

Estudio conformacional de péptidos modificados de las proteínas STARP, CeITOS, TRSP y SERA 5 de *Plasmodium falciparum* y su relación con una respuesta inmune en malaria

ADRIANA JANNETH BERMUDEZ QUINTERO

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR:

Profesor MANUEL ELKIN PATARROYO, MD, Drs. (hons. caus.)

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO Y

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA



BOGOTÁ, 2015

A Dios por darme fortaleza en la vida. A mis padres, Marco Aurelio y Ana Cecilia que me enseñaron el verdadero camino de la sabiduría. A mis hermanos Orlando, Paco, Marco y Néstor por su apoyo e impulso incondicional. A mis sobrinos y sobrinas: Ana María, Juan Diego, David Alejandro, Laura Camila, Natalia y Daniel Esteban y a toda mi familia que han sido siempre mi motivación y respaldo.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE PUBLICACIONES Y ARTICULOS COMPLEMENTARIOS AL TRABAJO DE TESIS	iv
ABREVIATURAS	v
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Malaria en el contexto Mundial	4
2.1.1. Generalidades de la Malaria	4
2.1.2. Ciclo de vida del <i>plasmodium</i>	6
2.1.3. Sintomatología y patogénesis de la malaria	10
2.2. Principales proteínas antigénicas del esporozoíto y del merozoíto	12
2.2.1. CSP	12
2.2.2. TRAP	15
2.2.3. STARP	17
2.2.4. CelTOS	18
2.2.5. TRSP	20
2.2.6. MSP-1	21
2.2.7. SERA	22
2.3. Inmunidad contra <i>P. falciparum</i> en el contexto de vacunas	25
2.4. Estructura tridimensional de péptidos y proteínas	29
2.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	33
2.5.1. Generalidades	33
2.5.2. Fundamento de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	33
2.5.3. Experimentos y Espectros	34

2.5.4. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)	47
2.6. Cálculo de la Estructura Molecular	47
3. HIPÓTESIS	52
4. OBJETIVO GENERAL	53
4.1. Objetivos Específicos	53
5. CAPÍTULO 1	54
3D structure determination of STARP peptides implicated in <i>P. falciparum</i> invasion of hepatic cells.	
6. CAPÍTULO 2	64
The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi (ϕ) and psi (ψ) angles.	
7. CAPÍTULO 3	72
Binding activity, structure, and immunogenicity of synthetic peptides derived from <i>Plasmodium falciparum</i> CeITOS and TRSP proteins.	
8. CAPÍTULO 4	88
Protective immunity provided by a new modified SERA protein peptide: its immunogenetic characteristics and correlation with 3D structure.	
9. CAPÍTULO 5	102
<i>Gauche</i> + side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine.	
10. DISCUSIÓN GENERAL	114
11. CONCLUSIONES GENERALES	124
12. PERSPECTIVAS	126
13. REFERENCIAS	127
14. ANEXOS	137

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estimación de los casos (a) y muertes (b) por malaria en diferentes regiones en el mundo, realizado por la OMS, para los años 2000, 2005 y del 2010–2013 (Tomado de WORLD MALARIA REPORT 2014 (4)).

Tabla 2. Distribución de los casos de malaria por departamento de procedencia, Colombia, semana epidemiológica 50 de 2014. Tomado de: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud. Colombia (13).

Tabla 3. Desplazamiento químico de RMN de ^1H para el residuo X en el péptido GGXA a pH 7.0 y 35° C para cada uno de los 20 residuos de amino ácido comunes. Tomado de (129).

Tabla 4. Archivo de salida de restricciones atómicas provenientes del espectro NOESY del péptido 38136 para el cálculo de estructura. La tabla indica un fragmento de la posición interatómica entre átomos de H involucrados y su clasificación de acuerdo a la intensidad del NOE en rangos de distancia: 1.8 a 2.7 Å señales intensas en el espectro, de 2.8 a 3.4 señales de intensidad media y 3.5 a 5.0 para señales débiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del *P. falciparum*. El ciclo de vida del parásito comprende diversas etapas, en las cuales cerca de 5400 proteínas actúan y muchas de ellas podrían ser el blanco de las respuestas inmunitarias del huésped. El ciclo inicia con la inoculación de esporozoítos por parte del mosquito *Anopheles* en la dermis humana, estos acceden a los vasos sanguíneos, transitan a través de diferentes células, se deslizan a lo largo de las sinusoides hepáticas, cruzan el parénquima hepático y migran a través de varios hepatocitos hasta que algunos de los esporozoítos invaden éstos e inician el desarrollo asexual (esquizogonia), para luego desarrollarse en miles de merozoítos. Estos salen del hepatocito infectado en vesículas (merosomas) que, después de la ruptura, permiten a los merozoítos invadir glóbulos rojos, iniciando con ello el estadio eritrocítico. Durante esta etapa de la infección, también se produce la formación de gametocitos los cuales son ingeridos por un nuevo mosquito en donde se inicia el ciclo sexual. Tomado de (1).

Figura 2. Diagrama de la localización sub-celular de algunas proteínas del esporozoíto (a) y del merozoíto (b) involucradas en la invasión al hepatocito y al eritrocito respectivamente. Adaptada de Curtidor y colaboradores (10) y Patarroyo y colaboradores (14).

Figura 3. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína CSP del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs (39) (4383,4388 y 4389 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

Figura 4. Estructura tridimensional del dominio α TSR de CSP. Representación en superficie transparente del fragmento α TSR resaltándose en naranja un bolsillo hidrofóbico. En amarillo se resaltan los aminoácidos que intervienen en el mismo. En verde las diferentes estructuras secundarias como hélice α , hoja plegada antiparalela β y bucles. Tomado de (41).

Figura 5. Diagrama que ilustra la organización de las regiones características de la proteína TRAP. Se resalta la ubicación de los cHABPs (55) (cuadros negros).

Figura 6. Estructura tridimensional del dominio TSR de la proteína TRAP. La presencia de puentes de hidrógeno entre el esqueleto del fragmento y las cadenas laterales y puentes disulfuro, uno en su extremo N-terminal y 2 en su extremo C-terminal hacen que la estructura sea bastante estable (57) .

Figura 7. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína STARP del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs (60) (20546 y 20570 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

Figura 8. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína CeITOS del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs (34451, 34452 y 34458 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

Figura 9. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína TRSP del esporozoíto. Se resalta el cHABP (36075 enumerado de acuerdo al código de la FIDIC).

Figura 10. Diagrama de la localización de los fragmentos proteolíticos de la proteína MSP-1. Se resalta la ubicación de los cHABPs (75) (cuadros negros).

Figura 11. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína SERA 5 del merozoíto. Se resaltan los cHABPs (83) (6725, 6733, 6737, 6746, 6754 y 6762 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

Figura 12. Estructura del fragmento de 50kDa de la proteína SERA 5 de *P. falciparum*. Figura tomada de (90).

Figura 13. Región del Complejo mayor de histocompatibilidad de humano sobre el cromosoma 6 (99).

Figura 14. Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (a) Representación en superficies de la estructura HLA-DR β 1*0101 (código PDB: 1DLH). Cadena α en rosado y cadena β en azul claro y (b) vista lateral de la representación en cintas y esferas de la misma molécula en (a), resaltando la región de unión al péptido (PBR). Adaptada de Patarroyo y colaboradores (9).

Figura 15. Estructura secundaria en péptidos de *P. falciparum*. **a.** Estructura de hélice α del péptido 23762. **b.** Estructura giro β del péptido 24166. **a.** y **b.** Péptidos pertenecientes a la proteína TRAP. Adaptada de (113).

Figura 16. Espectro 1D (600 MHz, tiempo de mezcla, 295 K) del péptido 38136 de la proteína CelTOS. Las regiones características de los desplazamientos químicos de los H de los aminoácidos son señaladas.

Figura 17. Espectro ^1H - ^1H TOCSY del péptido 38136. Las regiones características NH-H α o huella digital, NH-H $\alpha\beta\gamma\delta$, H α - $\beta\gamma\delta$, región de aminoácidos aromáticos y NH-NH son resaltadas.

Figura 18. Espectro COSY del péptido 38136 de la proteína CelTOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H α o huella digital y su secuencia.

Figura 19. Espectro TOCSY del péptido 38136 de la proteína CelTOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ y su secuencia.

Figura 20. Espectro TOCSY del péptido 38136 de la proteína CelTOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación del sistema de espín de los aminoácidos del péptido, región H α -H β , γ , δ y su secuencia.

Figura 21. Espectro NOESY del péptido 38136 de la proteína CelTOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H $\alpha,\beta,\gamma,\delta$. Protones de los aminoácidos en verde para señales de secuencia y en rojo conectividades de media y larga distancia.

Figura 22. Espectro NOESY del péptido 38136 de la proteína CelTOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región de correlación H α - β,γ,δ y su secuencia. Protones de los aminoácidos en rojo para conectividades de media distancia.

Figura 23. Representación de correlaciones NOE a media y larga distancia. En flechas amarillas la interacción intra-residual observada en los espectros COSY y TOCSY y en flechas azules la interacción inter-residual observada en el espectro NOESY.

Figura 24. Patrón de conectividades NOEs esperado para las estructuras: hélice α , hélice 3_{10} , giros β tipo I, II, I' y II'. La intensidad de las señales clasifican a los NOEs en: débiles, medios y fuertes. Tomado de (131).

Figura 25. Coeficiente de temperatura: $-\Delta\delta\text{NH}/\Delta T * 10^3$ (ppm/K).

LISTA DE PUBLICACIONES

1. **Bermúdez A**, Alba MP, Vanegas M, Patarroyo ME. 3D structure determination of STARP peptides implicated in *P. falciparum* invasion of hepatic cells. *Vaccine*. 2010 Jul 12; 28(31):4989-96.
2. Patarroyo ME, **Bermúdez A**, Alba MP. The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi (ϕ) and psi (ψ) angles. *BiochemBiophys Res Commun*. 2012 Dec 7; 429(1-2):81-6.
3. Curtidor H, Arévalo-Pinzón G, **Bermúdez A**, Calderon D, Vanegas M, Patiño LC, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Binding activity, structure, and immunogenicity of synthetic peptides derived from *Plasmodium falciparum* CeTOS and TRSP proteins. *Amino Acids*. 2012; 43(1):365-78.
4. **Bermúdez A**, Moreno-Vranich A, Patarroyo ME. Protective immunity provided by a new modified SERA protein peptide: its immunogenetic characteristics and correlation with 3D structure. *Amino Acids*. 2012 Jul; 43(1):183-94.
5. **Bermúdez A**, Calderon D, Moreno-Vranich A, Almonacid H, Patarroyo MA, Poloche A, Patarroyo ME. *Gauche*⁽⁺⁾ side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine. *Vaccine*. 2014 Apr 11; 32(18):2117-26.

ARTÍCULOS COMPLEMENTARIOS AL TRABAJO DE TESIS

6. Patarroyo ME, **Bermúdez A**, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chem Rev*. 2011, 111, 3459-507. **Review**.
7. Patarroyo ME, **Bermúdez A**, Moreno-Vranich A. Towards the development of a fully protective *Plasmodium falciparum* antimalarial vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2012, 11, 1057-70. **Review**.
8. Patarroyo ME, **Bermúdez A**, Alba MP, Vanegas M, Moreno-Vranich A, Poloche LA, Patarroyo MA. IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric-Electron and Topochemical Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine Development. *PLoS One*. 2015, 10, e0123249.

ABREVIATURAS

CeITOS	cell traversal protein for ookinete and sporozoite
cHABP	conserved, high activity binding peptides
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
COSY	COrrelationSpectroscopY
CSP	circumsporozoite protein
CVFF	Consistent-Valence Force Field
DC	dominio citoplasmático / dicroísmo circular
DGII	Distance Geometry II
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FC	fracción constante
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HLA	human leukocyte antigen
HSPGs	heparan sulfate proteoglycans
mHABP	modified, high activity binding peptide
MSP1	Merozoite surface protein 1
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
PBR	protein binding region

PDR	pruebas de diagnóstico rápido
PPIIL	Polyproline II left handed
RCT	receptor de células T
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SERA	Serine repeat antigen
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia
STARP	Sporozoite threonine-asparagine- rich protein
TOCSY	TOTal Correlation SpectroscopY
TRAP	thrombospondin-related anonymous protein
TRSP	thrombospondin-related sporozoite protein
TSR	thrombospondin type-1 repeat
VWA	Von Willebrand tipo A1
WB	Western-blot
2D	dos dimensiones

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Manuel Elkin Patarroyo, maestro y tutor, quien con sus conocimientos, experiencia y dirección, me encaminó para alcanzar este gran logro profesional.

A mis compañeros de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), de la sección de Inmunología, Yolanda Silva y Martha Forero por su colaboración y apoyo en lo relacionado con los ensayos inmunológicos, a Luis Poloche y Raúl Rodríguez por su apoyo en las inmunizaciones en la estación de primates en Leticia-Amazonas, a la sección de Química dirigida por la Dra. Magnolia Vanegas por su soporte en la síntesis, caracterización y purificación de los péptidos, a la sección de Biología Molecular, dirigida por el Dr. Manuel A. Patarroyo por el apoyo en lo relacionado con la obtención de las recombinantes de las proteínas CelTOS y TRSP, a la sección de Receptor-Ligando, dirigida por el Dr. Hernando Curtidor, por la colaboración en los ensayos de unión, al grupo de Resonancia Magnética Nuclear especialmente a Gladys Cifuentes, Patricia Alba, Hannia Almonacid, Rocío Rojas y Jorge Aza Conde por su apoyo en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Marisol Ocampo y Dr. Hernando Curtidor, gracias por su aporte a esta Tesis doctoral (lectura y recomendaciones).

A los profesores del doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Rosario: Doctores: Lilian Chuaire, Sandra Ramírez, Ana Isabel Gómez, Constanza Contreras, Ramón Fayad, Luisa Matheus, Amparo Mogollón, Emilio Quevedo, Carlos Restrepo, Magda Carolina Sánchez y Carlos Trillos por lo aprendido a su lado.

Al Dr. Pierre Druille, Pasteur Institute, Paris, Francia, por proveer la recombinante de la proteína STARP.

A la Dra. Patricia de la Vega, Maryland University, School of Medicine, Baltimore, USA por proveer las láminas de esporozoitos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo de investigación, especialmente, Vicente, Oswaldo, Jamer, Edwin, Rigoberto, Rosana, Carmenza, Rosita, su apoyo y estímulo permanentes han sido fundamentales para llevar a buen término esta tesis.

RESUMEN

El desarrollo de una vacuna contra malaria es un área de exploración activa pero con enormes retos debido especialmente a la complejidad del ciclo del parásito. Así, es necesario bloquear las diferentes etapas de la invasión que tiene el *Plasmodium falciparum* y extraer de ellas la mayor información posible de la artillería que utiliza para su ataque. Para esto, péptidos de las proteínas STARP, CeTOS y TRSP (del esporozoito) y SERA 5 (del merozoito) que tienen alta afinidad de unión a células HepG2 y a glóbulos rojos respectivamente (conocidos como cHABPs), han sido modificados (conocidos como mHABPs), sintetizados y evaluados a nivel de respuesta inmune en monos *Aotus* así como estudiados en su conformación estructural por RMN de ^1H .

Los resultados muestran que los péptidos nativos no son inmunogénicos, pero pueden inducir altos títulos de anticuerpos cuando sus residuos críticos o sus vecinos son reemplazados por otro con un volumen y masa similar, pero diferente polaridad. El estudio conformacional pone de manifiesto que las estructuras de los péptidos nativos son diferentes de sus péptidos modificados ya sea que muestren regiones estructuradas más cortas o más largas o que no presenten ninguna, en comparación con sus análogos modificados altamente inmunogénicos. Las características estereoquímicas particulares en las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos de estos péptidos modificados así como los rasgos fisicoquímicos parecen jugar un rol importante en la respuesta inmune apropiada cuando estos fueron inmunizados en grupos de monos *Aotus* confirmando un avance al diseño de una vacuna contra malaria totalmente eficaz.

ABSTRACT

Developing an anti-malarial vaccine represents a dynamic area for exploration, even though one having enormous challenges, especially due to the complexity of the parasite's lifecycle. *Plasmodium falciparum*'s different invasion stages must thus be blocked and the greatest amount of information possible concerning the artillery to be used in its attack must be extracted from them. Peptides from (sporozoite-derived) STARP, CelTOS and TRSP and (merozoite-derived) SERA 5 proteins having high binding affinity for HepG2 cells and red blood cells, respectively (known as conserved HABPs), have thus been modified, synthesised and evaluated at immune response level in *Aotus* monkeys as well as having been studied regarding their structural conformation by ¹H-NMR.

The results have shown that native peptides are not immunogenic, but can induce high antibody titres when their critical or neighbouring residues are replaced by others having similar volume and mass but different polarity. Conformational study has revealed that native peptide structures are different from that of their modified peptides, having shorter or longer structured regions or not having any compared to their highly immunogenic modified analogues. Particular stereo-chemical characteristics in the side-chains of some of these modified peptides' amino acid residues, such as physical-chemical features, seem to play an important role in inducing an appropriate immune response when they have been immunised in groups of *Aotus* monkeys, thereby complementing the design of a totally effective vaccine against malaria.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria, especialmente la causada por *P. falciparum*, es considerada una de las enfermedades parasitarias de mayor impacto en salud pública mundial ya que causa los mayores índices de mortalidad y morbilidad al año (1, 2).

La gran distribución de la enfermedad en las zonas tropicales del planeta, el aumento en la resistencia del vector de transmisión (hembra del mosquito *Anopheles*) a los insecticidas, resistencia del parásito a los medicamentos antimaláricos, a la migración de la población hacia áreas endémicas, al calentamiento global y a condiciones sanitarias de pobreza han favorecido la persistencia de esta enfermedad (3).

Estas circunstancias han animado la búsqueda de nuevas medidas para el control de la enfermedad, como las orientadas a erradicar el mosquito vector, al mejoramiento de tratamientos antiparasitarios con nuevos fármacos (4) y, por otro lado, una de las más importantes medidas como lo es el desarrollo de una vacuna antimalárica totalmente efectiva para la cual muchos grupos de investigación del mundo han venido trabajando desde hace varias décadas.

Lograr una vacuna contra la malaria constituye una tarea muy compleja ya que para obtener una vacuna totalmente efectiva contra esta enfermedad, se deben resolver problemas relevantes, como los relacionados con el complejo ciclo de vida del parásito, dada su capacidad para cambiar la composición celular y molecular, controlada por un genoma con más de 5400 genes reconocidos hasta hoy (5-7). Por otra parte, la interacción con dos hospederos uno vertebrado y otro invertebrado hace que el área de estudio se incremente. Adicionalmente, en el estadio pre-eritrocítico del parásito, el cual constituye el primer

encuentro con el hospedero, la cantidad de esporozoítos infectivos inoculados es mínima (8), y no existe una metodología para cultivar el parásito *in vitro* en esta fase.

Teniendo en cuenta cada uno de los aspectos que determinan la complejidad de esta enfermedad, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), ha trabajado desde hace más de 30 años en el desarrollo de una vacuna contra la malaria sintetizada químicamente, dirigida contra los diferentes estadios del *P. falciparum*. En el avance de este objetivo, recientemente se han descrito algunos principios a seguir para desarrollar vacunas multi-estadio, basadas en mínimas subunidades y que son sintetizadas químicamente (9, 10), sin embargo algunos de estos todavía tienen que definirse para garantizar una protección completa y definitiva, para así obtener la metodología que permita el desarrollo de vacunas contra las enfermedades infecciosas que afectan la humanidad.

Como herramienta en la búsqueda del establecimiento de dichos principios, este trabajo de tesis doctoral incluye un estudio estructural detallado realizado por medio de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN de ^1H), de nuevos péptidos candidatos a ser considerados como vacuna contra malaria, los cuales fueron derivados de proteínas de diferentes estadios de *P. falciparum*, que conllevaron determinaciones conformacionales, físico-químicas y rasgos estereoquímicos (orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos). También de estudios a nivel inmunológico con dichos péptidos sintetizados químicamente y que fueron altamente inmunogénicos en primates no humanos (monos *Aotus*).

De acuerdo a los hallazgos reportados en este trabajo, fragmentos peptídicos modificados en secuencia, derivados de proteínas del estadio pre-eritrocítico y eritrocítico vitales para la supervivencia del parásito y que están involucrados en el tránsito celular y el reconocimiento e infección de las células, evidencian un cambio, tanto en la inducción de la respuesta inmune

(en monos *Aotus* inmunizados con dichos fragmentos) como en su configuración espacial con respecto al péptido nativo no inmunogénico. Los cambios en las propiedades inmunogénicas y estructurales están relacionados directamente con las modificaciones de los residuos críticos de unión a células blanco, las cuales deben ser hechas estratégicamente. De este trabajo se sugiere que los péptidos modificados 24972, 24320 y 24322 derivados de la proteína STARP, 38138 de la proteína CelTOS, 38148 de la proteína TRSP y 23426 de la proteína SERA 5 podrían ser algunos de los epítopes relevantes a ser incluidos como posibles candidatos en una vacuna contra malaria, dada su capacidad de inducir títulos de anticuerpos duraderos en monos *Aotus*, además de generar protección (péptido 23426) en ensayos *in vivo*.

Se muestra también que las características estereoquímicas de péptidos provenientes de diferentes proteínas, juegan un papel importante en la respuesta inmune. Entre éstos rasgos estereoquímicos se resaltan los ángulos diedros ϕ y ψ de las moléculas empleadas en los ensayos de inmunización. Los péptidos modificados que indujeron una respuesta inmune, presentan como rasgo característico la tendencia a tener una conformación poliprolina tipo II (ya sea parcial o total), además la mayoría de estos péptidos contenían otros fragmentos ligeramente estructurados. Igualmente, se evidenció que la conformación y orientación de la cadena lateral de los aminoácidos de la mayoría de los péptidos, específicamente el ángulo diedro χ_1 , fue crítica con respecto a su respuesta inmune siendo relevantes las posiciones 3 y 7, éstas últimas basada en los motivos y registros de unión de acuerdo al HLA-DR β 1* de monos *Aotus*.

En conjunto estos resultados generan novedosas e importantes contribuciones para el diseño de una vacuna contra malaria totalmente efectiva pero que podrán ser aplicadas a diferentes enfermedades producidas por patógenos.

2. MARCO TEORICO

2.1. Malaria en el contexto Mundial

2.1.1. Generalidades de la Malaria

La malaria en humanos es una enfermedad causada por cinco especies de protozoarios del filum apicomplexa del género *plasmodium* entre los cuales están: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, siendo el primero la forma que más afecta la vida humana y que predomina en África. *P. vivax* es menos letal pero más generalizado y las otras especies se encuentran con menos frecuencia.

De acuerdo al informe mundial de la malaria para el año 2014 que compila la información recibida de 97 países, donde la malaria es endémica y que genera impacto de las medidas de control contra esta enfermedad, los casos y muertes por malaria en el 2013 fueron 198 millones y 584.000 respectivamente. Estos últimos estimados comparados con los años anteriores muestran como ha disminuido esta enfermedad a nivel mundial (4) (Tabla 1 a y b respectivamente), sin embargo se debe recordar que las estimaciones del número de casos y muertes por malaria están acompañadas de un alto grado de incertidumbre debido a la incompleta presentación o inconsistencia de los informes finales de cada región. Así, para esta enfermedad se estima que una población de más de 2 billones de personas que viven en regiones endémicas o cerca del 40% de la población mundial está expuesta al riesgo de infectarse (11). Se estima también que las poblaciones que viven en el África subsahariana tienen el riesgo más alto de adquirir malaria: aproximadamente el 80% de los casos y el 90% de las muertes se producen en esta región, siendo los más afectados los niños menores de cinco años de edad y las mujeres embarazadas (4). Sin embargo se ha observado que la carga de malaria ha disminuido en todas las regiones, estas disminuciones se han presentado en África, posiblemente se deba al aumento en la financiación de los últimos años que se ha

traducido en acceso a mosquiteros, a insecticidas y a programas de erradicación (12), pero desafortunadamente esto ha traído consecuencias adversas como son la resistencia del mosquito a al menos un insecticida como se ha identificado en varios países (4) y a algunos de los derivados antimaláricos por parte del hospedero humano que llevan a el aumento de las cifras en los estimados estadísticos.

Tabla 1. Estimación de los casos (a) y muertes (b) por malaria en diferentes regiones en el mundo, realizado por la OMS, para los años 2000, 2005 y del 2010–2013 (Tomado de WORLD MALARIA REPORT 2014 (4)).

(a) Number of cases (000's)	2000	2005	2010	2011	2012	2013
Africa	174 000	192 000	167 000	163 000	163 000	163 000
Americas	2 500	1 700	1 100	800	800	700
Eastern Mediterranean	14 000	10 000	9 000	11 000	10 000	9 000
Europe						
South-East Asia	33 000	34 000	28 000	28 000	27 000	24 000
Western Pacific	4 000	2 000	2 000	1 000	1 000	1 000
World	227 000	240 000	207 000	203 000	202 000	198 000
Lower bound	150 000	155 000	133 000	129 000	127 000	124 000
Upper bound	304 000	328 000	287 000	282 000	281 000	283 000
(b) Number of deaths	2000	2005	2010	2011	2012	2013
Africa	801 000	761 000	576 000	543 000	530 000	528 000
Americas	2 300	1 800	1 300	1 000	900	800
Eastern Mediterranean	17 000	13 000	12 000	13 000	12 000	11 000
Europe	3					
South-East Asia	53 000	50 000	46 000	44 000	43 000	41 000
Western Pacific	9 500	4 700	3 900	3 300	3 500	3 300
World	882 000	830 000	639 000	605 000	590 000	584 000
Lower bound	599 000	547 000	405 000	384 000	376 000	367 000
Upper bound	1 104 000	1 029 000	795 000	755 000	742 000	755 000

Source: WHO estimates

En Colombia, según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud, para la semana 19 de 2015 se habían notificado 11601 casos de malaria, de los cuales 6130 (52,8%) correspondieron a infección por *P. falciparum* y 5282 (45,5%) por *P. vivax* (13). El departamento del Chocó notificó el mayor porcentaje de los casos con 51,8 %, seguido por Antioquia con el 14,7 %. Se observa en la Tabla 2 el predominio de la especie *P. falciparum* en los departamentos de Chocó y Nariño.

Tabla 2. Distribución de los casos de malaria por departamento de procedencia, Colombia, semana epidemiológica 50 de 2014. Tomado de: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud. Colombia (13).

Departamento	Malaria mixta	Malaria falciparum	Malaria malarie	Malaria vivax	Frecuencia absoluta casos	Frecuencia relativa de casos	Frecuencia acumulada
Chocó	304	10 302	1	5307	15914	42,4 %	42,4 %
Antioquia	60	2068	4	7052	9184	24,5 %	66,9 %
Nariño	3	4659	0	70	4732	12,6 %	79,5 %
Bolívar	75	195	0	1428	1698	4,5 %	84,0 %
Córdoba	7	82	0	1346	1435	3,8 %	87,9 %
Amazonas	2	60	0	972	1034	2,8 %	90,6 %
Otros departamentos	74	977	3	2467	3521	9,4 %	100,0 %
Total	525	18 343	8	18 642	37 518	100,0 %	

Por otra parte, es importante recalcar que Colombia notificó 19 muertes por malaria hasta la semana 50 del 2014, con 8 muertes provenientes de Choco lo cual concuerda con la alta mortalidad asociada a la infección con *P. falciparum* y 11 repartidas en 8 departamentos (13).

La malaria es una enfermedad totalmente prevenible y tratable, siempre y cuando las intervenciones recomendadas actualmente por la organización mundial de la salud sean correctamente implementadas (4). Estas incluyen el control de vectores a través del uso de mosquiteros tratados con insecticida, el control de las larvas, la quimio-prevención para las poblaciones más vulnerables, particularmente mujeres embarazadas y niños, la confirmación del diagnóstico de malaria a través de microscopía o pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para cada caso sospechoso, y el tratamiento oportuno con el medicamento antimalárico apropiado (teniendo en cuenta la especie de parásito y cualquier resistencia documentada a los medicamentos) (4). Sin embargo continúa siendo prioridad mundial el desarrollo de una vacuna eficaz para eliminar esta enfermedad.

2.1.2. Ciclo de vida del *Plasmodium*

Parásitos del género *Plasmodium* se desarrollan en dos hospederos y en cada uno de ellos tienen un ciclo reproductivo diferente. En el *Anopheles*, hospedero definitivo, se efectúa la

fase sexual o esporogónica del ciclo de vida del parásito, mientras que en el hombre, huésped intermediario, tiene lugar la fase asexual o esquizogónica.

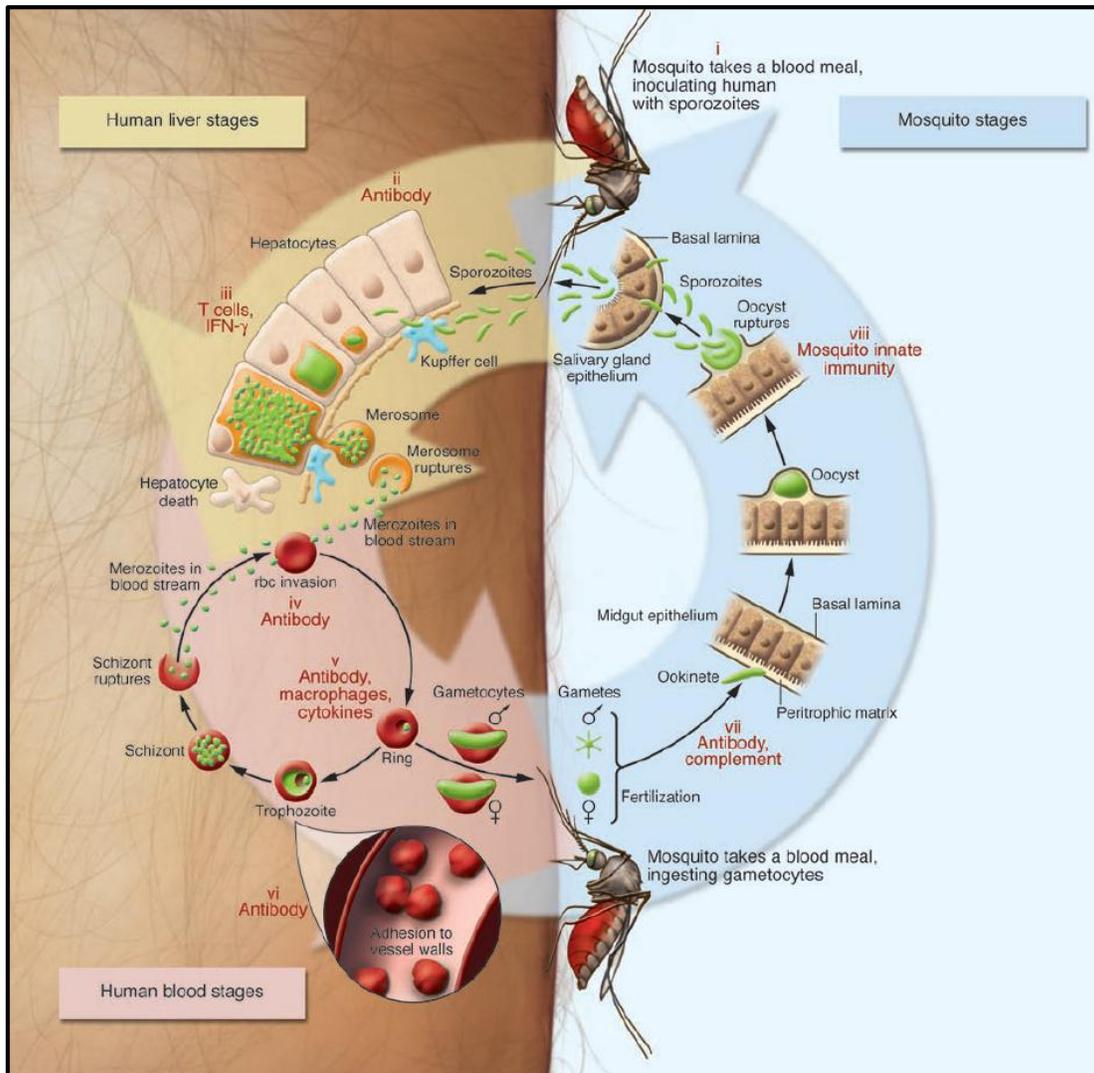


Figura 1. Ciclo de vida del *P. falciparum*. El ciclo de vida del parásito comprende diversas etapas, en las cuales cerca de 5400 proteínas actúan y cualquiera de ellas podría ser el blanco de las respuestas inmunitarias del huésped. El ciclo inicia con la inoculación de esporozoítos por parte del mosquito *Anopheles* en la dermis humana, estos acceden a los vasos sanguíneos, transitan a través de diferentes células, se deslizan a lo largo de las sinusoides hepáticas, cruzan el parénquima hepático y migran a través de varios hepatocitos hasta que algunos de los esporozoítos invaden e ingresan al interior de éstos e inician el desarrollo asexual (esquizogonia), para luego desarrollarse en miles de merozoítos. Estos salen del hepatocito infectado en vesículas (merosomas) que, después de la ruptura, permiten a los merozoítos invadir glóbulos rojos, iniciando con ello el estadio

eritrocítico. Durante esta etapa de la infección, también se produce la formación de gametocitos los cuales son ingeridos por un nuevo mosquito en donde se inicia el ciclo sexual. Tomado de (1).

El ciclo de vida del *P. falciparum* en el hombre incluye un estadio pre-eritrocítico el cual inicia la infección, un estadio asexual eritrocítico que causa la enfermedad clínicamente definida y un estadio gametocítico el cual infecta al mosquito que transmite el parásito para completar con ello su ciclo (Figura 1) (14). En cada uno de estos estadios, el parásito expresa múltiples proteínas que tienen funciones específicas en el reconocimiento e infección de la célula blanco, que son por lo tanto los blancos o candidatos a vacuna contra la malaria.

El estadio pre-eritrocítico comienza cuando una hembra del mosquito *Anopheles*, durante la picadura a un hospedero humano, introduce esporozoítos (estructuras morfológicamente parecidas a larvas) provenientes de sus glándulas salivales.

Después de que el mosquito infectado inoculara en la dermis los esporozoítos, éstos se deslizan aleatoriamente hasta que hacen contacto con células endoteliales, las cuales ellos atraviesan para entrar en el torrente sanguíneo y rápidamente alcanzan el hígado. Dentro del hígado los esporozoítos cruzan la barrera sinusoidal y entran en la parénquima hepática, donde invaden los hepatocitos y se convierten en un estado exoeritrocítico maduro, estableciendo así la infección de la malaria en el huésped vertebrado (15). Se ha demostrado que los esporozoítos pueden interactuar con las células blanco de dos maneras: uno migran a través de la célula, hiriendo está en el proceso, o dos pueden productivamente invadir la célula con la formación de una vacuola parasitófora (16). Como los esporozoítos deben atravesar varias barreras celulares con el fin de alcanzar a los hepatocitos, atravesar las células es un paso crítico para la infectividad de los esporozoítos *in vivo* (17). Se ha demostrado que los niveles de sulfatación de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, del inglés “heparan sulfate proteoglycans) en la superficie de una célula blanco determinan si los esporozoítos atravesarán o invadirán una célula, por lo tanto los HSPGs altamente sulfatados de los hepatocitos desencadenan una cascada de señalización en los esporozoítos que resulta en la

invasión (15). Las células hepáticas resultan óptimas para el desarrollo parásito ya que son adecuadas para su nutrición y desarrollo, permiten su crecimiento y la iniciación del ciclo esquizogónico. Aunque se conoce que los eventos más importantes en la invasión del hígado por los esporozoítos son atravesar la capa de diferentes células y la infección de hepatocitos, las bases moleculares de estos eventos aún no se han esclarecido (18).

Una vez en el hepatocito cada esporozoíto se divide hasta generar entre 15.000 a 45.000 nuevas formas del parásito llamadas merozoítos (estadio asexual), los cuales tienen morfología semejante a una pera; ellos salen del hígado al torrente sanguíneo por medio de merozomas (19) en aproximadamente una semana, sin dejar ningún residuo de los parásitos en el hígado, con excepción del *P. vivax* y *P. ovale* que pueden generar un estado de hipnozoito (20). Esta etapa pre-eritrocítica no causa la enfermedad. Los merozoítos invaden glóbulos rojos, en donde crecen y se reproducen, dividiéndose consecutivamente hasta dar origen a aproximadamente 36 células intra-eritrocíticas que forman el esquizonte adulto eritrocítico. Cuando este se encuentra maduro, se rompe y estalla el eritrocito dejando en libertad nuevos merozoítos, capaces de invadir otros glóbulos rojos e iniciar una nueva generación de merozoítos. Los síntomas de la malaria sólo se producen durante esta fase eritrocítica de la infección (21, 22).

Un pequeño porcentaje de merozoítos en el estadio eritrocítico asexual se diferencian a formas sexuales o gametocitos (formas sexuales del protozoario, macho y hembra), los cuales ingiere el mosquito para iniciar el ciclo sexual.

La fase sexual se inicia en el momento en que, como consecuencia del carácter hematófago de las hembras *Anopheles*, los gametocitos hembra y macho desarrollados en el individuo infectado llegan al intestino medio del mosquito, abandonan el eritrocito infectado y maduran para convertirse en gametos. El microgameto o gameto macho se fracciona en seis o siete

cuerpos flagelares mientras que el macrogameto o gameto hembra aumenta de tamaño y su núcleo emigra a la periferia en donde sobresale como una estructura cónica sobre la que se implanta uno de los flagelos en el momento de la fecundación (23).

De esto surge el cigoto que se alarga en forma de huso y se hace móvil transformándose en el ooquinetto. Éste penetra las paredes del estómago del mosquito y produce una membrana a su alrededor para formar un quiste (oocito) que crece hasta alcanzar la pared externa del estómago del *Anopheles* y se subdivide repetidas veces. En este momento el oocito mide 50 micras y contiene miles de esporozoítos, cuerpos fusiformes con un núcleo central de 13 micras de largo por 2 de diámetro, que por ruptura del oocito maduro son liberados y emigran hacia las glándulas salivares del mosquito. Es desde estas glándulas que son inoculados en el hospedero vertebrado, cuando el mosquito se alimenta y de esa manera se reinicia el ciclo (23) (Figura 1).

2.1.3. Sintomatología y Patogénesis de la malaria

Los síntomas característicos incluyen episodios febriles, cefalea, escalofríos, anemia y sudoración, resultantes de la ruptura sincronizada de las células rojas en la etapa eritrocítica (21), las cuales en estadios más avanzados de la enfermedad pueden conducir a daño renal reversible, malaria cerebral, trombopenia, y aun la muerte del individuo, lo cual acontece entre el 1% y 2% de las personas infectadas.

Una característica clave en la biología del *P. falciparum* es su habilidad para hacer que glóbulos rojos infectados se adhieran a las paredes de los vasos sanguíneos. Estos parásitos secuestrados causan considerables obstrucciones en la perfusión de los tejidos, hecho especialmente importante en malaria cerebral y placentar. Este fenómeno compromete el

fluido sanguíneo entre órganos, por ello individuos afectados con malaria se tornan deshidratados e hipovolémicos. La destrucción de los glóbulos rojos y la anemia severa son parte inevitable en la malaria, que compromete el transporte de oxígeno. Las complicaciones de la malaria incluyen anemia hemolítica, recrecimiento y ruptura del bazo, hígado y riñones, fallo pulmonar, disturbios gastrointestinales, malaria cerebral, coma y muerte (1, 24-26).

2.2. Principales proteínas antigénicas del esporozoíto y del merozoíto

Han sido identificadas un gran número de moléculas en cada etapa del parásito gracias al esclarecimiento completo del genoma, proteoma y transcriptoma de *P. falciparum* (6, 27-29) las cuales son de gran interés para diferentes grupos de investigación (7, 30).

En los últimos años se ha logrado identificar una diversidad de proteínas que inducen respuesta inmune celular y humoral. Algunas de estas proteínas se han clonado y se han secuenciado, lo cual permite comprender mejor su estructura, su expresión funcional, y la identificación de sus respectivos epítopes. Por otro lado, las proteínas que inducen inmunogenicidad son específicas de cada especie y de cada una de las fases que conforman el ciclo biológico del parásito (9, 10).

De esta variedad de proteínas se destacan las provenientes del esporozoíto (Figura 2a) y del merozoíto (Figura 2b) que han sido estudiadas como posibles blancos para una vacuna contra la malaria y que son relevantes para el ciclo del parásito. Algunas de estas proteínas están situadas en la superficie de la forma invasiva, mientras otras están localizadas en orgánulos como las roptrias, micronemas y gránulos densos. La gran mayoría han sido agrupadas entre varias familias de acuerdo a su localización celular o características moleculares. En la figura 2 se identifican estas estructuras así como las principales proteínas en las cuales han sido

descritas de acuerdo a la forma invasiva en el humano/vertebrado (en azul se resaltan las proteínas utilizadas en este trabajo). A continuación se detallan algunas de las proteínas más importantes en los dos estadios.

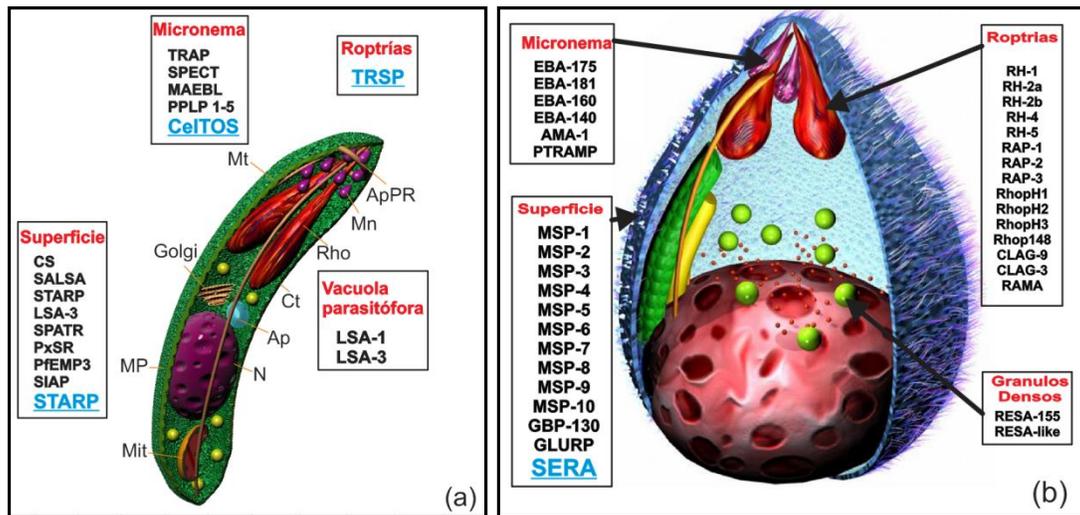


Figura 2. Diagrama de la localización sub-celular de algunas proteínas del esporozoíto (a) y del merozoíto (b) involucradas en la invasión al hepatocito y al eritrocito respectivamente. Adaptada de Curtidor y col. (10) y Patarroyo y col. (14).

2.2.1. CSP

En los esporozoítos, la efectividad en la motilidad y la capacidad de unirse e invadir las células hepáticas son los eventos más importantes en el viaje hacia el hígado. En este tránsito se han identificado diferentes proteínas gracias a nuevas estrategias desarrolladas en el área de la biología molecular (31), entre las más estudiadas está: La proteína circumsporozoito (CSP del inglés “circumsporozoite protein”) que ha sido considerada como un excelente blanco para el desarrollo de vacunas contra la malaria del estadio pre-eritrocítico, debido a que es abundante en la composición de los esporozoítos, a su alta inmunogenicidad y al papel fundamental en la invasión de las células hepáticas (32, 33). Esta molécula muestra características comunes en su estructura molecular a todos los plasmodios; está formada por

un dominio N-terminal, con un motivo conservado en el cual se destaca el pentapéptido (KLKQP) que es el sitio de clivaje a proteasas llamado región I (RI) (34), también posee una región central de repetición de amino ácidos, la cual es blanco de anticuerpos que bloquean la entrada de los esporozoítos (35). Además, contiene una secuencia corta conservada llamada región III (RIII). La región II+ (RII+), presenta una secuencia de 18 aminoácidos embebida en una región del dominio de repetición trombospondina tipo 1 (TSR, del inglés “thrombospondin type-1 repeat”) (36). Esta región media la adhesión de los esporozoítos a los proteoglicanos de heparan sulfato en las sinusoides del hígado ya que contiene un surco cargado positivamente que permite acomodar grupos sulfato de los proteoglicanos de heparan sulfato (37). Esta proteína contiene además una secuencia de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en su extremo C-terminal que ancla esta proteína a la membrana del esporozoíto (38) (Figura 3).

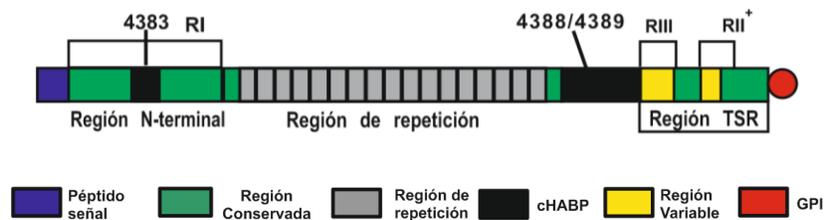


Figura 3. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína CSP del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs del inglés “conserved high activity binding peptides” (4383,4388 y 4389 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC) (39).

En estudios previos se identificaron péptidos conservados en diferentes especies de *plasmodium* con alta capacidad de unión a células blanco o cHABPs, derivados de la proteína CSP de *P. falciparum* que tienen alta afinidad por las células HepG2 (Figura 3), a los cuales se les identificó los residuos críticos de unión a este tipo de células. Estos péptidos no inducen respuesta inmune cuando son inoculados en monos *Aotus* (39); sin embargo, en otro estudio estos péptidos fueron modificados en sus residuos críticos de unión con el fin de potenciar su capacidad de inducir una respuesta inmune, estos péptidos modificados o mHABPs fueron usados para inmunizar monos *Aotus* los cuales generaron una importante respuesta inmune humoral, además el estudio por RMN de ¹H de estos péptidos, evidenció una conformación del tipo giro β (40).

En cuanto a la estructura tridimensional de CSP, recientemente se ha elucidado un fragmento recombinante, que contiene la región III y el dominio TSR. Este segmento recombinante presenta estas regiones entre una sola unidad llamada α TSR. Este dominio, a su vez posee un bolsillo hidrofóbico (Figura 4 en naranja) cuya función es desconocida. La región III forma un plegamiento integral que involucra una α hélice anfipática a la cual le siguen ortogonalmente 3 hebras en la región homóloga TSR, que están situadas una junto a la otra como una hoja beta antiparalela, además se determinó que los extremos N y C terminal están bastante cercanos (41).

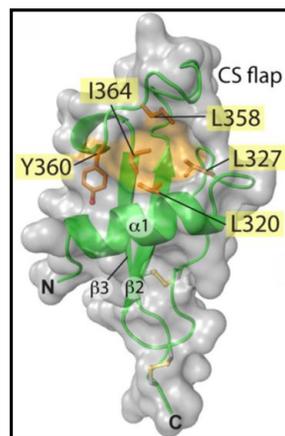


Figura 4. Estructura tridimensional del dominio α TSR de CSP. Representación en superficie transparente del fragmento α TSR, en naranja se resalta un bolsillo hidrofóbico, en amarillo se indican los aminoácidos que lo componen. En verde se señalan las diferentes estructuras secundarias como hélice α , hoja plegada antiparalela β y bucles. Tomado de (41).

Los estudios en los cuales aparece CSP, están los relacionados con SPf66 que fue la primera vacuna contra la malaria químicamente sintetizada, multi-antigénica, multi-estadio, basada en mínimas subunidades, la cual produjo una completa protección en cerca del 40% de los monos *Aotus* que fueron inmunizados con fragmentos de dicha molécula (42). SPf66 tiene 45 amino ácidos de largo e incluye la secuencia NANP (Asn-Ala-Asn-Pro, intercalada 2 veces) derivada de la región de repetición de CSP. Esta molécula fue incluida en ensayos de campo por diferentes grupos científicos alrededor del mundo y con diversos grupos étnicos en poblaciones de individuos mayores a 1 año de edad (43-46) con resultados positivos en

cuanto a respuesta inmune, seguridad y reactogenicidad, lo que generó las bases para el desarrollo de la nueva generación de vacunas.

CSP es reconocida como el único candidato incluido en una vacuna biológica en alcanzar ensayos clínicos Fase III en grandes poblaciones y en diferentes partes del mundo; conocida como la “recombinante RTS-S”, consta entre otros del antígeno de superficie (S) del virus de la hepatitis B como una matriz transportadora entre la cual una secuencia de aminoácidos de CSP ha sido insertada. Esta vacuna recombinante tiene una eficacia del 34,8% contra malaria severa en la categoría de edades combinadas (47, 48).

Aunque la vacuna no es totalmente protectora, es una de las principales proteínas en jerarquía con respecto a aquellas que pueden intervenir en la actividad inmunológica en una vacuna.

2.2.2. TRAP

Proteína anónima relacionada a trombospondina (**TRAP**, del inglés “thrombospondin-related anonymous protein”) también llamada SSP2 (Sporozoite surface protein) (49). Importante porque media la motilidad o deslizamiento del parásito y la invasión celular en el mosquito y en el huésped vertebrado (50). Pertenece a una familia de proteínas que se encuentran en los micronemas en las etapas de invasión de los parásitos del filum apicomplexa y en las vesículas secretoras del complejo apical (51). Los miembros de la familia TRAP tienen una estructura similar que consiste de: un dominio citoplasmático en el extremo C-terminal (DC), un dominio transmembranal (Región IV), una región rica en prolinas (Región III) y, dos regiones de adhesión: el dominio TSR (Región II) (52, 53), y la región Von Willebrand tipo A1 (VWA) (Región I) (54) (Figura 5), estas últimas son conocidas porque intervienen en interacciones proteína-proteína.

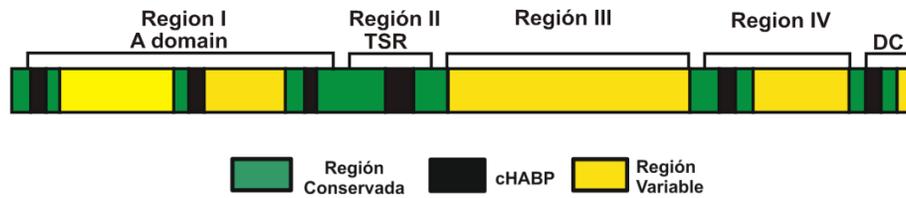


Figura 5. Diagrama que ilustra la organización de las regiones características de la proteína TRAP. Se resalta la ubicación de los cHABPs (55) (cuadros negros).

López y colaboradores, encontraron 21 péptidos (cHABPs) de alta unión a células HepG2 provenientes de TRAP, de los cuales 5 han sido ubicados en los dominios de unión de esta proteína, evidenciando también los residuos críticos de unión para cada uno de estos cHABPs (55). Modificaciones realizadas a los residuos críticos y posteriores inmunizaciones con estos péptidos (mHABPs) a monos *Aotus* potenciaron la respuesta inmune, lo que fue asociado a los cambios estructurales si se compara la estructura de los péptidos nativos con la de los modificados, se encuentran que la mayoría de los cHABPs presentan una conformación al azar, mientras los modificados mostraron regiones estructuradas cortas que involucran estructuras tipo giros β clásicas o distorsionadas (56).

Tossavainen y colaboradores describieron la estructura tridimensional del dominio TSR de TRAP (57), ésta presenta un plegamiento alargado formando una hoja β antiparalela de tres cadenas (Figura 6). Las hebras B y C forman una hoja β regular, mientras que la hebra A es irregular con un patrón ondulado, se evidenciaron varios enlaces de hidrógeno entre el esqueleto de la proteína y átomos de la cadena lateral, así como las interacciones entre las cadenas laterales intercaladas por dos triptófanos y tres argininas que estabilizan la estructura. Es probable que se forme interacciones entre lisina o arginina y una cadena lateral aromática de la fenilalanina, tirosina o triptófano lo que le confiere una mayor estabilidad energética, adicional a los tres puentes disulfuro en los extremos de la estructura (58).

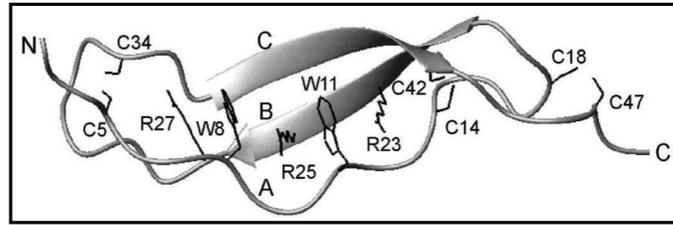


Figura 6. Estructura tridimensional del dominio TSR de la proteína TRAP. La presencia de puentes de hidrógeno entre el esqueleto del fragmento y las cadenas laterales y puentes disulfuro, uno en su extremo N-terminal y 2 en su extremo C-terminal hacen que la estructura sea bastante estable (57).

2.2.3. STARP

La proteína del esporozoíto rica en treonina y asparagina (**STARP**, del inglés “Sporozoite threonine-asparagine-rich protein”), fue identificada sobre la superficie del esporozoíto mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopia inmunoelectrónica (7, 59). Ésta consta de 604 residuos de amino ácidos y tiene una masa molecular cercana a los 78 kDa, posee un péptido señal y 3 regiones centrales de repetición (Figura 7), entre las cuales está la región conocida como Mosaico (M), que esencialmente está compuesta por una serie de motivos cortos de entre 3 y 9 residuos dispersos en esta región, la región Rp45 que contiene 2 repeticiones idénticas de 45 amino ácidos de largo y la región Rp10 constituida por 26 unidades repetidas en tándem de 10 amino ácidos y un fragmento N-terminal conservado (59).

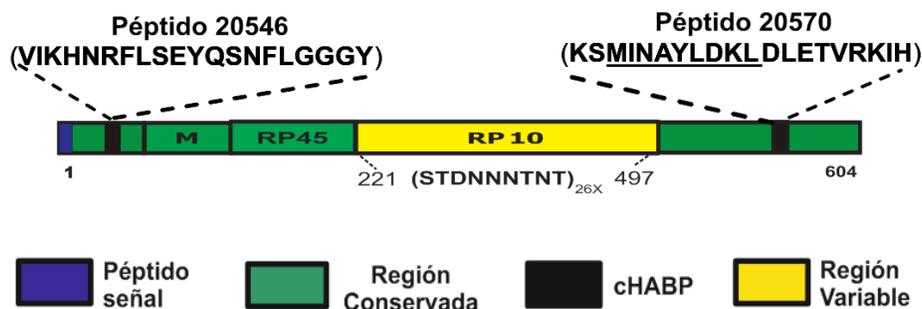


Figura 7. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína STARP del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs (60) (20546 y 20570 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

STARP ha sido considerada candidata potencial para generar una vacuna contra malaria del estadio pre-eritrocítico porque anticuerpos contra este antígeno bloquean la invasión de los esporozoítos a las células hepáticas (61). Adicionalmente esta proteína contiene el motivo PEXEL (*Plasmodium* export element) RxLxE/Q/D que ha sido involucrado en el transporte de proteínas más allá de la vacuola parasitófora, resaltando su importancia (62). En otro estudio se identificaron 12 péptidos de alta unión a células HepG2, de los cuales 5 estaban en regiones conservadas, a los que se les determinó cuales eran los residuos críticos de unión mediante un ensayo de competición (60). Recientemente, se evaluó la capacidad del reconocimiento del fragmento C-terminal de la proteína recombinante STARP por parte de sueros de pacientes infectados con malaria en un área geográfica de características endémicas; los análisis por Western blot (WB), muestran que el 42.6% de las muestras contenían anticuerpos específicos contra esta recombinante, lo cual evidenció el papel antigénico de STARP (63).

Adicionalmente el estudio prospectivo realizado en Mali, utilizando microarreglos de proteínas de *P. falciparum* y sueros de 220 individuos, mostró que la proteína STARP es la segunda en importancia con respecto a la respuesta de anticuerpos, en pruebas realizadas antes y después de la temporada de malaria, sugiriendo que STARP es un excelente candidato a vacuna (64). Hasta ahora la estructura de esta proteína no ha sido elucidada total o parcialmente.

2.2.4. CelTOS

La proteína CelTOS cuya fusión está relacionada con el paso a través de células y es producida por el ooquineto y los esporozoítos, (**CelTOS**, del inglés “**C**ell **t**raversal **p**rotein **f**or **o**okinete and **s**porozoite”), es esencial para la migración del parásito desde el intestino medio del mosquito a las glándulas salivares y para la migración de los parásitos desde el

sitio de picadura del mosquito en la piel hasta el hígado (17). CelTOS se localiza en los micronemas (17, 18), que son orgánulos en donde se depositan algunas proteínas antes de ser trasladadas a la superficie del esporozoíto, y es una proteína de masa molecular relativa de 25 kDa que presenta péptido señal (Figura 8) y que es conservada entre las diferentes especies de *plasmodium*.

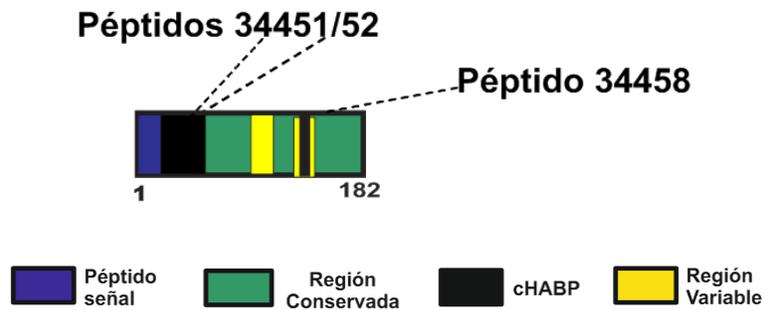


Figura 8. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína CelTOS del esporozoíto. Se resaltan los cHABPs (34451, 34452 y 34458 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

Kariu y colaboradores (17) encontraron que la interrupción selectiva del gen CelTOS de *Plasmodium berghei* (Pb) en un ensayo *in vivo* redujo la infección en algunos animales. En el mismo estudio, con el fin de evaluar la habilidad de infectar hepatocitos en un ensayo *in vitro*, células HepG2 incubadas con parásito tipo silvestre y con el gen interrumpido mostraron que CelTOS no es necesaria para la infección. Los mismos autores también evaluaron la actividad de la proteína sobre el tránsito de los esporozoítos a través de células HeLa mediante el ensayo de ruptura celular, logrando determinar que CelTOS está involucrada en el tránsito celular del parásito; además encontraron que la infectividad en el hígado en ratones se restauró cuando se eliminaron las células de Kupffer, lo cual indica que se requiere de CelTOS para el paso de los esporozoítos desde el sistema circulatorio a través de la capa de células sinusoidales del hígado, en particular las células de Kupffer (17).

Bergmann-Leitner y colaboradores (65) encontraron que la inmunización de ratones con una proteína recombinante de PfCelTOS induce una marcada respuesta humoral y celular así como protección estéril contra el reto heterólogo con esporozoítos de *P. berghei* en ratones.

Posteriormente se evaluó la eficacia protectora contra la malaria en ratones, inducida por la inmunización con la proteína recombinante de PbCelTOS acompañada del adyuvante Montanide ISA-720 (66), en este caso se encontró que la eficacia protectora inducida por la proteína recombinante fue alta y que los anticuerpos generados reconocieron los esporozoítos de *P. berghei*, lo que puso de manifiesto el potencial de esta proteína como componente esencial de una vacuna contra la malaria. Actualmente, la recombinante PfCelTOS, expresada en *E. Coli* se está ensayando en estudios clínicos fase I (67). La estructura de CelTOS no ha sido elucidada a la fecha por métodos convencionales, recientemente se reportaron modelos de la estructura obtenidos por diferentes métodos de predicción, mostrando en todos su alto contenido α helical (68).

2.2.5. TRSP

La proteína del esporozoíto relacionada a trombospondina (**TRSP**, del inglés “**thrombospondin-related sporozoite protein**”), fue descrita en esporozoítos de *P. yoelii* (28), como una proteína de 18 KDa (con 163 amino ácidos). Estudios de inmunolocalización indicaron que TRSP se expresa en oocistos y en esporozoítos de las glándulas salivares del mosquito, con un patrón de distribución exclusivo si se compara con el patrón de proteínas de micronema y de superficie, lo cual indica una posible localización en las roptrias de los esporozoítos, infortunadamente no se ha identificado a la fecha proteínas del esporozoíto específicas de roptrias con las cuales confirmar esta localización. TRSP es también una proteína altamente conservada entre las diferentes especies del *plasmodium*, se predice que contiene un péptido señal, una región central-RII que contiene el dominio TSR y un dominio transmembranal seguido de un dominio citoplasmático corto (Figura 9) (28). La proteína TRSP al igual que la proteína STARP contiene el motivo PEXEL en el N-terminal significativo en el transporte de esta proteína.

y que induce altos títulos de anticuerpos anti-MSP1₄₂ en las poblaciones del estudio (75), indicando la importancia de mantener este fragmento en las fases siguientes de investigación.

La proteína MSP-1 completa (76), se sintetizó en fragmentos de 20 residuos, con el fin de conocer cuáles de estos eran importantes en la interacción con la membrana del glóbulo rojo, y mediante estudios de competición se determinaron 4 péptidos nativos (cHABPs) que se unían con alta especificidad a los eritrocitos y que estaban situados en regiones conservadas de la proteína (76) (Figura 10). Estos péptidos fueron modificados en sus residuos críticos de unión, determinados previamente (76), se elucidó la estructura tridimensional mediante RMN de ¹H, resaltando su característica α helical en la mayoría de los cHABPs y en todos sus mHABPs, lo cual junto con los estudios de inmunización en ensayos *in vivo* mostraron la importancia de algunos péptidos modificados en el diseño de vacunas (77-80).



Figura 10. Diagrama de la localización de los fragmentos proteolíticos de la proteína MSP-1. Se resalta la ubicación de los cHABPs (76) (cuadros negros).

2.2.7. SERA

La proteína del merozoíto conocida como antígeno de repetición de serina (**SERA**, del inglés “**Serine repeat antigen**”), pertenece a una gran familia de genes que incluye un total de 9 miembros en *P. falciparum* de los cuales SERA 5 se expresa en mayor proporción que los otros miembros. Por otra parte, SERA 5 parece ser esencial para el crecimiento del parásito en el estadio eritrocítico y dada la dificultad de interrumpir este gen utilizando diferentes enfoques, se ha sugerido que desempeña un papel importante para el sostenimiento del ciclo eritrocítico (81).

SERA 5 es expresada en la vacuola parasitófora y sobre la superficie del merozoíto, es sintetizada como un precursor de cerca de 111 kDa, es procesada en 3 dominios de 47 (N-terminal) , 56 (central), y 18 kDa (C-terminal) (Figura 11). Los fragmentos de 47 y 18 están unidos por un enlace disulfuro y se mantienen sobre la superficie del merozoíto en el momento de la ruptura del esquizonte, mientras el dominio de 56 se somete a un segundo procesamiento originando 2 fragmentos de 50 y 6 kDa que son secretados al sobrenadante de cultivo después de la ruptura del esquizonte (81-83).

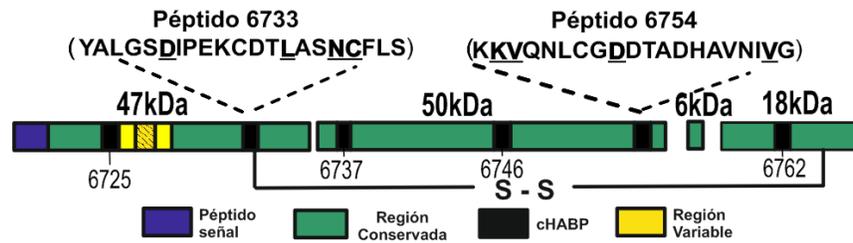


Figura 11. Diagrama de la localización de las regiones representativas de la proteína SERA 5 del merozoíto. Se resaltan los cHABPs (84) (6725, 6733, 6737, 6746, 6754 y 6762 enumerados de acuerdo al código de la FIDIC).

El fragmento N-terminal de 47 kDa es uno de los más estudiados ya que ha demostrado ser inmunogénico e inducir la producción de anticuerpos que inhiben la invasión de los eritrocitos y la replicación del parásito *in vitro* e *in vivo* (85-87). Este dominio ha sido estudiado por Horii y colaboradores (82, 87-89), ellos iniciaron con el estudio del fragmento completo llamado SE47, al cual luego le removieron un grupo de serinas que dificultaban su purificación y lo denominaron SE36. Los estudios en primates no humanos y clínicos Fase I muestran que este último fragmento es altamente inmunogénico (88, 89).

El otro fragmento de SERA 5 en estudio es el de 50 kDa ya que ha sido considerado un dominio catalítico activo por tener un alto grado de homología con la familia de las cisteína proteasas conocida como papaínas. Esta actividad catalítica ha sido tema de considerables debates debido a la sustitución de una cisteína (C) por una serina (S) dentro de la triada catalítica de la proteína, este clivaje final de 50 y 6 kDa podría ser la clave del papel proteolítico de este fragmento. Recientemente, estudiaron la actividad enzimática de dicho fragmento y su inhibición por péptidos derivados del fragmento de 6 kDa, evidenciando 2 péptidos que inhiben el crecimiento y el desarrollo de parásitos de *P. falciparum* en ensayos *in vitro* y demostrando que el paso del clivaje final es esencial en la actividad enzimática (90). En cuanto a la estructura de SERA 5, solo el fragmento de 50kDa fue elucidado, para éste, los autores aducen algunas contradicciones con respecto al sitio catalítico putativo al compararlo con el de la catepsina L, al parecer existen algunos residuos como el ácido aspártico en la posición 594 (D594) cuya cadena lateral ocupa un espacio importante, restringiendo posiblemente el acceso del sustrato al sitio catalítico (Figura12) quedando dudas sobre la función de dicho sitio (91).

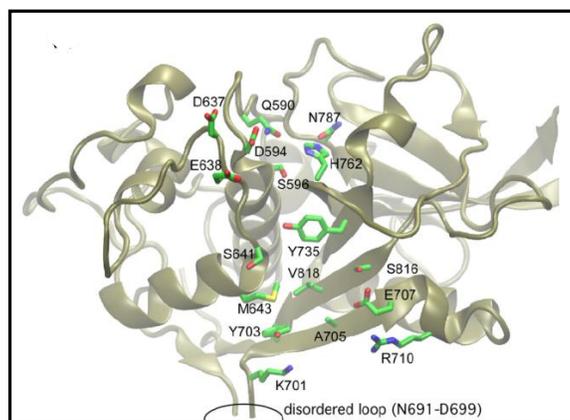


Figura 12. Estructura del fragmento de 50kDa de la proteína SERA 5 de *P. falciparum*. Figura tomada de (91).

Adicionalmente, en otro estudio se sintetizó la proteína SERA 5 en fragmentos de 20 residuos, mediante estudios de receptor-ligando, se encontró 6 péptidos presentaron alta capacidad de unión al eritrocito, y adicionalmente, determinaron los residuos críticos de dicha unión de estos péptidos mediante ensayos de competición (84). A la fecha se han realizado varios estudios estructurales mediante RMN de ^1H con 4 de estos 6 péptidos y sus

correspondientes modificados, los cuales todos presentaron fragmentos α helicales, confiriéndole posiblemente la importancia de su plegamiento en la estructura terciaria de la proteína, estos péptidos modificados inoculados en monos *Aotus* generaron altos títulos de anticuerpos y protección contra el reto experimental, suministrando posibles candidatos en el diseño de vacunas contra el estadio eritrocítico (92-95).

2.3. Inmunidad contra *P. falciparum* en el contexto de vacunas

La inmunidad adquirida, que constituye la base del desarrollo de las vacunas, se caracteriza por el reconocimiento específico de los antígenos extraños y la generación de memoria inmunológica hacia estos antígenos por parte de linfocitos B y células T. Esta respuesta se clasifica en dos amplias categorías, la humoral y la celular. Generalmente la respuesta inmune humoral es importante en la reacción contra parásitos extracelulares, mientras que la celular está implicada en infecciones por microorganismos intracelulares, aunque la combinación de ambas se presenta con frecuencia durante las infecciones causadas por los patógenos (21, 96).

De estos patógenos, el *Plasmodium falciparum* el cual como ya se ha mencionado se desarrolla parte en el hombre y parte en el mosquito invertebrado. Esta infección parasitaria tiene un ciclo de vida muy complejo y la respuesta inmunitaria humana contra este parásito está influenciada por las características del ciclo de vida en el que alterna fases del ciclo de vida intra- y extra-celular infectando hepatocitos y eritrocitos (21).

Aunque a la fecha, esta respuesta inmune no ha sido completamente esclarecida, las evidencias experimentales en humanos y en animales están proporcionando conocimiento sobre la inmunología de la infección por *plasmodium*, mostrando que la respuesta inmune humoral es relevante en el control de los parásitos y por ende en su desarrollo asexual. La

importancia de la inducción de anticuerpos fue evidenciada por primera vez por estudios de transferencia pasiva realizados en seres humanos (97).

La producción de anticuerpos específicos en respuesta a antígenos experimentales y contra sus homólogos naturales en el parásito se ha estudiado tanto en los voluntarios humanos como en los animales de experimentación vacunados, utilizando diferentes metodologías. De las técnicas de laboratorio frecuentes en investigación para la evaluación de la inmunidad *in vitro* mediada por anticuerpos, están las que miden la especificidad de la unión Antígeno-Anticuerpo. Distintas propiedades que tienen las inmunoglobulinas tales como la unión a un antígeno con alta especificidad y el hecho de que la interacción antígeno-anticuerpo pueda ser visible por fenómenos como la precipitación, la aglutinación y otros mecanismos indirectos hacen que estas mediciones se empleen ampliamente para evaluar la calidad de la respuesta inmune dirigida por anticuerpos que reconocen un antígeno durante un proceso de inmunización. Una vez se realiza la reacción antígeno-anticuerpo se debe evidenciar, en algunas ocasiones, la posibilidad de combinar diferentes sustancias con la fracción constante (Fc) de los anticuerpos, como enzimas acopladas a fluoro-cromos y radioisótopos, cuyo uso además de no afectar su afinidad del anticuerpo por el antígeno amplifican las opciones de detección del anticuerpo. Entre este grupo de técnicas están el ELISA (del inglés “Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”); el Western-blot (WB), la inmuno-fluorescencia y la citometría de flujo entre otras (98). Como técnicamente es posible producir anticuerpos contra cualquier molécula, el empleo de técnicas basadas en la detección de anticuerpos sirve para estudiar cualquier tipo de molécula contenida en una solución o en una célula si ella es identificable por un anticuerpo.

En cuanto a la respuesta inmune por activación de células T, se ha postulado que en humanos la respuesta inmune contra malaria en vacunas, están bajo control de genes localizados en el complejo mayor de histocompatibilidad (99). Con el fin de introducir el tópico de la activación de las células T, es bueno recordar que los linfocitos T solo pueden reconocer

antígenos que se presentan en otras células. El trabajo de presentar antígenos asociados a células para que sean reconocidos por los linfocitos T está a cargo de unas proteínas especializadas que son codificadas por genes presentes en el *locus* designado **Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)**, de los cuales existen 2 tipos principales: clase I y clase II. La región genética que codifica las moléculas del CMH II se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 en la posición 6p21.3 y codifica para la síntesis de tres tipos de proteínas de membrana, llamadas en humanos (**human leukocyte antigen**) HLA-DP, -DQ y -DR (Figura 13) (100). Las moléculas del CMH II son heterodímeros formados por dos cadenas pesadas: la cadena alfa (α) codificada por la región monomórfica en el caso de HLA-DRA y la cadena beta (β) codificada por la región altamente polimórfica HLA-DRB (101). Esta región HLA-DRB contiene nueve genes (representados por los números, 1al 9), cinco de ellos son pseudogenes, mientras que los otros cuatro (HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, y HLA-DRB5) se transcriben, siendo el locus HLA-DRB1* uno de los más polimórficos. Las moléculas codificadas por estos genes son llamados HLA-DR β 1*, como por ejemplo en el caso del HLA-DR β 1*0401 (el número después del * identifica el alelo), son las encargadas de presentar antígenos peptídicos al TCR mediante la formación del complejo MHCII-P-TCR necesarios para inducir una respuesta inmune apropiada contra el antígeno por parte de los linfocitos T (96, 101).

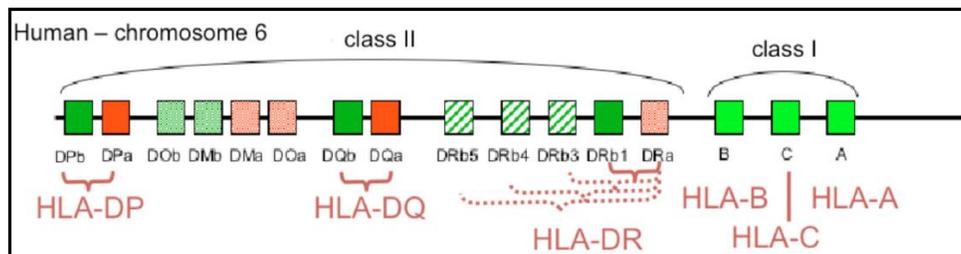


Figura 13.Región del Complejo mayor de histocompatibilidad de humano sobre el cromosoma 6(100).

Estos alelos han sido agrupados de acuerdo a la serología, métodos moleculares y estudios filogenéticos en cinco grandes grupos o haplotipos (102). Estos haplotipos son: HLA-DR1, HLA-DR51, HLA-DR52, HLA-DR8 y HLA-DR53 (como ejemplo, este último expresando especificidades serológicas de los alelos: HLADR β 1* 04, 07, y 09) (101, 102).

En estudios de secuenciación de los genes que codifican las moléculas Clase II (HLA-DR β 1*) de monos *Aotus*, se ha encontrado una similitud entre el 88% al 100% con las moléculas HLA-DR β 1* 04, 03, 08, 11, 13, 14, 15, 16, 10, 07, y 01 de humano (103), refiriendo al mono *Aotus* como un modelo experimental útil para el desarrollo de vacunas para uso humano (9, 103).

Como se mencionó anteriormente, las moléculas CMH II están formadas por dos cadenas, α y β (Figura 14a), las cuales se combinan para formar una ranura o región de unión a la proteína llamada PBR del inglés “protein binding region” (Figura 14b). Formada por un piso o plataforma de ocho hojas β derivadas de ambas cadenas y dos hélices α , una formada por la cadena α y el otro por la cadena β .

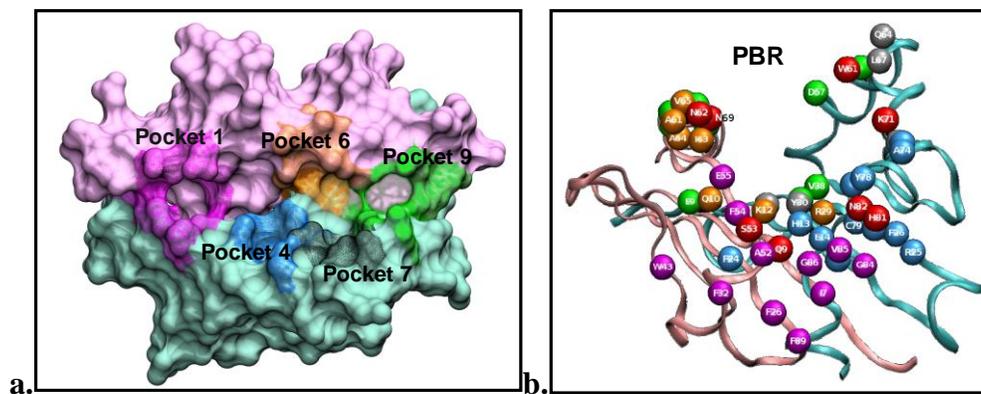


Figura 14. Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (a) Representación en superficies de la estructura HLA-DR β 1*0101 (código PDB: 1DLH). Cadena α en rosado y cadena β en azul claro y (b) vista lateral de la representación en cintas y esferas de la misma molécula en (a), resaltando la región de unión al péptido (PBR). Adaptada de Patarroyo y colaboradores (9).

A la fecha se han elucidado estructuralmente diferentes tipos de alelos humanos principalmente mediante cristalografía de rayos X (104-108), entre las cuales, la estructura del HLA-DR β 1*0101 de humano formando un complejo con un péptido del virus de la

influenza, elucidada por Stern y colaboradores (108), ha sido una de las pioneras en la investigación estructural de moléculas CMH II. En éste complejo se evidenciaron 4 bolsillos principales (en inglés “pockets”) denominados P1, P4, P6 y P9 (Figura 14a), donde el péptido que va a ser presentado al receptor de células T (RCT), puede ajustarse entre dichos bolsillos y formar puentes de hidrógeno entre los átomos del esqueleto del péptido y las cadenas laterales de los aminoácidos que están involucrados en los bolsillos del CMH II, dando una importante estabilidad al complejo pCMHII y así permitir una mejor presentación del complejo al receptor de células T. Por tal razón es importante que este ajuste ocurra y sea lo más inalterable posible para lograr la inducción de una respuesta inmune efectiva.

2.4. Estructura tridimensional de péptidos y proteínas

Las proteínas son macromoléculas con grupos funcionales neutros, cargados positivos y negativos distribuidos de forma característica sobre la superficie de cada molécula. Como resultado, la carga neta de cada proteína varía con el pH y puede ser positiva, negativa, o neutra. Las proteínas están compuestas de polímeros lineales de aminoácidos llamados polipéptidos. Cada polipéptido existe como un simple polímero de aminoácidos de una longitud precisa acoplados en un orden puntual.

El problema para definir la estructura completa de cualquier polímero polipeptídico es el grado de libertad rotacional alrededor del gran número de enlaces simples que están presentes en la cadena del polímero. En un polipéptido pueden existir desde 500 hasta 10.000 enlaces simples, lo que podría llevar a diferentes estructuras tridimensionales. Sin embargo, los polipéptidos en las proteínas, asumen solamente una estructura preferencial o un número pequeño de estructuras intercambiantes, que representa como única a cada secuencia de aminoácidos de un polipéptido.

Se ha observado que en las proteínas, los polipéptidos asumen estructuras conformacionales clásicas como: hélice- α , hélice- 3_{10} , vueltas β , laminas β entre otras, ordenadas y estabilizadas por enlaces de hidrógeno intramoleculares o por puentes de hidrógeno intercatenarios como en las láminas β .

Con el conocimiento del genoma humano, los investigadores tienen un gran reto ya que será necesario conocer la estructura tridimensional de las proteínas para entender su función; para esto la espectroscopia de RMN surge como una herramienta para este propósito la cual se realiza generalmente sobre las moléculas en solución, acercándose a las condiciones fisiológicas (109).

Conocer la estructura tridimensional de péptidos y proteínas es de gran ayuda para entender los detalles precisos de la función biológica y en algunos casos inmunológica. Básicamente, para describir la estructura de las proteínas, se deben considerar 4 niveles de organización conocidos como: estructura primaria, secundaria terciaria y cuaternaria (110).

En las proteínas, la estructura primaria se define como la secuencia lineal de aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. La estructura secundaria está determinada por interacciones no covalentes (interacciones débiles), conocidas como puentes de hidrógeno o enlaces de hidrógeno que pueden ser intra- e intermoleculares que determinan ciertos ordenamientos regulares dentro del esqueleto de la cadena polipeptídica. La estructura terciaria describe todos los aspectos relacionados con el plegamiento tridimensional de un polipéptido, que se presenta por diferentes interacciones al interior de la secuencia de aminoácidos, entre las que se encuentran las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales, los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes (interacciones fuertes) tipo puente disulfuro, junto con asociaciones moleculares con los solventes del medio (110).

Algunas proteínas presentan actividad únicamente al estar en agregados moleculares, éstas estructuras macromoleculares corresponden a la estructura cuaternaria (111, 112).

De las estructuras secundarias, de interés en este trabajo, sobresalen las **hélices α** (Figura 15a), en las cuales la cadena polipeptídica se enrolla en espiral sobre si misma debido a los giros producidos en torno al carbono α de cada amino ácido. Esta estructura se mantiene estable gracias a las interacciones entre hidrógeno inter-residuo (secuenciales o a larga distancia) formados entre el grupo carbonilo de un enlace peptídico con el hidrógeno de la amida del cuarto enlace peptídico siguiente, cada vuelta de una hélice-alfa contiene 3.6 residuos (113). Existen algunos residuos como la prolina que no permiten la formación de esta estructura secundaria ya que su grupo amino no es geoméricamente compatible con la espiral derecha de la hélice-alfa (no posee hidrógeno amida); por el contrario produce un cambio en la estructura que interrumpe la estructura helicoidal. Otra estructura secundaria es la **hélice 3_{10}** que es poco frecuente y que se caracteriza por ser más corta que la hélice α ya que tiene 3 residuos por vuelta, formando un anillo de 10 átomos, además de otras características (114).

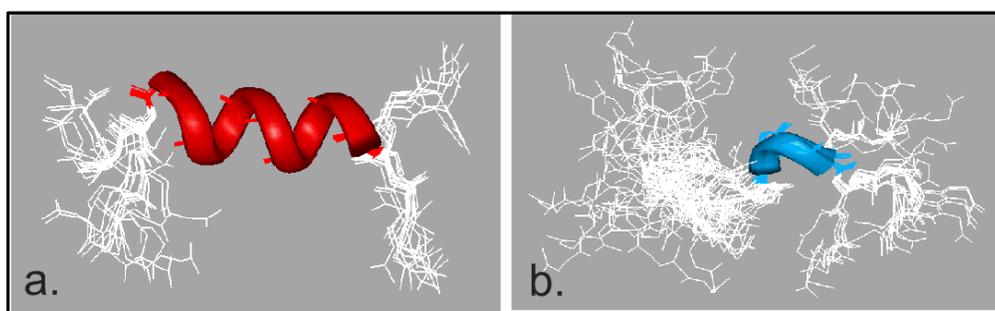


Figura 15. Estructura secundaria en péptidos de proteínas de *P. falciparum*. **a.** Estructura de hélice α del péptido 23762. **b.** Estructura giro β del péptido 24166. **a.** y **b.** Péptidos pertenecientes a la proteína TRAP. Adaptada de (115).

Las **hojas plegada β** , estructura secundaria muy habitual en las proteínas pero no en péptidos (cadena peptídica corta) (ver en Figura 4, hoja plegada β antiparalela resaltada con flechas verdes en sentido contrario), son otro tipo de estructura secundaria en la cual todos los componentes del enlace peptídico están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno.

Los **giros beta** (Figura 15b), estructura secundaria de alto interés estructural y funcional (116) se caracterizan por el giro de la cadena polipeptídica, estabilizado por un puente de hidrógeno, son secuencias cortas, con una conformación característica que impone un brusco giro de 180° a la cadena principal de un polipéptido. Existen muchas clases de giros β que son clasificados de acuerdo a sus ángulos diedros Φ y Ψ (117).

La hélice de **poliprolina tipo I y II**, la I, es una hélice de mano derecha, caracterizada por contener todos los enlaces peptídicos en posición cis, tiene 5.6 \AA/vuelta y $3.3 \text{ residuos/vuelta}$ siendo muy raras en contextos biológicos. Adoptan ángulos diedros ($\phi = -75^\circ$, $\psi = 150^\circ$ y $\omega = 0^\circ$). No tiene puentes de hidrogeno. Mientras que las de tipo II son estructuras helicoidales de mano izquierda (conocida como PPII_L del inglés **Polyproline II left handed**), poseen isómeros trans en sus enlaces peptídicos, se forman cuando todos los residuos secuenciales de la columna adoptan ángulos diedros cercanos a $\phi = -75^\circ$, $\psi = 145^\circ$ y $\omega = 180^\circ$. La hélice de poliprolina II extendida, tiene una hélice de 9.3 \AA/vuelta y $3 \text{ residuos/vuelta}$ en la forma ideal (118, 119); no tiene ningún enlace de hidrógeno interno, a diferencia de las estructuras arriba descritas. Es normal tanto en proteínas plegadas como las que no lo son y su papel funcional es relevante (119, 120).

Para la determinación de la estructura de proteínas y péptidos, se han desarrollado técnicas como la cristalografía de Rayos X, que ha permanecido a la vanguardia por muchos años, la espectroscopia de RMN (121-123) y más recientemente la crio-microscopía electrónica (124). Los dos primeros métodos son los de mayor auge actualmente, y ambos pueden generar de forma fiable estructuras de proteínas de alta calidad para una amplia variedad de moléculas. Estas metodologías tienen ventajas y desventajas en términos de preparación de muestra, recolección y análisis de datos, pero la RMN de moléculas en solución tiene obviamente la ventaja de ser esencial para aquellas proteínas que no pueden ser cristalizadas, además de tener la posibilidad de realizar experimentos en función de la temperatura y con

la oportunidad de realizar estudios de cinética y de acceder a diferentes núcleos haciéndola quizás más importante incluso que la cristalografía de Rayos X.

2.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

2.5.1. Generalidades

Para entender el papel que juegan las proteínas en las funciones biológicas se requiere un estudio detallado de su estructura tridimensional y la identificación de los residuos de amino ácidos cruciales involucrados en la interacción con los diferentes blancos celulares como: proteínas, péptidos, DNA, RNA y pequeños ligandos moleculares (122, 123), para lo cual la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) constituye una de las metodologías analíticas más poderosas en la actualidad para el estudio de la estructura, la función y la dinámica de moléculas en solución (125, 126). A la fecha hay alrededor de 10980 estructuras derivadas de proteínas elucidadas por RMN que han sido depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB) del inglés “protein data bank” (127).

2.5.2. Fundamento de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

El fundamento de la RMN radica principalmente en la interacción de la radiación electromagnética con núcleos atómicos en presencia de un campo magnético. La mayoría de los núcleos atómicos poseen espín, el cual es una propiedad de las partículas que componen los átomos (128) y se da principalmente en los átomos como: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P entre otros, con núcleos magnéticamente activos y que poseen un número impar de protones, neutrones o de ambos.

Al momento de someter átomos con espín nuclear a un campo magnético externo, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espines nucleares se le conoce como resonancia magnética nuclear. La energía aplicada, ΔE , corresponde a la radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias, la cual se rige por la relación:

$$\Delta E = h \gamma B_0 / 2\pi$$

donde, h es la constante de Planck, γ es la relación giromagnética y B_0 el campo magnético aplicado.

La técnica de resonancia magnética nuclear basada en las propiedades nucleares del átomo de hidrógeno principalmente, permiten determinar cuál es la localización de éste, con lo cual se puede construir un modelo tridimensional de la molécula y con esta información es posible obtener la correlación de dicha estructura con su actividad inmunológica. Esta última se puede obtener de ensayos como por ejemplo inmunizaciones en modelos animales con la molécula de interés y la evaluación de la producción de anticuerpos y generación de protección contra el reto experimental, y de tal manera obtener información acerca del su potencial como candidatos a ser componente inmunogénico en vacunas sintéticas con el fin de prevenir enfermedades (129).

2.5.3. Experimentos y Espectros

Cuando se obtiene un espectro de RMN de un péptido o una proteína, las señales se ensanchan debido al movimiento lento de estas moléculas en el medio acuoso. Mientras más

rápido sea el movimiento molecular en el solvente, las señales son más finas. Este ensanchamiento de las señales junto con el traslape entre ellas provocan que los espectros unidimensionales (1D) de un péptido (Figura 16) o una proteína sean imposibles de interpretar.

La representación gráfica de un espectro unidimensional es una representación en dos dimensiones (en el eje de las abscisas: el desplazamiento químico y en el eje de las ordenadas: la intensidad), como se muestra en la figura 16 para el péptido 38136 de la proteína CeITOS, en el cual se señalan las regiones características de acuerdo a los valores de desplazamiento químico de las señales de RMN de ^1H (122).

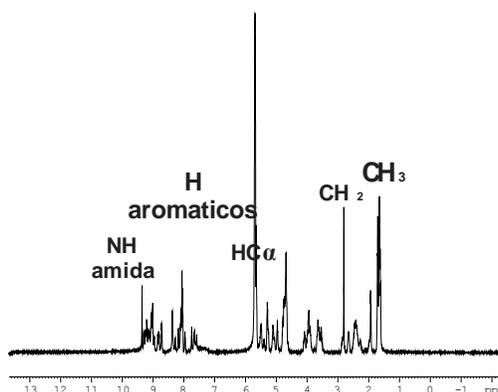


Figura 16. Espectro 1D (600 MHz, tiempo de mezcla, 295 K) del péptido 38136 de la proteína CeITOS. Las regiones características de los desplazamientos químicos de los H de los aminoácidos están indicadas.

Para lograr determinar la estructura tridimensional de péptidos o proteínas con un peso molecular de hasta 15 kDa son suficientes los métodos de RMN homonucleares y experimentos bidimensionales (2D-RMN). Con estos experimentos es posible determinar qué núcleos dentro de una molécula se encuentran acoplados entre sí. Este conocimiento permite determinar el número de protones que se encuentran a dos o tres enlaces de o de menos de 4.5 Å de distancia.

Los experimentos en dos dimensiones se pueden clasificar en homonucleares y heteronucleares, para este trabajo como se dijo anteriormente la determinación de la estructura 3D de un péptido se requiere de experimentos homonucleares que involucran ^1H (como son: COSY, TOCSY y NOESY entre otros, los cuales serán definidos más adelante). Para lograr identificar las diferentes señales detectadas en dichos experimentos de RMN, se tienen en cuenta valores de referencia para los desplazamientos químicos de acuerdo a un estudio previo (130) en el cual una asignación completa se realizó para el residuo X modificado con cada uno de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas en el tetrapéptido GGXA utilizando espectros 1D y 2D, las asignaciones son presentados en la tabla 3, que sirven de base para la asignación total de todos los aminoácidos de un péptido.

Tabla 3. Desplazamiento químico de RMN de ^1H para el residuo X en el péptido GGXA a pH 7.0 y 35° C para cada uno de los 20 residuos de amino ácido comunes. Tomado de (130).

Residue	NH	αH	βH	Others
Gly	8.39	3.97		
Ala	8.25	4.35	1.39	
Val	8.44	4.18	2.13	γCH_3 0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH_2 1.48, 1.19 γCH_3 0.95 δCH_3 0.89
Leu	8.42	4.38	1.65, 1.65	γH 1.64 δCH_3 0.94, 0.90
Pro ^b		4.44	2.28, 2.02	γCH_2 2.03, 2.03 δCH_2 3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88, 3.88	
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH_3 1.23
Asp	8.41	4.76	2.84, 2.75	
Glu	8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH_2 2.31, 2.28
Lys	8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH_2 1.45, 1.45 δCH_2 1.70, 1.70 ϵCH_2 3.02, 3.02 ϵNH_3 7.52
Arg	8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH_2 1.70, 1.70 δCH_2 3.32, 3.32 NH 7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH_2 7.59, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH_2 2.38, 2.38 δNH_2 6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2 2.64, 2.64 ϵCH_3 2.13
Cys	8.31	4.69	3.28, 2.96	
Trp	8.09	4.70	3.32, 3.19	2H 7.24 4H 7.65 5H 7.17 6H 7.24 7H 7.50 NH 10.22
Phe	8.23	4.66	3.22, 2.99	2,6H 7.30 3,5H 7.39 4H 7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13, 2.92	2,6H 7.15 3,5H 6.86
His	8.41	4.63	3.26, 3.20	2H 8.12 4H 7.14

Los espectros en 2D (como el COSY, TOCSY y NOESY) deberían ser una representación en tres dimensiones; sin embargo, los espectros se grafican en dos dimensiones como

diagramas de contornos para que la representación sea de dos dimensiones solamente y se facilite su interpretación, como se muestra en la figura 17. Estos espectros bidimensionales de correlación homonuclear tienen regiones características de identificación del sistema de espín de los aminoácidos de acuerdo a la secuencia del péptido, donde se resaltan las señales que aparecen a las mismas frecuencias en ambas dimensiones, denominadas señales de la diagonal, las señales fuera de la diagonal, también llamadas picos de cruce, indican que existe interacción, o correlación entre los núcleos como las regiones de huella digital o NH-N α , región de señales de los aminoácidos aromáticos y las regiones NH-H α β γ δ , H α - β γ δ y NH-HN (Figura 17).

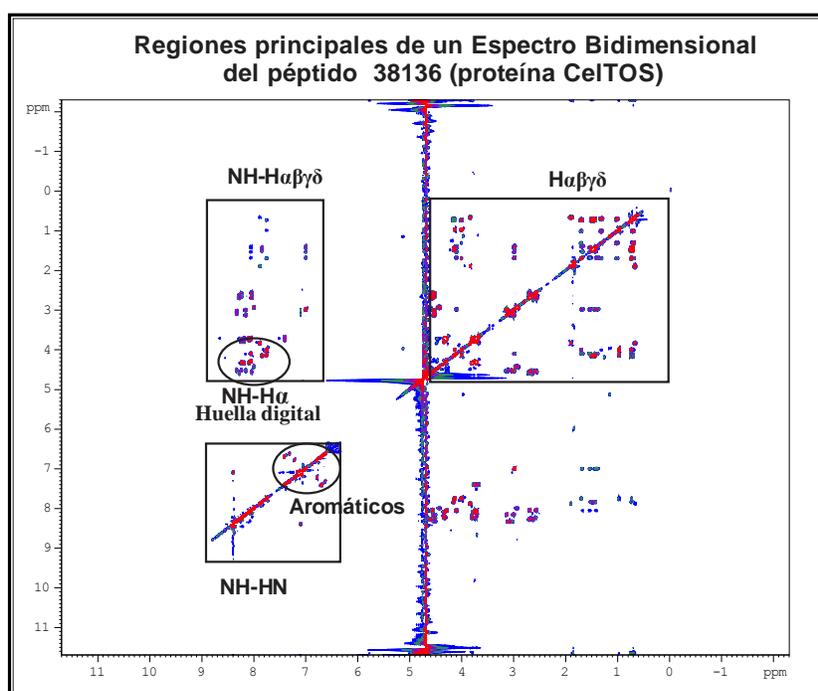


Figura 17. Espectro ^1H - ^1H TOCSY del péptido 38136. Las regiones características NH-H α o huella digital, NH-H α β γ δ , H α - β γ δ , región de aminoácidos aromáticos y NH-NH son resaltadas por recuadros.

El primer paso para la obtención de las estructuras tridimensionales de péptidos, consiste en la asignación de todos los protones de los aminoácidos que conforman la cadena peptídica. Para ello se utilizan estrategias bien establecidas encaminadas a la identificación y asignación

de resonancias de todos los hidrógenos. Se basan fundamentalmente en asignaciones a partir de los efectos en inglés “Nuclear Overhauser Effect” (NOE) (122), los cuales son el parámetro de RMN que proporciona una mayor y más segura información acerca de las estructuras adoptadas por un péptido, pues se deben a la transferencia de la magnetización entre núcleos próximos en el espacio, una transferencia que tiene lugar por acoplamiento dipolar directo entre espines nucleares que proporciona información acerca de las distancias entre los protones del péptido (131).

Existen diferentes experimentos necesarios para la elucidación estructural de un péptido o molécula, uno de ellos es el experimento “CORrelationSpectroscopY” (COSY) que indica la correlación entre dos protones que se encuentran acoplados escalarmente entre ellos, es decir que se hallan a dos o tres enlaces. El acoplamiento escalar se representa como la influencia que ejerce un núcleo activo en RMN sobre otro activo. Al tener dos núcleos acoplados, uno de ellos siente a través de los enlaces químicos un incremento o decremento del campo magnético debido al espín a favor o en contra del núcleo vecino. Este fenómeno produce que las señales de RMN sean más complejas de lo que aparentemente se esperarían. Los espectros bidimensionales de correlación homonuclear, como el COSY (Figura 18), son simétricos con respecto a la diagonal las cuales corresponden a las señales del espectro unidimensional.

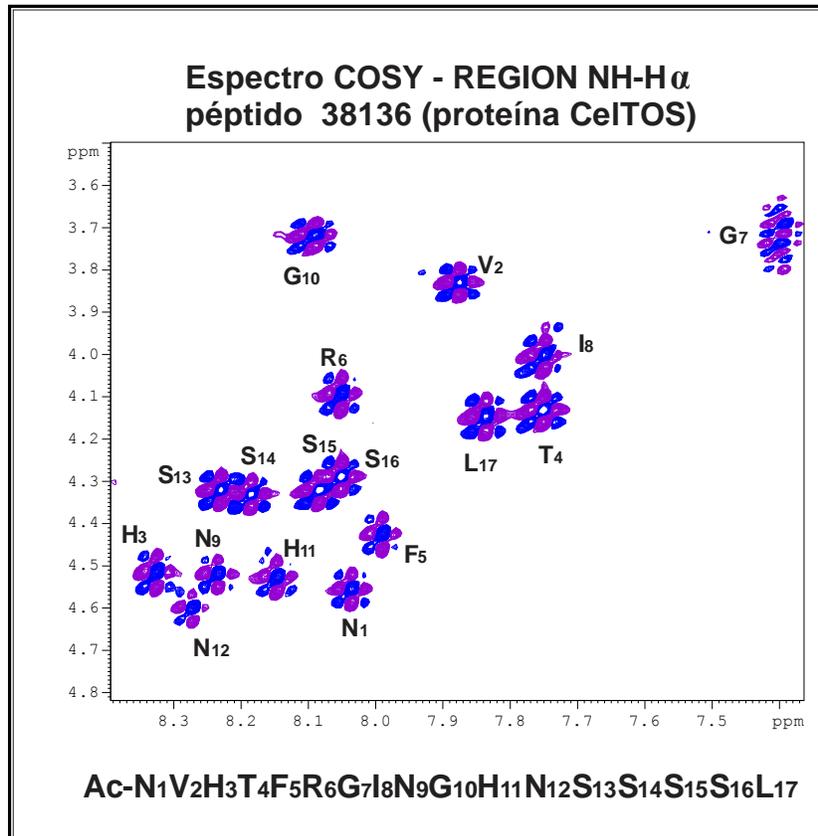


Figura 18. Espectro COSY del péptido 38136 de la proteína CeITOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H α o huella digital y su secuencia.

En un experimento COSY cómo aparecen señales de correlación entre protones acoplados escalaramente, entonces se pueden identificar las señales NH-H α (huella digital), H α -H β , etc de un mismo residuo (ya que el acoplamiento escalar se interrumpe en el grupo carbonilo del enlace péptico) (Figura 18).

Existe otro experimento en dos dimensiones llamado “Total Correlation SpectroscopY” (TOCSY) que muestra la correlación de todos los núcleos (Figuras 19 y 20). La determinación de todos los núcleos que se acoplan entre ellos mismos es una función muy importante en la determinación de estructuras proteicas. Al conjunto de estos núcleos se le llama un sistema de espín. En un péptido, al menos hay tantos sistemas de espín como el número de aminoácidos. El número de sistemas de espín puede ser mayor, ya que en los

aminoácidos aromáticos los protones de los anillos no se acoplan escalarmente a los protones alifáticos.

En el experimento TOCSY la magnetización fluye a lo largo de toda la red de acoplamientos y se obtienen señales de correlación entre todas las frecuencias de los espines que pertenecen a una misma red de acoplamientos (mismo sistema de espín), todas las correlaciones de los protones NH amídicos para el péptido 38136 de la proteína CelTOS se observan en la figura 19. En este punto el sistema de espín de algunos aminoácidos queda identificado pero no es posible distinguir aún residuos con el mismo sistema de espín ni aminoácidos repetidos en la secuencia.

Para completar la asignación, se utiliza un experimento llamado “Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy” (NOESY) el cual genera señales fuera de la diagonal cuando los núcleos se encuentran próximos, a no más de 5 Angstroms de distancia estén o no acoplados escalarmente. En el experimento NOESY la información de interés para la asignación proviene de las conectividades NOE observadas entre los protones que se encuentran contiguos, llamada asignación secuencial y la determinación de NOEs a media y larga distancia que definirán la estructura (Figuras 21 y 22).

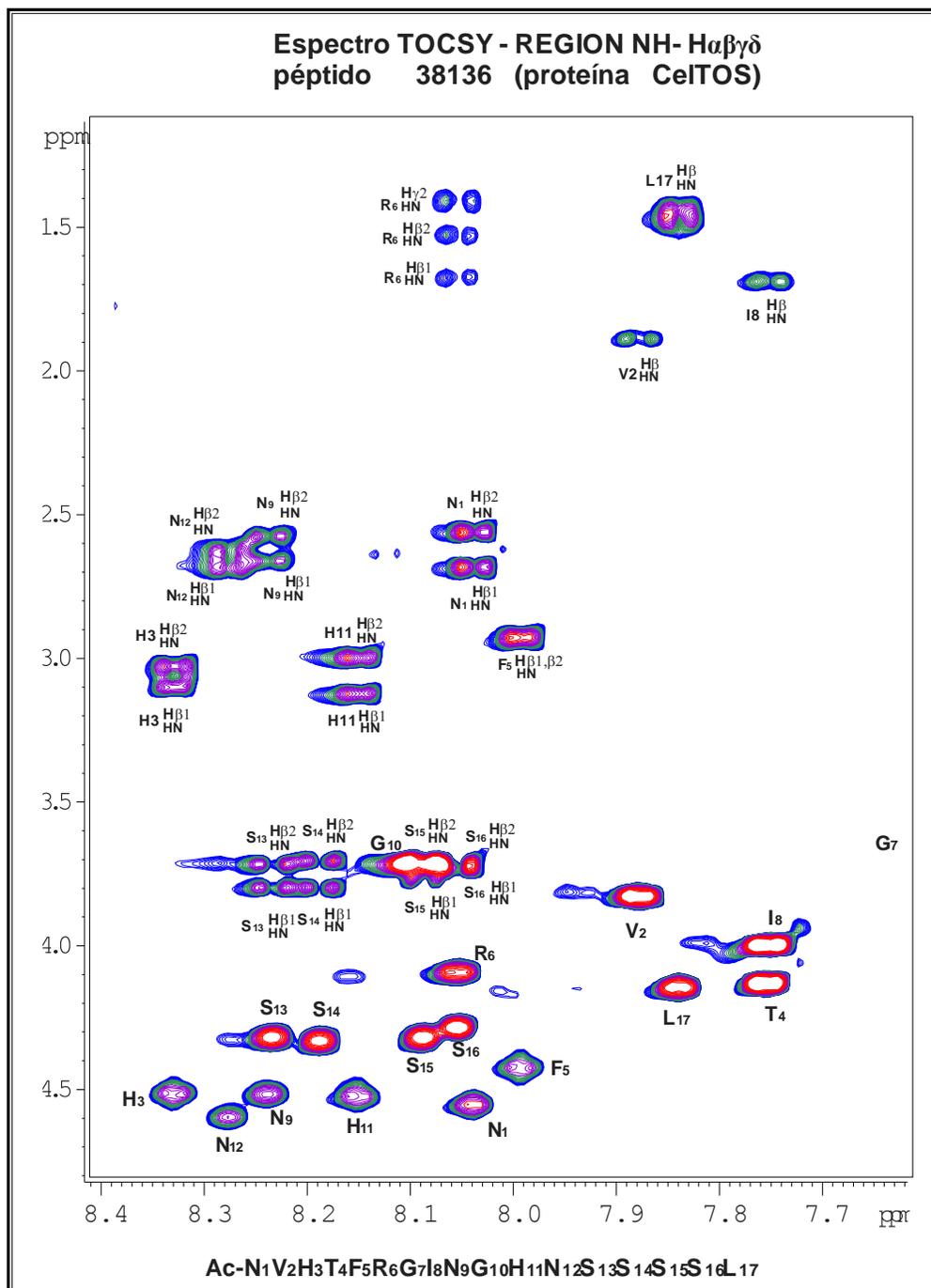


Figura 19. Espectro TOCSY del péptido 38136 de la proteína CeITOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H α , β , γ , δ y su secuencia.

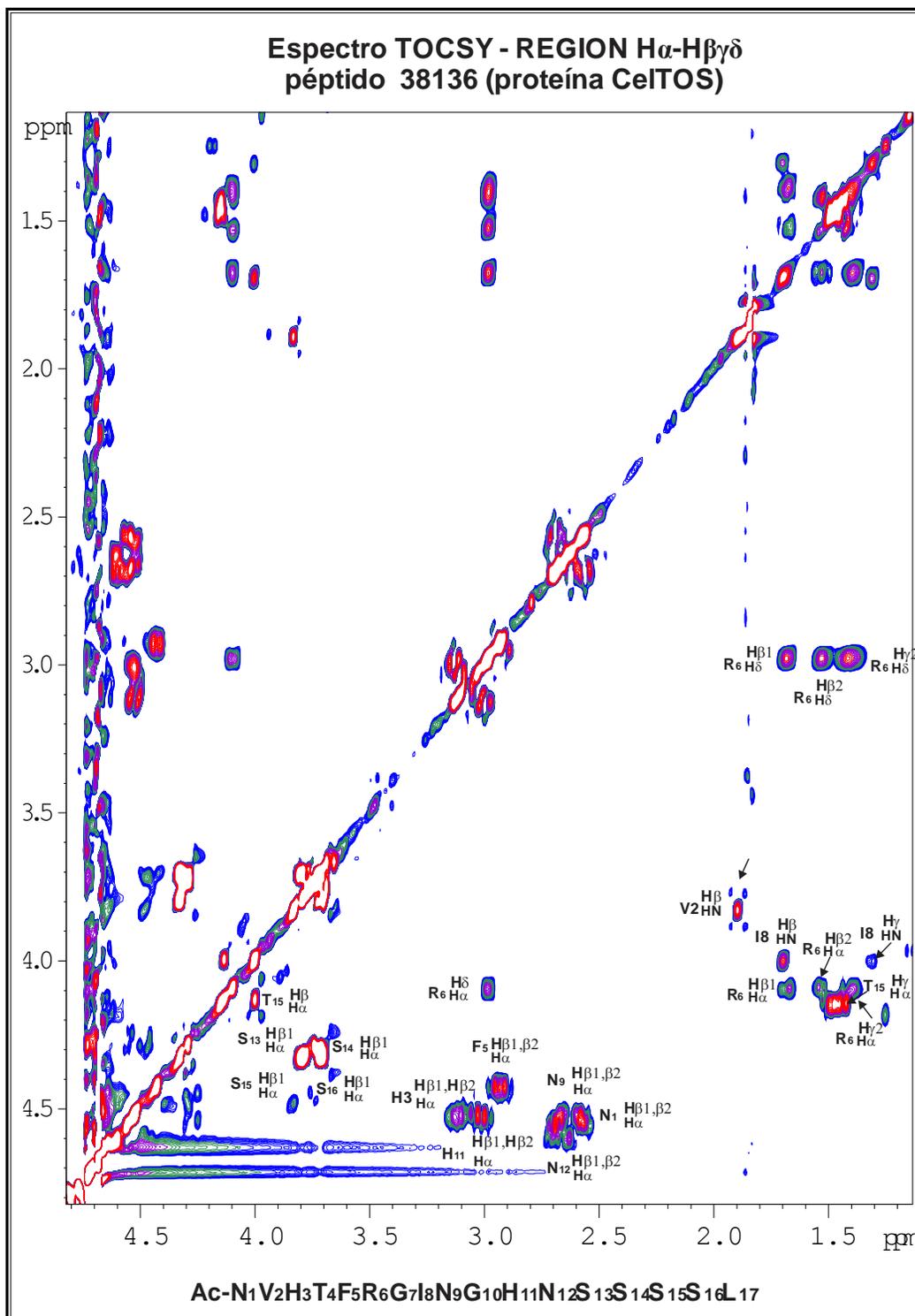


Figura 20. Espectro TOCSY del péptido 38136 de la proteína CeITOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación del sistema de espín de los aminoácidos del péptido, región $H\alpha$ - $H\beta$, γ , δ y su secuencia.

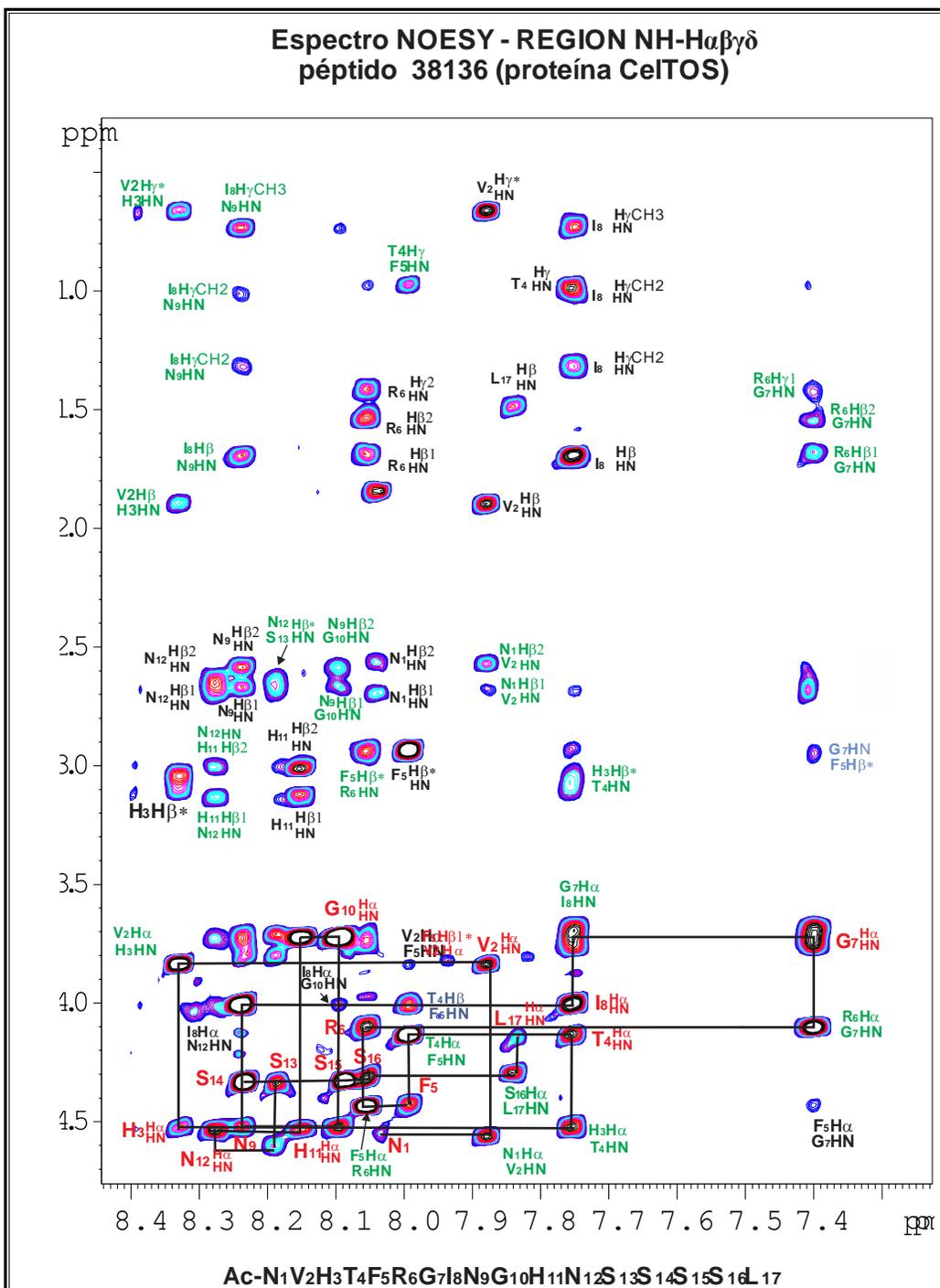


Figura 21. Espectro NOESY del péptido 38136 de la proteína CeITOS (Espectrómetro DRX 600 MHz, 295 K). Asignación de la región NH-H α , β , γ , δ . Protones de los aminoácidos en verde para señales de secuencia y en rojo conectividades de media y larga distancia.

Para llevar a cabo las asignaciones de NOEs secuenciales, se inicia con los sistemas de espín de los residuos previamente identificados mediante los espectros TOCSY y la determinación secuencial ordenada; esta conectividad secuencial resulta de la interacción dipolar, a través del espacio, entre los protones amídicos de la cadena principal HN de un residuo (i) con su homólogo del residuo siguiente HN (i+1) así como el protón amídico HN (i+1) de la cadena principal con los protones H α , H β , H γ , H δ del residuo anterior (i) (Figura 21), una vez realizada esta tarea se concluye la asignación completa de la mayor cantidad posible de señales de cruce contenidos en el espectro NOESY. Para la determinación de NOEs de media distancia, aquellas interacciones NOE que se observan entre los protones, tanto de cadena principal como de la cadena lateral, de los aminoácidos que se hallan entre un segmento de cuatro residuos consecutivos son determinadas como se muestra en las figuras 21 y 22. Mientras, las correlaciones a larga distancia son aquellas que se originan mediante el acoplamiento dipolar entre los protones de residuos que se encuentran al menos de cinco posiciones de aminoácidos separados entre la secuencia. En la figura 23 se muestra un resumen del asignación de acuerdo al espectro bidimensional realizado donde se destacan los acoplamientos intra- e inter-residuales.

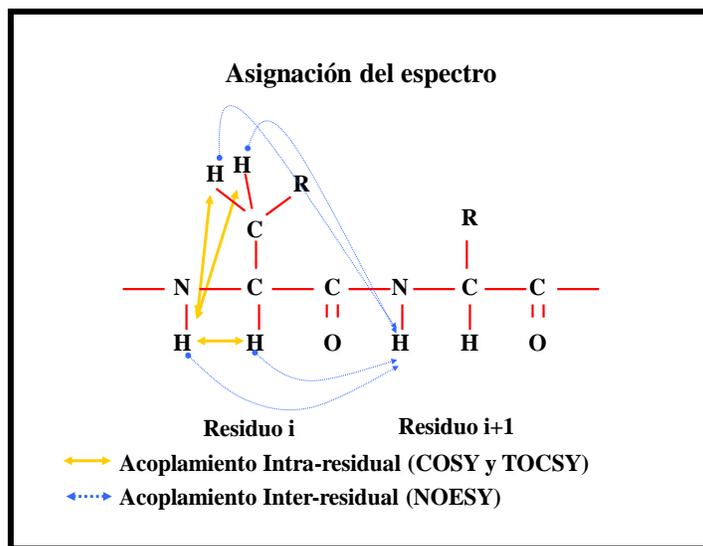


Figura 23. Representación de correlaciones NOE a media y larga distancia. En flechas amarillas la interacción intra-residual observada en los espectros COSY y TOCSY y en flechas azules la interacción inter-residual observada en el espectro NOESY.

Así, se logra determinar protones que se encuentran alejados en la secuencia de los aminoácidos, pero cercanos debido a la estructura tridimensional que se presenta en la proteína o en el péptido.

La observación de ciertas señales NOEs en el espectro NOESY puede ser usada para inferir la presencia de regiones estructuradas. Los NOEs que dan información sobre la conformación son aquellos que normalmente no aparecen como señales entre aminoácidos vecinos (secuenciales), en un péptido normal. Las señales secuenciales presentes en el espectro NOESY para todos los péptidos o proteínas en estudio deben incluir conectividades de tipo: $d_{\alpha N}(i, i+1)$ y $d_{\beta N}(i, i+1)$, $d_{\gamma N}(i, i+1)$, d_{NN} . Conectividades más débiles pero importantes, son las observadas entre $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+4)$ cuya presencia de unas u otras son rasgos característicos de la formación de estructuras secundaria (122) (Figuras 21 y 22) y la ausencia de las conectividades NOE conllevaría a una conformación al azar o “random coil”. El patrón de conectividades esperado para la geometría estándar de las principales estructuras secundarias se rige de acuerdo a la Figura 24 donde se puede realizar la correspondiente clasificación al nivel de estructura secundaria de acuerdo a la presencia o ausencia de éstas.

	α -Helix	3_{10} -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'
$d_{\alpha N}(i, i+4)$	—————					
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$	————— ————— —————	—————				
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	————— ————— —————	—————	—————		—————	—————
$d_{NN}(i, i+2)$	————— —————	—————	—————	—————	—————	—————
$d_{\alpha N}(i, i+2)$		—————	—————	—————	—————	—————
d_{NN}	—————	—————	—————	—————	—————	—————
$d_{\alpha N}$	—————		—————	—————	—————	—————

Figura 24. Patrón de conectividades NOEs esperado para las estructuras: hélice α , hélice 3_{10} , giros β tipo I, II, I' y II'. La intensidad de las señales clasifican a los NOEs en: débiles, medios y fuertes. Tomado de (132).

2.5.4. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)

El desplazamiento químico de los protones NH amídicos dependen de la temperatura. La variación de este desplazamiento con la temperatura es denominado coeficiente de temperatura, el cual suministra información acerca de la interacción del protón amídico con las moléculasceptoras del enlace de hidrógeno del disolvente. Un coeficiente cercano a 0 indica que el grupo NH amídico se encuentra protegido del disolvente, lo que indica que este protón está involucrado en un puente de H intramolecular. El desplazamiento químico depende de la inversa a la tercera potencia de la distancia entre el protón amida y el átomo aceptor en el enlace de hidrógeno- $\Delta\delta_{\text{HN}}/\Delta T(*10^3)$ (122) (Figura 25).

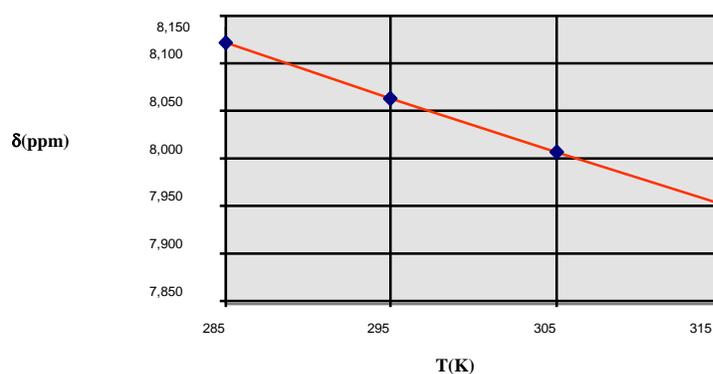


Figura 25. Coeficiente de temperatura: $-\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T*10^3$ (ppm/K)

2.6. Cálculo de la Estructura Molecular

Con el fin de evidenciar la estructura tridimensional de moléculas relevantes a nivel químico, biológico e inmunológico, el cálculo de la estructura molecular constituye una estrategia

importante para este objetivo. Existen varias herramientas de cálculo para determinar la estructura tridimensional de péptidos y proteínas a partir de datos de RMN, para esto es necesario identificar en el espectro NOESY tantas restricciones de distancia como sea posible, limitando así el espacio conformacional de la cadena peptídica y definiendo apropiadamente la conformación en solución. Para iniciar un cálculo molecular se parte de conocer y asignar todo el espectro NOESY y de allí extraer los NOEs correspondientes a cada interacción. Para obtener la intensidad de las señales en el espectro NOESY se usa la representación en gráficos de contorno y la evaluación de la intensidad de acuerdo al número de contornos de cada señal de correlación o “crosspeak”.

Se pueden utilizar plantillas con cada uno de los sistemas de spin de cada amino ácido que se confrontan con la intensidad de la señal y que dependerán luego de crear el modelo con programas como el INSIGHT II (2000) (Accelrys Software Inc., USA), aplicar restricciones en las distancias hidrógeno - hidrógeno o en inglés “constrains” (Tabla 4), mediante un algoritmo basado en geometría de distancias llamado en inglés “Distance Geometry II” (DGII)(133) el cual crea una matriz de distancias interatómicas y calcula modelos consistente con las restricciones de distancia utilizada. Este algoritmo hace entonces la transformación de las distancias espaciales a coordenadas cartesianas que describen la estructura tridimensional de la molécula. Esta es descrita como un grupo de vectores \mathbf{X}_i que dan la posición de cada átomo y la matriz métrica se fundamenta en los productos escalares de estos vectores: $\mathbf{g}_{ij} = \mathbf{X}_i \cdot \mathbf{X}_j$ (133).

Tabla 4. Archivo de salida de restricciones atómicas provenientes del espectro NOESY del péptido 38136 para el cálculo de estructura. La tabla indica un fragmento de la posición interatómica entre átomos de H involucrados y su clasificación de acuerdo a la intensidad del NOE en rangos de distancia: 1.8 a 2.7 Å señales intensas en el espectro, de 2.8 a 3.4 señales de intensidad media y 3.5 a 5.0 para señales débiles.

```

!BIOSYM restraint 1 pep38136
!
#remote_prochiral_center
1:LEU_17:HD1* 1:LEU_17:HD2* 1:LEU_17:CD1 1:LEU_17:CD2 1:LEU_17:CG
!
#NOE_distance
1:VAL_2:HN 1:VAL_2:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:HIS_3:HN 1:HIS_3:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:THR_4:HN 1:THR_4:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:PHE_5:HN 1:PHE_5:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:ARG_6:HN 1:ARG_6:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:GLY_7:HN 1:GLY_7:HA* 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:ILE_8:HN 1:ILE_8:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:ASN_9:HN 1:ASN_9:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:GLY_10:HN 1:GLY_10:HA* 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:HIS_11:HN 1:HIS_11:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:ASN_12:HN 1:ASN_12:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:SER_13:HN 1:SER_13:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:SER_14:HN 1:SER_14:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:SER_15:HN 1:SER_15:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:SER_16:HN 1:SER_16:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:LEU_17:HN 1:LEU_17:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:VAL_2:HN 1:VAL_2:HB 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:VAL_2:HN 1:VAL_2:HG* 1.800 5.200 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:VAL_2:HB 1:VAL_2:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:VAL_2:HG* 1:VAL_2:HA 2.800 5.900 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:HIS_3:HN 1:HIS_3:HBS 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:HIS_3:HN 1:HIS_3:HBR 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:HIS_3:HBS 1:HIS_3:HD2 2.800 4.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:HIS_3:HBR 1:HIS_3:HD2 2.800 4.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:THR_4:HN 1:THR_4:HB 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:THR_4:HN 1:THR_4:HG2* 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:THR_4:HB 1:THR_4:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:THR_4:HG2* 1:THR_4:HA 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:PHE_5:HD* 1:PHE_5:HA 2.800 5.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:PHE_5:HD* 1:PHE_5:HE* 2.800 7.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:ARG_6:HN 1:ARG_6:HB* 2.800 4.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !medium:
1:ARG_6:HN 1:ARG_6:HG* 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00 !strong:
1:ARG_6:HN 1:ARG_6:HD* 3.500 6.500 5.500 30.00 30.00 1000.000 0.00 !weak:

```

Generalmente, luego se siguen protocolos de refinamiento de estos últimos modelos obtenidos como el SA o “Simulated Annealing” que corresponde a un proceso de simulación de desorden restringido mediante el cual se fuerzan a los átomos de la molécula a que ocupen posiciones posibles en el espacio generando energía necesaria para que salten barreras energéticas, esta última conocida como dinámica molecular restringida permitiendo aumentar la energía cinética del sistema (temperatura) para luego bajar ésta lentamente. Este proceso se puede realizar con el programa DISCOVER el cual debe repetirse las veces que sea necesario hasta lograr la mayor consistencia con las restricciones obtenidas experimentalmente por RMN. El cálculo está bajo la influencia de un campo de fuerzas de valencia consistente del inglés “Consistent-Valence Force Field” (CVFF) que aplica diferentes términos de energía potencial (134).

También existe protocolos de minimización de energía en condiciones restringidas, el cual utiliza este mismo campo de fuerzas pero bajando la energía de las moléculas u optimizando la hasta llegar a estructuras estables permitidas. Entre los algoritmos que trabajan este tipo de minimizaciones están: “Steepest Descendent” y gradiente conjugado que se encuentran implementados también en el programa DISCOVER.

El cálculo estructural genera entre 50 y 100 estructuras las cuales deben ser evaluadas de acuerdo a su energía y a los rasgos estructurales obtenidos en los experimentos bidimensionales, se escoge la molécula consenso (más baja energía) de la cual se parte para realizar la superposición de las estructuras. De este proceso resulta una familia de conformeros que confluyen si los datos son suficientes para establecer un plegamiento concluyente.

Existe diversidad de programas computacionales, de los cuales CYANA (135) o XPLOR-NIH (136), tienen en cuenta estas restricciones obtenidas a partir de RMN, así como la longitud de los enlaces y ángulos permitidos. Estos programas convierten dichas restricciones experimentales y las propiedades de los enlaces en términos energéticos, y minimizan la energía de la molécula.

El cálculo de estructura es un proceso bastante complejo en el que principalmente la velocidad de los resultados depende del uso del computador/servidor pues involucra cálculos bastante largos hasta generar el modelo. El tiempo aproximado es particular para cada molécula.

Uno de los aspectos más importantes en la elucidación estructural es poder conocer la representación de superficies macromoleculares, así como el análisis de las interacciones entre proteína-ligando y proteína-proteína. Se han desarrollado métodos para la representación paramétrica por computador de estas superficies para caracterizarlas y

visualizar la estructura y otras propiedades importantes en la interacción de proteínas. Con el uso del módulo “docking” del paquete computacional de Accelrys que predicen las conformaciones de unión de un ligando pequeño y flexible a una macromolécula blanco no flexible de estructura conocida, es posible dilucidar como las dos moléculas se reconocen e interactúan una con otra y cómo es esta interacción y qué la determina, dando herramientas para el conocimiento de posibles principios en la actividad inmunológica o biológica que éstas moléculas cumplen.

3. HIPOTESIS

Péptidos sintéticos derivados de las proteínas nativas CeITOS, TRSP, STARP y SERA 5 del *P. falciparum* son modificados y evaluados como candidatos para una vacuna antimalárica en monos *Aotus*. La respuesta inmune inducida por ellos obedece a características dependientes de su conformación estructural, de las moléculas del propio hospedero y de su interacción.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura tridimensional de péptidos nativos y modificados provenientes de las proteínas STARP, CeITOS, TRSP y SERA 5 de *P. falciparum*, evaluar sus propiedades estereoquímicas e inmunogénicas, establecer la posible relación entre sus características estructurales y su función inmunológica y proveer bases conceptuales y metodológicas para el diseño de vacunas sintéticas basadas en subunidades proteicas.

4.1. Objetivos Específicos

- 4.1.1. Determinar la estructura tridimensional de péptidos modificados derivados de nativos con alta capacidad de unión a células blanco de las proteínas: STARP, CeITOS, TRSP y SERA 5.
- 4.1.2. Obtener modelos de estructura tridimensional, derivados de los datos de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , de los péptidos que hayan evidenciado elementos de estructura secundaria y determinar conformacionalmente, rasgos característicos de los mismos.
- 4.1.3. Evaluar la inmunogenicidad de los fragmentos peptídicos nativos y modificados importantes en ensayos *in vivo*.
- 4.1.4. Establecer si hay correlaciones, entre los rasgos estructurales de los péptidos y su actividad inmunológica.
- 4.1.5. Establecer herramientas basadas en principios estereoquímicos que mejoren el entendimiento de la respuesta inmune en mono *Aotus* inmunizados con péptidos provenientes de *P. falciparum*.