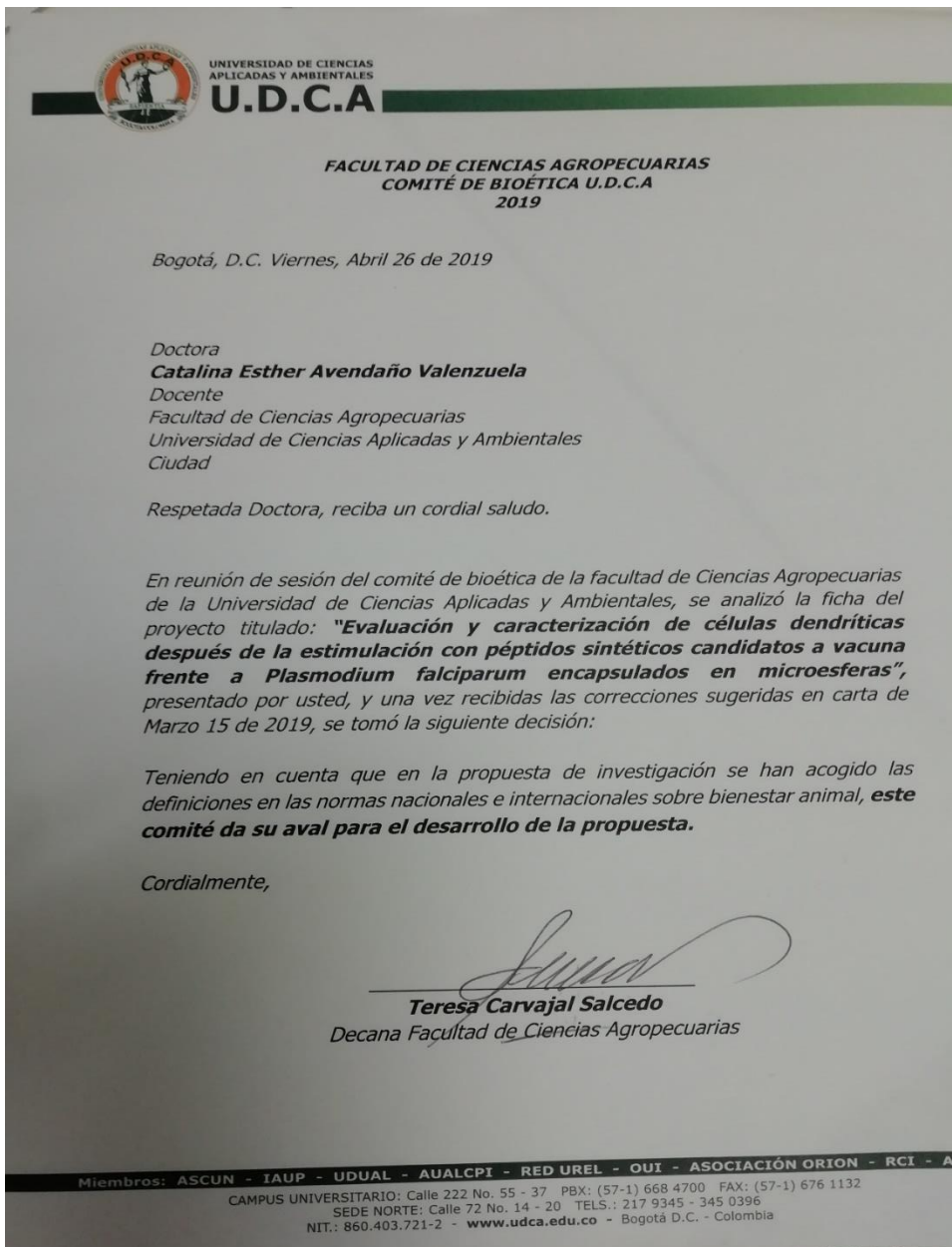
- mAb production processes. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2(1), 58–69. <https://doi.org/10.1002/btm2.10061>
- Shulman, M., Wilde, C. D., & Köhler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, 276(5685), 269.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings of the 8th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175–182. <https://doi.org/9783223>
- Soria-guerra, R. E., Nieto-gomez, R., Govea-alonso, D. O., & Rosales-mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction : Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
- Surh, C. D., & Sprent, J. (2008). Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*, 29(6), 848–862. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002>
- Tazi, L., & Ayala, F. J. (2011). Unresolved direction of host transfer of Plasmodium vivax v. P. simium and P. malariae v. P. brasilianum. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.08.007>
- Tiller, T. (2011). Single B cell antibody technologies. *New Biotechnology*, 28(5), 453–457. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.014>
- Tomar, N., & De, R. K. (2010). Immunoinformatics : an integrated scenario. *Immunology*, 131, 153–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03330.x>
- Wipasa, J., Suphavitai, C., Okell, L. C., Cook, J., Corran, P. H., Thaikla, K., ... Hafalla, J. C. R. (2010). Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000770.
- World Health Organization. (2018). *World Malaria Report, 2018*.
- Xiao, Y., Hendriks, J., Langerak, P., & Jacobs, H. (2019). CD27 Is Acquired by Primed B Cells at the Centroblast Stage and Promotes Germinal Center Formation. *The Journal of Immunology*, 172, 7432–7441. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7432>
- Xu, Y., Beavitt, S.-J. E., Harder, K. W., Hibbs, M. L., & Tarlinton, D. M. (2002). The

activation and subsequent regulatory roles of Lyn and CD19 after B cell receptor ligation are independent. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6910–6918.

12 ANEXOS

Anexo 1 : Comité de ética.

Carta de aprobación del proyecto como parte del macroproyecto "Evaluación y caracterización de las células dendríticas después de la estimulación con péptidos sintéticos candidatos a vacuna frente a *Plasmodium falciparum* encapsulados en microesferas"



Anexo 2: Propuesta de artículo para sometimiento a la revista.

Monoclonal Antibodies for the Tracking of *Aotus spp.* Memory T and B Cells

Jenner Rodrigo Cubides¹, Diana Díaz^{1,2}, Catalina Avendaño³, Barbara Ymaña-Gonzales², Daniel Roeth⁴, Markus Kalkum⁴, Manuel Elkin Patarroyo^{2,5}, and Manuel Alfonso Patarroyo^{1,2}.

- 1.Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia
- 2.Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Bogotá, Colombia.
- 3.Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá, Colombia
- 4.Beckman Research Institute. City of Hope. Pasadena, CA.
- 5.Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Abstract

Even though several malaria vaccine candidates are currently in clinical phase 2, and 3 trials, their mechanisms of immune protection are not fully understood, and durations of vaccine protection are largely unknown. The *Aotus* monkey model has been recommended by the World Health Organization for the study of malaria vaccine candidates because of strong similarities to pathology and genetic background observed in humans. However, the lack of antibodies specific for molecular surface markers of immune cells in *Aotus* have delayed advances in malaria research. Among commercial monoclonal antibodies (mAbs) for human CD19+, CD27+ B cell and CD4+, CD45RO+ memory T cell molecular markers, only those of the clone SK3 recognized *Aotus* CD4 T cells. Here, bioinformatics approaches were used to design antigenic peptides that correspond to the extracellular regions of the membrane proteins CD19, CD27, CD4, and CD45RO, to produce mAbs. 1746 resulting hybridoma clones recognized molecular surface markers of immune cells by flow cytometry and 30% of them bond to the synthetic peptide by ELISA. The mAbs, CD194G12A3G3, CD275F11C11, CD45H3D10, and CD45RO3A8G1 bound to 17.7%, 40.1%, 27.4 and 51% of the *Aotus*' PBMCs with high affinity ($\square 100$ ng/106 cells) but displayed only medium affinity to human cells ($\square 300$ ng/106 cells) in FACS analyses. Double staining of B and T cells showed that the mAbs CD194G12A3G3 and CD275F11C11 recognized 15.9%, and CD45H3D10 and CD45RO3A8G1 bound to 20.6% of *Aotus*' PBMCs, suggesting that the mAbs recognized membrane protein markers of memory B and T cells. These mAbs are useful for the identification and tracking of memory cells in the *Aotus* model to elucidate which human immune cells may mediate protection against malaria.

Introduction

The principle etiological agent of malaria is a parasitic protist of the genus *Plasmodium*. Completion of its life cycle requires vertebrate or invertebrate hosts (1). The parasite has the capacity to infect a wide range of animals, including non-human primates (NHPs), humans, reptiles, birds and rodents. The four main species that are recognized as human pathogens include *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax*. A fifth species that has emerged in recent years to infect humans is *Plasmodium knowlesi*, which in the past was wrongly diagnosed as *Plasmodium malarie*, due to morphological similarity (2, 3).

By estimation, 219 million cases of malaria occurred world-wide in 2017 (CI 95% 203-262). The majority of these cases were registered in Africa (92%), followed by Southeast Asia (5%), and the Eastern Mediterranean (2%). Within the same year, approximately 435 thousand deaths resulted from malaria; with 93% of the fatalities in Africa alone. While a decreasing trend of disease fatalities was observed for Africa, Southeast Asia, and the East Pacific, an increase in the malaria death rate was noted in the Americas. The most prevalent parasite in sub-Saharan Africa was *P. falciparum*; responsible for 99.7% estimated malaria cases in 2017. The population of infants below the age of five is by far most vulnerable to the infection, suffering up to 61% of malaria-related deaths world-wide (266,000 cases). *P. vivax* is the second parasite most prevalent of infection in malaria with global estimated of 3.4%. It is distributed at South-East Asia region (37% of cases), Eastern Mediterranean region (31%) and predominant in the Americas region (74% of cases) (3).

There are no approved vaccines against *P. falciparum* and *P. vivax*, despite the research efforts of the last decades. RTS,S/AS01 is the only vaccine candidate that has advanced to phase-3 clinical trials. This vaccine contains a recombinant fusion protein that consists of a part of the circumsporozoite protein (CSP) of *P. falciparum*, the viral envelope of the hepatitis B virus (HBsAg), and the AS01 adjuvant (4). It has been administered to thousands of people (including children) in various parts of the world, however the vaccine efficacy during 7 years after the last vaccination was reduced, to -2.4% (95% CI, -26.1 to 16.8) in high endemic regions (5). It had been hypothesized that the vaccine efficacy waned after the third year due that the vaccine only protects against the pre-erythrocyte stage by antibodies, preventing the liver cell sporozoite invasion but does not induce immunity against the

erythrocyte stage, responsible for clinical malaria. However, other studies had reported high titer of IgG antibody responses to only 4 proteins including CSP (sporozoites: 2, trophozoite:1 and schizonts:1) but low titers of antibody responses to a wide range of Pf antigens, that appear to be of short duration (6, 7). The immunological mechanisms by which it induces protection are not completely understood. The results obtained indicated that the vaccine cannot induce life-long memory T cells and B cells.

Following malarial stimulation, naïve B-cells give rise to memory B-cells and antibody-secreting plasma cells. However, these plasma cells survive for months or year in humans, generating short-term memory. Plasma cells are not all long-lived; they may subdivide into two different groups, the first characterized by their extra-follicular localization and short-lived cells and the second considers long-lived plasma cells and are localized in the bone marrow (8, 9). Consequently, these long-lived immune cells play a key role in maintaining serum antibody levels and CD4+ T helper memory cells to conserve recognition of *P. falciparum*. The production of long-lived plasma cells is an important issue for the protection against malaria and should be systematically investigated for malaria vaccine candidates. An ideal vaccine against malaria should generate long-lived plasma cells, CD4+ and CD8+ T cells.

Plasmodium has great potential to move and adapt from NHP to human models. *P. falciparum*'s origin has been determined recently and African apes have been identified as a probable reservoir. Different species of *Plasmodium* have been identified in gorillas, baboons and chimpanzees (10, 11). Some New World monkeys are susceptible to *P. falciparum*, *P. malarie* and *P. vivax* infection. Such correlation between humans and NHP, making them models of choice for studying human malaria as well as biomedical research (12). Using NHP models have been proposed due to their similarity with humans in terms of their physiology, immune system, neuroanatomy, reproduction, cognitive development and social structure (10).

The choice of NHP model depends on the nature of the pathogen being studied, its adaptability in the chosen model and the reproducibility of the results regarding the target species. Similarities between humans and this model suggest that data obtained from NHP should have great validity compared to other animal models (10). The NHP model has been a fundamental tool in understanding *Plasmodium* biology for decades now, the pathogenesis of malaria, preclinical research, developing new pharmacological challenges and new interventions (1).

NHP and human models' phylogenetic closeness makes these animals an excellent model for studying a broad range of biological phenomena. The World Health Organization recommends primates from the genera *Aotus* and *Saimiri* as experimental models for studying malaria since they develop reproducible parasitemia when inoculated with *P. vivax* or *P. falciparum* blood or sporozoite (Spz) stages. This means that they are ideal for studying the pathogenesis of malaria as well as preclinical studies regarding potential vaccines for controlling malaria (13-15). Preclinical evaluations in NHP experimental models can provide valuable information concerning the immunogenicity, efficacy and safety of a series of compounds and formulations as a prior step to their use in humans (11). Owl monkeys' immune system molecules (MHCII-DRB, IGKV, Vγ9Vδ2 T-cells, MHC-DPB1, MHC DQA and DQB, T-cell receptor alpha V, J, and C genes, T-cell receptor γ-variable gene and CD45 phosphatase) have been described and characterised in an effort to design and test a synthetic antimalarial vaccine (16-29). Such studies have demonstrated that *Aotus* monkeys have an immune system having significant structural and functional characteristics in common with the human immune system.

The lack of reagents and tools for evaluating a primate's immune system response represents a limitation regarding the use of NHP models, especially when the aim is to evaluate the immune response of memory T- and B-lymphocytes' surface antigens. This study describes the production of mAb against *Aotus*' B- and T-cell memory markers using synthetic peptides derived from CD19, CD27 (memory B-cells) CD4 and CD45RO (memory T-cells). Identifying such cells will help in understanding protection-inducing immune responses induced by antimalarial vaccine candidates in NHP models.

Results

Anti-human monoclonal antibodies' reactivity to *Aotus* proteins

Anti-human mAbs were tested against *Aotus*' PBMCs cells; human PBMCs were used as control. The SK3 anti-human CD4 clone reacted with *Aotus* peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and was used as positive control; however, anti-human CD27 O323, anti-human CD45RO UCHL1 and anti-human CD19 4G7 clones did not react with them. All clones reacted positively with human cells (Figure 1A and 1B). Other studies have tested commercial antibodies; however, none of them have reacted with *Aotus* cells (30-32).

Predicting high binding B-cell epitopes in silico

It was decided to produce mAbs using an in silico approach for finding extracellular B-cell epitopes due to missing antibodies which would have recognised *Aotus* cells.

Aotus nancymaae CD27 (access number XP_012328288.1), CD19 (XP_012320028.1), CD4 (AKM95886.1) and CD45RO (XP_012315003.1) proteins' predicted B- and T-cell epitopes were obtained from the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=Aotus+nancymaae+genome>). The sequences were used for predicting the extracellular domain, signal peptide and B-epitope (Table 1).

CD45RO (low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) type-C receptor) was analysed from a DNA sequence, since the CD45RO sequence was not available when designing the peptides. Previous studies have shown that CD45RO is a

CD45splice variant, lacking exons 4, 5 and 6 (33, 34); exons 4, 5 and 6 were thus removed from the RNA sequence and translated into amino acids (aa) for obtaining the (extracellular) 144-ENPTSPITDSTHETITLSPSGSTAHS-175 peptide (Supplementary Figure 1, Table 2).

Mouse immunogenicity

FACS and ELISA analysis of immunized mice sera revealed complex antibody responses with the synthetic peptides. Sera reactivity by ELISA after the second and third immunizations revealed CD27A (1:12.800), CD19A (1:600), CD4 (1:12.800), CD27 (1:400), CD4A (1:200) and CD45RO mixed titers (only mouse CD45RO.21, 1:200; the other 2 were negative) (Fig. 2A). However, mouse sera reactivity with Aotus' PBMCs by FACs gave CD27A (36.1%), CD27 (35.7%), CD19A (12.6%), CD19 (43.6%), CD4A (26.6%), CD4 (38.7%) and CD45RO (28.8%) (Figure 2B). The mice selected for producing the mAbs were chosen for their positive reactivity by FACS and ELISA analysis. Positive cut-off threshold was taken as being twice the standard deviation for pre-immune sera by ELISA. The best reactivities (by FACS) with the Aotus sub-population being studied were selected, bearing in mind that the mice selected to fusion the spleen cells with myeloma (PAI) were CD27.6, CD19.12, CD4A.16 and CD45RO.21.

Generating and characterizing memory B- and T-cell mAb protein markers

One thousand, seven hundred and forty-six mAbs were produced from immunized mice, containing 417 positive clones for CD19, 354 for CD4, 760 for CD27 and 215 for CD45RO; these mAbs recognized the peptides or cells by ELISA or FACS, or both. The 3C7C11B2, 3C7G3H4F4 and 4G12G2D5 clones were the best mAbs for detecting CD19 on live cells after three and four cloning's by limiting dilution. CD4 was recognised by clone 5H3D10, this being the only clone which reacted with the protein and peptide by ELISA, FACS and immunofluorescence. CD27 was recognised by 5F11C11, 5E9D4, 2F7F9 and 2F7F1 and CD45RO by 3A8G1.

One mAb was selected for each protein to continue characterising the cells: CD194G12A3G3, CD45H3D10, CD275F11C11 and CD45RO3A8G1. The mAbs were tested against human and Aotus cells; only mAb CD275F11C11 did not recognise the human cells (Figure 1A, Figure 1B). There was 31.5% human cell recognition by mAb CD194G12A3G3, 24.1% by CD45H3D10 and 22% by CD45RO3A8G1 (Figure 1C), thereby confirming Aotus monkeys' immunological proteins' close identity with those of humans.

Confirming mAb reactivity with CD4, CD19 and CD45RO proteins

Human cells were stained with anti-human antibodies and the specific mAb for each protein to know whether the mAbs recognised the correct proteins. Aotus cells were stained with mAb CD45H3D10 and anti-human CD4 which recognised 28% of the same population (double positive); however, mAb CD45H3D10 recognised 4% of the population which was not recognised by anti-human CD4 (Figure 3A). Such reactivity may have been due to some monocytes having receptors binding to antibodies' fragment crystallisable (Fc) region.

Human cells were labelled with mAb CD194G12A3G3-anti-human CD19 and mAb CD45RO3A8G1-anti-human CD45RO. The CD19 sub-population was recognised by both antibodies, but 11% of cells were only recognised by anti-human CD19 antibody. However, the tailor-made mAb reacted with the CD19 human population (Figure 3B). The CD45RO3A8G1 mAb recognised 22% of the human cell population (Figure 3C); however, mAb reactivity decreased to 8.73% when this mAb was used in combination with commercial anti-human CD45 (Figure 3C). The commercial antibody could have had higher affinity for CD45RO than CD45RO3A8G1. It is known that UCHL1 binding to CD45RO depends on aa O-glycosylation, especially asparagine 174 and serine 176, encoded in the junction of exon 3 and exon 7. Sialic acid is also necessary for this commercial mAb's reactivity (35).

Mass spectrometry was used for confirming CD45RO3A8G1 reactivity with CD45RO. Aotus CD45RO was purified after passing Aotus PBMCs membrane proteins through a CD45RO3A8G1-sepharose column; they were separated from contaminant proteins by native SDS-PAGE. Peptide fingerprinting and MS data identified the Aotus vociferans CD45 short form (GenBank accession number: AAS069031) having 27 peptide-long sequence coverage (Supplementary Table 1). Taking mass spectrometry results and the FACS analysis together, it is highly probable that CD45RO3A8G1 recognised Aotus CD45RO.

Memory B- and T-cell staining

Aotus PBMCs were double labelled with mAbs for recognising CD45RO+ (PB) labelled lymphocytes and, simultaneously, with CD4+ (FIT-C) to differentiate the cell lines. This led to identifying CD4+ (36.4% of total lymphocytes) and CD45RO+ populations (45.7%), as well as a double labelled CD4+ and CD45RO+ memory T-cell population (16.3%) (Figure 4A). CD 27+ (PB) (28.3% total Aotus PBM) and CD19+ (PE) (18.9% PBMCs) labelled lymphocytes were also recognised. A double labelled CD27+ and CD19+ memory B-cell population was also identified (16.0%) (Figure 4B).

Discussion

The disease produced by obligate eukaryotic parasites from the genus *Plasmodium* continues being a neglected pathology regarding public health in developing countries and takes a substantial amount of lives per year, especially regarding children, i.e. one child every 30 seconds, meaning about 3,000 children every day (36). Worldwide efforts in the search for an effective vaccine (as a significant mechanism for controlling the disease) have been limited by the parasite's tremendous genetic variability, as well as its mechanisms for evading the immune response when exposed to vaccine candidates.

The need for an optimal experimentation model for vaccine development as a step prior to human experimentation represents another limitation, from an ethical point of view. The WHO recommends the Aotus monkey model. However, the lack of cellular immunology-related tools has hindered immune response detection, evaluation and quantification in preclinical studies of malaria vaccine candidates, as well as advances in vaccine development. Immune system cells secrete cytokines which play a significant role in malarial invasion and development and disease transmission; it is worth mentioning that cytokines secreted by long-lived memory cells also contribute towards protection.

Developing specific tools aimed at detecting and quantifying these molecules and memory cells' membrane proteins enables important information to be provided about the physio-pathological and immunological changes occurring during the NHP model's infection phase. They can also help in evaluating an immune response arising from immunisation with vaccine candidates with a view to developing a protective response against malaria (32).

Developing reagents which react with expression antigens regarding lymphocyte differentiation in the Aotus model has been slow compared to progress in obtaining reagents in humans and the murine model. These limitations have restricted researchers to developing specific reagents represented in many species; this is why mAb cross-reactivity studies have taken advantage of certain protein sequences' homology and identity between different species, offering an alternative approach regarding the detection of new reagents for less characterised species (37).

Saalmuller et al., (2007) determined widespread cross-reactivity overcoming mAb reactivity with a wide range of cluster differentiation (CD) antigens amongst species (NHP, ruminants, equines, carnivores, rabbits, guinea pig, chicken and fish), indicating a high degree of epitope conservation on lymphocyte surface during CD9, CD11, CD14, CD18, Cd21, CD29, Cd44, CD45, CD49d; CD61, CD86, CD921 and CD172a evolution.

Hoglund et al., 2016, made a systematic evaluation of human mAbs for detecting interferon gamma and interleukin-2 in old (Rhesus, cynomolgus, pigtail macaques, African Green monkey, baboon) and New World NHP (Ma's night monkey, squirrel monkey, common marmoset). They found mAb panreactivity, recognising cytokines from all NHP species which were subsequently analysed in capture assays and flow cytometry with PBMC (31).

The present study has reported producing 4 new mAbs for the specific recognition of surface antigens (CD) for evaluating long-term immunological memory for T- (CD4+, CD45RO+) and B-lymphocytes (CD19+, CD27+) in *Aotus nancymae* PBMC. Anti-human mAbs were tested against these proteins but only SK3 reacted to Aotus CD4 cells; the other 3 proteins were not recognised by the anti-human mAbs (30, 32). Although Daubenberger et al., found that the anti-human CD45RO (UCHL1) antibody recognised Aotus cells with low affinity, the present study could not reproduce this result. The loss of mAb CD45RO3A8G1 reactivity with human cells in double staining with mAb UCHL1 could have been due to the lack of glycosylation of the peptide used for immunisation and a different aa sequence (58% identity).

The mAbs produced when adopting this approach had high affinity for Aotus cells and 3 of them (CD194G12A3G3, CD45H3D10 and CD45RO3A8G1) also had a medium affinity reaction with human cells. CD275F11C11 did not recognise the human cells, although identity with the peptide was 86%. The 3 aa in human cells (positions P173R, A175L and A181P) or one of them could be critical for antibody hypervariable region binding to human cells.

One of the problems associated with antimalarial vaccine candidates is inducing short-lived memory cells; this requires repeat immunisations, becoming problematic in developing countries' rural areas where access to health centres or hospitals is difficult. The Fundacion Instituto de Inmunologia de Colombia (FIDIC) has been studying synthetic peptide-based vaccine candidates from the conserved regions of the proteins which the parasite uses to invade target cells. Such peptides must be modified to bind with high affinity to specific MHCII (38, 39); however, the long-lived memory responses involved in this are not known. The mAbs produced here could enable memory cells (T and B-cells) to be ascertained after one year, checking their immune responses reacting with immunised peptides and the parasite. The mAbs produced here should provide a good tool for identifying long-lived immune memory cells in the Aotus model and predicting human immune responses and protection.

Materials and Methods

Ethical considerations

BALB/c mice were maintained according to that laid down by Law 84/1989, Colombia Ministry of Health Resolution 8430/1993 (40, 41), the US National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition) (2011) (42) and the American Veterinary Medical Association's (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals (June 2007) (43). The Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA) Agricultural Sciences Faculty's Bioethics Committee approved this study. Two milliliters of blood were collected from 40 healthy adult Aotus monkeys in 4 ml heparinised Vacutainer tubes (BD Biosciences).

FIDIC's primate station in Leticia, Amazonas, Colombia was used for the monkey experiments, in compliance with animal care regulations laid down by the Colombian Ministry of Health (Law 84/1989) and Colombian Institute of Health regulations for animal care, monitored weekly by CORPOAMAZONIA (resolutions 0202/1999 and 0028/2010). This study was approved by UDCA's Health Research Ethics Committee and FIDIC's Primate Station Ethics Committee. Human samples were collected from healthy adults residing in Bogotá, Colombia. This study was performed according to the legal framework for research in Colombia and the Colombian Ministry of Health's Resolution 8430/1993. The patients were at least risk; all data was kept confidential and rigorously protected.

In silico prediction of peptide sequences

The sequences described in GenBank for Aotus nancymae proteins CD4 (AKM_95886.1) and CD45RO (XP_012315003.1) were taken as memory T-cell markers and CD19 (XP_012320028.1) and CD27 (XP_012328288.1) sequences as memory B-cell markers for designing the peptides used in murine model immunisations. The TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) transmembrane protein localization prediction tool was then used for determining a protein of interest's extra-membrane sequences to which an antibody would bind (by predictions based on the hidden Markov model) (44).

The Signal IP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP>) was then used for predicting signal peptide presence and localization in a protein of interest's aa sequence (Supplementary Figure 1.). The signal peptide's sequence was then eliminated from the bioinformatics prediction phase. IEDB Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/bcell/>) software, using the BepiPred Linear Epitope Prediction model, was used for predicting B-epitopes after determining a protein's extra-membrane aa sequences and removing the peptide signal.

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) was then used for aligning the epitopes' predicted peptide sequences with *Mus musculus* and *Homo Sapiens* CD protein homologous sequences described in GenBank for determining their homology and identity. Predicted epitope sequences having less than 50% identity with *Mus musculus* were selected for being synthesized for immunising the mice (Table 3).

Peptide synthesis

The multiple-solid-phase system, using the tert-butoxycarbonyl (t-Boc) approach, was used for chemically synthesizing the selected epitopes' peptide sequences (45). The peptides were hydrolysed with TFA/TIS/H₂O (95%/2.5%/2.5%), purified by RP-HPLC, lyophilised and then analyzed by MALDI-TOF, thereby confirming their molecular weight. Circular dichroism was also used; the spectrum was recorded at 20°C by Jasco J-815 spectropolarimeter coupled to a Peltier PFD-425S system for temperature control. 0.1 mg/mL peptide solutions were used at differing 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) percentages (46). The spectra were recorded at 195 a 260 nm, using a 1 mm quartz cell (parameters: 100 nm / min exploration speed, 0.2 nm data pitch, 2s response, 1 nm bandwidth and 3 scans) (47).

Mouse immunisation

Seven groups (3 mice per group) of BALB/c female mice were subcutaneously immunized three times, two weeks apart, with 30 µg synthetic peptides (Table 2) coupled to keyhole limpet haemocyanin (KLH) (Sigma Aldrich cat: H7017) suspended in Sigma Adjuvant System oil-in-water emulsion (Sigma Aldrich cat: S6322). All synthetic peptides (7) were individually coupled to the KLH carrier using glutaraldehyde as coupling agent (48). Mice were sacrificed one month after the last immunization peptide without adjuvant was administered on days 5 and 4 before to obtain the splenocytes needed for mAb-secreting hybridoma production.

The mice chosen for mAb production were anaesthetised with ketamine+xylazine and then humanely sacrificed, following AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (42).

Measuring immunogenicity

Antibodies specific for each CD protein were analyzed 14 days after the second immunization by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Nunc MaxiSorp uncoated flat-bottom 96-well ELISA plates (BioLegend, Cat: 423501), coated with the synthetic peptides (1.0 µg/well). The plates were incubated (2 h at 22°C) with 1:100 dilution of mouse sera diluted in PBS with skimmed milk (5.0%). Specific antibodies were detected using alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma Aldrich, Cat: SAB3701085) as secondary antibody and p-nitrophenyl phosphate, disodium salt (PNPP) was used as substrate.

FACS analysis involved using the mAbs obtained against memory cell protein markers for Aotus spp. and human PBMCs. Mouse sera or hybridoma supernatants were incubated for 2 hours at room temperature (RT); fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was used for developing the reaction. Labelled mAbs were incubated for 30 min at 4°C and the positive population was evaluated by FACSCanto II cytometer (BD, Biosciences) and FlowJo V10 software.

Generating mAbs

Spleen cells were isolated and fused with myeloma PAI cells (non-antibody producer), kindly provided as a gift by Professor Gerd Pluschke from the Swiss Tropical Institute, Basel, Switzerland, using 50% polyethylene glycol (MW 1,400-1,800, Sigma Aldrich cat: 10783641001) (49). The hybridoma cells were suspended in hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT) medium with 20% fetal bovine serum (FBS) and distributed 1,000,000 cells/mL on 96-well plates. The antibodies were selected for their positive reactivity to Aotus spp. cells using flow cytometry. The selected positive clones were also tested by ELISA and immunoprecipitation (IP).

Labelled monoclonal antibody

CD27 (5F11C11), CD19 (4G12A3G3), CD4 (5H3D10), and CD45RO (3A8G1) mAbs which had high affinity for membrane proteins by FACS were produced and purified by affinity chromatography using HiTrap Protein G HP antibody purification columns (GE Healthcare Life Science; cat: 17040401). 5F11C11 (CD27) and 3A8G1 (CD45RO) mAbs were labelled with Pacific Blue Succinimidyl Ester (Thermo Fisher Scientific; Cat: P10163), 5H3D10 (CD4) with fluorescein isothiocyanate isomer I (Sigma Aldrich, Cat: F7250) and 4G12A3G3 with rhodamine B isothiocyanate (Sigma Aldrich, Cat: 283924), as per manufacturer's protocols.

Anti-human antibodies' reactivity against cluster differentiation markers

Human and Aotus cells were stained with the tailor-made mAbs and commercially labelled antibodies (anti-human CD27-Pacific Blue (BioLegend, Cat:O323), anti-human CD4-PerCP (BD Biosciences, Cat:347324), anti-human CD45RO-PerCP (BD Biosciences, Cat: 555494 and anti-human CD19-FITC (BD Biosciences, Cat: 340864) to confirm mAb reactivity with CD27, CD19, CD4 and CD45RO. The tailor-made mAbs and commercial antibodies were incubated for 30 min at 4°C, then washed and analysed by FACSCanto II cytometer (BD, Biosciences) using FlowJo V10 software.

Furthermore, 1 mg 3A8G1 (CD45RO) mAb was purified for immunoprecipitation of recognised protein. The mAb was covalently coupled with cyanogen-bromide (CNBr)-activated sepharose beads, following the manufacturer's instructions. Sixty-seven million Aotus spp. peripheral blood cells were isolated/obtained following a Ficoll-Hypaque density gradient spinning. These cells were lysed using RIPA Lysis and Extraction Buffer (Sigma-Aldrich, Cat. R0278). Membrane proteins were incubated overnight at 4°C with sepharose-coupled mAbs; proteins recognised by the mAbs were eluted with 0.1% TFA. These proteins were subjected to electrophoresis with 8% polyacrylamide gel. The gel was stained with colloidal Coomassie and the bands of interest were sequenced by mass spectrometry.

Mass spectrometry identification of proteins

Gel bands were cut out from the polyacrylamide gels stained with 50% acetonitrile and 100 mM ammonium bicarbonate. Proteins were reduced in 10 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (Pierce) and 50 mM ammonium bicarbonate. Iodoacetamide (IAM) was used for alkylation, followed by 8 h digestion with trypsin at 37°C. Markus or Daniel protocol (Ref)

Table 1. Predicting B-cell epitopes' high binding *in silico*

Protein	Length (aa)	Signal peptide (aa)	B-cell epitope sequence
CD27	260	20	168- QLPAPTPSTHWPAQRSLC SSD-188
CD19	559	21	98-CQPGPPSEK PWQPGWTVSVEGS-119
CD4	457	25	144- ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQLE-175

Table 2. Peptides designed *in silico* by TMHMM, signal peptide and IEDB

Protein	Peptide	Sequence
CD27AAona	39852	KECTECDPPPD TLLTQLSKALDPHLQ
CD27Aona	39853	QLPAPT PSTHWPAQRSLC SSD
CD19AAona	39854	CGLENRSSEG PSSPSGNLMSSQLYIWAKDRPK
CD19Aona	39855	CQPGPPSEK PWQPGWTVSVEGS
CD4AAona	39856	ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKTLVSQLE
CD4Aona	39857	VVVLAFQQASSTVYKKEGEQV
<i>CD45ROAona</i>	<i>39858</i>	<i>ENPTSPTDSHASETITLSPSGSSAHS*</i>

*The CD45RO peptide was obtained after removing exons 4, 5 and 6 from the complete CD45 sequence.

Table 3. Predicting memory B- and T-cell epitopes

Species	Access number	AA position	CD4
<i>Aotus nancymaae</i>	AKM95886.1	144-175	ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQLE
<i>Homo sapiens</i>	AAB51309.1	144-175	ESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGCKILSVSQLE
<i>Mus musculus</i>	AAA37402.1	147-179	DSNSKVSINPLTECKHKKGKVVSGSKVLSMSNLR
Selected peptide			ESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKTLVSQLE

Species	Access number	AA position	CD45RO
<i>Aotus nancymaae</i>	XP_012315003.1	26-50	ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTAHS
<i>Homo sapiens</i>	NP_563578.2	26-54	QSPTPSPTDAYLNASETITLSPSGSAVIS
<i>Mus musculus</i>	NP_035340.3	26-53	QTPTPSDGASLTTLTPSTLGLASTDPPS
Selected peptide			ENPTSPTTDSHASETITLSPSGSSAHS

Species	Access number	AA position	CD19
<i>Aotus nancymaae</i>	XP_012320028.1	98-119	CQPGPPSEKPWQPGWTVSVEGS
<i>Homo sapiens</i>	NP_001171569.1	97-118	CQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGS

<i>Mus musculus</i>	EDL17351.1	97-118	CQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDS
Selected peptide			CQPGPPSEKPWQPGWTVSVEGS

Species	Access number	AA position	CD27
<i>Aotus nancymae</i>	XP_012328288.1	168-188	QLPAPTPSTHWPAQRSLC SSD
<i>Homo sapiens</i>	XP_016875721.1	168-188	QLPARTLSTHWPTQRSLC SSD
<i>Mus musculus</i>	AAI39126.1	158-179	QLPNSTVYSQRSSHRPLC SSD
Selected peptide			QLPAPTPSTHWPAQRSLC SSD

The peptides were selected from the extracellular domains without membrane proteins' signal peptides as memory B- and T-cell markers. The letters highlighted in green show substitution in the *Homo sapiens* sequence and yellow in the *Mus musculus* sequence compared to that for *Aotus* spp.

Figure 1. Anti-human antibodies reactivity against *Aotus* and human cells. 1A. *Aotus* cells stained with anti-human CD4-PerCP, anti-human CD27-Pacific Blue, anti-human CD19 FITC and anti-human CD45-Pe Cy5. 1B. Human cells used as positive control for the human mAbs. 1C. Tailor-made mAbs (CD45H3D10, CD275F11C11, CD194G12A3G3, and CD45RO3A8G1) at 0.4 µg concentration per antibody.

Figure 2. Mouse sera reactivity against synthetic peptides and *Aotus* cells. 2A. ELISA analysis of antibody reactivity with synthetic peptides. The mouse sera were diluted 1:100. 2B. FACS analysis of serum reactivity with *Aotus* cells; anti-mouse-FITC was used 1:100. ELISA: the numbers below the X axis refer to each immunised mouse.

Figure 3. Indirect confirmation of monoclonal antibody reactivity against memory cell molecular markers. 3A. *Aotus* cells double stained with CD45H3D10-FITC and anti-human CD4 PerCP. 3B. Human cells double labelled with CD194G12A3G3-PE and anti-human CD19 FITC, and 3C. with CD45RO3A8G1 Pacific Blue and anti-human CD45RO PE Cy5. The left-hand column shows the doubled staining, the middle one tailor-made mAbs and the right-hand column shows anti-human antibodies.

Figure 4. *Aotus* memory cells dual antibody staining. 4A. Memory CD4 T-cells labelled with CD45H3D10-FITC and CD45RO3A8G1 Pacific Blue. 4B. Memory B-cells labelled with CD194G12A3G3-PE and CD275F11C11. The left-hand column shows double staining analysis, the middle one mAb anti-T- or B-markers and the right-hand column anti-second membrane protein antibody for identifying the memory cells.

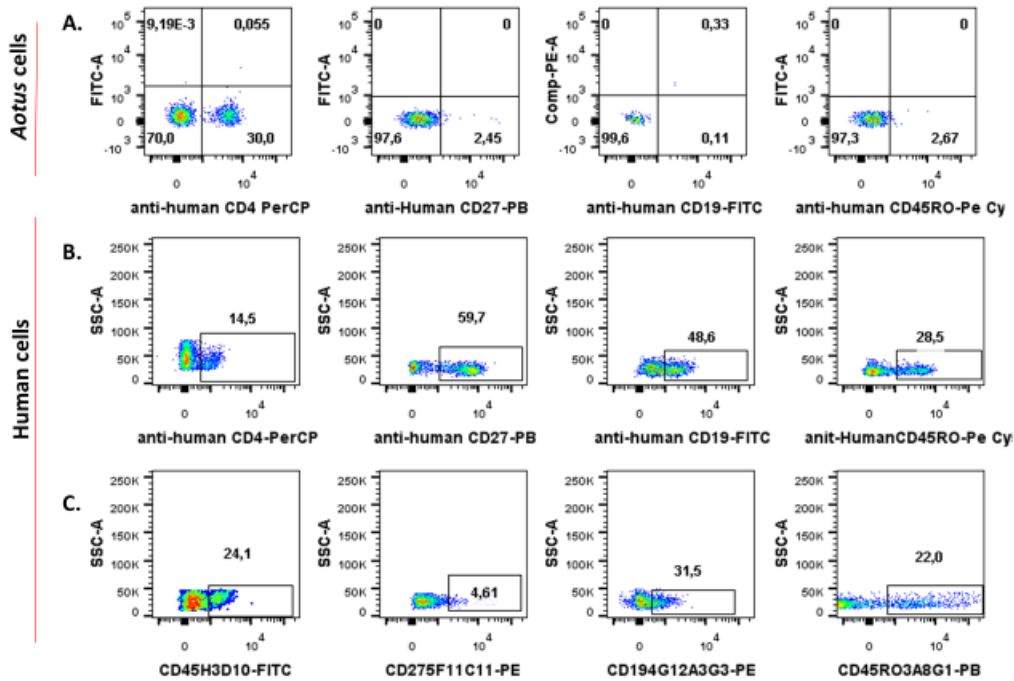


Figure 1. Anti-human antibodies against *Aotus* and human cells. 1A. *Aotus* cells stained with anti-human CD4-PerCP, anti-human CD27-Pacific Blue, anti-human CD19-FITC and anti-human CD45-Pe Cy5. 1B. Human cells used as positive control for the human monoclonals. 1C. Homemade monoclonal antibodies (CD45H3D10, CD275F11C11, CD194G12A3G3, and CD45RO3A8G1) with a concentration of 0,4 µg per antibody.

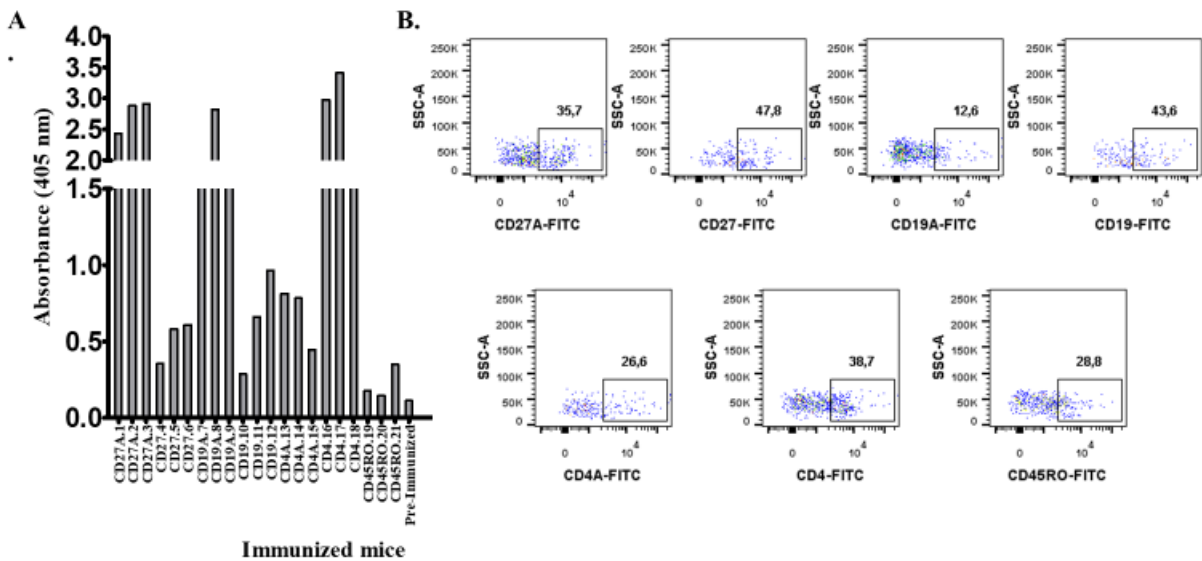


Figure 2. Mouse sera reactivity against synthetic peptides and *Aotus* cells. 2A. ELISA analysis of antibody reactivity against synthetic peptides. The mouse sera were diluted 1:100. 2B. FACS analysis of serum reactivity against *Aotus* cells, anti-mouse-FITC was used 1:100. ELISA: the numbers below the X axis correspond to each immunized mouse.

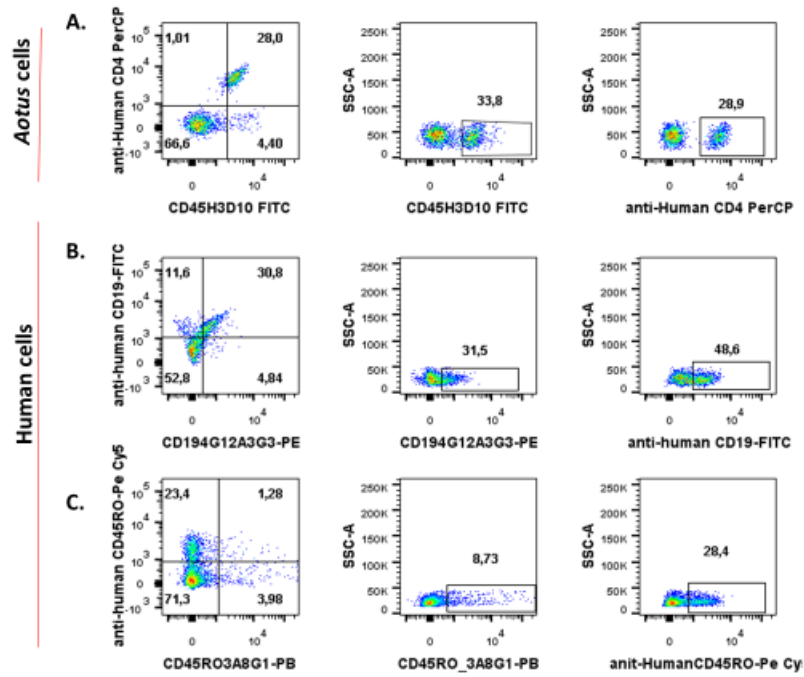


Figure 3. Indirect confirmation of monoclonal antibody reactivity against memory cell molecular markers. 3A. *Aotus* cells double stained with CD45H3D10-FITC and anti-human CD4 PerCP. 3B. Human cells double label with CD194G12A3G3-PE and anti-human CD19 FITC and 3C. with CD45RO3A8G1Pacific Blue and anti-human CD45RO PE Cy5. The left column is the doubled staining, middle one is homemade monoclonal antibody and the right column correspond to anti-human antibodies.

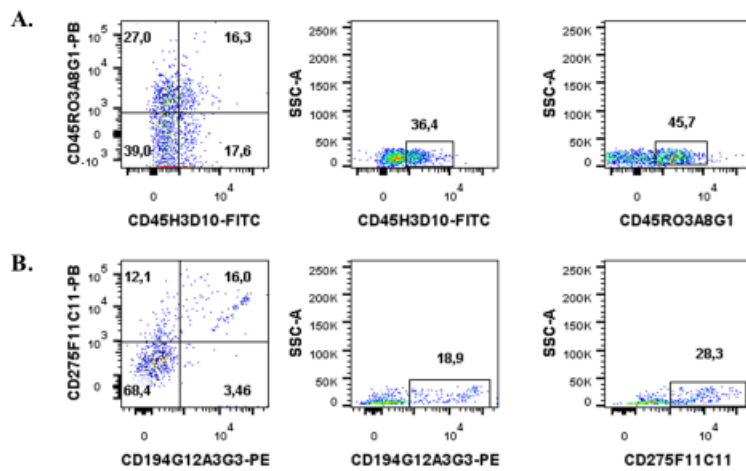


Figure 4. *Aotus* memory cells double antibody staining. 4A. Memory CD4 T cells labeled with CD45H3D10-FITC and CD45RO3A8G1Pacific Blue. 4B. Memory B cells labeled with CD194G12A3G3-PE and CD275F11C11. The left column showed the analysis of doubled staining, the middle one with monoclonal antibody anti-T or B marker and the right column with anti-second membrane protein antibody to identify the memory cells.

References

1. Joyner C, Barnwell JW, Galinski MR. No more monkeying around: primate malaria model systems are key to understanding *Plasmodium vivax* liver-stage biology, hypnozoites, and relapses. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:145.
2. Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annual review of entomology*. 2012;57:107-21.
3. Organization WH. World Malaria Report 2018. World Health Organization. WHO Geneva; 2018; Available from: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>.
4. Gordon D, McGovern T, Krzych U, Cohen J, Schneider I, LaChance R, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(6):1576-85.
5. Olotu A, Fegan G, Wambua J, Nyangweso G, Leach A, Lievens M, et al. Seven-year efficacy of RTS, S/AS01 malaria vaccine among young African children. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(26):2519-29.
6. Bejon P, Cook J, Bergmann-Leitner E, Olotu A, Lusingu J, Mwacharo J, et al. Effect of the pre-erythrocytic candidate malaria vaccine RTS, S/AS01E on blood stage immunity in young children. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(1):9-18.
7. Campo JJ, Aponte JJ, Skinner J, Nakajima R, Molina DM, Liang L, et al. RTS, S vaccination is associated with serologic evidence of decreased exposure to *Plasmodium falciparum* liver-and blood-stage parasites. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(3):519-31.
8. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(10):741.
9. Bortnick A, Allman D. What Is and What Should Always Have Been: Long-Lived Plasma Cells Induced by T Cell–Independent Antigens. *The Journal of Immunology*. 2013;190(12):5913-8.
10. Duval L, Fourment M, Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM, et al. African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification

of the *Laverania* subgenus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(23):10561-6.

11. Beignon A-S, Le Grand R, Chapon C. In vivo imaging in NHP models of malaria: challenges, progress and outlooks. *Parasitology international*. 2014;63(1):206-15.
12. Collins WE. The owl monkey as a model for malaria. *Aotus: The Owl Monkey*. 1994;217.
13. Gysin J. Animal models: primates. *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. 1998:419-41.
14. Carvalho LJ, Oliveira SG, Alves FA, Brígido MC, Muniz JA, Daniel-Ribeiro CT. *Aotus infulatus* monkey is susceptible to *Plasmodium falciparum* infection and may constitute an alternative experimental model for malaria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):363-5.
15. Riccio EK, Pratt-Riccio LR, Bianco-Júnior C, Sanchez V, Totino PR, Carvalho LJ, et al. 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*. 2015;14(1):166.
16. Baquero JE, Miranda S, Murillo O, Mateus H, Trujillo E, Suarez C, et al. Reference strand conformational analysis (RSCA) is a valuable tool in identifying MHC-DRB sequences in three species of *Aotus* monkeys. *Immunogenetics*. 2006;58(7):590-7.
17. Daubenberger CA, Salomon M, Vecino W, Hübner B, Troll H, Rodrigues R, et al. Functional and structural similarity of V γ 9V δ 2 T cells in humans and *Aotus* monkeys, a primate infection model for *Plasmodium falciparum* malaria. *The Journal of Immunology*. 2001;167(11):6421-30.
18. Diaz D, Daubenberger CA, Zalac T, Rodriguez R, Patarroyo M. Sequence and expression of MHC-DPB1 molecules of the New World monkey *Aotus nancymaae*, a primate model for *Plasmodium falciparum*. *Immunogenetics*. 2002;54(4):251-9.
19. Diaz D, Naegeli M, Rodriguez R, Nino-Vasquez JJ, Moreno A, Patarroyo ME, et al. Sequence and diversity of MHC DQA and DQB genes of the owl monkey *Aotus nancymaae*. *Immunogenetics*. 2000;51(7):528-37.

20. Diaz OL, Daubenberger CA, Rodriguez R, Naegeli M, Moreno A, Patarroyo ME, et al. Immunoglobulin kappa light-chain V, J, and C gene sequences of the owl monkey *Aotus nancymaae*. *Immunogenetics*. 2000;51(3):212-8.
21. Favre N, Daubenberger C, Marfurt J, Moreno A, Patarroyo M, Pluschke G. Sequence and diversity of T-cell receptor alpha V, J, and C genes of the owl monkey *Aotus nancymaae*. *Immunogenetics*. 1998;48(4):253-9.
22. Guerrero J, Pacheco D, Suarez C, Martinez P, Aristizabal F, Moncada C, et al. Characterizing T-cell receptor γ -variable gene in *Aotus nancymaae* owl monkey peripheral blood. *Tissue Antigens*. 2003;62(6):472-82.
23. López C, Suárez CF, Cadavid LF, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Characterising a Microsatellite for DRB Typing in *Aotus vociferans* and *Aotus nancymaae* (Platyrrhini). *PloS one*. 2014;9(5):e96973.
24. Montoya GE, Vernot JP, Patarroyo ME. Partial characterization of the CD45 phosphatase cDNA in the owl monkey (*Aotus vociferans*). *American Journal of Primatology*. 2002;57(1):1-11.
25. Nino-Vasquez JJ, Vogel D, Rodriguez R, Moreno A, Patarroyo ME, Pluschke G, et al. Sequence and diversity of DRB genes of *Aotus nancymaae*, a primate model for human malaria parasites. *Immunogenetics*. 2000;51(3):219-30.
26. Vecino W, Daubenberger C, Rodriguez R, Moreno A, Patarroyo M, Pluschke G. Sequence and diversity of T-cell receptor β -chain V and J genes of the owl monkey *Aotus nancymaae*. *Immunogenetics*. 1999;49(9):792-9.
27. Moncada CA, Guerrero E, Cardenas P, Suarez CF, Patarroyo ME, Patarroyo MA. The T-cell receptor in primates: identifying and sequencing new owl monkey TRBV gene sub-groups. *Immunogenetics*. 2005;57(1-2):42-52.
28. Cardenas PP, Suarez CF, Martinez P, Patarroyo ME, Patarroyo MA. MHC class I genes in the owl monkey: mosaic organisation, convergence and loci diversity. *Immunogenetics*. 2005;56(11):818-32.
29. Suárez CF, Patarroyo ME, Trujillo E, Estupiñán M, Baquero JE, Parra C, et al. Owl monkey MHC-DRB exon 2 reveals high similarity with several HLA-DRB lineages. *Immunogenetics*. 2006;58(7):542-58.

30. Daubenberger CA, Spirig R, Patarroyo ME, Pluschke G. Flow cytometric analysis on cross-reactivity of human-specific CD monoclonal antibodies with splenocytes of *Aotus nancymae*, a non-human primate model for biomedical research. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2007;119(1-2):14-20.
31. Höglind A, Areström I, Ehrnfelt C, Masjedi K, Zuber B, Giavedoni L, et al. Systematic evaluation of monoclonal antibodies and immunoassays for the detection of Interferon- γ and Interleukin-2 in old and new world non-human primates. *Journal of immunological methods*. 2017;441:39-48.
32. Saalmüller A, Aasted B. Animal homologue section of HLDA8. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007;1(119):1.
33. Kozieradzki I, Kündig T, Kishihara K, Ong CJ, Chiu D, Wallace VA, et al. T cell development in mice expressing splice variants of the protein tyrosine phosphatase CD45. *The Journal of Immunology*. 1997;158(7):3130-9.
34. Oberdoerffer S, Moita LF, Neems D, Freitas RP, Hacohen N, Rao A. Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science*. 2008;321(5889):686-91.
35. Pulido R, Schlossman S, Saito H, Streuli M. Identification of amino acids at the junction of exons 3 and 7 that are used for the generation of glycosylation-related human CD45RO and CD45RO-like antigen specificities. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(3):1035-40.
36. Organization WH. World malaria report 2018. 2018; Available from: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en>.
37. Haverson K, Bailey M, Stokes C, Simon A, LeFlufy L, Banfield G, et al. Monoclonal antibodies raised to human cells—specificity for pig leukocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2001;80(1-2):175-86.
38. Patarroyo MA, Bermúdez A, López C, Yepes G, Patarroyo ME. 3D analysis of the TCR/pMHCII complex formation in monkeys vaccinated with the first peptide inducing sterilizing immunity against human malaria. *PloS one*. 2010;5(3):e9771.
39. Patarroyo ME, Bermúdez A, Alba MP, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche LA, et al. IMPIPS: The Immunoprotection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electronic and Topochemical Principles for Complete Fully-

Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. PloS one. 2015;10(4):e0123249.

40. Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, et al. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2002;100(13):4521-8.

41. Chaudhary N, Staab JF, Marr KA. Healthy human T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PloS one*. 2010;5(2):e9036.

42. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council of the National Academies. Eight edition. 2011.

43. AVMA Guidelines on Euthanasia. Panel on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 2007.

44. Sonnhammer EL, Von Heijne G, Krogh A, editors. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Ismb*; 1998.

45. Houghten RA. 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*. 1985;82(15):5131-5.

46. Roccatano D, Colombo G, Fioroni M, Mark AE. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12179-84.

47. Bethke J, Rojas V, Berendsen J, Cardenas C, Guzman F, Gallardo JA, et al. Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *J Fish Dis*. 2012;35(5):379-88.

48. Pfaff E, Mussgay M, Böhm H, Schulz G, Schaller H. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. *The EMBO journal*. 1982;1(7):869-74.

49. Pluschke G, Joss A, Marfurt J, Daubenberger C, Kashala O, Zwickl M, et al. Generation of chimeric monoclonal antibodies from mice that carry human immunoglobulin C γ 1 heavy or C κ light chain gene segments. *Journal of immunological methods*. 1998;215(1-2):27-37.

Supplementary Figure 1. Alignment of Cluster Differentiation (CD) 27, CD19, CD4 and CD45RO. Highlight yellow color is signal peptide and green color mAb selected peptides.

CD27

>XP_012328288.1 CD27 antigen isoform X1 [Aotus nancymaae]
MAWPHPWLLCILGTLVGLSA TPAPKICPERHYWAQGKLCQMCAPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCMPGVS
 FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLIRNCTITANAECACPKGWQCRDKECTECDPPPDTLLTTQLSKALDPHL
 QPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLAGFR**QLPAPTSTHWPQRSLCSD** FIRILVIFSGTFLVFTLAGALF
 LHQQRKYRPNRGESPVEPAEPCPYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPTSSP

>AAI39126.1 CD27 antigen [Mus musculus]
MAWPPPYWLCMLGTLVGLSAT LAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRATAAQCDCPCIPGTS
 FSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQP
 PPTHLPHGTEKPSWPLHR**QLPNSTVYSQRSSHRPLCSD**CIR IFVTFSSMFLIFVLGAILFFHQRRNHGP
 NEDRQAVPEEPCPYSCPREEEGSAIPIQEDYRKPEPAFYF

>XP_016875721.1 CD27 antigen isoform X1 [Homo sapiens]
MARPHPWLLCVLGLTLVGLSA TPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVS
 FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSHPH
 QPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLADFR**QLPARTLSTHWPQRSLCSD** FIRILVIFSGMFLVFTLAGALF
 LHQRRKYRSSKRQNTGLRSCPCTTPHWLNPTAHAWNLTTETHQLHFTSLGPTPSLPLAGVLLTLPQAHPP
 LPISFSRLLPPLAKTHRISFCRQRRKSCGACRALSLQLPQGGGGQHHPHGGGLPKTGACLLPLSQHLR
 ELHYSPLGHPHPADHPRESEWQPQLQSHPLVRALSCVHVTECLFETGRDEDKYG

Extracellular sequence Without Signal peptide

>XP_012328288.1 CD27 antigen isoform X1 [Aotus nancymaae]
 TPAPKICPERHYWAQGKLCQMCAPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCMPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLIRNCTI
 TANAECACPKGWQCRDKECTECDPPPDTLLTTQLSKALDPHLQPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLAGFRQLPAPTST
 HWPQRSLCSD

>AAI39126.1 CD27 antigen [Mus musculus]
 LAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRATAAQCDCPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVT
 ANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPPTHLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCS
 SD CIR

>XP_016875721.1 CD27 antigen isoform X1 [Homo sapiens]
 TPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVS
 FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSHPH
 QPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLADFRQLPARTLSTHWPQRSLCSD

AAI39126.1 M	-LAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRATAAQCDCPCIPGTSFSPDYHTRPH	59
XP_012328288.1 A	TPAPKICPERHYWAQGKLCQMCAPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCMPGVSFSPDHHTRPH	60
XP_016875721.1 H	TPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPH	60
	: **:*: * **:* ***:***:*.*.*****:*.*****:*****	
AAI39126.1	CESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQP	119
XP_012328288.1	CESCRHCNSGLLIRNCTITANAECACPKGWQCRDKECTECDPPPDTLLTTQLSKALDPHL	120
XP_016875721.1	CESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSHPH	120
	*****:*.****:*****:* .*****:***** : ** :*::.*:	
AAI39126.1	PPTHLPHGTEKPS-----WPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSDCIR	161
XP_012328288.1	QPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLAGFRQLPAPTSTHWPQRSLCSD---	168
XP_016875721.1	QPHTLPYVSEMLEARTAGHMOTLADFRQLPARTLSTHWPQRSLCSD---	168
	*****: * . . ***** * :: :* *****	

Peptide 167 QLPAPTPSTHWPQRSLCSD 188
AAI39126.1 QLPNSTVYSQRSSHRPLCSD
XP_012328288.1 QLPAPTPSTHWPQRSLCSD
XP_016875721.1 QLPARTLSTHWPQRSLCSD

CD19

>XP_012320028.1 B-lymphocyte antigen CD19 isoform X1 [Aotus nancymae]
MPPPCLLFFLLFLTPMGVPRQ EPRLVKVEEGDDAVLLCLEETSHDPAQQLVWWRESSSLEPFLKLTGLGLP
GLGIHVGPWGIWLFIFNVSHQMGGFYLCQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGS GELFRWNASDLGGRGCLENR
SSEGPSSPSGNLMSSQLYIWAKDRPKIWEGEPPCGPLRDSLNTLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSR
GPLSWTHVRPKETNFSLLSLELKDHPARDMVMMEKGLLLPQATAQDAGKYYCHRGNTISWHLEITARS
ALWHHLVVRTGGWKVPAVT LTYMIFCLGSLVGIHLQALVLRKRKRMTDPARRFFKVTPPPSSGPPQNQY
GNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPRSDVEADGAVGSRSPPGAGPEEEEEEGEGYEEPDSSEGS
EFYENDSNLQDQLSQDGSYENPEEEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVSRTMDFLSPHGSADWP
SREATSLAGSQSYEDMRGILYSAPQLRSIRGQPGPNHEEDADS YENMDNPDGPDPAWGGGGHVGTWGAR

>EDL17351.1 CD19 antigen [Mus musculus]
MPSPLPVSFLLFLTLVGG RPQKSLLEVEVEEGNVVLPCLPDSSPVSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPG
LGLHVGS LGILLVIVNVSDHMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLNRNS
SGSHRSTSGSQLYVWAKDHPKVVWGTKPVCAPRGS SLNQSLINQDLTVAPGSTLWLSGCVPPVPAKGSIS
WTHVHPRRPNVSLLSLSLGGEHPVREMWWGSLLLLPQATALDEGTYYCLRGNTIERHVKVIARSAVWL
WLLRTGG WIVPVVTLVYVIFCMVSLVAFLYCQRAFILRRKRKRMTDPARRFFKVTPPSGNGTQONQYGNVL
SLPTSTSGQAHAQRWAAGLGSVPGSYGNPRIQVQDTGAQSHETGLEEEGEAYEEPDSSEGESEFYENDSNL
GQDQVSDGSGYENPEDEPMGPEEEDSFSNAESYENADEELAQPVGRMMDFLSPHGSADWPSREASSLGS
QSYEDMRGILYAAPQLHSIQSGPSHEEDADS YENMDKSDLEPAWEGEGHMGTTWGT

>NP_001171569.1 B-lymphocyte antigen CD19 isoform 1 precursor [Homo sapiens]
MPPRLLFFLLFLTPMEVRF EEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPG
LGIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGELFRWNVSDLGGGCGLNKNS
SEGSPSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNTLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRG
PLSWTHVHPKPKSLLSLELKDHPARDMVMVETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVL
WHWLLRTGGWKVSA VTLAYLIFCLCSLVGIHLQALVLRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPSSGPPQNQYGN
VLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPPEEEEEEGEGYEEPDSSEDEF
YENDSNLQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSADWPSR
EATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADS YENMDNPDGPDPAWGGGGGRMGTWSTR

Extracellular sequence Without Signal peptide

>XP_012320028.1 B-lymphocyte antigen CD19 isoform X1 [Aotus nancymae]
EPRLVKVEEGDDAVLLCLEETSHDPAQQLVWWRESSSLEPFLKLTGLPGLGIHVGPWGIWLFIFNVSHQMGGFYLCQ
PGPPSEKWPQPGWTVSVEGS GELFRWNASDLGGRGCLENRSSEGPPSSPSGNLMSSQLYIWAKDRPKIWEGEPPCGPL
RDSLNTLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVRPKETNFSLLSLELKDHPARDMVMMEKGLLLPQATA
QDAGKYYCHRGNTISWHLEITARSALWHHLVVRTGGWKVPAVT

Extracellular sequence Without Signal peptide

>EDL17351.1 CD19 antigen [Mus musculus]
RPQKSLLEVEVEEGNVVLPCLPDSSPVSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGLHVGS LGILLVIVNVSDHMGGFYLC
CQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLNRNSSGSHRSTSGSQLYVWAKDHPKVVWGTKPVCAPRGS
SLNQSLINQDLTVAPGSTLWLSGCVPPVPAKGSISWTHVHPRRPNVSLLSLSLGGEHPVREMWWGSLLLLPQATAL
DEGTYYCLRGNTIERHVKVIARSAVWLWLLRTGG

Extracellular sequence Without Signal peptide

>NP_001171569.1 B-lymphocyte antigen CD19 isoform 1 precursor [Homo sapiens]

EEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFKLKSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQ
PGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPP
RDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWMVETGLLLPRATAQ
DAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSA

EDL17351.1	RPQKSLIVEVEEGNVVLPCLPDSSPVSEKLAWYRG-NQSTPFLELSPGSPGLGLHVGS	59
XP_012320028.1	---EPRLVKVEEGDDAVLLCLEETSHDPAQQLVWWRSSLEPFLKLTGLPGLGIHVGP	57
NP_001171569.1	--EEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE-SPLKPFKLKSLGLPGLGIHMRP	57
	: :*:****:.* ** :* :*:.* * . ****:* * ****:*:	
EDL17351.1	LGILLVIVNVSDHMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDLR	119
XP_012320028.1	WGIWLFIFNVSHQMGGFYLCQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGSGELFRWNASDLGGRGCGLE	117
NP_001171569.1	LAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLK	117
	* *.*.***:***** ** :. ***.***.*.***:***.*.***: .*.*. *	
EDL17351.1	NRSSGSHRSTSG---SQLYVWAKDHPKVGWTKPVCAPRGSSLNQSLINQDLTVAPGSTL	175
XP_012320028.1	NRSSEGPSSPSGNLMSSQLYIWAQDRPKIWEGEPPCGPLRDSLNTL-SQDLTMAPGSTL	176
NP_001171569.1	NRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSLS-SQDLTMAPGSTL	176
	**** . * ** :*:****:*:* * :* * * .****:* .****:*****	
EDL17351.1	WLSGCVPPVPVAKGISWTHVHPRRPNVSLLSLSLGGHEHPVREMWWGSLLLLPQATAQD	235
XP_012320028.1	WLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVRPKETNFSLLSLELKDNHPARDMWMVEKGLLLPQATAQD	236
NP_001171569.1	WLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP-KSLLSLELKDDRPARDMWMVETGLLLPRATAQD	235
	***** *:.* :*****:*: *****.* :*:.*.*** . ****:*** *	
EDL17351.1	EGTYYCLRGNTIERHVKVIARSAVWLWLLRTGG-----	269
XP_012320028.1	AGKYYCHRGNTISWHLEITARSAWHLVVRTGGWKVPAVT	277
NP_001171569.1	AGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSA--	274
	*.*** *****: . *::: ** :.* **:*:****	

97 CQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGS 119

EDL17351.1 M	CQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDS
XP_012320028.1 A	CQPGPPSEKWPQPGWTVSVEGS
NP_001171569.1 H	CQPGPPSEKWPQPGWTVNVEGS
	** ** :. ***.***.*.*

CD4

>AKM95886.1 CD4 [Aotus nancymaae]

MNGGIPFRHLLLVQLALLPAVTHG KTVVLGEGKETVELPCETSLKKNVQFHWKTSQIKILGNQGSFLT
RGQSKLADRIDSKSSWDRGSFPLIIKINVQVEDSETYICEVERKKEEVELQVFGLTASPDTNLLQGQSLT
LTLESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQLE IQDSGTWKCTVSQRPELLFKINVVLAFAQQASSTV
YKKEGEQVEFSFPLAFAAEKLTGSGELCWQAEKASSSKSWISFNLTQSQEVCKVVTQDPKLRMGKKLPLH
LTLPLQALPQYAGSGNFTLALKGKTGKHLQKVNLVVMRATQLQNNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENQEAKV
SKQEKAHVWVNLNPEAGVWQCLLSDSGQVLLLESKVEVLPWSPVQPM LIVPGGVAGLLVFTGLGIFFCVR
CRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQCPCRHFQKTCGPI

>AAA37402.1 T-cell differentiation antigen [Mus musculus]

MCRATISLRLLLLLQLSLLA VTQEKTLVLGKEGESAEPCSSQKKITVFTWKFSDQRKILGQHGKGV
LIRGGSPSQFDRFDSKKGAWKGSFPLIINKLMEDSQTYYICELENRKEEVELWVFKVTFSPGTSLLQGQ
SLTLTLDSNSKVSNPLTECKHKKGKVVSGSKVLSMSNLRVQDSDFWNCTVTLQKKNWFGMTLSVLGFQ
TITAYKSEGESAEFSFPLNFAEENGWELMWAKEKDSFFQPWISFSIKNKEVSVQKSTKDLKQLKETL
PLTLKIPQVSLQFAGSGNLTTLTDKGLHQEVENLVVMKVAQLNNTLTCEVMGPTSPKMRLTLKQENQEAR
VSEEQKVVQVAPETGLWQCLLSEGDKVKMDSRIQVLSRGNVQ TVFLACVLGGVSGFLGFLGLCILCCVR
CRHQQRQAARMSQIKRLLSEKKTQCPCRHFQKSHNLI

>AAB51309.1 surface antigen CD4 [Homo sapiens]

MNRGVPPFRHLLLVQLALLPAATQGK KVVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHWKNSNQIKILGNQGSFLT
KGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIINKLKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLT
LTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLEIQDSGTWCTVTLQNKQKVEFKIDIVVLAFAQKASSI
VYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAEARASSSKSWITFDLKNKEVSVKRVTDQPKLQMGKKLPL
HLTLPLQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKHLHQEVENLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMLSLKLENKEAK
VSKREKAVWVNLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLLESNIKVLPTWSTPVQPM ALIVLGGVAGLLLFIFGLGIFFCV
RCRHRRRQAERMSQIKRLLSEKKTQCPCRHFQKTCSPI

Extracellular sequence Without Signal peptide

>AAB51309.1 surface antigen CD4 [Homo sapiens]

KVVVLGKKGDTVELTCTASQKKSIOFHWKNSNQIKILGNQGSFLTGPSKLNDRADSRRLWDQGNFPLIINKLKIEDS
DTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANSDTHLLQGQSLTTLTLESPPGSSPSVQCRSPRGKNIQGGKTLVSQLEIQDSGTW
TCTVTLQNKQKVEFKIDIVVLAFAQKASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWQAEARASSSKSWITFDLKNKE
VSVKRVTDQPKLQMGKKLPLHLTLPLQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKHLHQEVENLVVMRATQLQKNLTCEVWGPTSPKL
MLSLKLENKEAKVSKREKAVWVNLNPEAGMWQCLLSDSGQVLLLESNIKVLPTWSTPVQPM

>AKM95886.1 CD4 [Aotus nancymaae]

KTVVLGEGKETVELPCETSLKKNVQFHWKTSQIKILGNQGSFLTRGQSKLADRIDSKSSWDRGSFPLIIKINVQVED
SETYICEVERKKEEVELQVFGLTASPDTNLLQGQSLTTLTLESPPGSSPSVECTSPRGKRIQGMKNLSVSQLEIQDSGT
WKCTVSQRPELLFKINVVLAFAQQASSTVYKKEGEQVEFSFPLAFAAEKLTGSGELCWQAEKASSSKSWISFNLTQS
VCVKVVTQDPKLRMGKKLPLHLTLPLQALPQYAGSGNFTLALKGKTGKHLQKVNLVVMRATQLQNNLTCEVWGPTSPKL
MLSLKLENQEAKVSKQEKAHVWVNLNPEAGVWQCLLSDSGQVLLLESKVEVLPWSPVQPM

>AAA37402.1 T-cell differentiation antigen [Mus musculus]

VTQEKTLVLGKEGESAEPCSSQKKITVFTWKFSDQRKILGQHGKGVVIRGGSPSQFDRFDSKKGAWKGSFPLIIN
KLMEDSQTYYICELENRKEEVELWVFKVTFSPGTSLLQGQSLTTLTLDNSKVSNPLTECKHKKGKVVSGSKVLSMSNLR
VQDSDFWNCTVTLQKKNWFGMTLSVLGFQSTAITAYKSEGESAEFSFPLNFAEENGWELMWAKEKDSFFQPWISF
SIKNKEVSVQKSTKDLKQLKETLPLTLKIPQVSLQFAGSGNLTTLTDKGLHQEVENLVVMKVAQLNNTLTCEVMGPT
SPKMRLTLKQENQEARVSEEQKVVQVAPETGLWQCLLSEGDKVKMDSRIQVLSRGNVQ

CD45RO

>XP_012315003.1 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform X4 [Aotus nancymaee]

MTMYLWLKLLAFGFALDTEVVFVAG

ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTAHS TKIATTPAKPSCDKKYANITVDYSYDNNTKLF TAKLNVNVEVVKADFDCTNNM LHNLKECEIRTVTISDN SCTAPNKTLKLDVPPPEVDKFLKDH TSPEKANTTINLKWETENFTCDRNKITYRFQCGKIT SDKEYIVLEDRKPNHNYTCYSEILYNHRKYININETIQ TDFGIPEEPQNVTCRSEGAHEGVITWNHPHSLFHSFTLCF QNKPDNCFQVDKNLTKYDLQNLKPYTKYDLSLYAYIIARVQRNGTAVPCHFTTNSARPSEVQNM TVSITSENSMLVKC NAPKDLNGPRGRYHLEVKGDSLVRNESNHTCLFHVKNLQYSTKYTFSAYYHNGDYPGHPVSEFQSTSYNFKA LIAFLAFLIIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAE FQSI PRVFSKFP I KEARKSFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVD DFWRMIWEQKATVIVMVT RCEEGRNRNKCAEYWPSVEEGTRAFGDVVVKNQHKRCPDYIIQKLN IINKKEKTAGREVT HIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLR RVNAFNSFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRR QRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETE VNLSLHPY LHMKKRDP PSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIGNQEEN KSKNRNSNVI PYDFNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEASKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDF WQMIFQRKVKAI VMLTELKRGDQELCAQYWGE GKQTYGDI EVDLKD TKNSSSTYTLHV FELRHSKRKDPRTVYQYQYTN WSAEQLPAEPKELISMIQVLKQKLPQKNSSEGNKYHKSAPLLIHCRDGSQQTGIFCALLN LLESAETEEVVDVFQVVK ALRKARPGMISTFEQYQFLYDTIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLP EANEQAAG SEPTSGTEGPEHCVNGPANPVLNQVS

>NP_563578.2 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform 2 precursor [Homo sapiens]

MTMYLWLKLLAFGFALDTEVVFVTG

QSPTSPPTDAYLNASETTTLSPSGSAVIS TTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLF TAKLNVNENVECGNNT CTNNEVHNLTECKNASVSI SHNSCTAPDKTLILDVPPGVKEFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRF QCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKI IKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFH NFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIK YDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSD NSMHVKCRPPDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSSTSYNS KAL IAFLAFLIIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGR LFLAEFQSI PRVFSKFP I KEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPRKYIAAQGPR DETVDDDFWRMIWEQKATVIVMVT RCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLN IIVNKKEKAT GREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLR RVNAFNSFFSGPIVVHCSAGVGRTGTYYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYV VKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETE VNLSLHPY LHMKKRDP PSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQHIG NQEENKSKNRNSNVI PYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKE TIGDFWQMIFQRKVKVI VMLTELKHGDQEICAQYWGE GKQTYGDI EVDLKD TDKSSTYTLRV FELRHSKRKDSRTVYQ YQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLN LLESAETEEVVDI FQVVKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLP EAK EQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

>NP_035340.3 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform 2 precursor [Mus musculus]

MTMGLWLKLLAFGFALLDTEVVFVTG

QTPTPSDGASLTTLTPSTLGLASTDPPS TTIATTTKQTCAAMFGN ITVNYTYESSNQTFKADLKD VQNAKCGNEDCENVLNNLEEC SQIKNISVSNDS CAPATTIDLYVPPGTDK FSLHDCTPKEKANTSICLEWKTKNLDFRKCNSDNI SYVLHCEPENNTKCIRRNTFIPERCQLDNLRAQTN YTCVAEILYRGVKLVKNVINVQTDLGI PETPKPSCGDP AARKTLVSWPEPVSKPESASKPHGYVLCYKNN SEKCKSLPNNVTSFEVESLKPYKYEVSLLAYVNGKIQRNGTAEKCNFHTKADRPDKVNGMKT SRPTDNS INVTCGPPYETNGPKTFYILVVRSGGSFVTKYKNTNCQFYVDNLYYSTDYEFVLSFHNGVYEGDSVIRNE STNFNAL ALIIFLVFLIIIVTSIALLVVLYKIYDLRKKRSSNLDEQQELVERDDEKQLMDVEPIHSDILLE TYKRKIADEGRFLAEFQSI PRVFSKFP I KDARKPHNQKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSTYINA SYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVT RCEEGRNRNKCAEYWPSMEEGTRAFKDIV VTINDHKRCPDYIIQKLNVAHKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLR RVNAFNSFFSGPIV VHCSAGVGRTGTYYIGIDAMLEGLEAEGKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQALVEYNQFGETE V

NLSELHSLHNMKKRDPPSDPSPLEAEYQRLPSYRSWRTQHIGNQEENKKKNRNSNVVPYDFNRVPLKHE
LEMSKESEPESEDESSDDSDSEETSKYINASFVMSYWKPEMMIAAQGPLKETIGDFWQMI FQRKVKVIVM
LTELVNGDQEVCAQYWGEKGQTYGDMEVEMKDTNRASAYTLRTFELRHSKRKEPRTVYQYQCTTWKGEEL
PAEPKDLVSMIQDLKQKLPKASPEGMKYHKHASILVHCRDGSQQTGLFCALFNLLESAETEDVVDVVFQVV
KSLRKARPGVVCSYEYQFLYDI IASIYPAQNGQVKKTN SQDKIEFHNEVDGGKQDANCVRPDGPLNKAQ
EDSRGVGTPEPTNSAEPEHAANGSASPAPTQSS

Extracellular sequence Without Signal peptide

>XP_012315003.1 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform X4 [Aotus nancymaae]

ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTAHSSTKIATTPAKPSCDKKYANITVDYSYDNNTKLFTAKLNVNEVVKCADFDCTNNM
LHNLKECEIRTVTISDNSTAPNKTLLKLDVPPPEVDKFLKDHSTPEKANTTINLKWETENFTCDRNKITYRFQCGKIT
SDKEYIVLEDRKPNHNYTCYSEILYNHRKYININETIQTDGFIPEEPQNVTCRSEGAHEGVITWNHPHSLFHSFTLFCF
QNKPDNCFQVDKNTKYDLQNLKPYTKYDLSLYAYIIARVQRNGTAVPCHFTTNSARPSEVQNMVTSITSENSMLVKC
NAPKDLNGPRGRYHLEVKGDSLVRNESNHTCLFHVKNLQYSTKYTFSAYYHNGDYPGHPVSEFQSTSYNFKA

>NP_563578.2 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform 2 precursor [Homo sapiens]

QSPTPSPTDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNENVECGNNT
CTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNTYRF
QCGNMI FDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFH
NFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIIAKVQRNGSAAMCHFTTTSAPPSQVWNMTVSMTSD
NSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHSTSYNS
KAL

>NP_035340.3 receptor-type tyrosine-protein phosphatase C isoform 2 precursor [Mus musculus]

QTPTPSDGASLTTTLTPSTLGLASTDPPSTTIATTTKQTCAMFGNITVNYTYESSNQTFKADLKDVQNAKCGNEDCEN
VLNNLEECQIKNISVSNDSAPATTIDLYVPPGTDKFLSLHDCTPKEKANTSICLEWKTKNLD FRKCNSDNISYVLHC
EPENNTKIRRNTFIPERCQLDNLRAQTNYTCVAEILYRGVVKLVKNVINVQTDLGIPETPKPSCGDPAAARKTLVSWPE
PVSKPESASKPHGYVLCYKNNSEKCKSLPNNVTSFEVESLKPYYEVSLLAYVNGKIQRNGTAEKCNFHTKADRPDK
VNGMKTSRPTDNSINVTGPPYETNGPKTFYILVVRSGGSFVTKYKNTNCQFYVDNLYYSTDYEFVLSFHNGVYEGDS
VIRNESTNFNAK

NP_035340.3	QTPTPSD-----GASLTTLTPSTLGLASTDPPSTTI-ATTTKQTCAAMFGNITVNYTYE	53
XP_012315003.1	----ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTA----H-STKIATTPAKPSCDKKYANITVDYSYD	51
NP_563578.2	QSPTPSPTDAYLNASETTTLSPSGSAV----ISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYN	56
	. . . **:* * :* * :* * :* * :* * :* * :	
NP_035340.3	SSNQTFKADLKDVQNAKCGNEDCEN-VLNNLEECSEQIKNISVSNDSCAPATTIDLYVPP	111
XP_012315003.1	NNTKLFTAALNVNEVVKCADFDCTNNMLHNLKECEIR-TVTISDNSTAPNKTLLKLDVPP	110
NP_563578.2	KETKLFATAALNVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNA-SVSI SHNSTAPDKTLILDVPP	115
	... :*.*.* : :*. : * * :** ** . :*:*. * * * . * * * :	
NP_035340.3	GTKFSLHDCTPKEKANTSICLEWKTKNLDFRKCNSDNISYVLHCEPENNTKCIIRNTFI	171
XP_012315003.1	EVDKFHLKDHTSPEKANTTINLKWET---ENFTCDRNKITRFPQCGKI-----TSD	158
NP_563578.2	GVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKN--IETFTCDTQNTYRFPQCGNM-----IFD	164
	..** *.* * **:*.* *.* : : . * : : * * : * * :	
NP_035340.3	PERCQLDNLRAQNTYTCVAEILYRGVKLVKNVINVTDLGIPETPKP--SCGDPAAARKTLV	230
XP_012315003.1	KEYIVLEDRKPNHNYTCYSEILYNHRKYININETIQDFGIPEEPQNVTCRSEGAHEGVI	218
NP_563578.2	NKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVI	224
	: * : : . : * . * : * * * . * : : * * : * * * : * . * : * : :	
NP_035340.3	SWPEPVSKPESASKPHGYVLCYKNN-SEKCKSLPNNVTSFEVESLKPYYEVSLLAYVN	289
XP_012315003.1	TWNHPHS-----LFHSFTLCFQNK-PDNCFQVDKNLTKYDLQNLKPYTKYDLSLYAYII	271
NP_563578.2	TWNPPQR-----SFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLHAYII	278
	:* * * . : * . * : * * * : * : . * . : * : : * * * . * : * * * :	
NP_035340.3	GKIQRNGTAEKCNFHTKADRPDKVNGMKTSRPTDNSINVTGPPYETNGPKTFYILVVR	349
XP_012315003.1	ARVQRNGTAVPCHFTTNSARPSEVQNMVTSITSENSMLVKCNAPKDLNGPRGRYHLEVKD	331
NP_563578.2	AKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWMMVTSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEA	338
	..:****:* *.* * : : * . * . * . : * * : * . * * : * * * : * * * .	
NP_035340.3	GGSFVTKYKNTNCQFYVDNLYYSTDYEFVLSFHNGVYEGDSVIRNESTNFNAK-- 402	
XP_012315003.1	GDSLVRNESNHTCLFHVKNLQYSTKYTF SAYYHNGDYPGHPVSEFQSTS SYNFKA- 385	
NP_563578.2	GNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSSTSYNSKAL 393	
	* . : * : . : * * * . : * * * . * . : * * * * . . * * . : * * * :	

Peptide: 25 ENPTSPTDSHASETITLSPSGSSAHS 50

NP_035340.3	QTPTPSD-----GASLTTLTPSTLGLASTDPPS
XP_012315003.1	----ENPTSPTTDSHETITLSPSGSTA----H-S
NP_563578.2	QSPTPSPTDAYLNASETTTLSPSGSAV----IST