

Teoría de péptidos de alta unión de malaria al glóbulo rojo. Predicciones teóricas de nuevos péptidos de unión y mutaciones teóricas predictivas de aminoácidos críticos

Javier Rodríguez, Pedro Bernal, Signed Prieto, Catalina Correa

Grupo de Investigación Insight, Bogotá, Colombia.

**THEORY OF MALARIA PEPTIDES WITH HIGH-AFFINITY BINDING TO RED BLOOD CELLS.
THEORETICAL PREDICTIONS OF NEW BINDING PEPTIDES AND
PREDICTIVE MUTATIONS OF CRITICAL AMINO ACIDS**

Recibido: Noviembre 2009

Aceptado: 15 Enero 2010

RESUMEN

El método de ensayo y error experimental ha sido usado para estudiar la capacidad de unión a receptores del glóbulo rojo de péptidos de proteínas del merozoíto. Caracterizaciones físicas y matemáticas con la probabilidad y la entropía han diferenciado objetivamente péptidos de alta unión de los que no lo son.

Se seleccionaron 5 péptidos teóricos y 40 pertenecientes a cuatro proteínas de superficie del merozoíto. Se realizó una inducción calculando la probabilidad de aparición de aminoácidos por grupos, y agrupados consecutivamente de a dos, construyendo un espacio de probabilidad con los péptidos de alta unión y otro con los péptidos que no se unen, se calcularon los valores que predicen cuando un péptido es o no de alta unión. Se cuantificaron los 116 péptidos que no presentaron alta unión de las mismas proteínas, confirmando los valores predictivos. Se calcularon los valores predictivos para los péptidos sobrelapados de la MSP-2, se realizaron medidas de desempeño de las predicciones respecto a los hallazgos experimentales. Se realizaron mutaciones teóricas de un péptido de alta unión calculando para cada mutación los valores predictivos.

Se desarrolló una metodología predictiva para proteínas de superficie del merozoíto a receptores del glóbulo rojo, encontrando una sensibilidad del 95% y una especificidad del 90%, según resultados experimentales.

El desarrollo de una teoría fundamentada en un orden físico y matemático acausal reemplazando el lenguaje de la biología molecular y el método ensayo-error por un experimento mental, leyes físico-matemáticas y una inducción teórica permitió crear predicciones eficaces de los experimentos.

PALABRAS CLAVE: Probabilidad / Merozoíto / Alta unión / Probabilidad condicional / Malaria.

ABSTRACT

The trial-error method has been used to study the binding capacity of peptides from merozoite proteins to red blood cell receptors.

Physical-mathematical characterizations with probability and entropy have differentiated in an objective way high-affinity binding peptides from those that do not bind.

Five theoretical peptides and 40 peptides from 4 merozoite surface proteins were selected. An induction was made by calculating the probability of grouped amino acids to happen, and consecutively that of two amino acids. By building a sample probability space with high-affinity binding peptides and another one with non-binding peptides, the predictive values for high-affinity and non-binding peptides was calculated. One hundred and sixteen non-binding peptides from the same proteins were quantified, confirming predictive values. The predictive values for overlapped peptides from MSP-2 were calculated, and some performance measures for predictions were quantified. Theoretical mutations for one high-affinity binding peptide were constructed, quantifying for each mutation the predictive values.

A predictive methodology for the binding of merozoite surface proteins to red blood cell receptors was developed, with 95% sensibility, and 90% specificity, with respect to experimental results.

The development of an a-causal theory founded in a physical-mathematical order, which replaced the molecular biology language and the assay-error method for a mental experiment, physical-mathematical laws and one theoretical induction lead to the creation of effective predictions of the experiments.

KEY WORDS: Probability / Merozoite / High binding / Conditional probability / Malaria.

INTRODUCCIÓN

En un experimento dado, el grupo de todos sus posibles resultados es llamado espacio muestral y la posibilidad de ocurrencia de los eventos que se encuentran contenidos dentro del espacio muestral es cuantificada a través de una medida matemática adimensional denominada probabilidad^(1,2).

La malaria es la más importante infección parasitaria en adultos, registrándose en todo el mundo 500 millones de ataques clínicos y 1 millón de muertes al año, principalmente en el África Subsahariana⁽³⁾. Para mejorar el control de esta epidemia en las regiones afectadas, la World Health Organization (WHO) propugna el desarrollo de sistemas de alerta temprana sobre la base de la evaluación de la vulnerabilidad, pronósticos del clima y vigilancia ambiental^(4,5). Producida por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida entre sujetos humanos por mosquitos anofelinos, la malaria representa uno de los mayores retos de control en Salud Pública a nivel mundial⁽⁶⁾. Su ciclo eritrocítico está caracterizado por la invasión periódica de merozoitos a los eritrocitos. Dicho proceso requiere el reconocimiento, unión, orientación e interiorización del merozoito dentro del eritrocito; estos procesos de vital importancia son analizados como interacciones receptor-ligando de alta especificidad bio-molecular⁽⁷⁾.

La proteína 2 de superficie del merozoito (MSP-2), una glicoproteína de 35±56 kDa, es la segunda molécula principal presente en la superficie del merozoito del *P. Falciparum*^(8,9). Es expresada doce horas antes de la invasión del merozoito y su máxima concentración es observada 42 horas después de la invasión^(10,11). El MSP-2 es un antígeno candidato para vacunas de malaria, comprende repeticiones centrales altamente polimórficas flanqueadas por variables de dominio únicas y dominios de los terminales N y C conservados⁽¹²⁾. Dos características del MSP-2 son particularmente relevantes para estudios evolutivos: (a) está codificado por alelos altamente divergentes agrupados en dos familias o linajes dimórficos, FC27 y 3D7⁽¹³⁾ y (b) la diversidad de la secuencia en MSP-2 claramente obstaculiza su reconocimiento por anticuerpos naturalmente adquiridos⁽¹⁴⁾ e inducidos por vacunas⁽¹⁵⁾. Los anticuerpos al MSP-2 naturalmente adquiridos han sido asociados recientemente con inmunidad clínica en África^(16,17).

El antígeno de membrana apical-1 (AMA-1) es una proteína de superficie de 83-kDa. Ésta proteína es expresada por parásitos intra-eritrocíticos maduros y procesada antes de ser exportada a la superficie del merozoito durante la ruptura del eritrocito infectado⁽¹⁸⁾. Varias líneas de evidencia incluyendo ensayos de inhibición de crecimiento *in vitro*⁽¹⁹⁻²²⁾, inhibición del procesamiento antigénico mediada por anticuerpos⁽²³⁾, y ensayos sero-epidemiológicos^(24,25) evidencian

un rol crítico de AMA-1 durante la invasión del merozoito al eritrocito. Una vacuna que aumentara los niveles de anticuerpos de AMA-1 podría por tanto reducir el riesgo de que la infección de la malaria causara enfermedad clínica. En la actualidad están siendo evaluadas en ensayos clínicos en Mali tres vacunas de AMA-1 basadas en adyuvantes, incluyendo dos vacunas monovalentes diferentes basadas en AMA-1 derivadas respectivamente de los clones 3D7 y FVO de *P. falciparum*^(26,27), y una vacuna bivalente que incluye ambas versiones de AMA-1⁽²⁸⁾.

Después de la reorientación del parásito, debe activar el proceso de invasión, y este probablemente incluye interacciones directas de ligandos en su terminal apical con receptores del eritrocito; estas adhesinas no han sido definidas, pero dos familias de proteínas, la familia de proteína DBL⁽²⁹⁾ y la proteína de unión homóloga del reticulocito del *P. falciparum* (PfRh o PfRBL), son los candidatos principales⁽³⁰⁻³³⁾. Las proteínas DBL incluyen la EBA-140 (también conocida como BAEBL)⁽³⁴⁾, y otras. Los dominios duales ricos en cisteínas DBL encontrados en la parte N terminal de la EBA-140 median la unión a su receptor afín.

Proteínas periféricas son también candidatas de unión a los receptores de los eritrocitos. Estas proteínas son secretadas en la vacuola parasitófora de parásitos en etapa de esquizonte y se unen a la superficie de los merozoítos en desarrollo, al menos en algún grado, por interacción con una proteína anclada por Glucosylfosfatidilinositol (GPI) como la MSP-1, el grupo MSP-3/-6, la familia MSP-7, y la familia SERA proteasa⁽³⁵⁾. Estudios sugieren que la MPS-3 es importante en la progresión de la invasión del merozoito en los eritrocitos. Ejemplares de *Saimiri sciureus* inmunizados con la proteína MSP-3 presentaron una reducción parcial y total, en algunos casos, de la parasitemia luego de una infección controlada con *P. falciparum*^(36,37).

En trabajos previos se ha estudiado la capacidad de unión de péptidos de tamaño de 20 aminoácidos de varias proteínas del merozoito a los receptores del glóbulo rojo, definiendo la actividad de unión como la cantidad (en pico-moles) de péptidos que se unieron específicamente a los eritrocitos por péptido adicionado (en pico-moles), definiendo la alta unión como una actividad de unión $\geq 2\%$. Tomando los péptidos sobrelapados cada 10 aminoácidos de MSP-2, se encontró que de las 25 secuencias posibles 3 fueron halladas experimentalmente de alta unión al eritrocito⁽³⁸⁾. En esta misma vía, fueron sintetizados 31 péptidos no sobrelapados, cubriendo la longitud total del AMA-1 y fueron identificados ocho péptidos con alta actividad de unión al eritrocito humano⁽³⁹⁾. Igualmente en un trabajo previo⁽⁴⁰⁾, 61 péptidos del EBA-140 de la cadena 3D7⁽⁴¹⁾ fueron sintetizados en 20 residuos no sobrelapados para determinar su especificidad

de unión, encontrando que 6 péptidos tienen unión selectiva y específica a los eritrocitos; finalmente se estudiaron 19 péptidos no sobreapilados de MSP-3 de la cadena FC27, y se encontró que 3 de los 19 péptidos presentan alta unión a los eritrocitos⁽⁴²⁾.

Previamente se han desarrollado trabajos en el área de la aplicación de teorías físicas y matemáticas, como la teoría de conjuntos, la probabilidad y la entropía para caracterizar el problema de unión de péptidos de la MSP-1 y EBA a los receptores del glóbulo rojo, definiendo macroestados de unión y no unión y acertando en el 100% de los casos⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

El propósito de la presente investigación es desarrollar, con base en la teoría de la probabilidad, una metodología física y matemática predictiva de carácter general, para diferenciar péptidos de alta unión de péptidos de no unión de proteínas de superficie del merozoito involucradas con el fenómeno de unión a los receptores del glóbulo rojo.

DEFINICIONES

Probabilidad Laplaciana. La probabilidad de un evento A se define como el cociente entre la frecuencia de aparición de este evento y el total de eventos (1).

$$P(A) = \frac{\text{Frecuencia de aparición del evento } A}{\text{Total de eventos}} = \frac{A}{N}$$

Ecuación 1

MÉTODOS

Inicialmente se desarrolló un experimento mental, donde se seleccionaron 5 péptidos que fueron construidos teóricamente, dichos péptidos se seleccionaron para conocer el comportamiento de las distribuciones generales, y son los siguientes:

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 STCNQAILMVWFYPGKERDH
 GGGGGGGSTCNQYGGGGGGG
 GGGGGGAILMVWFYGGGGGG
 GGGGGGGKERDHGGGGGGGG

Posteriormente se seleccionaron 40 péptidos con un tamaño de 20 aminoácidos cada uno, pertenecientes a las proteínas de superficie del merozoito EBA-140, MSP-2, MSP-3 y AMA-1. De éstos, 20 presentan alta unión a los receptores del glóbulo rojo y 20 no, según estudios experimentales previos^(38-40,42).

Posteriormente se realizó una inducción partiendo de estos 40 péptidos, agrupando los 20 aminoácidos en cuatro grupos de acuerdo con sus características: en el grupo uno

se encuentran Y, W, F, I, M, L, V, A; en el grupo dos los aminoácidos S, T, C, Y, N, Q; en el grupo tres los aminoácidos H, R, K, D, E y en el grupo cuatro G y P. Esta agrupación permite representar diferentes aminoácidos como un mismo evento probabilístico y así simplificar la distribución de aminoácidos en los péptidos, aplicando la teoría de la probabilidad de forma no equiprobable, pues se espera que las distribuciones de probabilidad cambien de acuerdo al fenómeno de unión. Esta agrupación se realizó partiendo de las características físico-químicas de los aminoácidos, pues al grupo uno pertenecen los hidrofóbicos, al dos los que tienen la capacidad de hacer puentes de hidrógeno, al tres los aminoácidos cargados y al cuatro los dos aminoácidos con menor peso molecular, para ser evaluados en el contexto de las leyes de probabilidad de forma global y no como eventos aislados.

Partiendo de esta cuantificación de las frecuencias por aminoácido se identificó el número de aminoácidos de cada grupo en cada péptido (Tabla I). Posteriormente se construyeron dos espacios de probabilidad que cuantifican la posibilidad de aparición de un número específico de aminoácidos de cada grupo, uno para los 20 péptidos seleccionados de alta unión y el otro para los 20 péptidos que no presentan alta unión, según los estudios experimentales, a través del cálculo de la probabilidad Laplaciana (ver definiciones, Tabla II). Posteriormente se cuantificaron las duplas de aminoácidos por grupos, esto es, cuando se encuentran dos aminoácidos consecutivos pertenecientes al mismo grupo y que los aminoácidos que los flanquean pertenezcan a un grupo diferente. Partiendo de esta cuantificación se identificó el número de duplas por grupo en cada péptido (Tabla I). Posteriormente se construyeron dos espacios de probabilidad que cuantifican la posibilidad de aparición de un número específico de duplas de cada grupo, uno para los 20 péptidos seleccionados de alta unión y el otro para los 20 péptidos que no presentan alta unión, a través del cálculo de la probabilidad Laplaciana (ver definiciones, Tabla III). Dichos espacios de probabilidad evalúan solamente los grupos uno, dos y tres, pues los aminoácidos del grupo cuatro aparecen indistintamente tanto en los péptidos de alta unión como de no unión, y no permiten desarrollar espacios de probabilidad cargados que diferencien estos estados de unión.

A continuación se compararon los mismos eventos para los dos espacios de probabilidad construidos, con el fin de determinar cuáles eventos simultáneos tienen diferencias en sus probabilidades, es decir, qué eventos iguales poseen valores de probabilidad bajos en un espacio y altos en el otro, con el fin de identificar los cargamientos y sus diferencias y magnificar matemáticamente estas diferencias dividiendo el valor menor por dos y multiplicando por dos el mayor.

TABLA I. Frecuencia de aparición de aminoácidos

Secuencia	ALTA UNIÓN						Secuencia	NO UNIÓN					
	G1	G2	G3	DG1	DG2	DG3		G1	G2	G3	DG1	DG2	DG3
SYTSFMKKSKTQMEVLTNLY	8	10	4	3	2	1	MKGYFNIIYFLIPLIFLYNVI	15	5	1	2	1	0
DLADIIGKGSIDIKDYYGKKM	9	3	8	4	1	2	NTNSNNFANTSEISIGKDNK	4	11	4	1	0	1
LKNKETCKDYDKFQKIPQFL	6	6	8	1	1	3	IQLCIANFLNSRLETMEKFK	9	6	5	2	1	1
GHSESSLNRTTNAQDIKIGR	4	8	6	0	1	0	CRYTATIICKSFLNGPAKNDV	8	7	4	2	1	0
CNNEYSMEYCTYSDERNSSP	4	13	5	0	1	0	DIASQINVNDLRGFGCNYKS	7	8	4	1	1	0
VQETNISDYSEYNNEKNMY	7	12	5	1	2	1	NNEKSWNCTGFTNKFGPTC	3	11	3	0	3	1
DAEVAGTQYRLPSPGKCPVFG	7	5	4	2	0	0	QQSGKDTANTSNTGNSSETDSPV	1	12	4	0	2	1
QYLDKGFFAFPPTEPLMSPM	8	4	3	2	1	1	SHEPESDAAINVEKLSGDES	5	5	8	0	0	3
TLDEMRHFYKDNEYVKNLDE	7	5	10	2	0	4	SSETRGILDINDPSVTNNVN	5	9	4	1	1	0
VDNWEKVCPRKLNQNAKFG	7	5	6	1	1	2	EVHDASNTQGSVNTSDITN	4	11	4	0	1	1
LWVDGNCEDIPHVNNEFSAID	8	4	6	1	1	1	GILVVIVLLLSSASRMGKSN	11	5	2	0	2	0
MIKSAFLPTGAFKADRYKSH	9	4	6	2	0	1	EEYDIGESNIEATFEEENNYL	7	7	7	1	1	2
PIEVENHPCSLYKNEIMKE	7	5	7	2	1	2	PLHQEHETYQQEDSGEDENTL	3	8	8	0	1	2
WGEEKRASHITPPVLMKPYY	7	5	7	1	2	1	QHAYPIDHEGAEPAPQEQNLL	6	5	6	1	1	0
KNESKYSNTFINNAYNMSIR	7	11	4	2	2	0	FSSIEIVERSNYMGNPWTY	8	8	4	2	1	1
INNAYNMSIRRSMAESKPPT	7	8	4	2	2	1	GAGASAGNGANPGADAERSP	6	4	3	0	0	1
NPNHKNAETNPKGKGEVQKP	2	6	7	0	1	1	NPGADAERSPSPTAPPATPA	5	5	3	0	0	1
NNVASKEIVKKYNLNLRNAI	9	7	5	3	2	2	SPTAPPATPATTTTTTND	3	12	1	0	0	0
YQKANKAVLKAKEASSYDYI	10	7	6	1	1	1	DAEQAQDAENASKEAEEAA	8	3	9	2	0	3
VKEAAESIMKTLAGLIKGN	9	4	5	4	1	1	TAASKAKKAVETALKAKDDA	9	3	8	3	0	1

Valores de la frecuencia de aparición de aminoácidos individuales para los grupos 1 a 3 (G1, G2, G3) y de la frecuencia de aparición de aminoácidos en duplas para los grupos 1 a 3 (DG1, DG2, DG3), para los 20 péptidos de alta unión y los 20 péptidos de no unión seleccionados para la inducción.

De esta forma se diferencian más los espacios de probabilidad construidos.

Posteriormente, para cada secuencia de 20 aminoácidos, tanto para los 20 péptidos de alta unión, los 20 que no son de alta unión y los 5 desarrollados teóricamente, se asignaron los valores de probabilidad por grupo correspondientes tanto a frecuencias individuales como a duplas, teniendo así por cada espacio de probabilidad 6 valores de probabilidad para cada secuencia, los cuales fueron multiplicados con el fin de calcular 2 valores de probabilidad conjunta, uno de estos corresponde a los valores de las frecuencias individuales y el otro a los valores tanto de frecuencias como de duplas por cada espacio de probabilidad. Posteriormente se sumaron los dos valores que corresponden al espacio de unión y se comparó respecto a la suma de los dos valores del espacio de no unión. Si los valores tanto de unión como de no unión son igual a cero el péptido se predice de no unión, si es mayor la suma de los valores que corresponde al espacio de no unión, entonces el péptido se predice como de no unión, pero si es mayor el valor correspondiente al espacio de unión, entonces se evalúan las siguientes condiciones:

Reglas de exclusión 1: Se tomó la frecuencia mayor asociada al grupo uno, dos, o tres, y partiendo de esta se calculó la resta respecto a los otros dos valores de frecuencia para dichos grupos. Posteriormente se sumaron dichas restas, esto con el fin de calcular qué tan similares son los valores de dichas frecuencias, determinando con esto que si dicha suma es menor que dos el péptido no es de alta unión.

Reglas de exclusión 2: La probabilidad de que un péptido presente cuatro glicinas es mayor a cero.

Reglas de exclusión 3: La probabilidad de que un péptido presente 10 aminoácidos cargados y menos de cuatro duplas de cargados es mayor a cero.

Reglas de exclusión 4: La probabilidad de que un péptido presente 8 o 7 aminoácidos cargados y cero duplas es mayor a cero.

Reglas de exclusión 5: La probabilidad de que un péptido presente 8 aminoácidos con capacidad de puente de hidrógeno y cero duplas es mayor a cero.

Reglas de exclusión 6: La probabilidad de que un péptido presente 10 aminoácidos con capacidad de puente de hidrógeno y menos de dos duplas es mayor a cero.

TABLA II. Probabilidad de aparición de un número específico de aminoácidos

Frecuencias/Grupos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ESPACIOS ORIGINALES																
ALTA UNIÓN																
G1	0	0	0,05	<u>0</u>	0,1	0	<u>0,05</u>	0,4	0,15	0,2	0,05	0	0	0	0,00	0,00
G2	0	0	0	<u>0,05</u>	0,2	0,25	0,1	0,1	0,1	0	0,05	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	0,05	0,00	0,00
G3	0	<u>0</u>	0	<u>0,05</u>	0,2	<u>0,2</u>	0,25	0,15	0,1	0	0,05	0	0	0	0,00	0,00
NO UNIÓN																
G1	0	0,05	0	<u>0,15</u>	0,1	0,15	<u>0,1</u>	0,1	0,15	0,1	0	0,05	0	0	0	0,05
G2	0	0	0	<u>0,1</u>	<u>0,05</u>	0,25	0,05	0,1	0,15	0,05	0	<u>0,15</u>	<u>0,1</u>	0	0	0
G3	0	<u>0,1</u>	0,05	<u>0,15</u>	<u>0,35</u>	<u>0,05</u>	0,05	0,05	0,15	0,05	0	0	0	0	0	0
ESPACIOS CARGADOS MATEMÁTICAMENTE																
ALTA UNIÓN																
G1	0	0	0,05	0	0,1	0	0,025	0,8	0,15	0,2	0,05	0	0	0	0,00	0,00
G2	0	0	0	0,025	0,4	0,25	0,1	0,1	0,1	0	0,05	0,025	0,025	0,05	0,00	0,00
G3	0	0	0	0,025	0,1	0,4	0,25	0,15	0,1	0	0,05	0	0	0	0,00	0,00
NO UNIÓN																
G1	0	0,05	0	0,3	0,1	0,15	0,2	0,05	0,15	0,1	0	0,05	0	0	0	0,05
G2	0	0	0	0,2	0,025	0,25	0,05	0,1	0,15	0,05	0	0,3	0,2	0	0	0
G3	0	0,2	0,05	0,3	0,7	0,03	0,05	0,05	0,15	0,05	0	0	0	0	0	0

Valores de la probabilidad de aparición de un número específico de aminoácidos por grupo (0 a 15), para los 20 péptidos de alta unión y los 20 péptidos de no unión seleccionados en la inducción (Espacios Originales), y valores de la probabilidad de aparición de un número específico de aminoácidos por grupo para los mismos espacios con los cargamientos matemáticos especificados en la metodología. Los valores subrayados y en negrita son los que tienen valores opuestos en los dos espacios de probabilidad originales y fueron los modificados.

Reglas de exclusión 7: La probabilidad de que un péptido presente 2 hidrofóbicos y más de 6 aminoácidos con capacidad de puentes de hidrógeno es mayor a cero.

Si alguna de estas reglas de exclusión se cumple, el péptido es predicho como de no unión; si no, entonces es predicho como de alta unión. De esta forma se establecen los valores matemáticos que predicen cuándo un péptido es o no de alta unión.

Finalmente, para aquellos péptidos que no cumplieron ninguna regla de las planteadas, se propone la siguiente condición:

Regla de inclusión 1: Si el péptido no cumple ninguna regla de exclusión, presenta valores mayores en la suma de las probabilidades conjuntas de espacio de no unión respecto al espacio de alta unión, entonces se evalúa si el péptido tiene siete aminoácidos hidrofóbicos y dos duplas de este mismo grupo; si esto se presenta se determina al péptido como de alta unión.

Posteriormente se tomaron los 116 péptidos que no presentaron alta unión de las mismas proteínas y se aplicó la metodología previa con el fin de confirmar los valores

predictivos. Con el objetivo de evaluar los resultados se calcularon medidas de desempeño por medio de una clasificación binaria, donde Verdadero Positivo (VP) es el número de péptidos de alta unión experimentales que son predichos de alta unión, Falsos Positivos (FP) es el número de péptidos predichos de alta unión los cuales no se corresponden con un péptido experimental de alta unión, Falsos Negativos (FN) es el número de péptidos experimentales de alta unión que se predicen de no unión, y finalmente Verdaderos Negativos (VN) es el número de péptidos experimentales de no unión que se predicen de no unión. Las medidas de desempeño calculadas fueron: Sensibilidad [SENS=VP / (VP + FN)], definida como la proporción de todos los péptidos de unión que son correctamente identificados; Especificidad [SPEC=VN / (VN + FP)], definida como la proporción de todos los péptidos de no unión que son correctamente identificados; Valor Predictivo Positivo [VPP=VP / (VP + FP)] definida como la probabilidad de que un péptido que es predicho de alta unión sea de hecho de alta unión; Valor Predictivo Negativo [VPN=VN / (VN + FN)], definida como la probabilidad de que un péptido

TABLA III. Probabilidad de aparición de duplas de aminoácidos por grupo

Frecuencias/Grupos	0	1	2	3	4
ESPACIOS ORIGINALES					
ALTA UNIÓN					
G1	<u>0,15</u>	0,3	0,35	0,1	0,1
G2	<u>0,15</u>	0,55	<u>0,3</u>	0	0
G3	0,2	0,5	<u>0,2</u>	0,05	0,05
NO UNIÓN					
G1	<u>0,45</u>	0,25	0,25	0,05	0,00
G2	<u>0,35</u>	0,5	<u>0,1</u>	0,05	0,00
G3	0,35	0,45	<u>0,1</u>	0,1	0,00
ESPACIOS CARGADOS MATEMÁTICAMENTE					
ALTA UNIÓN					
G1	0,08	0,3	0,35	0,1	0,1
G2	0,08	0,55	0,6	0	0
G3	0,2	0,5	0,4	0,05	0,05
NO UNIÓN					
G1	0,9	0,25	0,25	0,05	0,00
G2	0,7	0,5	0,05	0,05	0,00
G3	0,35	0,45	0,05	0,1	0,00

Valores de la probabilidad de aparición de duplas de aminoácidos por grupo, para los 20 péptidos de alta unión y los 20 péptidos de no unión seleccionados en la inducción (Espacios Originales), y valores de la probabilidad de aparición de un número específico de aminoácidos por grupo para los mismos espacios con los cargamientos matemáticos especificados en la metodología. Los valores subrayados y en negrita son los que tienen valores opuestos en los dos espacios de probabilidad originales y fueron los modificados.

que es predicho de no unión sea de hecho de no unión; Exactitud [EXC=(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)] definida como la proporción de todas las predicciones correctas.

Posteriormente se aplicó la misma metodología a todos los péptidos sobreapilados cada aminoácido de la proteína MSP-2 a través de un software diseñado para tal efecto, con el fin de predecir los valores de los péptidos de alta unión y de los que no se unen para todos los posibles péptidos sobreapilados cada aminoácido con un tamaño de 20 residuos. Luego de desarrollada la predicción, se evalúa la probabilidad de que los nuevos péptidos predichos de alta unión estén sobreapilados a un péptido de alta unión conocido experimentalmente en mínimo 9 aminoácidos, dicha elección de 9 aminoácidos se hizo porque el trabajo experimental está diseñado sobreapilando 10 aminoácidos, y de esta forma se estudia si existen regiones donde se acumulan solamente los nuevos péptidos predichos, y no los conocidos experimentalmente.

Finalmente, se realizaron todas las posibles mutaciones teóricas para el péptido KNESKYSNTFINNAYNMSIR de la proteína MSP-2 reemplazando simultáneamente tres aminoácidos críticos por glicinas y se realizaron los mismos cálculos de probabilidad conjunta para establecer si dichos péptidos teóricos son predichos de alta unión o no. Así se puede calcular el valor de la probabilidad de que, al reemplazar dichos aminoácidos, el péptido simulado fuera predicho de no unión, dividiendo el total de péptidos predichos de no unión entre la totalidad de los péptidos construidos teóricamente.

RESULTADOS

Se encontró que los valores de frecuencia de aparición por grupo para los 20 péptidos de alta unión variaron entre 0 y 13, correspondientes al grupo cuatro y dos respectivamente; de igual forma dichas frecuencias para los 20 péptidos que no son de alta unión variaron entre 0 y 15, correspondientes al grupo cuatro y uno respectivamente (Tabla I). Se encontró que los valores de frecuencia de aparición por grupo para las duplas para los 20 péptidos de alta unión variaron entre 0 y 4, de igual forma dichas frecuencias para los 20 péptidos que no son de alta unión variaron entre 0 y 3 (Tabla I).

Se encontró que los valores de frecuencia de aparición de un número específico de aminoácidos para los grupos uno, dos, y tres para los 20 péptidos de alta unión variaron entre 0 y 8, con valores de probabilidad respectivos de 0 y 0,40. Se encontró que los valores de frecuencia de aparición de un número específico de aminoácidos para los grupos uno, dos, y tres para los 20 péptidos de no unión variaron entre 0 y 7, con valores de probabilidad respectivos de 0 y 0,35 (Tabla II).

Se encontraron 11 eventos que se corresponden con cargamientos altos en uno de los espacios y con cargamientos bajos en el otro respecto a los eventos de valores de frecuencia de aparición de un número específico de aminoácidos para los grupos uno, dos, y tres (Tabla II).

Se encontró que los valores de frecuencia de aparición de un número específico de duplas para los grupos uno, dos, y tres para los 20 péptidos de alta unión variaron entre 0 y 11, con valores de probabilidad respectivos de 0 y 0,55. Se encontró que los valores de frecuencia de aparición de un número específico de aminoácidos para los grupos uno, dos y tres para los 20 péptidos de no unión variaron entre 0 y 10 con valores de probabilidad respectivos de 0 y 0,50 (Tabla III).

Se encontraron 4 valores que se corresponden con cargamientos altos en uno de los espacios y con cargamientos bajos en el otro respecto a los eventos de valores de frecuencia

TABLA IV. Medidas de desempeño evaluadas

Medida de Desempeño	Valor
SENS = VP / (VP + FN)	0,950
SPEC = VN / (VN + FP)	0,905
VPP = VP / (VP + FP)	0,633
VPN = VN / (VN + FN)	0,991
EXC = (VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)	0,912

de aparición de un número específico de duplas de aminoácidos para los grupos uno, dos, y tres (Tabla III).

Se encontró que los valores de probabilidad conjunta respecto al espacio de alta unión para frecuencias de aparición para los péptidos de alta unión variaron entre $2,50 \text{ E}^{-04}$ y $5,00 \text{ E}^{-02}$; los valores de probabilidad conjunta tanto para frecuencias como para duplas para estos mismos péptidos variaron entre $2,06 \text{ E}^{-06}$ y $3,30 \text{ E}^{-03}$. Mientras que los valores de probabilidad conjunta respecto al espacio de no unión para los péptidos de alta unión variaron entre 0 y $1,05 \text{ E}^{-02}$, los valores de probabilidad conjunta tanto para frecuencias como para duplas para estos mismos péptidos variaron entre 0 y $5,36 \text{ E}^{-04}$.

Se encontró que los valores de probabilidad conjunta respecto al espacio de no unión para frecuencias de aparición para los péptidos de no unión variaron entre $1,25 \text{ E}^{-04}$ y $2,70 \text{ E}^{-02}$; los valores de probabilidad conjunta tanto para frecuencias como para duplas para estos mismos péptidos variaron entre $1,56 \text{ E}^{-06}$ y $4,25 \text{ E}^{-04}$. Mientras que los valores de probabilidad conjunta respecto al espacio de alta unión para los péptidos de no unión variaron entre 0 y $1,20 \text{ E}^{-02}$, los valores de probabilidad conjunta tanto para frecuencias como para duplas para estos mismos péptidos variaron entre 0 y $7,92 \text{ E}^{-04}$.

Se encontró que 17 péptidos de alta unión presentaron valores mayores en la suma de las probabilidades conjuntas para el espacio de alta unión cargado respecto al espacio de no unión cargado. De los restantes tres péptidos, uno presentó un valor igual a cero en los valores del espacio de no unión y los dos valores diferentes de cero para el espacio de unión; ninguno de los restantes dos péptidos de alta unión cumplieron reglas de exclusión y uno de ellos presentó 7 aminoácidos hidrofóbicos y dos duplas del mismo grupo, siendo determinado entonces de alta unión según la metodología propuesta.

Se encontró que 17 péptidos de los 20 péptidos de no unión presentaron valores mayores en la suma de las probabilidades conjuntas para el espacio de no unión cargado respecto al espacio de alta unión cargado. De los restantes 3 péptidos de no unión, uno cumplió la regla 1.

TABLA V. Nuevos péptidos predichos de unión por la teoría

5- KTLSIINFFIFVTFNIKNES
6- TLSIINFFIFVTFNIKNESK
8- SIINFFIFVTFNIKNESKYS
9- IINFFIFVTFNIKNESKYSN
12- FFIIFVTFNIKNESKYSNTFI
14- IFVTFNIKNESKYSNTFINN
15- FVTFNIKNESKYSNTFINNA
25- KYSNTFINNAYNMSIRRSMA
26- YSNTFINNAYNMSIRRSMAE
27- SNTFINNAYNMSIRRSMAES
110- ENPNHKNAETNPKGKGEVQK
112- PNHKNAETNPKGKGEVQKPN

Los péptidos 12 a 112 corresponden a las predicciones que sobrelapan los péptidos conocidos experimentalmente de alta unión. El número inicial corresponde a la ubicación del primer aminoácido del péptido en la proteína.

Partiendo de los 40 péptidos seleccionados para la inducción junto con los 116 péptidos restantes, se encontraron 19 péptidos Verdaderos Positivos, 11 Falsos Positivos, 1 Falso Negativo, y 105 Verdaderos Negativos, con estos valores se calcularon las medidas de desempeño plasmadas en la Tabla IV.

Originalmente, en el experimento realizado para estudiar la capacidad de unión de los péptidos de la proteína MSP-2 se estudiaron 25 péptidos sobrelapados cada 10 aminoácidos y se encontraron 3 de alta unión, que corresponden al 3% de estos 25 péptidos. Sin embargo, sobrelapando de a un aminoácido se encontraron 231 péptidos que abarcan toda la proteína, por lo que se realizan teóricamente 206 nuevos experimentos, por lo tanto los 3 péptidos de alta unión corresponden al 1,3% de estas 231 secuencias posibles. Para los 231 péptidos de la proteína MSP-2 con tamaño de 20 residuos y sobrelapados cada aminoácido se encontraron 12 nuevos péptidos de unión que corresponden al 5,2% de los 231 posibles; por lo tanto por cada péptido comprobado experimentalmente se predicen 4 nuevos. Se encontró que, de los 12 péptidos predichos, 8 se encuentran sobrelapando en al menos 9 aminoácidos a los péptidos conocidos de alta unión por los estudios experimentales, de lo cual se encuentra que la probabilidad de encontrar un nuevo péptido de unión en estas regiones de la proteína es igual a 0,67. Además, se encontró que ninguno de los péptidos se encuentra aislado en la proteína, es decir, que por lo menos cada péptido predicho de unión se encuentra sobrelapado en al menos 9 aminoácidos con algún otro péptido predicho de alta unión, esto es el 100% de los péptidos predichos de alta unión se encuentran acumulados en zonas específicas de la proteína (Tabla V).

TABLA VI. Predicción de mutaciones teóricas realizadas

Secuencia	Predicción	Resta	RE1	RE2	RE3	RE4	RE5	RE6	RE7	RI1
KNGSKYSNTFINNAGNMSGR	NB	0,00E+00								V
KNGSKYSNTFIGNAYNMSGR	NB	3,25E-05								V
KNGSKYSNTFIGNAGNMSIR	NB	-3,18E-03								
KNGSKYSNTFGNNAYNMSGR	NB	-1,36E-02								
KNGSKYSNTFGNNAGNMSIR	NB	0,00E+00								V
KNGSKYSNTFGGNAYNMSIR	NB	3,23E-05								V
KNGSKYGNTFINNAYNMSGR	B	3,13E-05								
KNGSKYGNTFINNAGNMSIR	NB	-3,01E-03								
KNGSKYGNTFIGNAYNMSIR	B	-7,53E-04								V
KNGSKYGNTFGNNAYNMSIR	B	3,13E-05								
KNGSKGSNTFINNAYNMSGR	NB	0,00E+00								
KNGSKGSNTFINNAGNMSIR	NB	-2,35E-03								
KNGSKGSNTFIGNAYNMSIR	NB	-3,13E-03								
KNGSKGSNTFGNNAYNMSIR	NB	0,00E+00								
KNGSKGGNTFINNAYNMSIR	NB	-3,01E-03								
KNESKYSNTFIGNAGNMSGR	NB	-5,57E-03								
KNESKYSNTFGNNAGNMSGR	NB	5,04E-04								V
KNESKYSNTFGGNAYNMSGR	NB	0,00E+00								V
KNESKYSNTFGGNAGNMSIR	NB	-6,41E-03								
KNESKYGNTFINNAGNMSGR	NB	-5,27E-03								
KNESKYGNTFIGNAYNMSGR	NB	-7,03E-03								
KNESKYGNTFIGNAYNMSIR	NB	-2,17E-02								
KNESKYGNTFGNNAYNMSGR	NB	0,00E+00								
KNESKYGNTFGGNAYNMSIR	NB	-5,33E-03								
KNESKYGNTFGGNAYNMSIR	NB	-7,03E-03								
KNESKGSNTFINNAGNMSGR	NB	-3,65E-03								
KNESKGSNTFIGNAYNMSGR	NB	-5,48E-03								
KNESKGSNTFIGNAGNMSIR	NB	-1,67E-02								V
KNESKGSNTFGNNAYNMSGR	B	5,18E-04								
KNESKGSNTFIGNAGNMSIR	NB	-4,05E-03								
KNESKGSNTFGNNAYNMSIR	NB	-5,48E-03								
KNESKGGNTFINNAGNMSIR	NB	-5,27E-03								
KNESKGGNTFINNAGNMSIR	NB	-1,58E-02								
KNESKGGNTFIGNAYNMSIR	NB	-2,08E-02								
KNESKGGNTFIGNAYNMSIR	NB	-5,27E-03								
KGGSKYSNTFINNAYNMSIR	B	3,26E-05								
KGGSKYSNTFINNAGNMSIR	NB	-3,13E-03								
KGGSKYSNTFIGNAYNMSIR	B	-7,83E-04								V
KGGSKYSNTFGNNAYNMSIR	B	3,24E-05								
KGGSKYGNTFINNAYNMSIR	B	-7,53E-04								V
KGGSKGSNTFINNAYNMSIR	NB	-3,01E-03								
KGESKYSNTFINNAGNMSGR	NB	-5,48E-03								
KGESKYSNTFIGNAYNMSGR	NB	-7,31E-03								
KGESKYSNTFIGNAGNMSIR	NB	-2,20E-02								V
KGESKYSNTFGNNAYNMSIR	NB	0,00E+00								
KGESKYSNTFIGNAGNMSIR	NB	-6,08E-03								
KGESKYSNTFGGNAYNMSIR	NB	-7,31E-03								
KGESKYGNTFINNAYNMSGR	NB	-7,03E-03								
KGESKYGNTFINNAGNMSIR	NB	-2,08E-02								
KGESKYGNTFIGNAYNMSIR	B	3,06E-03								
KGESKYGNTFIGNAYNMSIR	NB	-7,03E-03								
KGESKGSNTFINNAYNMSGR	NB	-5,27E-03								
KGESKGSNTFINNAGNMSIR	NB	-1,64E-02								
KGESKGSNTFIGNAYNMSIR	NB	-2,17E-02								
KGESKGSNTFGNNAYNMSIR	NB	-5,27E-03								
KGESGGNTFINNAYNMSIR	NB	-2,08E-02								

Predicción de unión (B) y no unión (NB), valores de la resta de la probabilidad condicional del espacio de alta unión respecto al espacio de no unión, y resultados de las reglas de exclusión (RE1 a RE7) y de inclusión (RI1) que cumplen (V) o no (espacio en blanco), para las 56 secuencias teóricas de las mutaciones construidas reemplazando tres aminoácidos críticos por glicinas para el péptido KNESKYSNTFINNAYNMSIR de la proteína MSP-2.

Para las 56 secuencias teóricas de las mutaciones construidas reemplazando tres aminoácidos críticos por glicinas para el péptido KNESKYSNTFINNAYNMSIR de la proteína MSP-2, se encontró que 38 fueron predichos de no unión, lo cual corresponde a un valor de probabilidad igual a 0,68 (Tabla VI).

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo en el que se desarrollan de forma simultánea cinco predicciones físico-matemáticas. Dos de éstas cuantifican la capacidad de unión de péptidos a los receptores del glóbulo rojo, esto es, si es o no de alta unión; otras dos predicen cuáles son los nuevos péptidos no conocidos experimentalmente de alta unión y de no unión. La cuarta predice cuáles son las combinaciones de aminoácidos críticos para la unión del péptido, y la quinta predice las zonas donde se acumulan los aminoácidos de alta unión en la proteína. Estas predicciones son de aplicación a cualquier proteína de superficie del merozoito, y están basadas en estudios experimentales de cuatro proteínas de superficie, con la teoría de la probabilidad. La inducción teórica de los aminoácidos agrupados de acuerdo a características físico-químicas, su distribución individual y en duplas permitió desarrollar una metodología predictiva general e independiente de la especificidad proteica, encontrando una sensibilidad y especificidad superiores al 90%. La simulación computacional de los sobrelapamientos en el contexto de la teoría desarrollada permite predecir nuevos péptidos de alta unión que no han sido probados experimentalmente y sugiere “*a priori*” que los experimentos actuales no son exhaustivos.

En trabajos previos se había abordado el problema de la unión de péptidos a los receptores del glóbulo rojo, así como al HLA de clase II, realizando caracterizaciones con leyes de la naturaleza^(43,44); dichos trabajos mostraron que existe un orden físico y matemático acausal en estos problemas de alta complejidad. En un trabajo desarrollado con base en las teorías de probabilidad y entropía, se diferenciaron péptidos de alta unión y de no unión de la proteína EBA-140 con un 100% de efectividad⁽⁴⁵⁾. Así se desarrolló el primer trabajo físico y matemático que estudia los aminoácidos denominados críticos a través de la creación de mutaciones teóricas que cuantifican los cambios matemáticos para péptidos análogos, estudiando si los valores de probabilidad y entropía se conservaban dentro del macroestado de unión o no. En un trabajo previo se realizó una teoría de predicción de unión de péptidos presentados por moléculas de HLA clase II basada en leyes de probabilidad, combinatoria y entropía, encontrando los valores numéricos que caracterizan matemáticamente cualquier posible microestado y prediciendo

con la relación S/k los valores que corresponden al macroestado de unión, acertando en el 100% de los casos estudiados⁽⁴⁶⁾. Basados en esta investigación se realizó la predicción de péptidos nonámeros de MSA-2, y AMA-1, determinando que existen 35 péptidos nonámeros incluidos dentro del macroestado de unión para MSA-2, y 60 para AMA-1 como posibles antígenos útiles para el desarrollo de vacunas de malaria⁽⁴⁷⁾.

En este trabajo, las mutaciones teóricas tienen un sentido predictivo más profundo que el mencionado previamente, pues ya no están referidos a una caracterización sino a una predicción en el contexto de una teoría. Así se encuentra que realizar mutaciones teóricas en aminoácidos críticos permite observar cuándo el péptido predicho de alta unión “pierde sus valores predictivos de unión”, o sea, sus proporciones de probabilidad para ser de alta unión, lo que convierte esta generalización en la única metodología de predicción de alta unión y además de predicción de cuáles podrían ser los aminoácidos críticos para la unión del péptido. Aunque se realizaron pruebas reemplazando uno y dos aminoácidos críticos simultáneamente, se escogieron las mutaciones con tres aminoácidos críticos, pues éstas permiten predecir de forma más eficaz los aminoácidos críticos.

Previamente se aplicó la teoría mencionada⁽⁴⁶⁾ con el objetivo de predecir la unión de péptidos del oncogén HER-2/neu y del alergeno API m1 (J. Rodríguez et al., enviado para publicación); al comparar el desempeño de la teoría respecto a los métodos de predicción de péptidos de mayor cobertura alélica disponibles en línea, se obtuvieron los valores más altos de sensibilidad, valor predictivo positivo y exactitud. Esta teoría también fue aplicada a la totalidad de péptidos nonámeros sobrelapados de tres proteínas teóricas de 500 aminoácidos^(46,47), desarrolladas mediante un algoritmo pseudoaleatorio, determinando porcentajes de péptidos de unión cercanos al 20%. Al aplicar este procedimiento a la totalidad de péptidos sobrelapados del HER-2/neu, se encontró que el 19,04 % de éstos corresponden al macroestado de unión, revelando un orden matemático en la proporción de péptidos de unión al HLA clase II. De igual forma, en este trabajo se encontró un porcentaje del 5,2 % de nuevos péptidos predichos de alta unión respecto a la totalidad al realizar el sobrelapamiento cada aminoácido, demostrando “*a priori*” que este fenómeno es de alta especificidad y que son muy pocos los péptidos de alta unión respecto a la totalidad, mostrando la validez y sentido de la teoría.

Las clasificaciones físico químicas de los aminoácidos como hidrofóbicos, puentes de hidrógeno y cargados, útiles para describir las interacciones ligando receptor específicas de la biología y la inmunología molecular, resultan insuficientes

para poder realizar una teoría predictiva. Esta metodología se desarrolló en primer lugar al observar estas descripciones desde leyes de la naturaleza, logrando caracterizaciones físicas y matemáticas desde una concepción acausal, y no desde las causas-consecuencias convencionales. Esta concepción ha permitido la predicción de fenómenos estudiados tradicionalmente desde perspectivas causales, como la dinámica de las epidemias. Por ejemplo, en⁽⁴⁸⁾ se estudió la dinámica de dengue en Colombia como una caminata al azar probabilista, prediciendo el número de infectados del año 2007 con un 90,4 % de efectividad. Con base en las teorías de probabilidad y entropía, Rodríguez⁽⁴⁹⁾ desarrolló una metodología predictiva de la dinámica de la epidemia de malaria en cada municipio de Colombia cada tres semanas epidemiológicas sobrelapadas en el tiempo, estableciendo las condiciones matemáticas características de brotes que fueron comprobadas en el 99.98% de los casos en el periodo 2003-2007, logrando hacer predicciones efectivas, que superan los modelos de canales epidemiológicos que requieren información de cinco a siete años anteriores⁽⁵⁰⁾. En el campo de la inmunología, se realizó una caracterización matemática de aplicación clínica del repertorio T del alérgeno Poa P9, evidenciando diferencias respecto a la presencia o ausencia de interferón alfa⁽⁵¹⁾. Aplicaciones a la fisiología han permitido el desarrollo de métodos diagnósticos matemáticos de la dinámica cardiaca fetal y del adulto⁽⁵²⁻⁵⁴⁾; recientemente se desarrolló un método de ayuda diagnóstica con base en proporciones de la entropía de los atractores geométricos de la dinámica cardiaca, que reveló una autoorganización acausal predecible aplicable a la clínica (J. Rodríguez, datos no publicados).

La predicción teórica de 12 nuevos péptidos de unión en la proteína MSP-2 muestra que la arbitrariedad en la selección del tamaño del péptido, ya sea de 20 aminoácidos sobrelapados cada 10, o sin sobrelapar, no permite determinar de forma completa cuales son los péptidos de unión y cuáles no, evidenciando que los experimentos actuales no son exhaustivos. En contraposición, la teoría desarrollada permite un estudio sistemático y completo de las proteínas, simplificando y haciendo más eficaz el proceso de selección de péptidos para la comprensión del fenómeno de unión. El hallazgo de que la mayoría de los péptidos predichos teóricamente se encuentran sobrelapando los péptidos comprobados experimentalmente de alta unión, revela que hay regiones con mayor densidad de péptidos de alta unión dentro de la proteína, indicando las zonas específicas en las que deben concentrarse los estudios experimentales. Es posible que dichas zonas de alta unión sean explicadas por los arreglos geométricos tridimensionales de la proteína.

El movimiento de los planetas se observaba de forma empírica. Kepler, a partir del movimiento de Marte, desarrolló

la ley del movimiento planetario. Para Koestler, una ley es una “afirmación precisa y verificable acerca de las relaciones generales que gobiernan fenómenos particulares escrita en términos matemáticos”⁽⁵⁵⁾, como las predicciones matemáticas aquí presentadas. Los trabajos desarrollados previamente en el estudio de la unión de péptidos de superficie del merozoito al eritrocito son de carácter empírico y de ensayo error^(38-40, 42) o, como denominó Berzofsky, “el método de fuerza bruta”⁽⁵⁶⁾. En contraposición, en este trabajo se desarrolló un método de generalización de este problema simplificando el trabajo de escoger péptidos, permitiendo realizar simulaciones de sobrelapamientos de péptidos sobre la proteína de forma automática economizando recursos. Proponemos combinar lo expuesto en este artículo para encontrar los péptidos de alta unión y posteriormente confirmar cuáles generan una respuesta inmune para bloquear la invasión al glóbulo rojo. De igual forma, se realizarían cambios de aminoácidos propuestos por Patarroyo y Patarroyo⁽⁵⁷⁾ para producir anticuerpos para la malaria y así combinar la evaluación teórica de unión al glóbulo rojo y la experimental de cambios de aminoácidos, mientras se desarrolla una teoría predictiva de estos cambios para finalmente y de forma simultánea predecir los péptidos que se unen al HLA clase II de las mismas proteínas⁽⁴⁶⁾. Desarrollamos así una nueva metodología fundamentada teóricamente y en unión a los métodos experimentales, como un camino útil, rápido y menos costoso comparado con el método del ensayo y el error, y generando de esta forma un camino para elevar la biología molecular y la inmunología al nivel de ciencia teórica predictiva fundamental.

Bacon fue precursor del desarrollo del método científico, al proponer un estudio sistemático de la evidencia experimental para realizar una inducción con base en la experiencia misma. Sin embargo, fue Newton quien estableció por primera vez una teoría universal, para lo cual siguió un método de inducción teórica basada en una concepción matemática del orden del universo, por lo cual no se ocupa de su naturaleza física, sino de las relaciones matemáticas subyacentes a todo fenómeno. Mientras que para Bacon el camino del conocimiento era la verificación experimental de hipótesis parciales que explicaran un número cada vez mayor de fenómenos, Newton no trabajaba con hipótesis, sino con premisas matemáticas y físicas certeras, realizando inducciones teóricas que evidencian el orden subyacente⁽⁵⁸⁾. La biología molecular, del mismo modo que las disciplinas basadas en lo predominantemente experimental y estadístico, evolucionaron a partir de la línea planteada por Bacon, por eso se basan en el método de ensayo y error y en la recopilación de la mayor cantidad de información posible, creando afirmaciones empíricas parciales no predictivas,

pues no se basan en leyes matemáticas estrictas. En contraposición, este trabajo sigue el camino newtoniano, simplificando un fenómeno altamente complejo al ser observado desde leyes matemáticas, lo que permitió un estudio sistemático del problema, que no puede realizarse únicamente acumulando información experimental. En palabras de Einstein⁽⁵⁹⁾: "En su búsqueda de una teoría el científico teórico se ve compelido a guiarse, en grado creciente por consideraciones puramente matemáticas, formales, porque la experiencia física del experimentador no puede conducirle hasta las más elevadas regiones de la abstracción. En este mismo sentido "El teórico que emprenda esa labor no tendrá que ser acusado de "caprichoso", sino que, por el contrario, se le tendrá que garantizar su derecho a dar rienda suelta a su capricho, porque no existe otro camino hacia su objetivo. De todas maneras su trabajo no será una ensoñación vana, sino una búsqueda de las posibilidades de mayor simplicidad lógica y de sus consecuencias"⁽⁵⁸⁾, como las predicciones desarrolladas en este trabajo.

Dos concepciones han sido fundamentales en la física teórica; Einstein quien dice que "Dios no juega a los dados" lo que implica que los fenómenos pueden ser deterministas, como por ejemplo sus resultados de la relatividad especial y general⁽⁶⁰⁾, en contra de la posición de Bohr, quién "manifiesta" que "Dios si juega a los dados" como en la mecánica cuántica, permitiendo sistemas indeterminados y aleatorios⁽⁶¹⁾. El resultado determinista de este trabajo se logra al considerar una posición determinista-indeterminista simultánea, en la cual se consideró que "Dios juega a los dados, pero cargados", así el determinismo y el indeterminismo conviven y esta concepción se introdujo mediante el cargamiento de los espacios de probabilidad de unión y de no unión durante la realización de la inducción, para poder diferenciar unión de no unión y desarrollar las predicciones.

LIMITACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Este es el primer desarrollo de una teoría predictiva de carácter general, de este fenómeno tan complejo para estas proteínas de malaria; el trabajo debe aplicarse a otras proteínas del merozoito y probablemente con más información experimental desarrollar inducciones más completas.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo Insight por su fe, su entrega y su amor en el camino, sin los cuales hubiera sido imposible crear esta teoría. A los doctores Mauricio Urquiza, Marisol Ocampo, María Luz Gunturiz, Manuel Alfonso Patarroyo, Eduardo

Caminos, José Manuel Lozano y a todos los trabajadores del Instituto de Inmunología, en especial al Doctor Manuel Elkin Patarroyo, líder del desarrollo de los resultados experimentales, sin cuyo trabajo no hubiera sido posible crear esta teoría, y gracias a los cuales este trabajo es cien por ciento colombiano. A los doctores Lucero Zamudio, Carolina Wiesner y Alejandro González, miembros del CIDS de la Universidad Externado de Colombia por apoyar mi camino. A los físicos con los que empecé a trabajar en este tema, por acompañarme durante mi internado y mi rural en el Instituto de Inmunología. Al Cirujano Rubén Caycedo, y a los Ginecólogos Jaime Gallego, Alejandro Bautista y Alberto Páez, por su trabajo y apoyo dentro del camino del grupo Insight. A Colombia mi país, pues desarrollos experimentales y creaciones de teorías en biología molecular e inmunología han sido una aventura extraordinaria para nuestra vida. Dedicado al Maestro Newton por despertar en mí la armonía matemática y la magia del conocimiento. A Nuestros Hijos y a Nuestros Sobrinos.

CORRESPONDENCIA:

Javier Rodríguez
Carrera 79b Número 51-16 Sur
CP: 11001000. Bogotá, Colombia
Phone: (057-1) 4527541
Email: grupoinsight2025@yahoo.es

REFERENCIAS

1. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Probabilidad. En: Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Física. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana; 1964. Vol. 1. p. 6-1,6-16
2. Blanco L. Probabilidad, notas de clase. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Matemáticas y Estadística: 1996.
3. Greenwood BM, Bojang K, Whitty C, Targett T. Malaria. Lancet 2005; 365: 1487-1498.
4. Najera JA, Kouznetsov RL, Delacollette C. Malaria Epidemics: Detection and control, forecasting and prevention. Report no. WHO/MAL/98.1084. WHO, Geneva, 1998; 1-81.
5. WHO. Malaria early warning systems, concepts, indicators and partners. A framework for field research in Africa. Report no. WHO/CDS/RBM/2001.32. WHO, Geneva, 2001; 1-84.
6. Rodríguez M. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. Rev Biomed 2008; 19:61-79.
7. Cowman A and Crabb B. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Cell 2006; 124: 755-766.
8. Stanley HA, Howard RF, Reese RT. Recognition of a Mr 56K glycoprotein on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites by mouse monoclonal antibodies. J Immunol 1985; 134: 3439-3444.
9. Fenton B, Clark JT, Wilson CF, McBride JF, Walliker D. Polymorphism of a 35±45 Kda *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. Mol Biochem Parasitol 1989; 34: 79-86.

10. Heidrich HG, Strych W, Mrema JE. Identification of surface and integral antigens from spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites by radioiodination and metabolic labeling. *Z Parasitenkd* 1983; 69: 715-725.
11. Heidrich HG, Strych W, Prehm P. Spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites from culture possess glycoproteins. *Z Parasitenkd* 1984; 70: 747-751.
12. Ferreira M, Hartl D. *Plasmodium falciparum*: Worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol* 2007; 115: 32-40.
13. Snewin VA, Herrera M, Sanchez G, Scherf A, Langsley G, Herrera S. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 49: 265-275.
14. Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun* 1995; 63: 4382-4388.
15. Flück C, Smith T, Beck HP, Irion A, Betuela I, Alpers MP, et al. Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine. *Infect Immun* 2004; 72: 6300-6305.
16. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol* 2003; 25: 307-312.
17. Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN, et al. High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine* 2006; 24: 4233-4246.
18. Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67: 59-68.
19. Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, van Gemert GJ, et al. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* 1998; 273: 15119-15124.
20. Deans JA, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, et al. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Exp Immunol* 1982; 49: 297-309.
21. Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 13: 187-199.
22. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2001; 69: 3286-3294.
23. Dutta S, Haynes JD, Moch JK, Barbosa A, Lanar DE. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12295-12300.
24. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 730-740.
25. Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 100-107.
26. Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der WA, Hackett F. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun* 2002; 70: 4471-4476.
27. Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with S02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2007; 25: 4203-4212.
28. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2005; 73: 3677-3685.
29. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415: 673-679.
30. Rayner JC, Vargas E, Huber CS, Galinski MR, Barnwell JW. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. *J Exp Med* 2001; 194: 1571-1581.
31. Duraisingham MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, and Cowman AF. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J* 2003; 22: 1047-1057.
32. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingham MT, et al. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. *Science* 2005; 309: 1384-1387.
33. Triglia T, Duraisingham MT, Good RT, Cowman AF. Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2005; 55: 162-174.
34. Maier AG, Duraisingham MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW, Zimmerman PA, Cowman AF. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med* 2003; 9: 87-92.
35. Carvalho LJ, Oliveira SG, Theisen M, Alves FA, Andrade MC, Zanini GM, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. *Scand J Immunol* 2004; 9: 363-372.
36. Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: Complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun* 2004; 72: 247-252.
37. Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, Israelsen H, et al. A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine* 2004; 22: 1188-1198.

38. Ocampo M, Urquiza M, Guzmán F, Rodriguez LE, Suarez J, Curtidor H, et al. Two MSA2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. *J Peptide Res* 2000; 55: 216-223.
39. Urquiza M, Suarez J, Cardenas C, Lopez R, Puentes A, Chavez F, et al. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. *Vaccine* 2001; 19: 508-513.
40. Rodríguez L, Ocampo M, Vera R, Puentes A, Lopez R, Garcia J, et al. *Plasmodium falciparum* EBA-140 kDa protein peptides that bind to human red blood cells. *J Peptide Res* 2003; 62: 175-184.
41. Thompson JK, Triglia T, Reed MB. A novel ligand from *Plasmodium falciparum* that binds to a sialic acidcontaining receptor on the surface of human erythrocytes. *Mol Microbiol* 2001; 41: 47-58.
42. Rodríguez LE, Curtidor H, Ocampo M, Garcia J, Puentes A, Valbuena J, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Sci* 2005; 14: 1778-1786.
43. Rodríguez J. Diferenciación matemática de péptidos de alta unión de MSP-1 mediante la aplicación de la teoría de conjuntos. *Inmunología* 2008; 27: 63-68.
44. Rodríguez J. Caracterización física y matemática de péptidos de alta unión de MSP-1 mediante la aplicación de la teoría de la probabilidad y la entropía. *Arch Alergia Immunol Clín* 2008; 39: 74-82.
45. Rodríguez J, Correa C, Prieto S, Puerta G, Vitery S, Bernal P, et al. Aplicación de la probabilidad y la entropía a la proteína EBA-140. Caracterización matemática de péptidos de alta unión. *Inmunología* 2009; 28: 65-73.
46. Rodríguez J. Teoría de unión al HLA clase II, teorías de probabilidad combinatoria y entropía aplicadas a secuencias peptídicas. *Inmunología* 2008; 27: 151-166.
47. Rodríguez J, Bernal P, Correa C, Prieto S, Benítez L, Vitery S, et al. Predicción de Unión de Péptidos de MSA-2 y AMA-1 al HLA Clase II: Probabilidad, combinatoria y entropía aplicadas a péptidos. *Inmunología* 2009; 28: 115-124.
48. Rodríguez J, Correa C. Predicción temporal de la epidemia de dengue en Colombia: Dinámica probabilista de la epidemia. *Rev Salud Pública* 2009; 11: 443-453.
49. Rodríguez J. Entropía y dinámica de la malaria en Colombia: Predicciones espacio temporales de la dinámica de la epidemia. (En proceso de publicación).
50. Bortman M. Elaboración de corredores o canales endémicos mediante planillas de cálculo. *Pan Am J Public Health* 1999; 5: 1-8.
51. Rodríguez J. Comportamiento fractal del repertorio T específico contra el alérgeno Poa P9. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2005; 53: 72-78.
52. Rodríguez J. Dynamical systems theory and ZIPF – Mandelbrot Law applied to the development of a fetal monitoring diagnostic methodology. XVIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetric. Kuala Lumpur, Malaysia. November 2006.
53. Rodríguez J, Prieto S, Ortiz L, et al. Diagnóstico matemático de la monitoría fetal aplicando la ley de Zipf-Mandelbrot. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2006; 54: 96-107.
54. Rodríguez J, Prieto S, Avilán N, Correa C, Bernal P, Ortiz L, Ayala J. Nueva metodología física y matemática de evaluación del Holter. *Rev Colomb Cardiol* 2008; 15: 50-54.
55. Koestler A. Kepler. Barcelona: Salvat Editores, S.A. 1986 p.78.
56. Meister GE, Roberts CG, Berzofsky JA, De Groot AS. Two novel T cell epitope prediction algorithms based on MHC-binding motifs; comparison of predicted and published epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* and HIV protein sequences. *Vaccine* 1995; 13: 581-591.
57. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Acc Chem Res* 2008; 41: 377-386.
58. Granés J. Newton y el empirismo. Una exploración de las relaciones entre sus concepciones del conocimiento del mundo natural. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 1988 p. 34-53.
59. Einstein A. El problema del espacio, el éter y el campo en la física. En: Sobre la teoría de la relatividad y otras aportaciones científicas. Madrid: Sarpe. 1983; p. 84-95.
60. Introduction to the Theory of Relativity and the Principles of Modern Physiscs. New York: Blaisdell Publishing Company. 1965; p. 1-8.
61. Calude C, Stay MA. From Heisenberg to Godel via Chaitin. *Int J Theoret Phys* 2007; 46: 2013-2025.