

Búsqueda de secuencias con actividad inmunogénica, útiles para el diseño de un modelo de posible vacuna contra la malaria

Román Yesid Ramírez Rueda¹

La malaria humana es una enfermedad infecciosa producida por cuatro especies de *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *malariae* y *ovale*). Según la OMS casi 3000 personas mueren diariamente por malaria. A pesar del esfuerzo aún no se ha desarrollado una vacuna 100% eficaz contra la malaria. Con el progreso de la bioinformática en el campo de las vacunas se han creado herramientas que apoyan el desarrollo *in silico* de vacunas. El presente trabajo pretende por medio de herramientas bioinformáticas obtener epítopes que serán propuestos como componentes de una aproximación teórica de vacuna contra malaria. **Materiales y métodos:** se utilizaron las aplicaciones SRS (Sistema de Recuperación de Secuencias) para recuperar proteínas antigénicas de *Plasmodium*, TAPPred, ProPred, CTLPred, ProPred I, ABCPred para predicción de epítopes, así como TMHMM2 en la predicción de la posición del péptido con respecto a la membrana plasmática y algunos péptidos de linfocitos Th tomados de la literatura científica. El cubrimiento alélico poblacional se determinó en base a los alelos supertipo planteados en los estudios de Sidney y Southwood. **Resultados:** se obtuvieron una serie de péptidos que se plantean como una aproximación teórica de vacuna contra malaria producida por *P. falciparum* y *vivax*, y tras la integración de los procesos se creó un modelo para la selección de péptidos candidatos a vacuna a partir de proteínas antigénicas. **Conclusiones:** la mayoría de los péptidos propuestos como candidatos a vacuna hacen parte de proteínas que están siendo utilizadas para el desarrollo de vacunas contra la malaria lo que hace pensar que la aproximación aquí planteada es confiable. **SaludUIS 2007;39:8-15**

Palabras clave: *Plasmodium*, vacuna, Biología computacional, péptidos, epítopes

Introduction: Human malaria is an infectious disease produced by four species of *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *malariae*, and *ovale*). According to the WHO, approximately three thousand people die each day from the disease. Despite efforts, there has not been developed a vaccine that is 100% effective against malaria. With the progress made in bioinformatics in regard to vaccines, tools have been created that aid in the development of vaccines *in silico*. The present work attempts through the bioinformatics tools to find epitopes that will be proposed as components of a theoretical approximation of a vaccine against malaria. **Materials and Methods:** The Sequence Retrieval System (SRS) application was used to recover the antigenic proteins of *Plasmodium*, TAPPred, ProPred, CTLPred, ProPred I, ABCPred for epitopes prediction, as well as TMHMM2 in the prediction of the peptide position with respect to the plasma membrane and other Th lymphocyte peptides taken from scientific literature. The population allele coverage was determined on the basis of the supertype alleles raised in the studies of Sidney and Southwood. **Results:** A series of peptides has been obtained that are proposed as a theoretical vaccine against malaria produced by *P. falciparum* and *P. vivax*, and through the integration of the processes a model has been created for the selection of peptides vaccine candidates from antigenic proteins. **Conclusions:** The majority of the peptides proposed as malaria vaccine candidates form part of a group of proteins that are being used for the development of malaria vaccines which makes one think that the approach proposed herein is reliable. **SaludUIS 2007;39:8-15**

Key words: *Plasmodium*, vaccine, Computational biology, peptides, epitopes

INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es la infección parasitaria más importante en el mundo y representa uno de los mayores retos de salud a los que se enfrentan muchos países en

vía de desarrollo. Se estima que alrededor de 107 países en el mundo son afectados por esta enfermedad; al menos entre 350 y 500 millones de personas por año contraen la infección y aproximadamente 3,2 billones de personas están en riesgo de contraerla.¹

Entre los problemas de salud pública en Colombia la malaria ocupa un lugar destacado, ya que un 85% del territorio colombiano está ubicado a menos de 1600 m sobre el nivel del mar donde las condiciones para la transmisión de la malaria son óptimas, allí viven aproximadamente de 18 a 24 millones de personas expuestas al riesgo de contraer la enfermedad o morir a causa de ella.²

¹ Centro de Bioinformática. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia.

Correspondencia: Román Yesid Ramírez R. UNIBOYACA, Carrera 2 ESTE No 64-169. E1 - 102I. Tunja- Boyacá. E-mail: royer94@gmail.com

Recibido: Julio 7 2006 **Aceptado:** Septiembre 6 2006

Según el sistema nacional de vigilancia en salud pública en el año 2003, se reportaron 124.077 casos clínicos de malaria derivándose de esta cifra 24 muertes, lo que corresponde a un 0,05% de letalidad.³

El agente etiológico de la malaria es el *Plasmodium* y en humanos es causada por cuatro especies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), y es transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados con *Plasmodium*. Los síntomas más frecuentes incluyen fiebre y escalofríos, los cuales pueden estar acompañados por dolor de cabeza, mialgias, artralgias, debilidad, vómito y diarrea. Otras características clínicas incluyen esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunción renal o pulmonar y cambios neurológicos que pueden llevar a la muerte del paciente.⁴

Se han desarrollado una gran variedad de fármacos para combatir la malaria, sin embargo, la resistencia de *Plasmodium* a estos, (hasta ahora descrita en *P. falciparum* y *P. vivax*) sigue siendo un grave problema en cuanto a las alternativas terapéuticas disponibles para el control de esta enfermedad. Particularmente *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos usados actualmente y *P. vivax* ha adquirido resistencia a cloroquina y/o primaquina en algunas regiones del mundo.⁵

Existen diferentes enfoques para tratar de solucionar este problema de salud pública, pero ninguno de ellos ha sido la solución absoluta. Una de las formas más eficaces de erradicar las enfermedades es la prevención, y esta se puede abordar desde diferentes aspectos, consolidándose como la estrategia más efectiva combatir el agente etiológico lo cual se logra con la generación de vacunas y la posterior inmunización de todos los individuos en riesgo.

La investigación actual en el campo de las ciencias biológicas esta siendo apoyada por la informática aplicada a la solución de problemas biológicos, más conocida como bioinformática. Existen diferentes tipos de aplicaciones que pueden ser utilizadas para apoyar el desarrollo de vacunas sintéticas como por ejemplo el Sistema de Recuperación de Secuencias (SRS) que es uno de los sistemas automatizados de búsqueda de secuencias proteicas, genómicas y demás bases de datos relacionadas.⁶ Otro tipo de aplicaciones son los programas de predicción de epítopes basados en matrices de afinidad, que generan péptidos afines a diferentes moléculas que intervienen en la respuesta inmune humoral y celular.

Otro avance importante en el campo de la elaboración de vacunas es el descubrimiento de los alelos supertipo de

clase I y II. Este hallazgo sugiere que la mayoría de alelos de HLA A, B y DR pueden ser agrupados en unos pocos supertipos que tienen la propiedad de ser afines a una amplia gama de péptidos, dando cubrimiento a casi un 95% de 5 etnias principales (caucásicos, negros, japoneses, chinos e hispanos) en la población mundial.^{7,8}

Teniendo en cuenta que existe un conocimiento acumulado, producto del gran número de investigaciones que se han adelantado sobre *P. falciparum*, de la disponibilidad de grandes bases de datos genómicas y proteicas y de poderosas herramientas computacionales para la predicción de epítopes; y ante la necesidad de proponer posibles candidatos a vacunas contra la malaria, un importante punto de partida es la búsqueda e identificación por medio de herramientas bioinformáticas, de epítopes de *Plasmodium* que después de ser confirmados por el laboratorio puedan ser postulados como posibles blancos de vacuna contra la malaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para identificar los epítopes que harán parte de una aproximación teórica de vacuna contra la malaria se utilizaron herramientas de tipo bioinformático, (que se describen brevemente a continuación) teniendo en cuenta las interacciones que el epítope tiene con el sistema inmune.

Búsqueda de secuencias proteicas antigénicas

Para obtener las secuencias se utilizó el SRS implementado en el European Bioinformatics Institute (EBI), (<http://srs.ebi.ac.uk>) seleccionando la base de datos UNIPROT, aplicando los siguientes criterios de inclusión:

- Secuencias proteicas de carácter antigénico de las cuatro especies de malaria que afectan al hombre (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*).
- Proteínas que estén siendo usadas en el diseño de vacunas o que hayan sido reportadas en literatura científica como posibles blancos de vacuna.
- Secuencias proteicas que idealmente estén completas o en su defecto el fragmento de mayor longitud.
- Seleccionar la proteína de mayor longitud en el caso de presentarse variantes alélicas

Predicción de epítopes

Para determinar los péptidos afines a las principales moléculas de la respuesta inmune celular y humoral se

utilizaron cinco programas disponibles en la red y de uso libre, pertenecientes a la suite de herramientas para la identificación de subunidades candidatas a vacuna del Institute of Microbial Technology (Chandigarh, India).

- **TAPPred:** (<http://www.imtech.res.in/raghava/tappred>) Con esta aplicación basada en Support Vector Machine (SVM) se pueden predecir cuantitativamente la afinidad de unión de péptidos de 9 aminoácidos (no números) a las proteínas transportadoras asociadas al procesamiento del antígeno (TAP) con un porcentaje de efectividad de alrededor del 89% según el método utilizado en la predicción.⁹ La predicción se llevó a cabo en el modo “Cascade SVM” para obtener una efectividad del 89%.
- **Propred I:** (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/1>) Es un programa de predicción basado en matrices de afinidad, que brinda la posibilidad de predecir péptidos (no números) que se unen a 47 diferentes moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (CMH I), con una eficacia que varía entre 90 y 99%.¹⁰ La predicción se realizó escogiendo 39 de los 47 alelos por ser estos de origen humano, con un umbral del 3% y activando el filtro proteasoma e inmunoproteasoma al 5%.
- **Propred:** (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>) Software de predicción basado en un modelo matemático/estadístico que utiliza matrices cuantitativas para predecir péptidos no números afines a 51 diferentes alelos del CMH II, con una eficacia que varía entre 90 y 99%.¹¹ Todos los alelos fueron seleccionados para hacer la predicción, (por ser todos estos de origen humano) usando un umbral del 3%.
- **CTLPred:** (<http://www.imtech.res.in/raghava/CTLPred/index.html>) Herramienta diseñada para la predicción de péptidos no números afines a Linfocitos T Citotóxicos (LTC) basándose en tres tipos de métodos: Quantitative Matrix (QM), Artificial Neural Network (ANN) y SVM. Posee una exactitud máxima del 77,6% combinando los métodos ANN y SVM.¹² La predicción se llevó a cabo en el modo aproximación consenso (ANN + SVM) con el objetivo de obtener la máxima exactitud en los resultados.
- **ABCpred:** (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/index.html>) ABCpred predice epítopes lineales de Linfocitos B (LB) en una secuencia antigénica por medio de un sistema de Redes Neuronales Artificiales. La exactitud del sistema es de 65.93% utilizando un umbral por defecto de 0,5 y

un tamaño de péptido de 16 aminoácidos.¹³ La predicción se efectuó con un umbral de 0,5 y con un tamaño de péptido de 16 aminoácidos.

Epítopes de Linfocitos T Helper (LTH).

Ante la imposibilidad de conseguir un software de uso libre para predecir los epítopes de LTH, se efectuó una búsqueda en la literatura científica de epítopes para linfocitos TH de *Plasmodium* (Tabla 1).

Localización de los epítopes con relación a la membrana plasmática.

Para determinar si un epítope se encuentra adentro, afuera o embebido en la membrana plasmática se utilizó un programa denominado TMHMM2 (Trans Membrana Helix Prediction 2) disponible en la red en la dirección electrónica: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>. Para realizar las predicciones, TMHMM2 aplica en sus procedimientos modelos ocultos de Markov y se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos que componen la proteína, con lo cual obtiene un 77% de exactitud en el método.¹⁴

Selección de los epítopes obtenidos por los programas de predicción.

Una vez predichos los epítopes de los principales receptores celulares y moléculas que intervienen en la respuesta inmune, se seleccionan aquellos epítopes comunes en la respuesta inmune celular cruzando las bases de datos de péptidos afines a: TAPs, contra la de CMH I y contra la de LTCs. Para determinar los epítopes comunes en la respuesta inmune humoral se cruzan las bases de datos de péptidos afines al CMH II y LB. Y por último para determinar cuales epítopes intervienen en la respuesta dada por LTH se cruzan las bases de datos de péptidos afines a LTH y CMH II (activación de LTH) y la de LTH contra la resultante del cruce entre CMH II y LB (respuesta LTH₂), todos estos cruces fueron realizados por un programa desarrollado en el Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Los péptidos resultantes de los anteriores cruces se ubican dentro de las proteínas que los contienen y se determina la posición de estos con respecto a la membrana por medio del programa TMHMM2, descartando aquellos cuya localización sea transmembranal o al interior de la membrana plasmática. Finalmente los péptidos resultantes del anterior procedimiento se filtran por el tipo de alelo dejando solo los que son afines a los alelos supertipo de clase I y II siendo estos péptidos los que serán propuestos como componentes de una aproximación teórica de vacuna contra la malaria.

Tabla 1. Epítopes de LTH seleccionados de la literatura científica.

Especie	Proteína	Epitope de Linfocito T _h	Posición
<i>falciparum</i>	CSP	NANPNVDPNANP ¹⁵	144-156
<i>falciparum</i>	CSP	EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT ¹⁶	326-345
<i>falciparum</i>	SALSA	SAEKKDEKEASEQGEESHK KENSQESA ¹⁷	23-49
<i>falciparum</i>	SALSA	NGKDDVKEEKKTNEKDDGKTDK VQEKVLEKSPKE ¹⁷	50-85
<i>falciparum</i>	AMA-1	DQPKQYEQLTDYEKIKEG ¹⁸	348-367
<i>falciparum</i>	AMA-1	EFTYMINFGRGQNYWEHPYQKS ¹⁸	14-35
<i>falciparum</i>	CSP	MRKLAILSVSFLFV ¹⁹	2-16
<i>falciparum</i>	LSA-1	LVNLLIFHINGKIIKNS ¹⁹	13-29
<i>falciparum</i>	CSP	MNYYGKQENWYSLKK ¹⁹	53-67
<i>falciparum</i>	SSP2	RHNWVNHAVPLAMKLI ¹⁹	61-76
<i>falciparum</i>	SSP2	VKNVIGPFMKAVCVE ¹⁹	223-237
<i>falciparum</i>	CSP	SSVFNVNSSIGLIM ¹⁹	375-389
<i>falciparum</i>	EXP-1	AGLLGNVSTVLLGGV ¹⁹	82-96
<i>falciparum</i>	EXP-1	KSKYKLATSVLAGLL ¹⁹	71-85
<i>falciparum</i>	SSP2	GLAYKFVVPGAATPY ¹⁹	527-540
<i>falciparum</i>	SSP2	HNWVNHAVPLAMKLI ¹⁹	62-78
<i>falciparum</i>	SSP2	KYKIAGGIAGGLALL ¹⁹	509-523
<i>falciparum</i>	ABRA	DSNIMNSINNVMDEIDFFEK ²⁰	487-506
<i>falciparum</i>	SERA	DDYTEYKLTESIDNILVKMFKTN ²⁰	391-411
<i>falciparum</i>	MSP-1	FGYRKPLDNIKDNVGMEDYIKK ²⁰	250-271
<i>falciparum</i>	MSP-1	SKLNSLNNPHNVLQNFVFFNKK ²⁰	1101-1121
<i>falciparum</i>	CSP	ENDIEKKICKMEKCSSVFN ²¹	376-395
<i>falciparum</i>	MSP-1	AVLTGYSLFQKEKMVLNEGTS ²²	38-58
<i>vivax</i>	CSPv	DRAAGQPAGDRAAGQPAG ²³	925-940
<i>vivax</i>	MSP-1v	LDMLKKVVLGLWKLPLDNIK ²³	1059-1073
<i>vivax</i>	MSP-1v	NFVGKFLQLIPGHTDLLHL ²³	78-97
<i>vivax</i>	MSP-1v	FNQLMHVINFHYDLLRANVH ²³	118-137
<i>vivax</i>	MSP-1v	LEYLREKAKMAGTLIIPES ²³	378-397
<i>vivax</i>	MSP-1v	KKIKAFLETSNNKAAAPAQS ²³	898-917
<i>vivax</i>	MSP-1v	SKDQIKKLTSLKKNLERRQN ²⁴	151-171
<i>falciparum</i>	RESA	EENVEHDAEENVEENV ²⁵	78-97
<i>falciparum</i>	RESA	YDEENVEHDEEYDE ²⁵	378-397

CSP: Circumsporozoite Protein; SALSA: Sporozoite Surface Protein 2 And Liver Stage Antigen; AMA-1: Apical Membrane Antigen 1; LSA-1: Liver Stage-Specific Antigen 1; SSP2: Sporozoite Surface Protein 2; EXP-1: Exported Antigen 1; ABRA: Acidic Basic Repeat Antigen; SERA: Serine Repeat Antigen; MSP-1: Merozoite Surface Protein 1; CSPv: Circumsporozoite Protein de *P.vivax*; MSP-1v: Merozoite Surface Protein 1 de *P.vivax*; RESA: Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen.

RESULTADOS

De la búsqueda inicial de proteínas de *Plasmodium* utilizando el SRS se obtuvieron 91 secuencias, todas

estas antigénicas y sin incluir variantes alélicas, distribuidas así: 59 de *P. falciparum*, 27 de *P. vivax*, 3 de *P. ovale* y 2 de *P. malariae*. Tomando estas proteínas como secuencias antigénicas representativas para cada

especie, se efectuaron los procedimientos descritos en la metodología obteniendo los péptidos propuestos como componentes de una aproximación teórica de vacuna contra la malaria (Tabla 2).

Además de los péptidos obtenidos para la aproximación a vacuna contra la malaria producida por *P. falciparum* y *P. vivax* también se obtuvo un péptido de *P. malariae* (VSNSLGIVL) que resultó ser común en la presentación antigénica de la respuesta inmune celular.

De la integración de los procesos utilizados para la selección de los epítopes se derivó un modelo general para la determinación in silico de epítopes para vacunas basadas en péptidos (Figura 1).

La efectividad teórica que podría tener esta aproximación teórica de vacuna se obtiene teniendo en cuenta que cada programa de predicción posee un porcentaje de efectividad y que son eventos independientes y se calcula de la siguiente manera:

Para la respuesta celular: (0,89 (efectividad de TAPPded en el modo "Cascade SVM") * 0,97 (efectividad de Propred con un umbral = 3) * 0,776 (efectividad de CTLPred en aprox. consenso) * 1 (Epítopes de linfocitos Th) * 0,77 (efectividad de TMHMM2)) * 100 = 51,6%

Para la respuesta humoral: (0,97 (efectividad de Propred

I con un umbral = 3) * 0,66 (efectividad de ABCPred con un umbral = 0,5) * 1 (Epítopes de linfocitos Th) * 0,77 (efectividad de TMHMM2)) * 100 = 49,3%

El cubrimiento alélico poblacional que teóricamente podría tener la aproximación teórica de vacuna propuesta para *P. falciparum* y *P. vivax* es de más del 73% y mas del 51% respectivamente, establecido a partir de extrapolación del cubrimiento que proporcionan los alelos supertipo (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

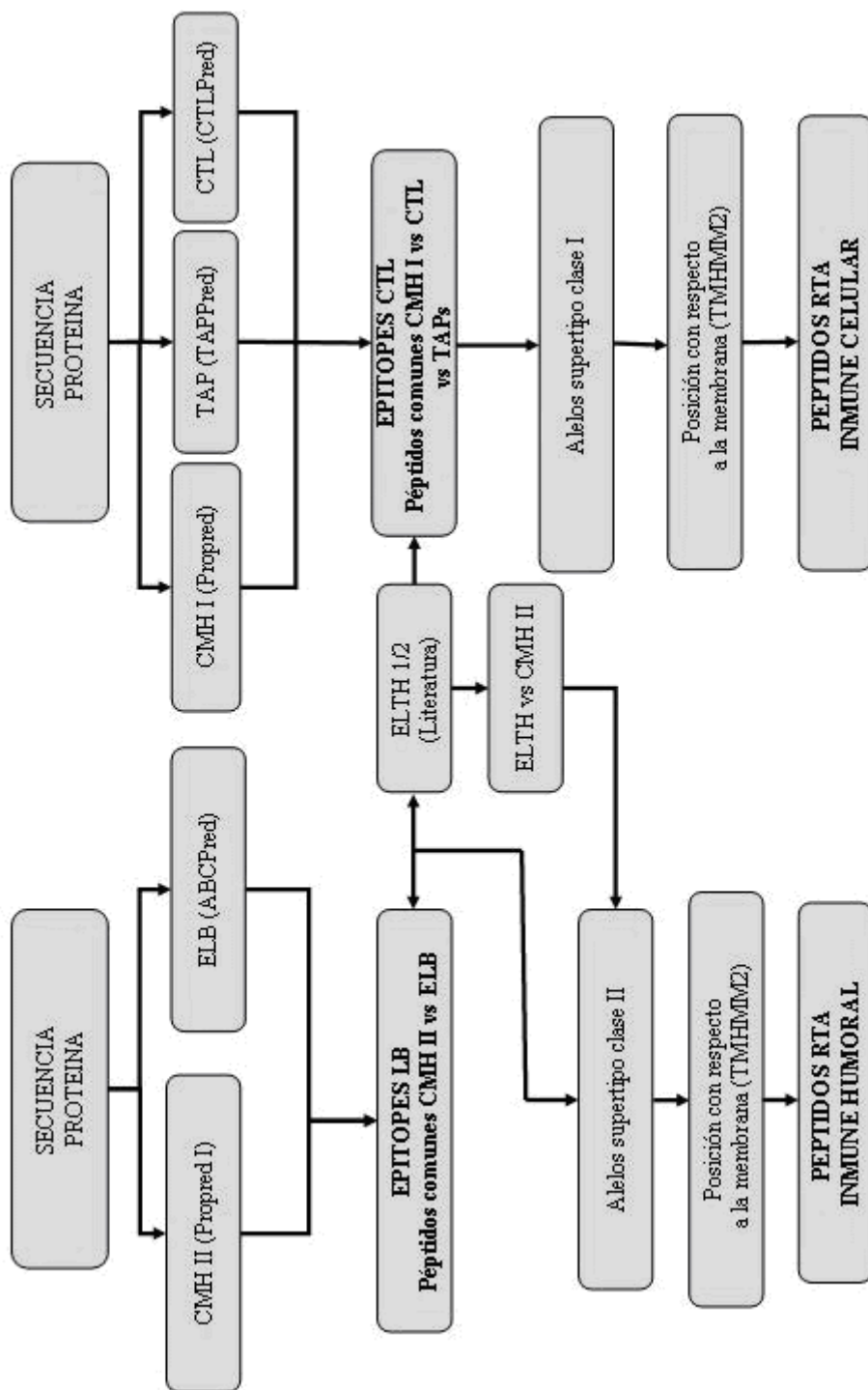
Observando las proteínas a las que pertenecen los péptidos señalados como epítopes postulados en la aproximación de vacuna teórica propuesta anteriormente, la mayoría de estas están siendo utilizadas en el desarrollo de vacunas contra la malaria, solo Ag 15 en *P. falciparum* y V-SERA3 y MSP3g en *P. vivax* no están siendo utilizadas para este propósito, lo que da lugar a pensar que la aproximación teórica postulada aquí está bien orientada; además la proteína Ag 15 según el modelo resultó contener un epítape útil en la respuesta inmune celular (ELSGLRISK) que se torna interesante ya que además de ser un epítape promiscuo hace parte de una proteína que se expresa en los cinco estadios de *Plasmodium* incluidos en el estudio (esporozoito, trofozoito, merozoito, gameto y gametocito).

Tabla 2. Péptidos propuestos en la aproximación teórica de una vacuna contra la malaria para *P. falciparum* y *P. vivax*

Especie	Péptido	Característica	Proteína
<i>P. falciparum</i>	ELSGLRISK	Epítopes de linfocitos T Citotóxicos afines al CMH I	Ag15
	FINDFILIL		RAP-2
	GSNDLINFL		ABRA
	IENSNTTFL		AMA-1
	SKLNS LNNPHNVLQNFVFFNKK	Epítopes de linfocitos TH afines al CMH II	CSP
	FGYRKPLDNIKD NVGKIMEDYIKK		MSP-1
	DSNIMNSINNVMDIEDFFEK		ABRA
	NIMNSINNVMDIEDFF	Epítopes de linfocitos B afines a CMH II y a receptores de LTH	AMA-1
	TYMNFGRGQNYWEHP		CSP
	ENDIEKKICKMEKCSS		MSP-1
<i>P. vivax</i>	ALLLYMLL	Epítopes de linfocitos T Citotóxicos afines al CMH I	VSERA-5
	AYLALFVTK		MSP 3g
	KS YLLVWFL		SSP2v
	KAIDSLKRL		RBP1
	KEAIGKTRL	RBP2	
	LEYVLRKAKMAGTLIIPES	Epítopes de linfocitos TH afines al CMH II	MSP1v
	SKDQIKKLTSLKINKLERRQN		
	FNQLMHVINFHVDLLRANVH	Epítopes de linfocitos B afines a CMH II y a receptores de LTH	MSP1v
VLREKAKMAGTLIPE			
SKDQIKKLTSLKINKLE			

RAP-2: Rhoptyr-Associated Protein 2; VSERA-5: Vivax Serine Repeat Antigen 5; MSP 3g: Merozoite Surface Protein 3g; SSP2v: Sporozoite Surface Protein 2 de *P. vivax*; RBP1: Normocyte Binding Protein-1; RBP2: Normocyte Binding Protein-2

Figura 1. Flujo de trabajo del modelo usado para determinar la aproximación teórica de vacuna contra la malaria.



El péptido seleccionado como epítipo de LTC para *P. malariae* que hace parte de la proteína circunsporozoito de *P. malariae* es un hallazgo importante que incentiva una búsqueda de más profunda de epítipes para esta especie de *Plasmodium*.

El cubrimiento alélico poblacional de la aproximación teórica de vacuna propuesta tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*, podría aumentar hasta alrededor de un 95% si los programas de predicción usados incluyeran la totalidad de los alelos supertipo de clase I y II.

Teniendo en cuenta que solo los péptidos que se unen a las moléculas que intervienen en la presentación del antígeno en la respuesta celular y humoral y que además se unen a receptores de LTCs, LTHs y LBs son propuestos como epítopes, existe cierto grado de seguridad al incluir estos en una aproximación de vacuna teórica.

El modelo usado aquí para obtener los epítopes que son propuestos para una aproximación teórica de vacuna contra la malaria, podría ser eventualmente usado para buscar péptidos epítopes de otros microorganismos patógenos, que posteriormente, después de ser comprobados experimentalmente podrían ser postulados como péptidos vacunales.

REFERENCIAS

1. OMS Rolling Back Malaria & UNICEF. World Malaria Report 2005. Consultado en: Febrero 12 de 2005. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199_section1_eng.pdf
2. SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. Boletín Epidemiológico Semanal. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003-2004. Consultado en: Noviembre 22 de 2005. Disponible en: http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE52_02.htm#_Toc8035
3. SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. Boletín Epidemiológico Semanal. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores 2003-2004. Consultado en: Noviembre 23 de 2005. Disponible en: http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2004/bole08_04.htm
4. Botero D., Restrepo M. "Parasitosis humanas." Cuarta edición. Medellín. *Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)* 2003: 177
5. Bloland PB. Drug resistance in malaria. World Health Organization (WHO). Consultado en: Noviembre 8 de 2004. Disponible en: http://www.who.int/emc/amrpdfs/Drug_resistance_in_malaria.pdf
6. SRS. Sistema de Recuperación de Secuencias del EBI. Public SRS Servers. Consultado en Marzo 3 de 2005. Disponible en: <http://srs.ebi.ac.uk>
7. Sidney J., Grey HM., Kubo RT., Sette A. "Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs." *Immunol Today* 1996. 17(6): 261-6
8. Southwood S., Sidney J., Kondo A., del Guercio MF., et al. "A several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires." *J Immunol* 1998. 160(7): 3363-73
9. Bhasin M., Raghava GP. "Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM." *Protein Sci* 2004. 13(3): 596-607
10. Harpreet S., Raghava GP. "ProPred1: Prediction of promiscuous CMH Class-I binding sites." *Bioinformatics* 2003. 19: 1009-14
11. Singh H., Raghava GP. "ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites." *Bioinformatics* 2001. 17(12): 1236-7
12. Bhasin M., Raghava GP. "Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques." *Vaccine* 2004. 22(23-24): 3195-204
13. Saha S., Raghava GP. "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." *PROTEINS: Structure, Functions and Bioinformatics*. 2006, Vol. 36, (In Press)
14. Sonnhammer EL., Von Heijne G., Krogh A. "A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences." *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1998. 6: 175-82
15. Nardin EH., Herrington DA., Davis J., Levine M., et al. "Conserved repetitive epitope recognized by CD4+ clones from a malaria-immunized volunteer." *Science* 1989. 246(4937): 1603-6
16. Moreno A., Clavijo P., Edelman R., Davis J., Szein M., Herrington D., Nardin E. "Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein." *Int Immunol* 1991. 10: 997-1003
17. Bottius E., BenMohamed L., Brahimi K., Gras H., Lepers JP., et al. "A novel Plasmodium falciparum sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and LTC epitopes." *J Immunol* 1996. 156(8): 2874-84
18. Lal AA., Hughes MA., Oliveira DA., Nelson C., Bloland PB., et al. "Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria." *Infect Immun* 1996. 64(3): 1054-9
19. Doolan DL., Martinez-Alier N. "Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites." *Curr Mol Med* 2006. 6(2): 169-85
20. Pimtanonthai N., Parra M., Johnson AH., David CS., Katovich HC. "Assessing the binding of four Plasmodium falciparum T helper cell epitopes to HLA-DQ and induction of T-cell responses in HLA-DQ transgenic mice." *Infect Immun* 2000. 68(3): 1366-73
21. Ritu G., Rao DN. "Construction of synthetic immunogens: Use of T and B-cell epitopes of CS and RESA proteins of Plasmodium falciparum." *Vaccine* 1992. 11: 761-5
22. Nickel B. "Human T cell responses to a semi-conserved sequence of the malaria vaccine candidate antigen MSP-1." Tesis de Doctorado en Filosofía. Universidad de Basel. Berlin (Alemania) 2001. Consultado en Abril 26 de 2006. Disponible en: http://Pages.Unibas.Ch/Diss/2001/Dissb_5858.pdf

23. Troye-Blomberg M., Riley EM., Perlmann H., Andersson G., et al. "T and B cell responses of *Plasmodium falciparum* malaria-immune individuals to synthetic peptides corresponding to sequences in different regions of the *P. falciparum* antigen Pf155/RESA." *J Immunol* 1989. 143(9): 3043-8
24. Nardin E., Clavijo P., Mons B., Van Belkum A., Ponnudurai T., Nussenzweig RS. "T cell epitopes of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. Recognition by lymphocytes of a sporozoite-immunized chimpanzee." *J Immunol* 1991. 146(5): 1674-8
25. Caro-Aguilar I., Rodríguez A., Calvo-Calle JM., Guzmán F., De la Vega P., Patarroyo ME., Galinski MR., Moreno A. "Plasmodium vivax promiscuous T-helper epitopes defined and evaluated as linear peptide chimera immunogens." *Infect Immun* 2002. 70(7): 3479-92