

# Predicción de unión de péptidos de MSA-2 y AMA-1 de *Plasmodium falciparum* al HLA clase II

Javier Rodríguez, Pedro Bernal, Catalina Correa, Signed Prieto, Luisa Benítez, Sarith Viteri, Germán Puerta, Diana Muñoz, Ingrid Rojas, Yolanda Soracipa

Grupo Insight, Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.

## PEPTIDE BINDING PREDICTION FOR MSA-2 AND AMA-1 FROM PLASMODIUM FALCIPARUM TO HLA CLASS II

Recibido: 24 Julio 2009

Aceptado: 24 Septiembre 2009

### RESUMEN

El propósito de esta investigación es aplicar la teoría de predicción de unión de péptidos a la región central del HLA clase II, a los péptidos noámericos de MSA-2, y la proteína AMA-1 del *Plasmodium falciparum*, y a los 492 péptidos noámericos sobrelapados de tres proteínas teóricas, de 500 aminoácidos cada una.

Se aplicó una teoría predictiva de unión al HLA clase II basada en la proporción S/k para la predicción del fenómeno de unión de péptidos de las proteínas MSA-2 y AMA-1 a la totalidad de secuencias de 20 aminoácidos de dichas proteínas. Se calcularon los valores de probabilidad, combinatoria y entropía de 300 secuencias noámericas sobrelapadas de la proteína MSA-2 y 372 de AMA-1. Finalmente se construyeron tres proteínas teóricas de 500 aminoácidos cada una a partir de una simulación computacional y se aplicó la teoría para cuantificar la unión de todos los péptidos noámericos sobrelapados de las mismas.

Se predijo que 35 secuencias de MSA-2 y 60 de AMA-1 están asociadas al macroestado de unión mientras que 265 de MSA-2 y 317 de AMA-1 están asociadas al macroestado de no unión. Se predijo que 102, 104 y 101 secuencias de las tres proteínas construidas están asociadas al macroestado de unión, mientras que las restantes 390, 388 y 391 se asocian al macroestado de no unión respectivamente.

La predicción teórica desarrollada puede facilitar la escogencia de péptidos implicados en el desarrollo de vacunas, evidenciando que existe un orden físico y matemático subyacente a la presentación antigénica.

**PALABRAS CLAVE:** Unión / Probabilidad / Entropía / Eritrocito / MSA-2 / AMA-1 / Simulación.

### ABSTRACT

The aim of this research is apply the predictive nonameric binding methodology to HLA class II central region, to nonameric peptides of MSA-2 and AMA-1 proteins from *Plasmodium falciparum*, and to 492 nonameric overlapped peptides for three theoretical proteins with size of 500 residues.

A predictive binding theory to HLA class II based on S/k proportion was applied in order to predict binding peptides of MSA-2 and AMA-1 proteins to all sequences with 20 residues size from these proteins. The probability, combinatorial and entropy values were calculated for 300 nonameric overlapped sequences of MSA-2 and 372 of AMA-1. Finally three theoretical proteins of 500 residues each one were made, starting from a computational simulation and the theory was applied, quantifying binding for all nonameric overlapped peptides for these proteins.

35 sequences for MSA-2 and 60 for AMA-1 associated to binding macrostate while 265 for MSA-2 and 317 for AMA-1 associated to non binding macrostate were predicted. 102, 104 and 101 sequences associated to binding macrostate for the theoretical proteins while the others 390, 388, and 391 associated to non binding macrostate respectively were predicted.

The theoretical prediction developed can facilitate the selection of peptides implied in vaccine development, showing that mathematical and physical order lies to antigenic presentation.

**KEY WORDS:** Binding / Probability / Entropy / Erythrocyte / MSA-2 / AMA-1 / Simulation.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la malaria representa la enfermedad parasitaria de mayor importancia mundial al generar cerca de 500 millones de casos/año en todo el mundo y cerca de 3 millones de muertes sólo en África<sup>(1,2)</sup>. Dado que las estrategias clásicas de control han fallado, se han desarrollado múltiples trabajos dirigidos al conocimiento del proceso de invasión al humano, para el desarrollo de vacunas. Los procesos implícitos a dicha invasión están mediados por interacciones receptor ligando específicas.

La segunda de las proteínas principales de la superficie del merozoito del *Plasmodium falciparum* es conocida como MSA-2, y es una glicoproteína de 35±56 kDa<sup>(3,4)</sup>, que se expresa doce horas antes de la invasión del merozoito, y presenta su máxima concentración 42 horas después<sup>(5,6)</sup>. Hace parte del grupo de antígenos reconocidos por anticuerpos que aglutinan merozoitos<sup>(7,8)</sup> y se ha encontrado que anticuerpos de MSA-2 inhiben invasión de una forma dosis-dependiente *in vitro*<sup>(9-11)</sup>. Por otro lado, *Plasmodium falciparum* AMA-1 es una proteína de 83 kDa caracterizada por una alta conservación en la transmembrana menor de la molécula. Dentro de su estructura, tiene un ectodominio putativo, el cual contiene 16 cisteínas, así como tres subdominios de 19, 13 y 13 kDa, respectivamente<sup>(12)</sup>. En el proceso de ruptura del esquizonte, esta proteína se asocia con el complejo apical y se desplaza a la superficie del merozoito<sup>(13)</sup>. La función biológica de la AMA-1 es desconocida, sin embargo, podría tratarse de una proteína de unión eritrocitaria.

El HLA, o antígeno leucocitario humano es un complejo proteínico que tiene como función la presentación de antígenos a las células T para la activación de la respuesta inmune. Los antígenos asociados al HLA clase I son reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup>, mientras que los asociados al HLA clase II son reconocidos por las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup><sup>(14)</sup>. El HLA clase II está compuesto por dos cadenas polimórficas y su región central está formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de las dos cadenas, conformando una hendidura que constituye la región de unión a los antígenos<sup>(15)</sup>. Al estar abierta en sus extremos<sup>(16-19)</sup>, a ella se unen péptidos con tamaños muy variables, que oscilan entre 13 y 16 aminoácidos<sup>(20-23)</sup>. Sin embargo estudios experimentales del fenómeno de unión han sugerido que sólo una región central compuesta por nueve aminoácidos es fundamental en este proceso de unión<sup>(24)</sup>. Adicionalmente se ha encontrado una alta frecuencia de aparición de grupos de aminoácidos en posiciones específicas, posiciones de anclaje, denominados motivos de unión<sup>(25)</sup>, determinados a partir de grupos seleccionados, tales como librerías M13 de péptidos presentados.

Dado que el HLA clase II es esencial en el reconocimiento de organismos ajenos, resulta de gran utilidad para

el desarrollo de vacunas determinar si existen péptidos de las proteínas de MSA-2 y AMA-1 que puedan ser reconocidos por dicha molécula. Recientemente, Rodríguez<sup>(26)</sup> desarrolló una teoría para la predicción de péptidos a la región central del HLA clase II, con base en las teorías de probabilidad, combinatoria y entropía. En dicho trabajo, las secuencias peptídicas fueron estudiadas realizando una analogía con los macroestados de la mecánica estadística, los cuales pueden caracterizarse por múltiples particularidades, como las múltiples posibles formas de organización de las moléculas de un gas<sup>(27)</sup>, que cumplen con ciertas condiciones generales que les permiten ser incluidas dentro de un mismo macroestado. Esta teoría se basó en un experimento mental físico y experimental en el cual se conceptualizó la región central de unión como un fenómeno probabilístico, en el cual estaban implicados un número finito de aminoácidos que podían tomar cada lugar, encontrando que ciertos lugares tenían una mayor probabilidad de presentar ciertos grupos de aminoácidos respecto a otros, en el caso de unirse al HLA clase II. De este modo se realizó la suposición de lo que ocurriría en el caso de encontrar un péptido con todos los aminoácidos iguales, así como un péptido que presentara todos sus aminoácidos diferentes, encontrando que los péptidos de unión se caracterizan por ciertas repeticiones y diferencias que podían cuantificarse al agrupar los aminoácidos de acuerdo a grupos y características específicas, con base en las leyes de probabilidad y combinatoria. Al tratarse de un fenómeno probabilístico, la autoorganización general del sistema podía ser evaluado con las leyes de la entropía, encontrando diferencias cuantitativas en la relación  $S/k$  en el fenómeno de unión respecto al de no unión. De este modo, se caracterizaron matemáticamente 161 péptidos, con una eficacia del 100% partiendo de péptidos teóricos, sintéticos, naturales y promiscuos, tanto de unión como de no unión. En un trabajo previo, en proceso de evaluación se aplicó esta misma metodología a dos proteínas el HER-2/neu y la API m1, y se comprobaron los resultados con los hallazgos experimentales de estas proteínas y se comparó el desempeño con los resultados de los métodos de predicción de péptidos disponibles en línea de mayor cobertura alélica, obteniendo los mayores valores para la sensibilidad, valor predictivo positivo y exactitud.

Las leyes de probabilidad permiten la cuantificación de la posibilidad de la ocurrencia de un evento<sup>(28-31)</sup>. Al estudiar la organización de aminoácidos para la construcción de un péptido como un fenómeno probabilístico, es posible realizar cuantificaciones que dan cuenta de la combinación de los aminoácidos en las secuencias. Por otro lado, la entropía es un concepto que ha recibido varias interpre-

taciones<sup>(27,32-34)</sup>. Boltzmann enunció la fórmula de la entropía equiprobable, la cual se enuncia en términos del número de microestados de un sistema en equilibrio<sup>(32,33)</sup>. Siguiendo la teoría desarrollada por Rodríguez<sup>(26)</sup>, haciendo una analogía con los microestados de la mecánica estadística, cada conjunto de aminoácidos que conforma las secuencias de los péptidos, pueden analizarse mediante la ecuación de Boltzmann, para cuantificar el fenómeno de unión de los péptidos de las proteínas antigénicas.

En la presente investigación se aplicará la teoría de predicción de unión de péptidos a la región central del HLA clase II, a los péptidos noámeros de MSA-2, y la proteína AMA-1, y a los 492 péptidos noámeros sobrelapados de tres proteínas teóricas, de 500 aminoácidos cada una.

## DEFINICIONES

*Macroestado:* conjunto de secuencias que presentan alta unión o no unión al HLA clase II, por lo tanto existen dos clases de macroestados, asociados a cada una de estas condiciones específicas.

*Microestado:* Toda secuencia específica de nueve aminoácidos.

*Tipo de secuencia:* Microestados que presenten el mismo valor en su combinatoria y su evaluación con los criterios definidos.

*Probabilidad Laplaciana:* La probabilidad de un tipo de secuencia A es definida como la cantidad de microestados  $N_A$  asociados a este tipo de secuencia dividida entre el total de posibles microestados  $N^{(29)}$ . Ver ecuación 1.

$$P(A) = \frac{\text{Microestados al tipo de secuencia A}}{\text{Todos los Microestados}} = \frac{N_A}{N}$$

Ecuación 1

*Ley combinatoria para determinar la cantidad de microestados  $\omega$ :* De acuerdo con la metodología desarrollada por Rodríguez<sup>(26)</sup>, cada posición del péptido tiene asociada un número de posibles aminoácidos. Para calcular el número de posibles microestados asociados a un tipo de secuencia se multiplican los valores asociados a cada posición, que dependen del número de posibles aminoácidos asociados a cada lugar, los cuales a su vez están determinados por el grupo al que pertenezcan y sus repeticiones en el tipo de secuencia<sup>(30,31)</sup>. Para las cuantificaciones específicas ver tablas de criterios evaluadores y tablas de grupos de aminoácidos de la teoría realizada.

*Entropía:* En un sistema con microestados equiprobables la entropía se define de acuerdo con la ecuación 2:

$$S = k \ln(\omega)$$

Ecuación 2

Donde k es igual a la constante de Boltzmann,  $1.38 \times 10^{-23}$  (J/k),  $\omega$  los posibles microestados y S el valor de la entropía<sup>(27)</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODO

Inicialmente se determinaron los péptidos noámeros sobrelapados constituyentes de las 25 secuencias no sobrelapadas de 20 aminoácidos de la proteína MSA-2, y de las 31 secuencias de 20 aminoácidos sobrelapados cada diez aminoácidos de la proteína AMA-1, así como los péptidos noámeros sobrelapados de tres proteínas teóricas compuestas por 500 residuos. Posteriormente se aplicó la metodología desarrollada por Rodríguez<sup>(26)</sup> para la determinación de su macroestado de unión o no unión. Para ejemplificar la aplicación de la metodología a continuación se presenta un ejemplo para el péptido noámero predicho de unión por la teoría desarrollada FLPTGAFKA que pertenece al péptido 20-mero de alta unión 4325 de la proteína AMA-1.

*Paso 1:* La primera posición F tiene un valor de 7 pues pertenece al grupo 1 (Tabla I); en la posición dos a L se le otorga un valor de 6 pues pertenece al grupo 1 y el valor decrece por la aparición previa de un aminoácido del mismo grupo y diferente; en la posición tres a P se le otorga un valor de 4 pues pertenece al grupo 3; a la siguiente posición, a T se le otorga un valor de 9 pues pertenece al grupo 2; la siguiente posición G toma un valor de 3, pues pertenece al grupo 3 y el valor decrece por la aparición previa de un aminoácido del mismo grupo y diferente a G; la siguiente posición A toma un valor de 6, pues pertenece al grupo de motivos para dicha posición; en la siguiente posición la F toma un valor de 1, pues el aminoácido ya había aparecido, la K toma un valor de 5, dado que está dentro del grupo de aminoácidos cargados; finalmente, en la última posición la A toma un valor de 1 dado que dicho aminoácido ya había aparecido.

Para el paso dos se verifica que este péptido no cumple ninguno de los criterios establecidos, por lo tanto el número de microestados asociados es 136080, la entropía de  $1.63E-22$ , y la relación  $S/k$  de 11,82, por lo cual se realizan los pasos siguientes:

*Paso 3:* La primera posición F tiene un valor de 5 pues es Hidrofóbico de alta unión (Tabla II); en la posición dos a L se le otorga un valor de 5 pues pertenece al grupo 4, en la posición tres a P se le otorga un valor de 4 pues pertenece al grupo 4 y el valor decrece por la aparición previa de un aminoácido del mismo grupo; en la siguiente posición, a T se le otorga un valor de 6 pues pertenece al grupo de Puentes de hidrógeno; la siguiente posición G toma un valor de 3 pues pertenece al grupo 4 y el valor decrece por la apari-

**TABLA I.** Péptidos de unión de la proteína MSA-2, junto con sus valores de la proporción S/k para los pasos finales

Secuencia	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k
MKVIKTLSIINFFIFVTFNY	MKVIKTLSI	9,8	IKTLSIINF	9,8	LSIINFFIF	7,31	SIINFFIFV	7,58
	FFIFVTFNY	8,19						
NFFIFVTFNIKNESKYSNTF	FIFVTFNIK	7,9	IFVTFNIKN	7,9	FNIKNESKY	9,57	IKNESKYSN	8,19
KNESKYSNTFINNAYNMSIR	YSNTFINNA	10,49	FINNAYNMS	9,39	INNAYNMSI	8,01		
INNAYNMSIRRSMAESKPPT	INNAYNMSI	8,01	MSIRRSMAE	8,19	IRRSMAESK	8,88	RRSMAESKP	9,84
RSMAESKPPTGTGGSGSAGS	MAESKPPTG	9,98						
GTGGSGSAGSGAGASAGNGA								
GAGASAGNGANPGADAERSP								
NPGADAERSPPTAPPATPA	ERSPPTAP	10,06						
SPTAPPATPATTTTTTTTND								
TTTTTTTTNDAEASTSTSSE								
AFASTSTSENPNHKNAETN	ASTSTSEN	8,05	SSENPNHKN	8,27				
NPNHKNAETNPKGKGEVQKP								
PKGKGEVQKPNQANKETQNN	VQKPNQANK	9,1						
NQANKETQNNNSNVQQDSQTK								
SNVQQDSQTKSNVPTQDAD	VQQDSQTKS	8,19						
SNVPTQDADTKSPTAQPEQ	VPPTQDADT	8,7						
TKSPTAQPEQAENSAPTAEQ	PTAQPEQAE	8,05						
AENSAPTAEQTESPELQSAP								
TESPELQSAPENKGTGQHG								
ENKGTGQHGHHMHSRNNHPQ	MHGSRNNHP	9,29						
MHGSRNNHPQNTSDSQKECT	MHGSRNNHP	9,29	SRNNHPQNT	10,06				
NTSDSQKECTDGNKENC								
GAADGNKENC								
GAATSLNNSSNY								
TSLNNSSNIASINKFVVL	LNNSSNIAS	8,01	IASINKFVV	9,51				
ASINKFVVLISATLVLSFAI	INKFVVLIS	9,51	FVVLISATL	9,8	VVLISATLV	8,7	VLISATLVL	8,7
	LISATLVLS	8,7	ISATLVLSF	9,8				

ción previa de un aminoácido del mismo grupo; la siguiente posición A) toma un valor de 2, pues pertenece al grupo 4 y el valor decrece por la aparición previa de un aminoácido del mismo grupo; en la siguiente posición la F toma un valor de 1, pues el aminoácido ya había aparecido; la K toma un valor de 3, dado que está dentro del grupo de cargados positivos; finalmente la última posición la A toma un valor de 1 dado que dicho aminoácido ya había aparecido.

Para el paso cuatro se verifica que este péptido no cumple ninguno de los criterios establecidos por lo tanto el número de microestados asociados es 10800, la entropía de 1,28E-22, y la relación S/k de 9,28, por lo tanto dicho péptido pertenece al macroestado Unión.

**Predicciones físicas y matemáticas**

La predicción teórica desarrollada por Rodríguez<sup>(26)</sup> se calcula con base en el rango de microestados y de entropía asociado a la unión, determinando el número de microestados

equivalentes y la configuración específica que deben tener los péptidos de unión al HLA clase II, mediante el despeje de  $\omega$  en la ecuación de Boltzmann (Ecuación 2), que es el número de microestados asociados a cada tipo de secuencia. De este modo, se realiza la deducción física y matemática de las secuencias de aminoácidos que se unen, Ecuación 3.

$$\omega = e^{S/k}$$

Ecuación 3

Después, con base en la Ecuación 2, se despeja el valor de S/k, Ecuación 4.

$$\ln(\omega) = S/k$$

Ecuación 4

La proporción S/k permite predecir cuales son los valores de los péptidos asociados al macroestado de unión y cuales son los asociados al macroestado de no unión. De este modo se evalúan las proporciones S/k entre 8,55 y 12,8 para los primeros pasos y entre 6,98 y 10,5 para los

**TABLA II.** Péptidos de unión de la proteína AMA-1, junto con sus valores de la proporción S/k para los pasos finales

Secuencia	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k	Péptidos de unión	S/k
EFTYMINFGRGQNYWEHPYQ	MINFGRGQN	10,49	INFGRGQNY	10,49				
KSDVYHPINEHREHPKEYQY								
PLHQEHTYQQEDSGEDENTL	LHQEHTYQQ	8,19						
QHAYPIDHEGAEPAPQEQLN	YPIDHEGAE	8,88	IDHEGAEPA	7,5				
FSSIEIVERSNYMGNPWTEY	FSSIEIVER	7,68	IEIVERSNY	9,57				
MAKYDIEEVHGSGIRVDLGE	MAKYDIEEV	8,19	YDIEEVHGS	9,29	IEEVHGSGI	8,19		
DAEVAGTQYRLPSGKCPVFG								
KGIIIENSNTTFLTPVATGNY	IIENSNTTF	8,48	IENSNTTFL	10,09				
QYLKDGGFAPFPTEPLMSPM	YLKDGGFAP	8,88	LKDGGFAP	8,19	FAPFPTEPL	8,19	FPTEPLMS	9,8
TLDEMRFHYKDNKYVKNLDE	LDEMRFHYK	8,88	FYKDNKYVK	8,19				
LTLCSRHAGNMIPDNDKNSNY	MIPDNDKNS	9,8	IPDNDKNSN	8,41				
YKYPAVYDDKDKKCHILYIA	YKYPAVYDD	7,78						
AQENNGPRYCNKDESKRNSM								
FCFRPAKDISFQNYTYLSKN	FCFRPAKDI	8,88	FRPAKDISF	8,88				
VVDNWEKVCPRKNLQNAKFG	VVDNWEKVC	8,19	WEKVCPRKN	10,49				
LWVDGNCEDIPHVNEFSAID	VDGNCEDIP	10,09						
LFECNKLVFELSASDQPKQY	LFECNKLVF	9,1	FECNKLVFE	9,8	LVFELSASD	8,48	LSASDQPKQ	9,29
EQHLTDYEKIKEGFKNKNAS	YEKIKEGFK	7,5	IKEGFKNKN	8,19				
MIKSAFLPTGAFKADRYKSH	FLPTGAFKA	9,29						
GKGYNWGNYNNTETQKCEIFN	GKGYNWGNY	8,67	KGYNWGNYN	9,19	GYNWGNYN	8,96	YNWGNYNTE	8,7
	WGNYNNTETQ	9,8						
VKPTCLINSSYIATTALSH	LINSSYIA	8,01	INSSYIAT	9,1	YIATTALSH	10,49		
PIEVEHNFPCSLYKNEIMKE								
IERESKRIKLNNDNDEGNKK	ERESKRIKL	9,37						
IIAPRIFISDDKSLKPCDY	IIAPRIFIS	8,19	IAPRIFISD	9,57	DDKSLKCP	7,66		
PEIVSNSTCNFFVCKCVERRY	VSNSTCNF	9,98	VSNSTCNFF	8,88	FFVCKCVER	7,27	FVCKCVER	7,27
	VCKCVERRY	7,5						
AEVTSNNEVVVKEEYKDEYA	EVTSNNEVV	8,96						
DIPEHKPTYDKMKIIASSA	IPEHKPTYD	9,1						
AVAVLATILMVYLYKRKGNA	VAVLATILM	8,19	VLATILMVY	9,8	LATILMVYL	9,8	LMVYLYKRK	7,5
	MVYLYKRKG	8,59	VYLYKRKGN	9,8	YLYKRKGNA	9,29		
EKYDKMDEPQHYGKSNSRND	YDKMDEPQH	8,88						
EMLDPEASFWEKCRASHTTY								
WGEEKRASHTTPVLMKPY								

últimos pasos como relacionadas con el macroestado de unión al HLA clase II de acuerdo con la teoría desarrollada previamente<sup>(26)</sup>.

**RESULTADOS**

De los 300 péptidos noámeros analizados para MSA-2, 35 corresponden al macroestado de unión, 11.6% respecto a la totalidad, mientras que 265 corresponden al macroestado de no unión (Tabla I). De los 377 péptidos analizados de AMA-1, 60 corresponden al macroestado de unión,

15.91% respecto a la totalidad, mientras que 317 corresponden al macroestado de no unión (Tabla II). Las proporciones S/k de los péptidos asociados al macroestado de unión oscilaron entre 7,31 y 10,49 para MSA-2, y entre 7,27 y 10,49 para AMA-1 (Tablas I y II).

De los 492 péptidos analizados en cada una de las proteínas teóricas, se encontró que 102, 104 y 101 corresponden respectivamente al macroestado de unión de cada una, mientras que las restantes 390, 391 y 388 corresponden al macroestado de no unión (ver Anexos 1, 2 y 3). El porcentaje de unión respecto a la totalidad de péptidos corres-

**ANEXO I.** Secuencia teórica número 1 y péptidos no números de unión de acuerdo con la predicción. Los números a la derecha de la numeración del péptido indican el lugar del péptido dentro de la secuencia.

LKKGRHLNYKHFHHYDRFRYRWCFFSSGIKQSEKQSWVYPTDLNSEDWLSESDHGYKVFHTMNEALAEWSFSGQV-DIEMRMLKNLKPQKRGEGKWVENREVCLYEWTIKGRYLQHWCVTLRVHHEEQGKWMLPNVYQGIEQIETMKLPWEDPMMNSYLLA-LIMKMITPRTCALCPGMRWMSRHLVQCSGLRIGVKQYCICTDCWGRSSTA WELGGSQECHSYVVIYMQGLENSFNDREMDA-ALTKTWVHLKFSKYRWNHDHWNLHMQVEAQFGNYEWECNWDGVMCDDTCNWDWHHKHTQPRCNPTSNMVWDRYLWPDQYPN-HAAAQCDIHYCSFHRTLFMSTAQEFRNWEHSDSSFTFNMDIKRTISDCMGPAPWPCPLIICYPFLQSDKGWKKDPWSQFHNPDQMRFKGYQT-NKTVEGFMFYMYRNNEVDQYKPAFVFEWTEICFMLVKIAWWCWVLEYCGFHIPYVVWPNTKCCSFQDVCHLVCAGHWSESTMKE				
1-1. LKKGRHLNY	27-146. LPWEDPMMN	53-255. YRWNHDHWNL	79-423. FMYFMYRNN	
2-7. LNYKHFFHHY	28-148. WEDPMMNSY	54-257. WNDHWNLHM	80-424. MYFMYRNNE	
3-13. HHYDRFRYR	29-152. MMNSYLLAL	55-271. FGNYEWCN	81-425. YFMYRNNEV	
4-15. YDRFRYRWC	30-153. MNSYLLALI	56-274. YEWCNWDG	82-426. FMYRNNEVD	
5-16. DRFRYRWC	31-156. YLLALIMKM	57-276. WECNWDGVM	83-428. YRNNEVDQY	
6-22. WCFSSGIKQ	32-158. LALIMKMIT	58-280. WDGVMCDDT	84-436. YKPAFVFEW	
7-24. FSSGIKQSE	33-160. LIMKMITPR	59-283. VMCDDTCNW	85-440. FVFEWTEIC	
8-25. SSGIKQSEK	34-161. IMKMITPRT	60-308. MVWDRYLWP	86-441. VFEWTEICF	
9-28. IKQSEKQSW	35-162. MKMITPRTC	61-309. VWDRYLWPD	87-442. FEWTEICFM	
10-42. LNSEDWLSE	36-165. ITPRTCALC	62-310. WDRYLWPD	88-447. ICFMLVKIA	
11-47. WLSESDHGY	37-167. PRTCALCPG	63-313. YLWPDQY	89-449. FMLVKIAWW	
12-48. LSESDHGYK	38-172. LCPGMRWFM	64-320. YPNHAAAQC	90-450. MLVKIAWWC	
13-61. MNEALAEWS	39-176. MRWMSRHL	65-335. FHRTRLFMS	91-451. LVKIAWWCW	
14-68. WSFSGQVDI	40-192. IGVKQYCI	66-340. LFMSTAQEF	92-452. VKIAWWCWV	
15-74. VDIEMRMLK	41-197. YCICTDCWG	67-348. FRNWEHSDS	93-454. IAWWCWVLE	
16-76. IEMRMLKNL	42-204. WGRSSTAWE	68-351. WEHSDSSFT	94-456. WWCWVLEYC	
17-81. LKNLKPQKR	43-211. WELGGSQEC	69-358. FTFNMDIKR	95-457. WCWVLEYCG	
18-84. LPKQKRGEG	44-213. LGGSQECHS	70-362. MDIKRTISD	96-463. YCGFHIPYV	
19-88. KRGEKWVE	45-222. YVVIYMQGL	71-364. IKRTISDCM	97-466. FHIPYVVWP	
20-94. WVENREVCL	46-223. YVIYMQGLE	72-372. MGPAPWPCP	98-468. IPYVVWPNT	
21-95. VENREVCLY	47-234. FNDREMDAA	73-376. WPCPLIIC	99-470. YVWPNTKCC	
22-103. YEWTIKGRY	48-236. DREMDAALT	74-378. FCPLIICYP	100-471. VVWPNTKCC	
23-134. VYQGIEQIE	49-239. MDAALTKTW	75-381. LIICYPRFL	101-481. FQDVCHLVC	
24-138. IEQIETMKL	50-243. LTKTWVHLK	76-395. WKKDPWSQF	102-484. VCHLVCAGH	
25-141. IETMKLPWE	51-247. WVHLKFSKY	77-411. FKGQYTNKT		
26-144. MKLPWEDPM	52-248. VHLKFSKYR	78-420. VEGFMYFMY		

ponde al 20.73% para la secuencia teórica 1, al 21.13% para la 2 y al 20.52% para la 3.

**DISCUSIÓN**

Este es el primer trabajo donde se realiza una predicción de péptidos no números de MSA-2 y AMA-1 que pueden unirse al HLA clase II con base en una teoría basada en las leyes de probabilidad, combinatoria y entropía, determinando que existen 35 péptidos incluidos dentro del macroestado de unión para MSA-2, y 60 para AMA-1 como posibles antígenos útiles para el desarrollo de vacunas. Adicionalmente se predijeron péptidos de unión en tres proteínas teóricas, encontrando 102, 104 y 101 péptidos de unión respectivamente, evidenciando

física y matemáticamente que el fenómeno de unión es caracterizado por una alta especificidad útil en su predicción. Las proteínas teóricas fueron construidas sin ningún parámetro de ordenamiento, pues el algoritmo equiprobable cumple con las condiciones de ser un generador de números pseudo aleatorios, sin embargo se encontró un orden constante de la proporción de péptidos predichos respecto a la totalidad posible cercano al 20%, evidenciando un orden subyacente a este fenómeno aparentemente aleatorio.

Trabajos anteriores en predicción de unión de péptidos han utilizado Redes neuronales artificiales, ANN por sus siglas en ingles, programación lineal, vectores de máquina, entre otros, con el objetivo de cuantificar la unión de péptidos al HLA<sup>(35-38)</sup>. Uno de los trabajos más recientes desa-

**ANEXO II.** Secuencia teórica número 2 y péptidos no números de unión de acuerdo con la predicción. Los números a la derecha de la numeración del péptido indican el lugar del péptido dentro de la secuencia.

QECPVTSRDHMLCAIVDPYDMSMSPRGRRDWFVPVKWIYEIQFQMWWETNTFMVISDSAWRPPQNTAARWVECEMEGRYISQIAWESECI- FAQHGHPQPYKGFCCYNVHCDSVSKRHLSNRQDAKDWFPISVMQYNFITWWWNFYDYNMITSWHKNWAGHC SMP- RRADWDTRRRWHKNCKEDIKQVWKKANGVVCSTKVGPMGECDLGTS MCWNKNDEETLRGMRVHNWCRNCMNARVRANHG- WEYMLLCNITCYRYGQVGDQENRNVD EDARLLIKWDWV MYNTSHADYEF SRNMTTYMIVTEWMLCID- CIEMGMHKYDLKWN GCKTLHMPLWNRNDCLYIVTFGPQREIKWVSATYMGNGSHYDFSGSWHVPGYRVHYTFSMIYINSYHMNC- VEFPNDSWWRHAEQSDV LNERDRHHLELFMCNYPQLESAMDVDYTFLTRRMDCCWWHMGIPHYCEPCAPFVMKNEMWHAHRQF- FRIMMFHFGYDATNLDRWV			
1-15. IVDPYDMSM	27-111. VSKRHLSNR	53-277. LIKWDWVMY	79-389. YINSYHMNC
2-16. VDPYDMSMS	28-124. LPAKDWFP	54-278. IKWDWVMYN	80-395. MNCVEFPND
3-19. YDMSMSPRG	29-140. ITWWWNFYD	55-280. WDWVMYNTS	81-398. VEFNDSWW
4-21. MSMSPRGRR	30-142. WWWNFYDYM	56-294. FSRNMTTYM	82-405. WWRHAEQSD
5-23. MSPRGRDWD	31-143. WWNFYDYM	57-298. MTTYMIVTE	83-406. WRHAEQSDV
6-25. PRGRDWF	32-154. WHKNWAGHC	58-301. YMIVTEWML	84-423. LELFMCNYP
7-28. RRDWFVPKW	33-164. MPRRADWDT	59-302. MIVTEWMLC	85-433. LESAMDVDY
8-31. WFPVKWIYE	34-172. TRRRWHKNC	60-303. IVTEWMLCI	86-437. MDVDYTFLT
9-32. FPKWIYEI	35-176. WHKNCKEDI	61-307. WMLCIDCIE	87-443. FLTRRMDCC
10-34. VKWIYEIQF	36-187. VWKKANGVW	62-309. LCIDCIEMG	88-444. LTRRMDCCW
11-36. WIYEIQFQM	37-188. WKKANGVWC	63-310. CIDCIEMGM	89-445. TRRMDCCWW
12-37. IYEIQFQMW	38-200. VGPMGEC	64-311. IDCIEMGMH	90-446. RRMDCWWH
13-38. YEIQFQMW	39-203. MMGECDLGT	65-314. IEMGMHKYD	91-447. RMDCCWWHM
14-40. IQFQMWET	40-204. MGECDLGTS	66-318. MHKYDLKWN	92-448. MDCCWWHM
15-44. MWWETNTFM	41-215. WKNDEETL	67-323. LKWN GCKTL	93-452. WWHMGIPHL
16-45. WWETNTFMV	42-226. MRVHNWCRN	68-331. LHMPLWNRN	94-453. WHMGIPHY
17-51. FMVISDSAW	43-228. VHNWCRNCM	69-335. LWNRNDCLY	95-457. IPHYCEPC
18-54. ISDSAWRPP	44-231. WCRNCMNAR	70-367. YDFSGSWHV	96-460. LYCEPCAPF
19-59. WRPPQNTAA	45-232. CRNCMNARV	71-369. FSGSWHVPG	97-461. YCEPCAPFV
20-77. YISQIAWES	46-236. MNARVRANH	72-375. VPGYRVHYT	98-468. FVMKNEMWH
21-81. IAWESECI	47-248. YMMLCNITC	73-378. YRVHYTFSM	99-469. VMKNEMWHA
22-88. IFAQHGHPQ	48-249. MMLCNITCY	74-382. YTFSMIYI	100-474. MWHHRQFF
23-89. FAQHGHPQP	49-251. LCNITCYRY	75-384. FSMIYINS	101-475. WHHRQFFR
24-98. YKGFCCYNV	50-259. YGQVGDQEN	76-386. MIIYINSYH	102-478. HRQFFRIMM
25-104. YNVHCDSVS	51-262. VGDQENRN	77-387. IYINSYHM	103-484. IMMFHFGYD
26-106. VHCDSVSKR	52-276. LLIKWDWVM	78-388. IYINSYHMN	104-485. MMFHFGYDA

rollados, disponible en internet y de amplia cobertura alélica es el NetMHCIIIPAN<sup>(39)</sup>, basado en redes neuronales; su entrenamiento integra datos de todos los alelos, región central de péptidos, composición y tamaño de los residuos de flanqueamiento de los terminales N y C, tamaño del péptido recurso, así como la afinidad normalizada de unión. Este método supone que la integración de todos estos datos en una red neuronal permite la predicción del fenómeno de unión al HLA clase II, sin embargo sus parámetros dependen de la muestra de entrenamiento, por lo que los resultados están condicionados a la misma y a la muestra usada para probarlo, haciendo limitada su generalización. A diferencia de estos planteamientos, este trabajo se basa en una

metodología de carácter general que parte de una inducción física con 7 péptidos no números, donde se desarrolla una metodología que no requiere entrenamientos y además no depende de la muestra de estudio para desarrollarse, pues está basada en un experimento mental en el contexto de leyes físicas y matemáticas permitiendo cuantificar la totalidad de posibilidades existentes de péptidos<sup>(26)</sup>.

El oncogen HER-2/neu es reconocido por producir una respuesta efectiva como antígeno tumoral, especialmente en cáncer de mama y de ovario, por lo cual se considera un buen candidato para desarrollar vacunas<sup>(40)</sup>, mientras que el API m1 constituye un tratamiento adecuado para los pacientes que sufren de graves reacciones a picaduras de

**ANEXO III.** Secuencia teórica número 3 y péptidos no números de unión de acuerdo con la predicción. Los números a la derecha de la numeración del péptido indican el lugar del péptido dentro de la secuencia.

AVYSFSVWNNVNSEYCLCNEIIHVNMKWCVMVALTNNHLSKYPESNIEEGAECDIVFPCTSGSSTYVRHFTICHPKIKSMFKIMQMNDAMHVNSYDPNMIMIGSYEPGNTHVYWGCEQNKHWCSLDLYAMKQCQHNGETWGNPFFWGHDSCHQLKESIAMLKHMNAQSYMRRIVPRKKKKWSHEYALLARDESYPNDYNNNEWFGFSDIAYKKKWFPKREAYYGWCGVHQHHLTHLDGILATPDWRVRVGSLLQNKRWGGNKYYKRITVQPASQDSQTSLSLWRWWNEMAVAVVTVQMDNADPCTRHSGGQYDLNLFVKQSTYKSDFHHPPIFGAHGDRHYAAAYWMIHKGQYWGKWSRWCQAKVMFWYYDTPHDPWFRRTCDDMKYFVGAEHNQCWDYSEIQDERRIAMNVVIQGGFVNRKRHNERCMYLCIHSGHMIYNRPHVLFPGWMRWGMNNCMVVFGWYAIPLSTFVSCQVFMDFVFFQIRQAYTTCCANIYFE			
1-2. VYSFSVWNN	27-97. YDPNMIMIG	53-273. VQPASQDSQ	79-414. VIQGGFVNR
2-3. YSFSVWNNV	28-101. MIMIGSYEP	54-284. LWRWWNEMA	80-432. LCIHSGHMI
3-5. FSVWNNVNS	29-102. IMIGSYEPG	55-285. WRWWNEMAV	81-434. IHSGHMIYN
4-6. SVWNNVNSE	30-103. MIGSYEPGP	56-287. WWNEMAVAV	82-446. VLFPGWMRW
5-7. VWNVNSEY	31-107. YEPGPGNTH	57-288. WNEMAVAVV	83-447. LFPGWMRWM
6-8. WNNVNSEYC	32-118. WGCEQNKHW	58-290. EMAVAVVTV	84-448. FPGWMRWVG
7-11. VNSEYCLCN	33-138. NGTETWGN	59-291. MAVAVVTVQ	85-450. GWMRWGMN
8-15. YCLCNEIIH	34-156. IHQLKESIA	60-293. VAVVTVQMD	86-451. WMRWGMN
9-17. LCNEIIHV	35-159. LKESIAMLK	61-295. VVTVQMDNA	87-452. MRWGMN
10-21. IIVNMKWC	36-163. IAMLKHMNA	62-318. FVKQSTYKS	88-454. WMGNM
11-22. IIVNMKWC	37-175. MRRIVPRKK	63-324. YKSDFHHP	89-455. MGNM
12-24. VNMMKWC	38-186. WSHEYALLA	64-328. FHHPIFGA	90-460. MVVFGWYAI
13-26. MMKWC	39-192. LLARDESYP	65-334. FGAHGD	91-461. VVFGWYAI
14-32. VALTNNHLM	40-199. YPNDYNN	66-345. YWMIHKGQY	92-468. IPLSTFV
15-34. LTNNHLSK	41-203. YNNEWFGF	67-346. WMIHKGQY	93-470. LSTFV
16-43. YPESNIEEG	42-207. WFGFSDIAY	68-348. IHKGQYWGK	94-473. FSVQV
17-48. IIEGAEC	43-213. IAYKKKWF	69-353. YWGKWSR	95-475. VCQV
18-58. FPCTSGS	44-219. WFPKREAY	70-354. WGKWSR	96-478. VFMDFV
19-67. YVRHFTICH	45-220. FPKREAYY	71-366. MFWYYD	97-479. FMDVFFQ
20-73. ICHPKIKSM	46-226. YYGWCGVHQ	72-370. YDTPHDP	98-480. MDVFFQ
21-78. IKSFMKIMQ	47-229. WCGVHQHHL	73-378. WFRRTCD	99-482. VFFQIRQ
22-81. MFKIMQMND	48-232. VHQHHLTHL	74-379. FRRTCD	100-486. IRQAYTT
23-82. FKIMQMND	49-237. LTHLDGILA	75-380. RRTCD	101-490. YTTCCANI
24-84. IMQMNDAM	50-240. LDGILATPD	76-407. RRIAMNV	
25-85. MQMNDAMH	51-249. WRRVGSLLQ	77-411. MNVVIQ	
26-94. VNSYDPNMI	52-261. WMGGNKYYK	78-413. VVIQGGF	

abeja<sup>(41)</sup>. Siete secuencias del HER-2/neu estudiadas experimentalmente (HER62, HER605, HER648, HER765, HER822, HER883, HER1124), así como la totalidad de péptidos no números del API m1 fueron evaluados con la teoría utilizada en el presente trabajo, comprobando los resultados con los hallazgos experimentales de estas proteínas y se comparó el desempeño con los resultados de los métodos de predicción de péptidos disponibles en línea de mayor cobertura alélica, obteniendo los mayores valores para la sensibilidad, valor predictivo positivo y exactitud.

La teoría planteada deja a un lado los costosos procesos experimentales de ensayo y error, por predicciones físicas y matemáticas logrando una simplificación en la escogen-

cia de los péptidos. En este caso, en lugar de realizar un análisis de la totalidad de las secuencias de las proteínas, los esfuerzos del trabajo de laboratorio se dirigirían al 11.67% de los péptidos en el caso de la proteína de MSA-2 y al 15.92% en la proteína AMA-1, pues son las que presentan las características matemáticas necesarias para unirse la HLA II según la teoría aquí planteada.

Como en las teorías fundamentales actuales de la física<sup>(34,42,43)</sup> no hay causas sino órdenes físicos y matemáticos acausales para la descripción y comprensión del fenómeno estudiado. Por ser una teoría no requiere de análisis estadísticos ni del uso de grandes cantidades de datos experimentales. Desde esta perspectiva física acausal han sido desa-



rolladas investigaciones en diversos campos de la medicina con resultados de aplicación experimental y clínica. Por ejemplo, la teoría de conjuntos ha sido utilizada para el desarrollo de una caracterización del fenómeno de unión de la proteína MSP-1 al receptor de glóbulo rojo<sup>(44)</sup>, así como a la unión de péptidos noaméricos al HLA clase II<sup>(45)</sup>. Del mismo modo, con base en las teorías de probabilidad y entropía se caracterizó la unión entre el receptor del eritrocito y los péptidos de la proteína MSP-1<sup>(46)</sup>. Siguiendo este camino, la teoría desarrollada<sup>(26)</sup> logra simplificar este fenómeno tan complejo, mediante una generalización que obvia la especificidad alélica, caracterizando el fenómeno de unión a partir de representaciones numéricas de tipos de secuencias y no de aminoácidos específicos. Al transformar la información experimental en información numérica en el contexto de leyes de la física este trabajo evidencia un orden físico y matemático subyacente al fenómeno de unión entre el péptido y el HLA clase II, desde una perspectiva acausal que permite realizar predicciones útiles para el desarrollo de vacunas.

#### DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

#### DEDICACIÓN

A nuestros hijos.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Militar Nueva Granada, en especial al Doctor Estrada y al Doctor Forero, por apoyar al Grupo de Investigación Insight.

#### CORRESPONDENCIA:

Javier Rodríguez Velásquez  
Carrera 79, número 51-16 Sur, Apartamento 102  
Bogotá, Colombia  
Correo-e: grupoinight2025@yahoo.es

#### REFERENCIAS

- World Health Organization, United Nations Children's Fund, World Malaria Report, Geneva, 2005.
- Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415: 680-685.
- 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.
- 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.
- Heidrich HG, Strych W, Mrema JE. Identification of surface and integral antigens from spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites by radioiodination and metabolic labeling. *Z Parasitenkunde* 1983; 69: 715-725.
- Heidrich HG, Strych W, Prehm P. Spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites from culture possess glycoproteins. *Z Parasitenkunde* 1984; 70: 747-751.
- Lyon JA, Thomas AW, Hall T, Chulay JD. Specificities of antibodies that inhibit merozoite dispersal from malaria infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 36: 77-86.
- Lyon JA, Haynes JD, Diggs CL, Chulay JD, Pratt-Rossiter JM. *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. *J Immunol* 1986; 136: 2252-2257.
- Clark JT, Donachie S, Anand R, Wilson CF, Heidrich HG, McBride JS. 46±53 Kilodalton glycoprotein from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 32: 15-24.
- Ramasamy R. Studies on glycoproteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Identification of a myristilated 45 Kda merozoite membrane glycoprotein. *Immunol Cell Biol* 1987; 65: 419-424.
- Epping RJ, Goldstone SD, Ingram LT. An epitope recognized by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 28: 1-10.
- Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 29446-29452.
- 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.
- Wang J-H, Reinherz E. Structural basis of T-cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 2001; 38: 1039-1049.
- Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular* 4ª edición. McGraw Hill 2002.
- Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:587-622.
- Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. Structure of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 1996; 272: 1001-1004.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 3-Dimensional structure of the human class-II histocompatibility antigen HLADR1. *Nature* 1993; 364: 33-39.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994; 368: 215-221.
- Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, Appella E. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 1992; 256: 1817-1820.
- Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DAA, Lane WS, Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 1993; 178:27-47.

22. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong S-C, Barlow A, Janeway CA. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353:622-627.
23. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DAA, Strominger JL. Predominant naturally processed peptides bound to HLA DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992; 358:764-768.
24. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* 1995, 41: 178-228.
25. Sinigaglia F, Hammer J. Motifs and Supermotifs for MHC Class II Binding Peptides, *J Exp Med* 1995; 181: 449-451.
26. Rodríguez J. Teoría de unión al HLA clase II teorías de Probabilidad Combinatoria y Entropía aplicadas a secuencias peptídicas. *Inmunología* 2008; 27: 151-166.
27. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Leyes de la Termodinámica. En: Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Física. Vol. 1. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. 1964: p. 44-1, 44-19
28. Laplace Pierre. Ensayo filosófico sobre las probabilidades. Barcelona: Altaya. 1995
29. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Probabilidad. En: Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Física. Vol. 1. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. 1964: p. 6-1, 6-16.
30. Mood A, Graybill F, Boes D. Introduction to the theory of statistics. 3a Ed. Singapore Mc. Graw-Hill. 1974.
31. Blanco L. Probabilidad, notas de clase. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Matemáticas y Estadística: 1996.
32. Matvéev A. Física molecular. Moscú: MIR, 1987.
33. Tolman R. Principles of statistical mechanics. New York: Dover Publications. 1979
34. Shannon Claude. The mathematical theory of communication. Chicago: University of Illinois Press, 1980.
35. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Sylvestre C, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O. Improved prediction of MHC class I and II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics* 2004; 20:1388-1397.
36. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio M-F, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol* 1998; 160. 3363-3373.
37. Brusic V, Rudy G, Honeyman M, Hammer J, Harrison L. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network, *Bioinformatics* 1998; 14: 121-130.
38. Dönnes P, Elofsson A. Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC. *BMC Bioinformatics* 2002; 3:25
39. Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, Buus S, Lund O. Quantitative predictions of peptide binding to any HLADR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol* 2008; 4: e1000107
40. Texier C, Pouvelle S, Busson M, Herve M, Charron D, Menez A, Maillere B. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J. Immunol* 2000; 164:3177-3184
41. Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Muller U, Blaser K. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98: 1676-1683.
42. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Comportamiento cuántico. En: Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Física. Vol. 1. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, S. A. 1964: p. 37-1, 37-15.
43. Rañada F. Movimiento caótico. En: Orden y Caos. Scientific American. Prensa Científica S.A., 1990; p. 66-77.
44. 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.
45. Rodríguez J. Teoría de conjuntos aplicada a la caracterización matemática de unión de péptidos al HLA clase II. *Rev Cienc Salud* 2008; 1: 9-15.
46. 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 Inmunol Clin* 2008; 39: 74-82.