



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

**Actividad de unión de la proteína adhesiva relacionada con trombospondina de
Plasmodium vivax (PvTRAP) a células HepG2**

Juliana Ortiz Gordillo

Trabajo de grado para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Bogotá, 2019

**Actividad de unión de la proteína adhesiva relacionada con trombospondina de
Plasmodium vivax (PvTRAP) a células HepG2**

Juliana Ortiz Gordillo

Asesor interno

Ruth Mélida Sánchez Mora., PhD

Asesor Externo

Gabriela Arévalo Pinzón., PhD

Tesis de grado para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Bogotá, 2019

A mi madre Adriana, mi ángel, mi cómplice, mi mejor amiga, mi ejemplo, mi inspiración.

A mi padre Julio, mi héroe, mi protector, mi ejemplo, mi artista, mi compañero, mi paz.

A mi hermano Camilo, mi persona favorita, mi fan, mi ídolo, mi guía. Tú eres mi tribu.

...Ustedes mi razón de ser, mi fortaleza.

Mi amor por ustedes no tiene límite...

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Adriana por hacerme a su imagen, por enseñarme cómo enfrentar la vida, a ser fuerte y valiente, por su amor infinito, por trabajar cada día por mis sueños y por enseñarme con su ejemplo, que una mujer es capaz de todo.

A mi padre Julio por cumplir cada uno de mis caprichos y sueños, por cuidarme cada segundo de mi vida, por enseñarme con su ejemplo a tener un corazón noble y darle mi luz a los demás, por su amor infinito y por apoyarme en todo.

A mi hermano Camilo, por creer en mí más que yo misma, por apoyarme y darme la fuerza para lograr todo lo que me propongo, por enseñarme tantas cosas, por ser la persona más especial conmigo, por amarme y no dejarme pasar un solo día sin reír a carcajadas.

A mi mejor amiga Valentina, por mostrarme que se puede confiar en las personas, por darme su amor incondicional, por escucharme, entenderme y ayudarme, por ser la mejor compañera de estudio y de vida, por ser la mejor parte de todo esto y por ser la mejor amiga que he tenido.

A mis amigas Paola y Laura por hacer de todo esto lo mejor, por las risas, la ayuda y el apoyo, por los waffles, las papitas y el amor.

A mi Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a todos los docentes por darme la oportunidad de estudiar y formarme profesionalmente.

A mi profesora Gabriela, por ser mi guía en este proceso, por ser una excelente persona, por enseñarme tantas cosas, por ser mi compañera, amiga y maestra.

A mi profesora Ruth, por su ayuda y excelente disposición cada vez que la necesite y por hacer parte de este proceso.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por abrirme sus puertas y hacer posible la realización de este proyecto.

Al grupo funcional Receptor-Ligando, Maritza, Mónica, Adriana, Jeimmy y Marcela, por hacerme parte de todo, por su buena disposición y enseñanzas.

A Marcela por ser mi compañera, guía y amiga en este proceso, por su calidez y buena energía.

A Jeimmy, por su ayuda infinita, su disposición, compañía y por compartir cada triunfo en el proceso.

A todas las personas que hicieron parte de mi proceso y que hicieron posible todo esto

...A todos ustedes gracias infinitas por ayudarme a llegar hasta aquí...

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
1. ANTECEDENTES	11
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Generalidades	17
2.2. Epidemiología	17
2.2.1. Malaria a nivel mundial	18
2.2.2. Malaria en Colombia	19
2.3. Ciclo de vida.....	21
2.3.1. Invasión al hepatocito	22
2.3.2. Invasión al Glóbulo Rojo.....	23
2.3.3. Ciclo en el mosquito	24
2.4. Sistemas de expresión de proteínas Recombinantes	25
2.4.1. Sistemas de expresión en células de mamífero.....	26
2.4.2. Sistema de expresión en Baculovirus	27
3. OBJETIVOS	29
4. METODOLOGÍA	30
4.1. Diseño de cebadores.....	30
4.2. Amplificación de dos regiones del gen <i>pvtrap</i> por reacción en cadena de la polimerasa ..	31
4.3. Clonación de los productos amplificados <i>pvtrap</i> y <i>pvtrap-vW-tsr</i>	33
4.3.1. Tratamiento enzimático de los productos amplificados (<i>pvtrap</i> , <i>pvtrap-vW-tsr</i>) y del vector pFASTBac-HT-C.....	33
4.3.2. Ligación de los genes <i>pvtrap</i> y <i>pvtrap-vW-tsr</i> en el vector pFASTBac-HT-C y transformación en células <i>E. coli</i> TOP10 competentes.	33
4.3.3. Análisis de colonias recombinantes mediante PCR y tratamiento enzimático	34
4.4. Generación de bácmidos recombinantes en células <i>E. coli</i> DH10Bac competentes.....	35
4.4.1. Análisis de los bácmidos recombinantes por PCR	35
4.5. Cultivo de la línea celular de insecto Sf9.....	36
4.6. Transfección de células de insecto Sf9 con los bácmidos recombinantes	36
4.7. Generación de stocks virales	37
4.8. Extracción de la proteína.....	38
4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	39

4.10. Western Blot.....	39
4.11. Purificación de la proteína.....	40
4.12. Diálisis.....	40
4.13. Ensayo de unión de la proteína rPvTRAP a línea celular hepática ATCC® HB-8065 ...	40
5. RESULTADOS	42
5.1. Generación de los plásmidos recombinantes pFastBac-pvtrap y pFastBac-pvtrap-vW-tsr en células <i>E. coli</i> TOP 10 competentes	42
5.2. Generación de bácmidos recombinantes en células <i>E. coli</i> DH10Bac competentes.....	48
5.3. Células Sf9 derivadas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expresan exitosamente la proteína PvTRAP y PvTRAP-vW-TSR	49
5.4. La rPvTRAP se une a la línea celular hepática ATCC® HB-8065.....	53
6.DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES.....	58
8. REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.	21
Figura 2. Invasión del merozoito al glóbulo rojo.....	24
Figura 3. Representación esquemática del gen <i>pvtrap</i> , la proteína PvTRAP y los respectivos dominios que la conforman.	32
Figura 4. Representación esquemática del proceso para la generación de stocks virales.....	38
Figura 5. Amplificación del gen <i>pvtrap</i> y el dominio <i>vW-TSR</i>	42
Figura 6. Representación gráfica del vector pFastBac-HT-C	43
Figura 7. Colonias de células <i>E. coli</i> TOP10 competentes transformadas	44
Figura 8. PCR de colonia de <i>E. coli</i> TOP10 competente transformada.....	44
Figura 9. Tratamiento enzimático de los plásmidos recombinantes pFastBac- <i>pvtrap</i> y pFastBac- <i>pvtrap-tsr</i>	45
Figura 10. Fragmento de los electroferogramas de los plásmidos recombinantes pFastBac- <i>pvtrap</i> y pFastBac- <i>pvtrap-vW-tsr</i>	47
Figura 11. Alineamiento del dominio <i>vW-TSR</i> entre las colonias obtenidas y las cepas de <i>P. vivax</i> Sal1 y PvP01.	47
Figura 12. Colonias de <i>E. coli</i> DH10Bac transformadas. Foto obtenida de las bacterias transformadas con el vector pFastBac- <i>pvtrap-vW-tsr</i>	48
Figura 13. PCR de colonia de <i>E. coli</i> DH10Bac competente transformada	49
Figura 14. Efecto citopático en células Sf9 infectadas con Baculovirus recombinante.	51
Figura 15. Expresión de rPvTRAP y rPvTRAP- <i>vW-TSR</i>	51
Figura 16. Purificación de rPvTRAP	52
Figura 17. Pureza de rPvTRAP.....	52
Figura 18. Unión de rPvTRAP a HepG2 cells medido por citometría de flujo de unión	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para la amplificación de <i>pvtrap</i>	31
Tabla 2. Cambios en la secuencia de aminoácidos de la PvTRAP entre la cepa VCG-1 y PvP01	46

TABLA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización mundial de la salud
CSP	Proteína del circumsporozoito
TRAP	Proteína adhesiva relacionad con trombospondina
<i>Pv</i>TRAP	Proteína adhesiva relacionad con trombospondina de <i>Plasmodium vivax</i>
TSR	Dominio de repetición de trombospondina
ECD	Dominio extracelular
MIDAS	Sitio de adhesión dependiente de iones metálicos
<i>rPv</i>TRAP	Proteína adhesiva relacionad con trombospondina de <i>Plasmodium vivax</i> recombinante
MSNM	Metro sobre el nivel del mar
IMC	Complejo de membrana interna
SV40	Virus del simio 40
ADNr	ADN recombinante
PEI	Polietilenimina
AcMNPV	Virus de la poliedrosis nuclear múltiple <i>Autographa californica</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADNg	ADN genómico
VCG-1	Vivax Colombian Guaviare-1
SFB	Suero fetal bovino
MOI	Multiplicidad de infección
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio
PBS	Buffer fosfato salino
<i>Tg</i>MIC2	Proteína micronemal 2 de <i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Nc</i>MIC2	Proteína micronemal 2 de <i>Neospora caninum</i>
TRAP-C1	Proteína adhesiva relacionada con TSP de <i>Cryptosporidium</i>
<i>Et</i>MIC1	Proteína micronemal-1 de <i>Eimeria tenella</i>
<i>Bb</i>TRAP	Proteína anónima relacionada con trombospondina de <i>Babesia bovis</i>
<i>Bg</i>TRAP	Proteína anónima relacionada con trombospondina de <i>Babesia gibsoni</i>

RESUMEN

La invasión de esporozoitos de *Plasmodium spp* a hepatocitos humanos representa el primer paso para que se establezca la invasión en el humano, esto ocurre mediante la interacción de proteínas de la superficie del esporozoito y receptores en la superficie del hepatocito. La proteína anónima relacionada con trombospondina de *Plasmodium vivax* (*PvTRAP*) es un polipéptido presente en la superficie de esporozoítos, del cual en otras especies de *Plasmodium* se ha investigado su participación en el proceso de invasión al hepatocito. Esta proteína es conservada en varias especies del género *Plasmodium* caracterizándose por la presencia de un dominio de repetición de trombospondina tipo I (TSR) y un dominio A similar al Factor von Willebrand (vW). En el presente estudio se amplificaron dos fragmentos del gen *pvtrap* que codifican para el ectodominio de la proteína *PvTRAP* y los dominios TSR-vW. Cada producto fue clonado en el vector pFastBac-HT-C y secuenciado mediante la técnica de Sanger, obteniendo por primera vez la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la proteína *PvTRAP* derivada de la cepa VCG-1. Los clones recombinantes confirmados fueron utilizados para la obtención de baculovirus recombinantes en células de insecto Sf9. Una alta concentración de stock viral fue utilizada para la expresión de los dos fragmentos recombinantes: *PvTRAP* y *PvTRAP-vW-TSR*. El ectodominio *PvTRAP* se purificó mediante cromatografía de afinidad, se dializó exhaustivamente frente a PBS y se cuantificó. Mediante ensayos de citometría de flujo se encontró que la proteína *PvTRAP* se unió a la línea celular hepática ATCC HB-8065. Futuros estudios son necesarios para evaluar las regiones mínimas de interacción con el fragmento *PvTRAP-vW-TSR*. Los resultados de este estudio destacan la capacidad de *PvTRAP* para interactuar con la célula blanco de *P. vivax* y pone en evidencia el potencial de esta polipéptido en *P. vivax* como ha sido mostrado para *P. falciparum*.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, *PvTRAP*, fase pre-eritrocítica, esporozoito e interacción receptor-ligando

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad prevenible y curable causada por protozoarios del género *Plasmodium* que son transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* infectados, durante la alimentación. Se estima que se presentan alrededor de 200 millones de casos de malaria en el mundo y aproximadamente 400000 muertes a causa de la enfermedad cada año, sumándole a esto la resistencia tanto a insecticidas como a antipalúdicos; de manera que cada vez se hace más necesario el desarrollo de una vacuna contra malaria.¹

Para el 2017 la Región de África de la OMS continúa soportando una carga desproporcionada de la enfermedad (92%), con predominancia de infección por *P. falciparum*², por lo que a lo largo de los años las investigaciones se han enfocado en estudiar esta especie. Sin embargo, fuera de África *Plasmodium vivax* es la especie más extendida y menos estudiada.

El ciclo de vida de *Plasmodium* es complejo, ya que cuenta con multiestadios y dos hospederos. En el hospedero humano, se encuentran dos estadios invasivos, el esporozoito y el merozoito que tienen como célula diana el hepatocito y el eritrocito respectivamente. Los procesos de invasión a las células diana por cada uno de los estadios del parásito están mediados por las interacciones receptor-ligando entre proteínas de la membrana del receptor y proteínas de superficie del parásito como la proteína del circumsporozoito (CSP del inglés, Circumsporozoite protein) y la proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP del inglés, “thrombospondin-related anonymous protein”) ^{3, 4} para el esporozoito, siendo estas interacciones puntos clave al momento de desarrollar una vacuna.

Por esto, la presente investigación se centra en el estudio de la proteína anónima relacionada con trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP del inglés, *Plasmodium vivax* Thrombospondin-related adhesive protein), que permita conocer más acerca de la actividad biológica de la proteína y su interacción con receptores presentes en la superficie de hepatocitos.

1. ANTECEDENTES

Existen registros de los años a.C y los primeros siglos d.C que se le atribuyen a personajes como Hipócrates, El Papa San Gregorio I y Plinio el viejo y que se relacionan con la malaria, los cuales fueron posibles de rastrear por la descripción de los síntomas asociados a la enfermedad que incluían fiebres altas y agrandamiento del bazo luego de la picadura de mosquitos sobre todo al final del verano y que cobró la vida de miles de personas incluyendo reyes, curas y guerreros. Desde entonces el hombre ha tratado de explicar la naturaleza de la enfermedad y continúa en la búsqueda de una cura, que en la antigüedad se basaba en rituales religiosos y milagros para obtener protección y que hoy en día está en manos de la ciencia.⁵

El término malaria deriva del italiano “mal'aria” que significa “aire malo” término que se encontró por primera vez en el libro de Marco Cornaro “Scritture della laguna” publicado en Venecia en 1440, aunque fue hasta 1838 que el término fue utilizado por Francesco Puccinotti en su libro “Storia delle febbri intermittenti di Roma” publicado en Nápoles, para referirse a la enfermedad. Sin embargo el origen de la malaria se remonta a muchos años atrás, incluso pre-humanitarios que suponen que la enfermedad evolucionó con nuestros antepasados primates, presentándose los primero casos de malaria en humanos en África que luego se extendió a Europa y Asia por medio de la movilización del hombre y luego en el siglo XVI llegó a América con la exportación de esclavos provenientes de África.⁵

A pesar de que la malaria ha acompañado a la humanidad durante muchos años y que el hombre ha trabajado en la búsqueda de una cura, al día de hoy no existe una vacuna eficiente contra la enfermedad, pero cada vez son más los estudios que se hacen para conseguirlo, ya que ésta desde años atrás y aun en la actualidad sigue siendo la mejor alternativa por su costo-beneficio.

Los primero intentos de producir una vacuna se dieron en 1910 cuando Sergent y colaboradores realizaron los primeros experimentos en aves, basados en la exposición a esporozoitos muertos

que le conferían inmunidad al huésped contra futuras exposiciones al parásito, después de esto se realizaron más estudios donde los esporozoitos se trataron de diferentes formas, que incluían exposición a luz ultravioleta, tratamiento con formalina y en 1967 Nussenzweig y colaboradores demostraron que mediante irradiación con rayos X se confería inmunidad del 90% a ratones, considerándose esta la mejor técnica para el tratamiento de esporozoitos hasta entonces. Posterior a esto en los años 70's continuaron los estudios en monos y humanos, basados en la exposición a esporozoitos irradiados.⁶

A causa de que eran necesarias demasiadas picaduras de mosquitos irradiados, surgió la necesidad de estudiar antígenos específicos, los cuales abrieron el camino para la elaboración de vacunas a base de antígenos de superficie presentes en los diferentes estadios de las etapas del ciclo de vida del parásito en el humano. Ya en 1983 se identificó la proteína circumsporozoito (CSP del inglés, circumsporozoite protein) implicada en el proceso de invasión, y fue la primera proteína de las superficie del esporozoíto que fue expresada en *E.coli* que se encontraba en auge en ese momento como sistema de expresión de proteínas recombinantes; CSP se usó como candidato a vacuna contra *P. falciparum* la cual probada en humanos demostró que logró conferir inmunidad.⁷ Sin embargo, era necesario continuar en la búsqueda de más antígenos de superficie para crear una vacuna más inmunogénica.

En 1993 había evidencia que sugería la interacción entre las proteínas CSP y TRAP del esporozoíto de *P. falciparum* y glicoconjugados sulfatados presentes en la superficie de hepatocitos, fue en este año que Müller y colaboradores⁸ realizaron una investigación que buscaba determinar si la proteína TRAP interactúa con la membrana de las células hepáticas a través de la unión con glicoconjugados sulfatados, para lo cual usaron *E. coli* para expresar constructos de TRAP que contenían el motivo WSPCSVTCG presentes también en la proteína CSP y una región RGD, que se sospechaba le conferían propiedades de adherencia a TRAP. Se expresaron diferentes polipéptidos con secuencias de aminoácidos que fueron cortadas en el extremo C-Terminal, de tal manera que algunos contenían los dos, solo uno o ninguno de los motivos asociados a adhesión, donde se encontró que los constructos TRAP que contenían el

motivo WSPCSVTCG tenían propiedades de adhesión mientras que los que carecían de dicho motivo en su secuencia no se adherían a células HepG2.

Finalmente para dejar en evidencia que la proteína TRAP desempeña un papel fundamental en el proceso de invasión al hepatocito se generaron sueros a base de los constructos creados y por medio de técnica de ELISA se evaluó su capacidad para inhibir la invasión del parásito, donde todos los sueros aunque no en las mismas proporciones presentaron actividad inhibitoria atribuida a los anticuerpos únicamente contra la proteína TRAP ya que aunque comparte el mismo motivo con la proteína CSP ninguno de los sueros tuvo reactividad contra un péptido sintético que solo contenía el motivo WSPCSVTCG, dejando en evidencia que la proteína TRAP tiene interacciones con los hepatocitos que aún son desconocidas.⁸

El hecho de que la proteína TRAP y CSP con funciones similares tengan afinidad por diferentes glicoconjugados de la superficie del hepatocito sugiere que la presencia de las dos dará como resultado un aumento en la afinidad y le otorga al hepatocito la capacidad de ser la única célula que puede producir las dos estructuras sulfatadas en su superficie.⁸

En 1997 en busca de comprender mejor la función de la proteína TRAP Templeton y colaboradores⁹ realizaron un estudio comparativo entre tres especies de *Plasmodium* (*Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium gallinaceu*), donde se esperaba encontrar diferencias en la estructura de la proteína teniendo en cuenta que los esporozoitos de *Plasmodium gallinaceu* invade macrófagos y células endoteliales a diferencia de los de *P. falciparum* que invaden hepatocitos, sin embargo, se encontró que “específicamente, todos los genes poseen un dominio A en el amino terminal; una región II de tipo CSP; una región de repetición rica en asparagina / prolina; dominio transmembrana; y un dominio citoplásmico corto”⁹. Además a partir de este momento nace la idea de que posiblemente la proteína TRAP tenga una función en las glándulas salivales del mosquito.

En 1999 Wengelnik y colaboradores¹⁰ realizaron un estudio del dominio A que es homólogo al Factor de von Willebrand en una secuencia de 200 aminoácidos en el extremo N-Terminal y el dominio TSR tipo I, demostrando que “una única sustitución de aminoácidos en el dominio A o una delección del TSR afectaba gravemente la capacidad de los esporozoitos para invadir las glándulas salivales”¹⁰, sin embargo, la invasión a glándulas salivales y la motilidad son independientes atribuyendo esta última al motivo TSR, ya que los esporozoitos de intestino delgado con mutaciones en la secuencia del dominio A sí presentaron motilidad. Los resultados demostraron que la proteína TRAP tiene un papel importante en la movilidad del esporozoito y la invasión a glándulas salivales en el mosquito, además de estar implicada en el proceso de invasión a los hepatocitos, donde el dominio A y TSR reconocen ligandos similares.¹⁰

En 2004 ya se conocía que TRAP está involucrado en el proceso de invasión y en la movilidad del esporozoito, lo que despertó más el interés en estudiar esta proteína para una posible vacuna. Estudios previos a este sugieren que el dominio A y el dominio extracelular (ECD del inglés, extracellular domain) existían *in vitro* como agregados oligoméricos, sin embargo, en este año Akhouri y colaboradores¹¹ expresaron los dominios A y ECD en Baculovirus donde fue posible obtener proteínas manométricas.

También se realizó un modelo del dominio A basado en su homología con el Factor von Willebrand y se determinó que tiene un sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (motivo MIDAS del inglés, metal-ion-dependent adhesion site) el cual se demostró que está involucrado en la unión a hepatocitos, por medio de un ensayo de unión a células HepG2. “Estos resultados indican que, además de la interacción del dominio A con heparina, puede existir un modo de entrada dependiente de ion-metal para los esporozoitos usando el dominio A de TRAP”¹⁰, esto explica porque el uso de análogos de la heparina no inhiben la invasión y justifica que el ECD se una con mayor afinidad a células HepG2 que el dominio A, ya que motivo MIDAS del dominio A participa en el reconocimiento dependiente de cationes de receptores desconocidos en los hepatocitos.

En 2006 Ogunbanwo y colaboradores¹² realizaron un estudio de expresión, purificación y caracterización de PvTRAP donde la proteína fue sometida a múltiples etapas de purificación y analizada en diferentes condiciones que mostraron total capacidad de la rPvTRAP para unirse a células HepG2, en comparación con rPvTRAP que no fue sometido al mismo proceso y que no tuvo una alta actividad de unión a células HepG2, dejando en evidencia la importancia de un buen plegamiento y purificación de la proteína recombinante para que esta pueda ejercer su actividad y confirma la interacción de unión entre la PvTRAP y sulfato de heparina.

En 2008 Patarroyo y colaboradores¹³ realizaron un estudio para la caracterización estructural de componentes de esporozoitos para una vacuna antipalúdica, multi-etapa, multi-epítipo. Ya para este año se consideraba que TRAP era una proteína fundamental en los procesos biológicos que le confieren al esporozoito capacidad de migración e invasión a células huésped tanto en vertebrados como en invertebrados, convirtiéndolo en el estadio más versátil. Se realizaron ensayos con mutantes con el gen TRAP bloqueado y se compararon con los de tipo salvaje, los resultados demostraron que, la ausencia de esta proteína no tiene efecto sobre el merozoito y la invasión a los glóbulos rojos, y la cantidad de esporozoitos en las glándulas salivales de mosquitos infectados con el mutante fue 60 veces menor que en el tipo salvaje, confirmando que TRAP tiene un papel importante en el mosquito.

También se encontró que TRAP es fundamental en la invasión al hepatocito ya que en los ensayos con el mutante la infectividad fue 10.000 veces menor que con el tipo salvaje, lo que supone que una vacuna contra la proteína TRAP acompañada de otras moléculas de esta etapa como CSP, será capaz de reducir la carga de esporozoitos.

En 2017 Nazeri y colaboradores¹⁴ realizaron el primer estudio de respuestas inmunes adquiridas de forma natural a la proteína TRAP de *Plasmodium vivax* en pacientes de áreas con transmisión inestable de la malaria (Irán, Afganistán y Pakistán), dado el interés que existe en la elaboración de una vacuna contra *P. vivax* por ser la especie que induce el desarrollo de hipnozoitos que es responsable de las recaídas. Los resultados de la investigación dejaron evidencia de respuestas de

IgG inducidas naturalmente a *Pv*TRAP entre pacientes, con predominio de las subclases IgG1 e IgG3 y menor prevalencia de IgG2 e IgG4. Sin embargo los resultados sugieren que “entre las poblaciones asociadas con diferentes patrones de endemicidad, se requiere más investigación para determinar si individuos con diferentes antecedentes genéticos podrían desarrollar respuestas anti-TRAP y evaluar si tales anticuerpos están asociados con la protección a la infección”¹⁴

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

La malaria o paludismo es una enfermedad de extensión mundial, causada por protozoarios del filo Apicomplexa, clase Aconoidasida; orden Haemosporida; familia Plasmodiidae, género *Plasmodium*.¹⁵ El filo Apicomplexa recibe este nombre por la presencia de un complejo apical especializado, importante en el proceso de invasión y que está presente en todos los parásitos de este filo.¹⁶ Se conocen cinco especies que pueden infectar al humano, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*.¹

La principal vía de transmisión de la malaria se da durante la alimentación de los mosquitos hembra del género *Anopheles*, por inoculación de esporozoitos de *Plasmodium* al hospedero vertebrado (transmisión vectorial)¹; a pesar de esto también se encuentran casos de transmisión de madre infectada a feto (transmisión vertical)¹⁷ o por vía transfusional por inoculación directa de glóbulos rojos infectados (transmisión horizontal).¹⁸

La malaria generalmente se presenta con escalofrío, fiebre y sudoración repetidos cada 24, 48 o 72 horas, entre otras características clínicas como dolor de cabeza, debilidad, fatiga, dolores en articulaciones y músculos y malestar abdominal; que van a depender de la especie de *Plasmodium*, el número de parásitos y el estado inmunitario del paciente. Si la enfermedad no es tratada a tiempo se puede dar lugar a una malaria complicada que en pocas horas puede progresar a una enfermedad grave con acidosis metabólica, anemia severa, hipoglicemia, falla renal aguda y edema agudo del pulmón, llegando a ser letal.¹⁹

2.2. Epidemiología

2.2.1. Malaria a nivel mundial

La malaria es la enfermedad de transmisión vectorial más importante en el mundo por ser responsable de al menos 400000 muertes cada año.¹ Durante los años sesentas hasta finales de los noventas fue una enfermedad desatendida, lo cual disparó la morbilidad y mortalidad de la enfermedad, de manera que a comienzos del siglo XXI fue objeto de amplia atención como un problema prioritario de salud mundial, debido a esto se aumentaron las intervenciones básicas entre 2000 y 2014 logrando contrarrestar la incidencia del siglo pasado. Sin embargo, las intervenciones no fueron muy consistentes además de una distribución desproporcionada y la persistencia de un número de casos inaceptable.²⁰

A raíz de esto y con miras en cumplir los objetivos propuestos por la OMS para 2030 respecto a malaria; la organización mundial de la Salud en Mayo de 2015 creó la estrategia técnica mundial de malaria 2016-2030 con orientaciones técnicas para los próximos 15 años, con énfasis en la necesidad de aumentar las inversiones en todos los aspectos relacionados con la enfermedad, que permitieran superar los retos de la lucha antimalarica que se encuentra amenazada por las problemáticas actuales y las que se estima que vendrán en los años posteriores, como el cambio climático, el incremento de la población sobre todo en los países donde se concentran los casos, problemáticas socio-políticas, pobreza y desastres humanitarios; que en consecuencia se verán implicados en un aumento del número de casos, aparición en países donde no se han notificado o reaparición donde ya se habían eliminado.²⁰

La situación actual de la malaria a nivel mundial es alarmante, teniendo en cuenta las cifras reportadas hasta el 2017 donde la Región de África de la OMS sigue soportando la mayor carga de morbilidad por malaria (92%), seguida de la Región de Asia Sudoriental de la OMS (5%) y la Región del Mediterráneo Oriental de la OMS (2%). La tasa de incidencia a nivel mundial solo se redujo de 61 por cada 100.000 habitantes en 2014 a 59 en 2015, y se mantuvo en este nivel en 2016 y 2017, en comparación con la reducción global de 72 a 61 casos entre 2010 y 2014; por otra parte, la tasa de mortalidad por malaria ha disminuido desde el 2010 hasta el 2017 en todas

las regiones excepto en la Región de las Américas de la OMS, debido a un rápido aumento de malaria en Venezuela [República Bolivariana de], a causa de la problemática socio-política que presenta el país.²

Se estima que globalmente hubo un aumento de aproximadamente 5 millones de casos en los últimos 2 años, considerando que en 2017 hubo 219 millones de casos de malaria en todo el mundo en comparación con los 216 millones en 2016 y 214 millones en 2015, según lo reportado en el informe mundial de paludismo 2018, donde además se evidencia un estancamiento en la disminución del número de casos a nivel mundial para el año 2017.²

Respecto a especies parasitarias predominantes, *P. falciparum* es la especie responsable de la mayoría de los casos a nivel mundial, sin embargo, los casos por *P. vivax* han ido aumentando cada vez más, no solo en la Región de las Américas que a pesar de ser la Región con menor número de casos de malaria, el 74.1% de estos corresponden a infección por *P. vivax*; sino también en algunos países Indios y Africanos como India, Pakistán, Etiopía, Afganistán e Indonesia, que hacen parte de los 15 países que representan casi el 80% de los casos en el mundo.²

2.2.2. Malaria en Colombia

En Colombia, cerca del 60% de la población está en riesgo de adquirir la enfermedad o morir debido a esta, ya que aproximadamente el 85% del territorio rural se encuentra situado por debajo de los 1.600 MSNM (metros sobre el nivel del mar), por tanto, es considerado como potencial área malárica a causa de que cuenta con las condiciones climáticas y geográficas necesarias para la transmisión del parásito; con una concentración de los casos principalmente en los departamentos de Chocó, Antioquia, Nariño, Amazonas, Valle del Cauca y Córdoba; con predominio de malaria por *P. vivax* (60 a 65%), a pesar de que en regiones como la costa Pacífica la relación favorece a *P. falciparum*.²¹ El comportamiento que se registra en Colombia

se caracteriza por la presencia de ciclos epidémicos que ocurren cada 2 a 7 años, relacionados con la ocurrencia del fenómeno del Niño-Oscilación Sur.²²

En el 2018 se notificaron 62141 casos de malaria, con predominio de infección por *Plasmodium vivax* con 31134 casos (50,1%), seguido de 29764 (47,9%) por *Plasmodium falciparum* y 1243 (2%) por infección mixta. Del total de los casos 61178 fueron malaria no complicada y 953 malaria complicada; con un aumento del 13,1% en la notificación de casos de malaria no complicada y una disminución del 5,1 % en malaria complicada con respecto al 2017. En cuanto al comportamiento de malaria en grupos poblacionales de alto riesgo, 25095 casos (40,4%) fueron notificados como afrocolombianos, de estos 1089 son procedentes del exterior (el 95% procedente de Venezuela) y 2433 realizan actividades de minería.²³

Colombia enfrenta grandes retos frente a la disminución de los casos de malaria; debido principalmente por la migración de extranjeros, en mayor proporción venezolanos que desde el año 2015 han causado un incremento de los casos procedentes del exterior²²; y a la minería ilegal que tiene como consecuencia la creación de pozos que posteriormente se convierten en criaderos de mosquitos, aumentando su densidad y por ende las probabilidades de transmisión de la enfermedad.²⁴

Además de los retos actuales, Colombia continúa con problemas para combatir la malaria que se deben a la carencia de buenos sistemas de vigilancia, la falta de acceso de todas las personas al diagnóstico microscópico, tratamientos inoportunos, la mínima destinación de dinero para la financiación de investigaciones que aporten al conocimiento y a la transformación de la situación de la malaria, carencia de sistemas de vigilancia de la respuesta terapéutica, y los intereses comerciales individuales como la minería que se ven afectados por la incorporación de programas mundiales contra la malaria.²⁵

2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Plasmodium spp.* es complejo, ya que presenta multiestadios y dos huéspedes; un invertebrado (mosquito) y un vertebrado (humano). Figura 1.

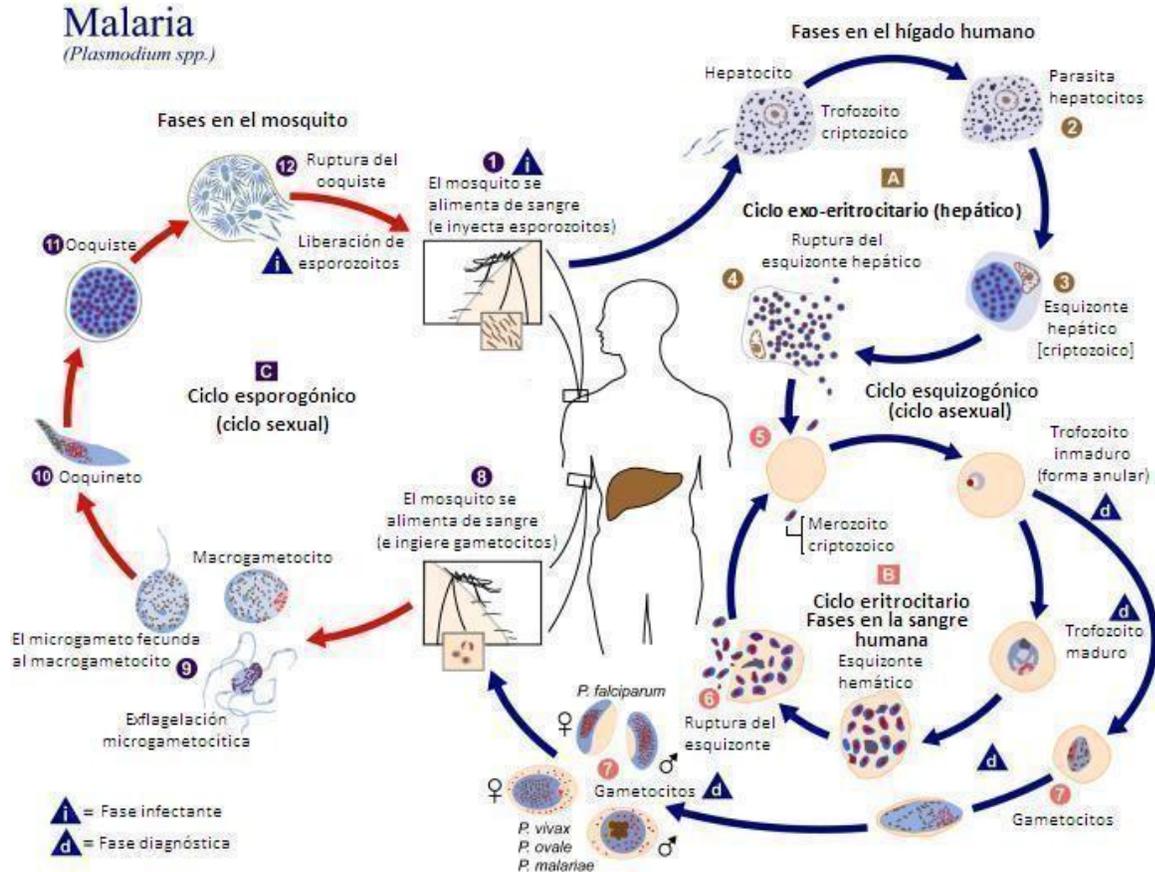


Figura 1. Ciclo de vida de Plasmodium spp. El ciclo de vida de *Plasmodium* inicia con la inyección de esporozoitos del mosquito hembra *Anopheles*, estos esporozoitos viajan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado donde tiene lugar el ciclo extra-eritrocítico con el desarrollo del esporozoito en esquizonte liberando merozoitos al torrente sanguíneo, los cuales invaden los eritrocitos dando inicio al ciclo eritrocitario/etapa asexual del parásito, con la formación de anillos, trofozoitos y esquizontes que liberan nuevamente merozoitos al torrente sanguíneo; los cuales pueden invadir nuevos glóbulos rojos y continuar con el ciclo eritrocitario. Algunos estadios eritrocitarios se pueden desarrollar en gametocitos masculinos o femeninos, los cuales son tomados por el mosquito durante la alimentación, dando inicio al ciclo esporogónico en el invertebrado, permitiendo la formación del cigoto que da origen al esporozoito que emigra a las glándulas salivales para la inyección en un nuevo huésped humano durante la próxima alimentación. Figura tomada del Centro de Control y Prevención de Enfermedades.

2.3.1. Invasión al hepatocito

El ciclo de vida de *Plasmodium* inicia con la inyección de entre 20 a 200 esporozoitos (estadio infectante) del mosquito hembra *Anopheles* infectado al hospedero humano durante la alimentación¹; las glándulas salivales de los mosquitos liberan antihistamínicos, vasodilatadores, anticoagulantes, inhibidores de la agregación plaquetaria e inmunomoduladores, lo que facilita tanto la ingesta de sangre como la inoculación de esporozoitos²⁶ que migran a través del torrente sanguíneo hasta el hígado para invadir su célula diana, el hepatocito, en tres pasos: detención en la sinusoide, pasó a través de las células de Kupffer e invasión de hepatocitos⁴. Este proceso está mediado por la interacción entre proteínas de superficie del esporozoito (ej. CSP y TRAP)^{3,4} y proteoglicanos de sulfato de heparán presentes en la superficie del hepatocito que se encuentra expuesta a la sangre circulante en el espacio de Disse^{26,27}; estos proteoglicanos presentan una sulfatación alta en comparación con otros tejidos.⁴

Una vez el esporozoito ha invadido el hepatocito tiene lugar el ciclo extra-eritrocítico donde el esporozoito invasor se diferencia y divide mitóticamente en merozoitos, que son liberados al torrente sanguíneo por un evento explosivo que dispersa los merozoitos no móviles, como consecuencia de la desestabilización del citoesqueleto de la célula debido a la presión ejercida por el rompimiento de la vacuola parasitófora mediado por proteasas (SERA).¹⁶

En *P. vivax* se ha descrito otro estadio adicional llamado hipnozoito, el cual queda latente en los hepatocitos y puede activar la infección siendo responsable de las recaídas de la enfermedad, lo que representa un reto frente al tratamiento de malaria.^{27, 28}

A continuación se amplía la información acerca de TRAP, por ser la proteína objeto del presente estudio.

2.3.1.1. TRAP

La proteína TRAP o proteína de superficie de esporozoíto 2 (SSP2 del inglés: sporozoite surface protein 2) es una proteína transmembrana tipo I que se encuentra principalmente en los micronemas y se transporta a la superficie del esporozoíto y que junto con CSP es esencial en el proceso de invasión al hepatocito.^{27, 29}

Como se vio anteriormente TRAP contiene el motivo WSPCSVTCG presente también en la proteína CSP^{8, 30} y que tiene propiedades de adhesión; además de dominio tipo A (similar a lo descrito como factor de von Willebrand) que además de unirse a proteoglicanos de sulfato de heparán³¹ cuenta con un sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (motivo MIDAS del inglés, metal-ion-dependent adhesion site)¹¹ y un segundo dominio con un motivo similar al de la repetición de trombospondina tipo I (TSR).^{26, 23, 32}

La proteína se encuentra localiza en el polo apical del parásito y en la unión entre el parásito y la célula huésped muestra un patrón de movimiento anterior-posterior durante la internalización del parásito.²⁷ Además de su importancia en el proceso de invasión al hepatocito, TRAP es importante para la unión del esporozoíto a las glándulas salivales.^{10,23,27}

2.3.2. Invasión al Glóbulo Rojo

Los merozoitos que son liberados del esquizonte al torrente sanguíneo miden $\square 1-2 \mu\text{m}$ y cuentan con un complejo de membrana interna (IMC), mitocondria, núcleo, y un complejo apical de orgánulos secretores (micronemas, rhoptrias y gránulos densos), resultando estos últimos críticos para el proceso de invasión que se da de manera rápida en aproximadamente 60 s¹⁶ y está mediado por proteínas de membrana que pueden funcionar como ligandos de unión directamente a receptores específicos en los eritrocitos (adhesinas, como EBL y Pfrh); o pueden

ser necesarias en el proceso de invasión sin unirse a receptores en la célula huésped (invasinas)³³ por lo que dichas proteínas presentan una aparición conjunta, coordinada y oportuna que permiten el reconocimiento y reorientación del parásito, colocando el vértice de este en contacto con la membrana de la célula huésped, lo que permite la entrada del parásito al eritrocito, con una posterior fusión de la membrana eritrocitaria y la membrana de la vacuola parasitófora para sellar el proceso de invasión.¹⁶ Figura 2.

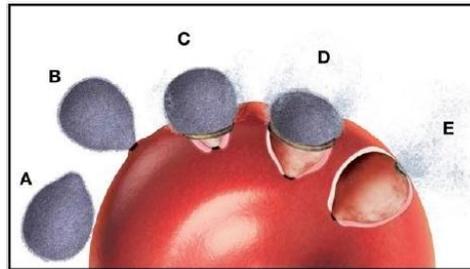


Figura 2. Invasión del merozoito al glóbulo rojo. Representación esquemática de la invasión del merozoito que inicia con un reconocimiento (A) seguido de una reorientación (B) y posterior unión entre receptor-ligando que se desplaza desde el polo apical al polo posterior (C y D) concluyendo con el sellado de membrana (E). Figura tomada de Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites.

La invasión al glóbulo rojo da inicio al ciclo eritrocitario/etapa asexual del parásito, allí el parásito se desarrolla en formas de anillo, trofozoito y esquizonte (estadio diagnóstico) que se replican hasta producir de 16 a 32 merozoitos hijas que son liberadas nuevamente al torrente sanguíneo; los cuales pueden invadir nuevos glóbulos rojos y continuar con el ciclo eritrocitario, en esta parte del ciclo es donde se presentan los síntomas clínicos.³⁴

2.3.3. Ciclo en el mosquito

Algunos estadios eritrocitarios se pueden desarrollar en gametocitos masculinos o femeninos, las formas sexuales del parásito (estadio diagnóstico), los cuales son tomados por el mosquito durante la alimentación, dando inicio al ciclo esporogónico en el invertebrado donde los gametos se fusionan para formar cigotos (etapa sexual). El cigoto se desarrolla para formar un ookinete

invasivo que sufre meiosis y migra hasta el intestino medio del mosquito; allí se une a la lámina basal y pierde su movilidad, dando forma al oocisto, que es capaz de replicarse y desarrollar un ooquiste el cual una vez ha madurado, contiene cientos de esporozoitos agrupados en lóbulos.²⁶ Cuando este ooquiste explota, libera miles de esporozoitos que son transportados por la hemolinfa a las glándulas salivales del mosquito, donde penetra en la lámina basal de la glándula salival y luego entra en la célula secretora para la inyección en un nuevo huésped humano durante la próxima alimentación.²⁷

2.4. Sistemas de expresión de proteínas Recombinantes

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes son usados con frecuencia en la producción de grandes cantidades de proteína con características homólogas a las nativas, para estudios proteómicos de estructura, función, localización o interacción entre proteínas.³⁵

Existen diferentes sistemas de expresión con hospedadores que van desde organismos procarióticos (bacterias) hasta organismos eucariotas unicelulares tales como levaduras y células de insectos y mamíferos más complejas³⁶; los cuales se diferencian en el costo, la facilidad de uso, tiempo, rendimiento y capacidad de realizar modificaciones postraduccionales; por lo que para la elección del sistema adecuado se debe tener en cuenta aspectos como el presupuesto, la cantidad necesitada, el tipo de proteína a expresar, el objeto para el que se quiere, y las modificaciones postraduccionales requeridas para la funcionalidad biológica de la proteína.³⁷

Para la expresión de proteínas recombinantes es necesario el uso de una molécula de ADN bicatenario o vector, que se replica de forma autónoma al cromosoma bacteriano y que sirve como vehículo para la clonación del gen de interés³⁸ que además debe contar con un origen de replicación, un marcador de selección, un promotor y un terminador de transcripción.³⁶ Los vectores de clonación en células eucarióticas usualmente tienen promotores derivados de virus como el SV40 (del inglés: Simian virus 40), poliomavirus, herpes virus y papovirus. Una vez se

tiene el vector y el gen de interés, deben ser tratados con enzimas de restricción para su posterior ligamiento, obtención de ADN recombinante (ADNr) y expresión de la proteína.³⁹

2.4.1. Sistemas de expresión en células de mamífero

Las células de mamífero como sistema de expresión de proteínas recombinantes tienen ventaja sobre los demás sistemas por ofrecer modificaciones postraduccionales con un correcto plegamiento de la proteína, sin embargo, presenta desventajas frente a los demás sistemas por ser más costoso, demorados y con un rendimiento más bajo, que los sistemas basados en bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, los cuales son rápidos, sencillos, escalables y económicos; y los sistemas basados en levaduras como *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* o células de insecto usando Baculovirus, que ofrecen modificaciones postraduccionales, aunque con una glicosilación diferente a las células de mamífero.^{35,38}

Para la expresión de proteínas recombinantes se han usado líneas celulares como COS y Vero (ambas de riñón de mono verde africano), HeLa (cáncer cervical humano) y NS0 (mieloma de ratón). Sin embargo, las líneas celulares más usadas son HEK 293 (riñón de embrión humano) y CHO (ovario de hámster chino)^{40, 41}. Las células pueden ser transfectadas mediante métodos químicos usando fosfato de calcio o polietilenimina (PEI) mediante la formación de complejos químico (carga positiva)/ADN (carga negativa), los cuales son captados por las células a través de endocitosis; y métodos físicos por transferencia directa de ADN como la microinyección; o por la formación de poros en la membrana que permitan la entrada del ADN, mediante pulsos eléctricos (electroporación) o ultrasonido (sonoporación).^{37, 41,42}

2.4.2. Sistema de expresión en Baculovirus

Los Baculovirus son virus líticos que pertenecen a la familia Baculoviridae y son específicos de artrópodos. El principal Baculovirus es el virus de la poliedrosis nuclear múltiple *Autographa californica* (AcMNPV del inglés, *Autographa californica* multiple nucleo polyhedrovirus) ⁴⁰; es un virus de doble cadena envuelto, que desde mediados de los años 1980's se ha desarrollado como un vector de expresión para líneas celulares de insecto como las Sf9 o Sf21, derivadas de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*. ⁴³

El sistema de expresión de Baculovirus tiene ventaja sobre los sistemas de expresión procarióticos; ya que las células de insecto tienen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, acilación, fosforilación, y la formación de enlaces disulfuro; con un correcto plegamiento de la proteína. ^{40, 44, 45}

2.4.2.1. Ciclo de vida de Baculovirus

Los virus ingresan a las células por endocitosis y se trasladan al núcleo, donde se libera su ADN. Allí 6 horas después de la infección tiene lugar la transcripción, traducción y ensamblaje viral, concluyendo con la generación de dos tipos de progenie viral; partículas no ocluidas que son liberadas por brotación entre las 12-36 horas después de la infección, y partículas ocluidas con una aparición más tardía (aproximadamente 18 horas), que se acumulan en los núcleos de las células infectadas hasta 72 horas después de la infección o hasta la lisis celular. ^{44, 45}

Estas partículas ocluidas están incrustadas en poliedros dentro del núcleo celular. Su componente principal es la proteína poliedrina (29kDa), que tiene una función importante para la supervivencia y propagación del virus en la naturaleza, secuestrando y protegiendo cientos de partículas virales de la inactivación proteolítica por parte del huésped en descomposición. Una

vez el virus es ingerido, la poliedrina se disuelve en el intestino del nuevo huésped en presencia de ambiente alcalino y se libera el virus ocluido dando lugar a la infección y replicación viral en las células epiteliales. Aunque la poliedrina es esencial para la supervivencia del virus en la naturaleza, es prescindible para la supervivencia y propagación del virus en células de cultivo ya que hay producción de virus no ocluidos que brotan de las células infectadas y se puede propagar a células vecinas.^{45, 46}

2.4.2.2. Baculovirus recombinantes

Anteriormente para la generación de Baculovirus recombinantes era necesario un vector de transferencia con el gen de interés; este vector luego se transfectaba junto con el ADN viral de tipo salvaje en células de insecto y mediante recombinación homóloga el gen de la poliedrina se veía interrumpido por la inserción del gen de interés, cuya expresión quedaba bajo control del promotor de polihedrina; lo que posteriormente permitía la selección de los Baculovirus recombinantes con fenotipo de oclusión negativa que puede ser vista en microscopio óptico como la ausencia de cuerpos de inclusión refringentes por acumulo de poliedrina.^{45,47}

Debido a que la recombinación homóloga entre el ADN de tipo salvaje y el ADN del plásmido recombinante es de frecuencia baja (0,2% al 5%)⁴⁸ y el proceso de purificación en placa resulta tedioso; se han desarrollado sistemas como Bac-to-Bac descrito por primera vez en 1993, en el cual se clona el gen de interés en un plásmido donante que contiene el promotor de poliedrina, seguido de uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para la inserción del gen de interés que luego se transforma en *E.coli* competentes que contienen un plásmido auxiliar con transposasa y un vector de Baculovirus (Bácmido). El Bácmido recombinante adquiere un marcador de resistencia a antibióticos y el gen LacZ (-), como consecuencia de una transposición específica que usa el transposón Tn7 insertando en el bácmido el gen de interés controlado por el promotor de poliedrina; estas propiedades permiten posteriormente la selección e identificación rápida de bácmidos recombinantes; que pueden ser transducidos directamente en células de insecto.^{44,47}

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células hepáticas HepG2.

3.1 Objetivos específicos:

1. Diseño, obtención y purificación en el sistema de expresión de Baculovirus del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
2. Diseño y obtención en el sistema de expresión de Baculovirus de los dominio von-Willebrand (vWA) y trombospondina (TSR) de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP).
3. Determinar la actividad de unión del ectodominio de la Proteína Adhesiva Relacionada con Trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAP) a células HepG2.

4 METODOLOGÍA

- Universo: *Plasmodium vivax*.
- Población: Genes de las proteínas expresadas por esporozoítos de *Plasmodium vivax*.
- Muestra: El gen *pvtrap* que codifica para la proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP) expresada por esporozoítos de *Plasmodium vivax*.

TIPO DE ESTUDIO

Estudio cuasi experimental en laboratorio, puro y explicativo.

VARIABLES

Variable Dependiente: Actividad de unión del ectodominio de la proteína PvTRAP

Variable Independiente:

- Receptores disponibles sobre una línea celular hepática ATCC® HB-8065

Variables controladas:

- Número de células transfectadas
- Tiempo de expresión
- Temperatura de expresión
- Concentración de los plásmidos recombinantes
- Concentración de la proteína recombinante.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño de cebadores

La secuencia de nucleótidos del gen *pvtrap* (PVX_082735) reportada en PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/>) fue utilizada como plantilla para el diseño de cebadores que cubran la secuencia específica del gen *pvtrap* y de sus dominios funcionales (von Willebrand y trombospondina-TSR) (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para la amplificación de <i>pvtrap</i>		
Proteína	Nombre del cebador	Secuencia
<i>PvTRAP</i>	<i>pvtrap</i> -Directo-Bacu	CG GGATCC CTGACGAAAAGGTTGTGGACG
	<i>pvtrap</i> -Reverso-Bacu	GC TCTAGA TTTTGTAGCCATTATTTGATGA
<i>PvTRAP-vW-TSR</i>	<i>pvtrap</i> -Directo-Bacu	CG GGATCC CTGACGAAAAGGTTGTGGACG
	<i>pvtrap-vW-tsr</i> -Reverso-Bacu	GC TCTAGA TCAGAGGCTCAGGTTCCAC

Durante el diseño de cebadores se excluyó la región que codificaba para el péptido señal (residuos en aminoácidos 1-24) y se excluyó la región que codifica para la región transmembranal (residuos en aminoácidos 494-516), para evitar problemas en el sistema de expresión. Al extremo 5' de cada cebador directo se adicionó el sitio de restricción para la enzima BamHI (en negrita) mientras que para el cebador reverso se adicionó el sitio para la enzima XbaI (en negrita). Pares de bases adicionales de apoyo fueron incluidas al extremo 5' de cada cebador para permitir un corte enzimático eficiente (tabla 1).

4.2. Amplificación de dos regiones del gen *pvtrap* por reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de la región que codifica para el ectodominio de *PvTRAP* y el fragmento que codifica para el dominio Von Willebrand y TSR se realizó mediante PCR con la enzima de alta fidelidad Hifi Hot Start (Kapa Biosystems) utilizando como plantilla ADN genómico (ADNg) proveniente de la cepa *Vivax* Colombian Guaviare-1 (VCG-1) (figura 3). Brevemente, se hicieron reacciones de 25 µl que contenían 12,5 µl de la enzima [1U/µl], 7,5 µl de agua libre de nucleasas, 1,5 µl de cada cebador [5µM] y 2 µl de ADNg. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de denaturación inicial a 95°C durante 3 min, 35 ciclos de 98°C por 20 seg, 58°C durante 30 seg y 72°C por 1 min y un ciclo final de 72°C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1% y fueron purificados con el kit DNA Clean & concentrator (Zymo Research), siguiendo las indicaciones del fabricante.

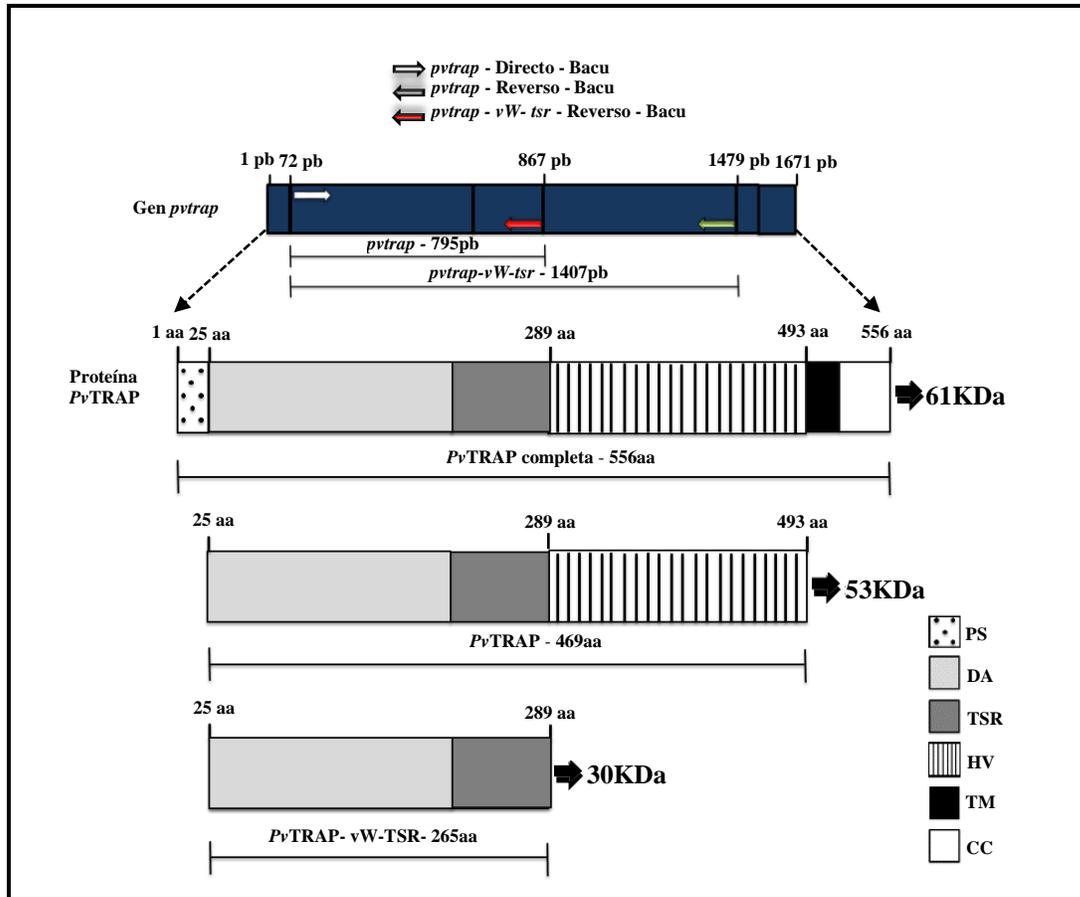


Figura 3. Representación esquemática del gen *pvtrap*, la proteína PvTRAP y los respectivos dominios que la conforman. El gen *pvtrap* de único exón que codifica para la proteína PvTRAP se encuentra en azul oscuro y las flechas (blanca, roja y verde) indican la localización de los cebadores sobre este. Los cebadores *pvtrap*-Directo-Bacu y *pvtrap*-Reverso-Bacu (flechas blanca y verde) amplifican desde el dominio A hasta la región hipervariable (1407 pb que codifican para un polipéptido de 53kDa); y los cebadores *pvtrap*-Directo-Bacu y *pvtrap*-vW-tsr-Reverso-Bacu (flechas blanca y roja) amplifican el dominio A y el dominio relacionado con trombospondina (795 pb que codifican para un polipéptido de 30 kDa). En ambos casos los productos de amplificación excluyeron la región que codifica para el péptido señal, la región transmembranal y la cola citoplasmática. Las flechas punteadas conducen a partir del gen codificante al polipéptido expresado con sus dominios: el péptido señal (PS) se muestra en blanco punteado, el dominio von Willebrand (dominio A) en gris claro, el dominio relacionado con trombospondina (TSR) en gris oscuro, la región hipervariable (HV) en blanco con líneas verticales, el dominio transmembranal (TM) en negro y la cola citoplasmática (CC) en blanco.

4.3. Clonación de los productos amplificados *pvtrap* y *pvtrap-vW-tsr*

431. Tratamiento enzimático de los productos amplificados (*pvtrap*, *pvtrap-vW-tsr*) y del vector pFASTBac-HT-C

Se realizó tratamiento enzimático de cada uno de los productos amplificados y del vector pFASTBac HT-C (Invitrogen). Brevemente, 20µL del vector : producto purificado, fue incubado con 1.5 µl de enzima XbaI (New England, Biolabs) y 1.5 µl de Buffer Cut Smart durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se adiciono 1 µl de la enzima BamHI (New England, Biolabs) y se incubó durante 30 min a 37°C. Los productos y el vector, tratados enzimáticamente se purificaron con el kit DNA Clean & concentrator (Zymo Research).

432. Ligación de los genes *pvtrap* y *pvtrap-vW-tsr* en el vector pFASTBac-HT-C y transformación en células *E. coli* TOP10 competentes.

Cada uno de los fragmentos tratados (*pvtrap* y *pvtrap-vW-TSR*) fueron ligados en el vector pFASTBac-HT-C. Para esto se utilizó 1 µl de enzima ADN ligasa T4 (PROMEGA), 5 µl de buffer, 100ng/µl del ADN y 80ng/µl del vector y se dejó incubando toda la noche a 16°C.

Para la transformación se utilizaron 50 µl de células *E. coli* TOP10 competentes, 100 µl de KCM (KCl [0,5M], CaCl₂ [0,15M], MgCl₂ [0,25M]) y 3 µl de la ligación y se incubó durante 30 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron sometidas a choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se incubó 2 minutos a 4°C, después se adicionaron 250 µl de SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl [10mM], KCl [2,5mM], MgSO₄ [10mM], MgCl₂ [10mM], glucosa [20mM]) y se incubó 1 hora a 37°C en agitación constante. Luego de la incubación se plaquearon 100µL de la transformación en cajas de Petri que contenían agar Luria Bertani con ampicilina [100µg/ml] como antibiótico de selección. Las cajas fueron incubadas durante 18 horas a 37°C y se seleccionaron las colonias grandes y aisladas.

433. Análisis de colonias recombinantes mediante PCR y tratamiento enzimático

- **PCR**

La presencia del inserto se verificó en 5 colonias recombinantes de cada ligación mediante PCR. Para esto se utilizó la enzima GoTaq MDx [5U/ μ l] (PROMEGA) en un volumen de reacción final de 10 μ l que contenía buffer [10X], agua libre de nucleasas, MgCl₂ [25mM], dNTPs [1,25mM] y cebadores [5 μ M] específicos de los productos (tabla 1). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de denaturación inicial a 95°C durante 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C durante 30 seg, 72°C por 1 min y un ciclo final de 72°C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1%. Se seleccionaron las colonias positivas y se hizo extracción del plásmido recombinante con el kit de purificación Zyppy plasmid miniprep (Zymo Research), siguiendo las indicaciones del fabricante.

- **Tratamiento enzimático**

Para confirmar la correcta orientación del inserto en el vector, el plásmido recombinante pFastBac-pvtrap fue tratado con la enzima PstI (New England, Biolabs), mientras que el plásmido pFastBac-pvtrap-tsr fue tratado con la enzima KpnI (New England, Biolabs). La selección de las enzimas de restricción se hizo teniendo en cuenta, que estas cortaran dentro y fuera del inserto. Brevemente se usaron 1,5 μ l de la enzima, 1,5 μ l de buffer y 100 ng/ μ l del plásmido y se dejó incubando toda la noche a 37°C. Los productos se visualizaron mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1%.

Se enviaron a secuenciar tres plásmidos de cada fragmento mediante secuenciación por Sanger a Macrogen, utilizando los cebadores pFastBac-Forward y pFastBac-Reverse. Los electroferogramas se analizaron con el programa CLC DNA Workbench.

4.4. Generación de b́acmidos recombinantes en ćelulas *E. coli* DH10Bac competentes

Para la generaci3n de b́acmidos recombinantes, se utilizaron los pĺasmidos recombinantes confirmados por secuenciaci3n y tratamiento enzimático. Para esto, 100 µl de ćelulas *E. coli* DH10Bac competentes (contienen ADN vírico y un pĺasmido auxiliar) se mezclaron con 5 µl del pĺasmido recombinante y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las ćelulas fueron sometidas a choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se incubó 2 minutos a 4°C, después se adicionaron 900 µl de SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl [10mM], KCl [2,5mM], MgSO₄ [10mM], MgCl₂ [10mM], glucosa [20mM]) y se incubó durante 4 horas a 37°C en agitaci3n constante. Luego de la incubaci3n, se plaquearon 100 µl de la transformaci3n sobre cajas de Petri que contenían agar Luria Bertani con Kanamicina [50 µg/ml], Gentamicina [7 µg/ml], Tetraciclina [10 µg/ml], IPTG [40 µg/ml] y X-gal [100 µg/ml] y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Las colonias blancas fueron seleccionadas y re-sembradas en nuevas cajas de agar Luria Bertani con los antibióticos previamente mencionados.

4.4.1. Análisis de los b́acmidos recombinantes por PCR

Para confirmar la integraci3n de pFastBac-*pvtrap* o pFastBac-*pvtrap-vW-tsr* en el genoma de los b́acmidos se realizaron PCRs sobre las colonias recombinantes utilizando la enzima Mango Taq (Bioline) y los cebadores pUC/M13-Directo (5'CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3') y pUC/M13-Reverso (5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3') proporcionados y sugeridos en el kit de expresi3n de Baculovirus Bac-to-Bac⁴⁹ (Invitrogen). Brevemente, se utilizó un volumen final de 11µL de que contenía 1µl de buffer [5X], 3,4µl de agua libre de nucleasas, 0,5µl de MgCl₂ [50mM], 4µl de dNTPs [5µM] y 1µl de cada uno de los cebadores. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Un ciclo de denaturaci3n a 95°C durante 3 min, y 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C durante 30 seg y 72°C por 30 seg y un ciclo final de 72°C por 5 min. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1%. Los b́acmidos recombinantes obtenidos fueron extraídos con el kit de extracci3n PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) y nombrados como Bac-*pvtrap* y Bac-*pvtrap-tsr*.

4.5. Cultivo de la línea celular de insecto Sf9

El cultivo de la línea celular Sf9 (derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda* ATCC® CRL-1711) se realizó en medio Grace suplementado (L-Glutamina, lactoalbumina y yestolato) con 20% de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvo a 27°C en incubadora humidificada libre de CO₂. Se realizó cambio de medio cada 5 días, con revisión cada 24 horas hasta su uso.

4.6. Transfección de células de insecto Sf9 con los bácmidos recombinantes

Para la transfección se utilizaron cajas de 6 pozos. En cada pozo se sembraron 1.5×10^5 células Sf9 previamente cultivadas en medio Grace suplementado con 20% de SFB sin antibióticos, con viabilidad >95%. Las cajas se incubaron a 27°C por cinco días para permitir la adherencia y crecimiento celular. Una vez las células se adhirieron se retiró el medio y se reemplazó con 2 ml de medio de Grace no suplementado sin antibióticos y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Durante la incubación se preparó para cada pozo una mezcla A que contenía 6 µl de cellfectin (Thermo Fisher Scientific) y 94 µl de medio de Grace no suplementado, seguido de agitación en vortex e incubación de 15 min a temperatura ambiente; adicionalmente se preparó una mezcla B que contenía 10 µl de los bácmidos recombinantes y 90 µl de medio de Grace no suplementado, seguido de agitación en vortex. Luego se mezcló el tubo A sobre el B con agitación constante y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciono la mezcla en cada pozo gota a gota y se incubó a 27°C durante 5 horas; se retiró el medio y se reemplazó con 2 ml de medio de Grace suplementado con 20% de SFB sin antibióticos y se incubó a 27°C en condiciones libres de CO₂ hasta ver signos de infección viral muy tardía. El monitoreo se realizó durante 7 días cada 24 h para identificar los signos de infección temprana (incremento del diámetro celular y del núcleo en un 25-50%), tardía (cese del crecimiento, apariencia granular y desprendimiento) y muy tardía (lisis celular).

4.7. Generación de stocks virales

Una vez que las células mostraron signos de infección muy tardía se recolectó el medio de cada pozo, se transfirió a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó a $500 \times g$ durante 5 minutos para separar las células. El sobrenadante que contenía el stock viral P1 se transfirió a un tubo estéril de 15 ml y se almacenó a 4°C protegido de la luz; mientras que el pellet con las células que contenían la proteína fue tratado con buffer laemmli y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE (ver 4.9.), el gel fue transferido a una membrana de PVDF (polivinilo de flúor) y la presencia de la proteína se observó mediante Western Blot con anticuerpo anti-histidinas (ver 4.10.).

Nuevas células adheridas en cajas de cultivo de 6 pozos fueron infectadas con el stock viral P1 (1×10^6 ufp/ml) a un MOI (multiplicidad de infección) de 0,5 para la generación del stock viral P2 (1×10^7 ufp/ml), que posteriormente se usó para infectar nuevas células adheridas en cajas de cultivo (75 cm^3) a un MOI de 2 con el objetivo de generar el stock viral P3 (1×10^8 ufp/ml) (Figura 4). Las células infectadas se incubaron a 27°C en condiciones libres de CO_2 y una vez que mostraron signos de infección tardía, se recolectó el medio de cada caja, se transfirió a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó a $500 \times g$ durante 5 minutos para separar las células. El sobrenadante que contenía el stock viral se transfirió a un tubo estéril de 15 ml y se almacenó a 4°C protegido de la luz; mientras que las células fueron almacenadas a -20°C para posterior extracción de proteínas recombinantes. El stock viral P3 fue usado para infectar nuevas células bajo las condiciones mencionadas anteriormente y aumentar la expresión de la proteína.

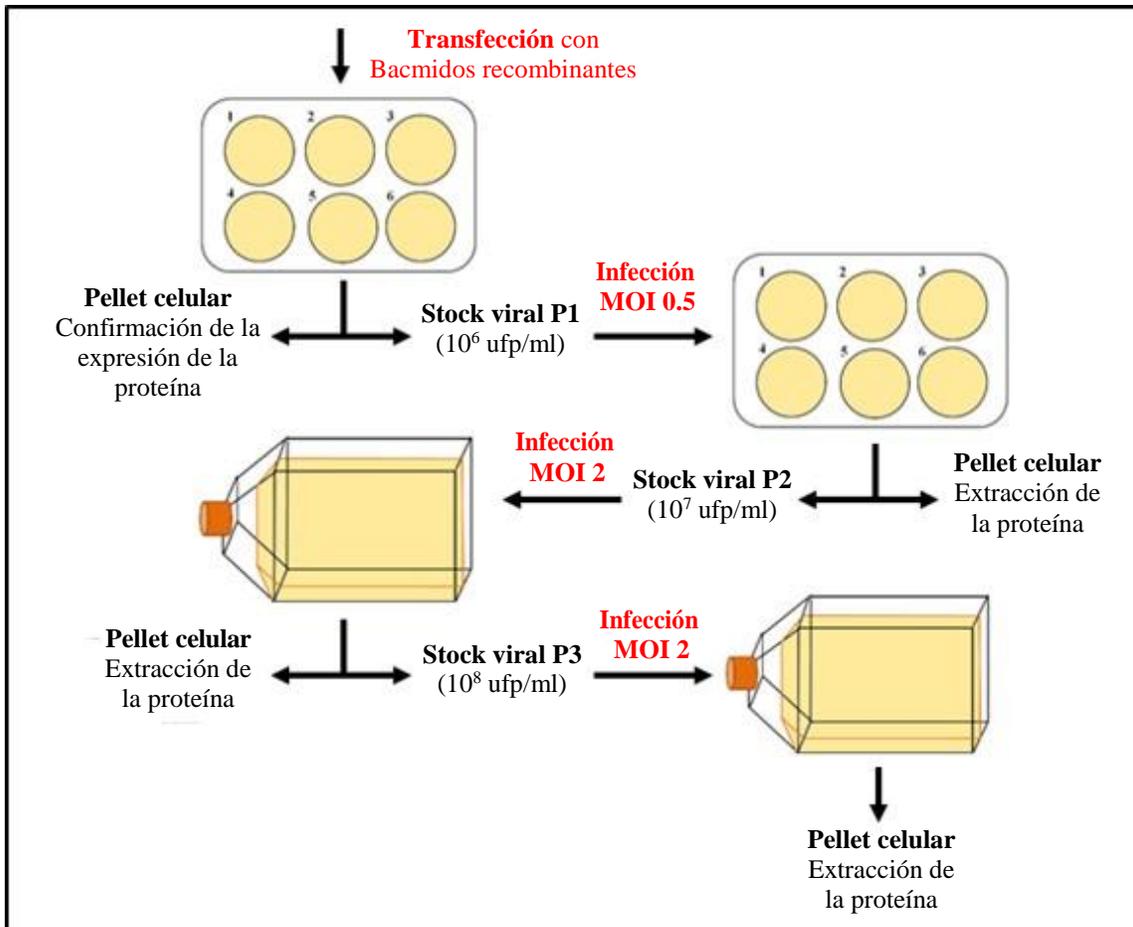


Figura 4. Representación esquemática del proceso para la generación de stocks virales. Inicia con la transfección con bacmidos recombinantes en cajas de 6 pozos, obtención del stock viral P1 (1×10^6 ufp/ml) y confirmación de la expresión de la proteína, seguido de infección con el stock viral P1 a un MOI de 0.5 en cajas de 6 pozos, obtención del stock viral P2 (1×10^7 ufp/ml) y extracción de la proteína; infección con stock viral P2 a un MOI de 2 en cajas de 75 cm^3 , obtención del stock viral P3 (1×10^8 ufp/ml) y extracción de la proteína finalizando con infección con stock viral P3 a un MOI de 2 en cajas de 75 cm^3 y extracción de la proteína. MOI: Multiplicidad de infección.

4.8. Extracción de la proteína

A partir de la infección con los stocks virales 2 y 3 se recolecto el medio de cada caja en tubos de 15 ml y se centrifugó a $500 \times g$ durante 5 minutos, el pellet se trató con buffer de lisis (Tis-Hcl [50mM] pH: 7.5, NaCl [0.5M], Nonidet P-40 0.5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo [1mM], iodacetamida [1mM], EDTA [1mM], leupeptina [1 $\mu\text{g/ml}$]); seguido de incubación en hielo por 30 min. Posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico en agua a temperatura de

ebullición durante 5 minutos, seguido de hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. Las proteínas extraídas fueron separadas por SDS-PAGE (ver 4.9), el gel fue transferido a una membrana de PVDF y la presencia de la proteína se observó mediante Western Blot con anticuerpo anti-histidinas (ver 4.10.).

4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas por SDS-PAGE se preparó un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4% que contenían agua destilada, Tris-HCl 1.5M (pH 8.8), dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, acrilamida/Bis 30%, persulfato de amonio (APS) 10% y la reacción fue polimerizada con TEMED; el gel separador se dispuso en un molde de vidrio de 0.75mm seguido de 100 µl de isopropanol (IPA); una vez gelificado se retiró el IPA, se agregó al molde el gel concentrador y se incorporó peine para marcar los pozos. Posteriormente se retiró el peine, se limpiaron los pozos y el molde se pasó a cámara para electroforesis (BIORAD) con buffer de corrido pH 8.3 (Tris 0.25M, glicina 2M, 1% de SDS). Las proteínas se trataron con buffer laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6.8, 25% glicerol, 10% SDS, 0.5% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) en relación 1:3, se calentaron durante 5 min a temperatura de ebullición y se separaron en el gel.

4.10. Western Blot

Una vez las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE el gel fue transferido a una membrana de polivinilidenedifloride (PVDF) en cámara de transferencia (BIORAD). Posteriormente la membrana fue lavada con buffer fosfato salino (PBS) que contenía tween al 0.05% durante 5 min (3 veces) y bloqueada con leche al 5% en PBS-tween al 0.05% a temperatura ambiente en agitación constante durante 1 hora, seguido de lavado con PBS-tween al 0.05% durante 5 min (3 veces); después se incubó con anticuerpos anti-histidinas a una dilución 1:4500 a temperatura ambiente con agitación constante durante 1 hora, se lavó con PBS-tween al 0.05% durante 5 min

(3 veces) y finalmente la presencia de la proteína se reveló con Kit de sustrato de peroxidasa (VECTOR).

4.11. Purificación de la proteína

La proteína recombinante fue sometida a cromatografía de afinidad utilizando el equipo de purificación ÄKTA™ START con el software de control UNICORN start versión 7.0. Brevemente se utilizó una columna His Trap™ FF de 1 ml y se lavó con buffer A pH 7.4 (20 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄), luego se pasó la proteína por la columna para la unión a la resina, seguido de un lavado con tritón al 0.1% en buffer A y finalmente se llevó a cabo una elución isocrática con 100% de buffer B pH 7.4 (500 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄), en 5 volúmenes de columna (VC) y adicionalmente se recolectó la fracción final.

4.12. Diálisis

La proteína se dializó empleando una membrana semipermeable que permitiera el intercambio entre el Buffer B en el que quedó disuelta la proteína, y PBS 1X. Brevemente la proteína purificada se dispuso dentro de la membrana cerrada por ambos lados y posteriormente fue sumergida en PBS 1X filtrado, a 4°C en agitación leve; se realizó cambio de PBS 1X cada 4 horas durante 48 h. Una vez dializada, la proteína fue concentrada con polietilenglicol, luego se extrajo de la membrana y finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.13. Ensayo de unión de la proteína rPvTRAP a línea celular hepática ATCC® HB-8065

Células HepG2 (derivadas de un carcinoma hepatocelular; ATCC® HB-8065) fueron cultivadas hasta obtener una confluencia del 70-80%. Posteriormente las células fueron despegadas y lavadas en PBS 1X y el porcentaje de viabilidad fue evaluado mediante azul de tripan.

Brevemente, se incubaron 25µg de rPvTRAP con 2×10^6 de células HepG2 durante toda la noche a 4°C en constante agitación. Luego la proteína no unida fue removida mediante centrifugación y las células fueron lavadas con PBS 1X con 0,5% de albúmina sérica bovina. Para visualizar la interacción célula-proteína, se adicionó un anticuerpo anti-histidinas conjugado con APC (Allophycocyanin) durante 20min a temperatura ambiente en agitación constante seguido de incubación con yoduro de propidio (Thermo Fisher) como marcador de viabilidad, como control negativo se usaron células HepG2 sin proteína y se adicionó un control del anticuerpo.

El número de células vivas que emitieron fluorescencia fue leído en FACSCanto II (BD Bioscience) y los resultados fueron analizados con el software Flowjo (TreeStar).

5. RESULTADOS

5.1. Generación de los plásmidos recombinantes pFastBac-*pvtrap* y pFastBac-*pvtrap-vW-tsr* en células *E. coli* TOP 10 competentes

El gen *pvtrap* que codifica para la proteína PvTRAP fue amplificado por PCR utilizando cebadores específicos (tabla 1) a partir de ADNg de la cepa Vivax Colombian Guaviare-1 (VCG-1). Se obtuvieron dos fragmentos uno de 795 pb que corresponde a la región que codifica para el dominio funcional von Willebrand y TSR (*pvtrap-vW-tsr*) y otro de 1407 pb que codifica para el ectodominio de la proteína PvTRAP (Figura 5).

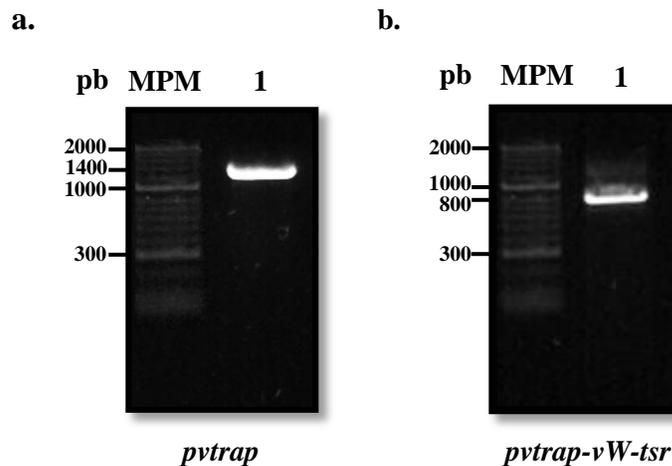


Figura 5. Amplificación del gen *pvtrap* y el dominio *vW-TSR*. Electroforesis en gels de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR a partir de ADNg de la cepa Vivax Colombian Guaviare-1 (VCG-1). (a) Gel de agarosa que mostró el producto de amplificación del gen *pvtrap*. 1 - Fragmento de 1407 pb que corresponde al peso esperado del producto de amplificación (b) Gel de agarosa que mostró el producto de amplificación del gen *pvtrap-vW-tsr*. 1 - Fragmento de 795 pb que corresponde al peso esperado del producto de amplificación. pb: pares de bases; MPM: marcador de peso molecular HyperLadder 50 pb (Bioline).

Estos productos fueron tratados y posteriormente ligados en el vector pFASTBac-HT-C. Este plásmido contiene: 1) una secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas, que se expresa al extremo N-terminal de la proteína de interés; 2) el promotor fuerte de la polihedrina para inducir altos niveles de expresión de la proteína de interés; 3) Dos transposones Tn7L and Tn7R ubicados al 5' y 3' del gen de interés; 4) un gen de resistencia a ampicilina para selección de los plásmidos

recombinantes; 5) un gen de resistencia a gentamicina para selección de los bécidos recombinantes y 6) una señal de poliadenilación del virus SV40 (Figura 6). La ligación fue usada para transformar bacterias TOP10 competentes que se seleccionaron sobre agar LB con ampicilina. Como se muestra en la Figura 7, en el agar crecieron colonias aisladas de color blanco-grisáceo. De allí se seleccionaron cinco colonias para confirmar la presencia y correcta orientación de los fragmentos clonados.

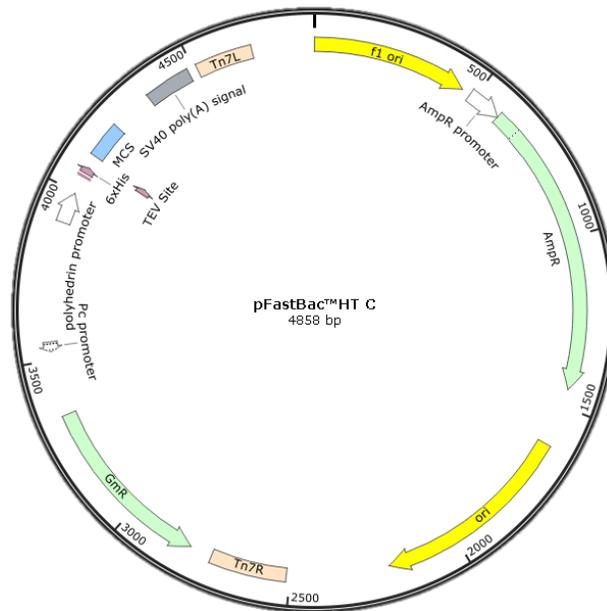


Figura 6. Representación gráfica del vector pFastBac-HT-C. Se observa el vector pFastBac-HT-C de 4858 pb que se encuentra conformado por los orígenes de replicación (f1 ori/ori) en color amarillo, dos genes de resistencia a ampicilina (AmpR) y a gentamicina (GmR) en color verde, dos sitios de transposición (Tn7R y Tn7L) en color rosado, el promotor de polihedrina en color blanco, una secuencia que codifica para una cola de 6xHis en el N-terminal y un sitio de restricción (TEV) en color morado, un sitio de clonaje múltiple en color azul y una señal de poliadenilación (SV40) en gris. Imagen tomada de Snapgene.

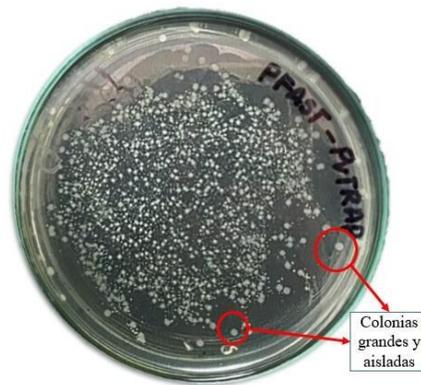


Figura 7. Colonias de células *E. coli* TOP10 competentes transformadas

Ejemplo de las colonias transformadas grandes y aisladas, señaladas en rojo.

Mediante PCR de colonia se amplificó una banda de peso molecular esperado para ambos fragmentos (Figura 8). Para el fragmento que codifica el ectodominio se esperaba una banda de 1409pb mientras que para los dominios vW-TSR una banda de ~ 795pb. De las cinco colonias evaluadas para *PvTRAP* todas fueron positivas para la amplificación del producto esperado, mientras que para los dominios vW-TSR solo cuatro colonias fueron positivas (Figura 8).

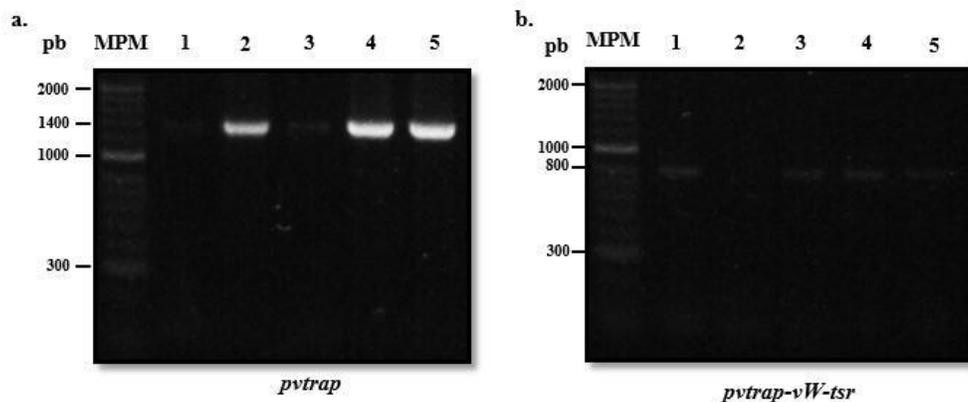


Figura 8. PCR de colonia de *E. coli* TOP10 competente transformada. Electroforesis en gels de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR a partir de colonia transformada (a) 1-5 PCR de colonia transformada con el gen *pvtrap* en el vector pFastBac-HT-C; colonias 1, 2, 3, 4 y 5 positivas. (b) 1-5 PCR de colonia transformada con el gen *pvtrap-tsr* en el vector pFastBac-HT-C; colonias 1, 3, 4 y 5 positivas. Pb: pares de bases; MPM: marcador de peso molecular HyperLadder II (Bioline).

Dos plásmidos recombinantes de cada fragmento (ectodominio o los dominios vW-TSR) fueron purificados y tratados con enzimas de restricción para confirmar la correcta orientación de los insertos. Los plásmidos recombinantes pFastBac-*pvtrap* con un tamaño de 6216pb (4809 pb del vector pFastBac-HT-C + 1407 pb del gen *pvtrap*) fueron tratados con la enzima PstI, mientras que los plásmidos recombinantes pFastBac-*pvtrap-vW-tsr* con un tamaño de 5604pb (4809 pb del vector pFastBac-HT-C + 795 pb del gen *pvtrap-vW-tsr*) fueron tratados con la enzima KpnI. Para los plásmidos pFastBac-*pvtrap* se esperan tres cortes uno al final del inserto y otro fuera del sitio múltiple de clonaje dejando dos fragmentos de 398pb y uno de 5818 pb (Figura 9). Para los plásmidos pFastBac-*pvtrap-vW-tsr* se esperaba la presencia de tres fragmentos de aproximadamente 212pb, 521pb y 4871 pb debido a que la enzima realizaba dos cortes dentro del gen de interés y uno fuera del sitio de clonaje (Figura 9).

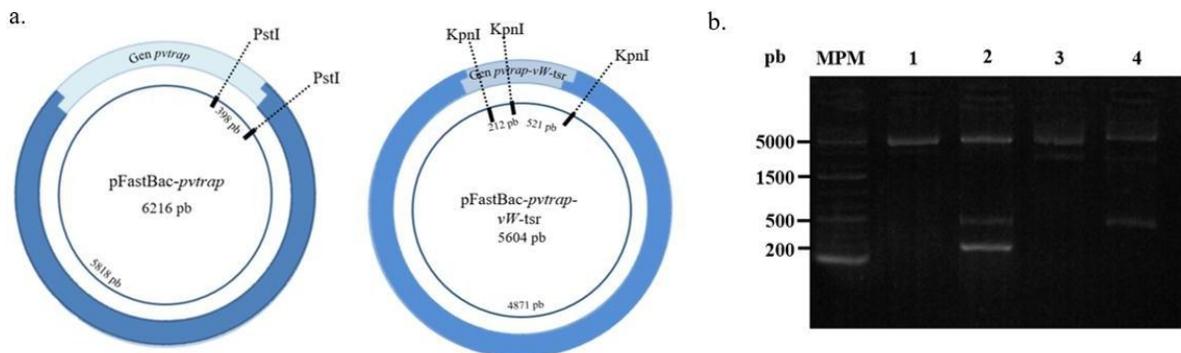


Figura 9. Tratamiento enzimático de los plásmidos recombinantes pFastBac-*pvtrap* y pFastBac-*pvtrap-tsr*. Representación esquemática de los cortes enzimáticos en los plásmidos; izquierda pFastBac-*pvtrap*, el vector pFastBac-HT-C se encuentra representado en color azul oscuro y el gen *pvtrap* de 1407 pb insertado en color azul claro para un tamaño final de 6216 pb con sus respectivos cortes; derecha pFastBac-*pvtrap-tsr* el vector pFastBac-HT-C se encuentra representado en color azul oscuro y el gen *pvtrap-tsr* de 795 pb insertado en color azul claro para un tamaño final de 5604pb con sus respectivos cortes. (b) Electroforesis de los plásmidos tratados; 1- plásmido pFastBac-*pvtrap-tsr* no tratado; 2- plásmido pFastBac-*pvtrap-tsr* tratado enzimáticamente, se obtuvieron 3 fragmentos de 212pb, 521pb y 4871 pb; 3- plásmido pFastBac-*pvtrap* no tratado; 4- plásmido pFastBac-*pvtrap* tratado enzimáticamente, se obtuvieron 2 fragmentos de 398pb y 5818 pb. Pb: pares de bases; MPM: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Una vez obtenidos los datos de la confirmación de la presencia y correcta orientación de los plásmidos recombinantes seleccionados, se extrajo al ADN plasmídico de cada uno y se obtuvo la secuencia mediante la técnica de Sanger (Macrogen). Se obtuvieron electroferogramas con picos definidos que permitieron obtener con un alto grado de certeza la secuencia a nivel de nucleótidos y de proteína de los fragmentos de *pvtrap* amplificados de la cepa VCG1 de *Plasmodium vivax* (Figura 10). La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos obtenidos fueron alineados con las cepas de referencia de *P. vivax* denominadas Sal-1 y PvP01 (Figura 11-Anexo 1). Los alineamientos muestran que nuestra secuencia (VCG-1) no presentó ningún cambio a nivel de aminoácidos (Figura 11) ni de nucleótidos con la cepa Sal-1. Sin embargo al compararla con la reciente cepa secuenciada PvP01, se encontraron cambios a nivel de aminoácidos que son descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios en la secuencia de aminoácidos de la PvTRAP entre la cepa VCG-1 y PvP01

Número	Aminoácido	Cepa
122	Treonina	VCG-1
	Serina	PvP01
124	Treonina	VCG-1
	Serina	PvP01
162	Valina	VCG-1
	Isoleucina	PvP01
168	Arginina	VCG-1
	Treonina	PvP01
174	Asparagina	VCG-1
	Lisina	PvP01
188	Valina	VCG-1
	Isoleucina	PvP01
208	Prolina	VCG-1
	Treonina	PvP01
270	Lisina	VCG-1
	Glicina	PvP01
338	Glicina	VCG-1
	Arginina	PvP01
412	Asparagina	VCG-1
	Lisina	PvP01
476	Ácido glutámico	VCG-1
	Alanina	PvP01

5.2. Generación de b́acmidos recombinantes en ćelulas *E. coli* DH10Bac competentes

Una vez confirmados los pĺasmidos pFastBac-*pvtrap* y pFastBac-*pvtrap-vW-tsr*, se generaron b́acmidos recombinantes mediante transformaci3n en ćelulas *E. coli* DH10Bac competentes; estas ćelulas contienen un vector lanzadera (b́acmido) con un sitio blanco de transposici3n denominado “mini-attTn7” y un vector ayudador el cual supe las protéinas de transposici3n. La generaci3n de b́acmidos ocurri3 gracias a la transposici3n espećfica entre el elemento mini-Tn7 presente en el vector pFastBac y el sitio objetivo mini-attTn7 localizado en el b́acmido mediado por las protéinas de transposici3n. Si la transposici3n ocurre, se bloquea la expresi3n del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa y que se encuentra localizado en el sitio de transposici3n. A nivel fenot́ipico se puede evidenciar en el crecimiento de colonias de color blanco; si la transposici3n no ocurre, el gen *lacZ* se expresa y es capaz de hidrolizar el sustrato (X-gal) presente en el medio y como consecuencia se obtienen colonias de color azul (Figura 12).

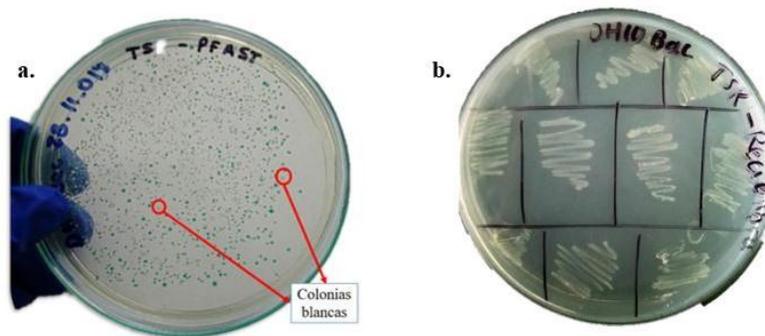


Figura 12. Colonias de *E. coli* DH10Bac transformadas. Foto obtenida de las bacterias transformadas con el vector pFastBac-*pvtrap-vW-tsr*. (a) Crecimiento de las colonias transformadas sobre agar LB suplementado con antibióticos, X-gal e IPTG. El IPTG se utiliz3 para inducir la transcripci3n del gen de la β -galactosidasa mientras que el X-gal se us3 como sustrato de la enzima. Se observ3 un abundante crecimiento de colonias de color azul y blanco. (b) A partir del crecimiento bacteriano obtenido en a, se seleccionaron 10 colonias blancas y se re-sembraron en un agar con la misma suplementaci3n. Se observ3 que todas las colonias seleccionadas son de color blanco, lo que indica una exitosa transposici3n.

Se seleccionaron 5 colonias blancas y se confirm3 la presencia del gen mediante PCR usando los cebadores pUC/M13-Directo y reverso (ver 4.4.1). El peso del b́acmido recombinante fue

calculado sumando el peso del bacmido con la transposición del plásmido pFastBac-HT-C (2430 bp) más el peso del inserto; por lo tanto el peso del bacmido esperado para *pvtrap* fue de 3837 bp y para *pvtrap-tsr* fue de 3225 (Figura 13).

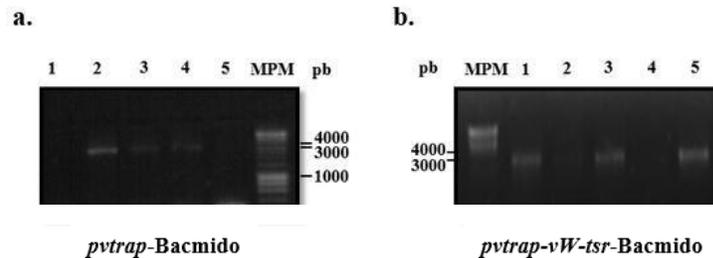


Figura 13. PCR de colonia de *E. coli* DH10Bac competente transformada. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR a partir de las colonias blancas transformadas (a) 1-5 PCR de colonia de bacterias transformadas con el plásmido pFastBac-*pvtrap*; colonias 2, 3 y 4 positivas (b) 1-5 PCR de colonia de bacterias transformadas con el plásmido pFastBac-*pvtrap-vW-tsr*; colonias 1, 2, 3 y 5 positivas. Pb: pares de bases; MPM: marcador de peso molecular HyperLadder I (Bioline)

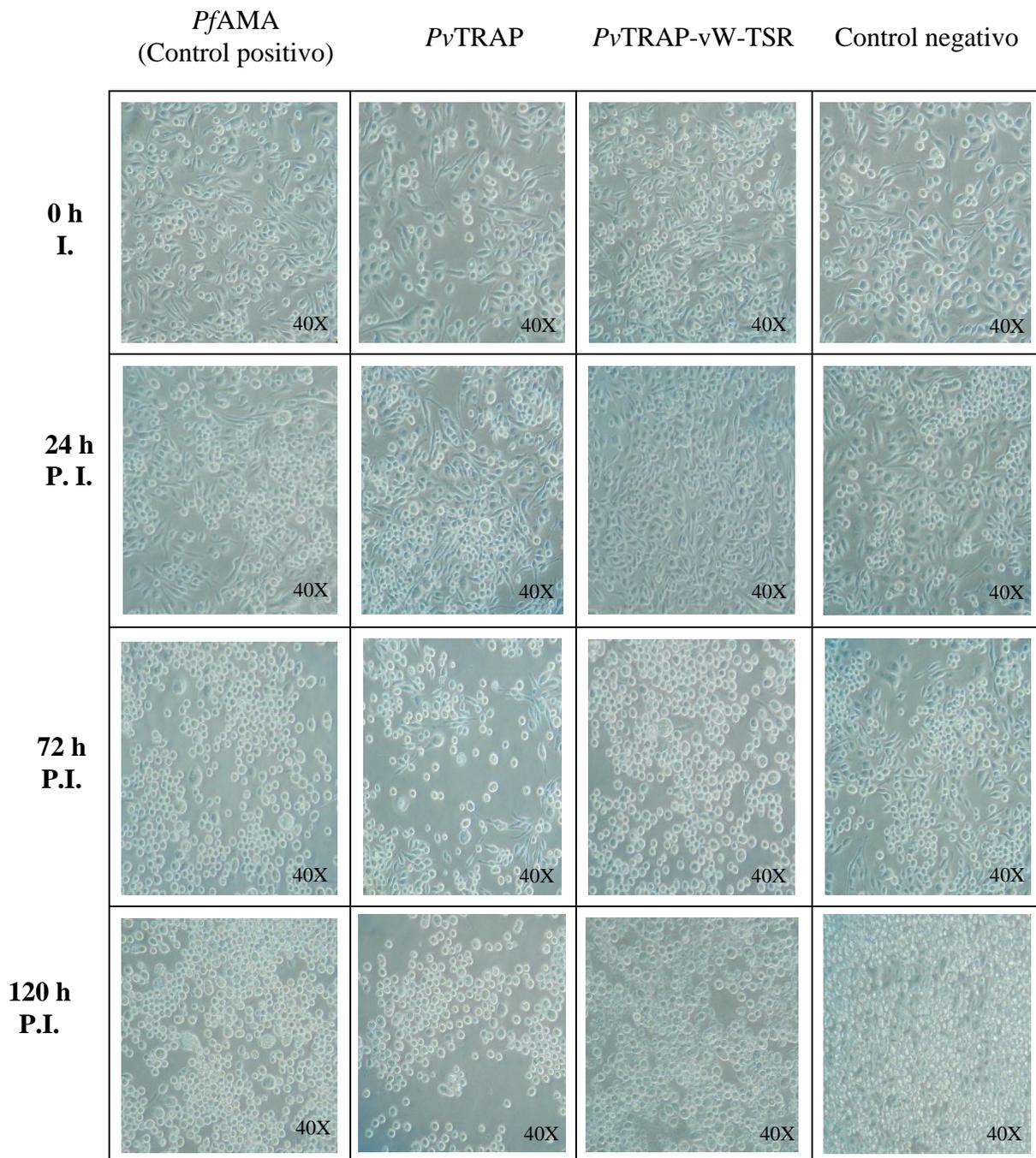
A las colonias positivas confirmadas por PCR se les realizó extracción de los báculos recombinantes y fueron nombrados Bac-*pvtrap* y Bac-*pvtrap-vW-tsr*.

5.3. Células Sf9 derivadas de *Spodoptera frugiperda* expresan exitosamente la proteína PvTRAP y PvTRAP-vW-TSR

Los bacmidos recombinantes Bac-*pvtrap* y Bac-*pvtrap-vW-tsr* fueron transfectados en la línea celular Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda* donde la proteína se expresó bajo el control del promotor de la polihedrina (proteína encargada de generar los virus ocluidos).

Las células presentaron efecto citopático que varió con el tiempo post-infección. Se presentaron signos de infección viral temprana, tardía y muy tardía. La infección temprana se dio entre las primeras 48 horas donde se evidenció un crecimiento entre el 25 y el 50% del diámetro celular y nuclear debido a la replicación del genoma viral, seguido de un cese en el crecimiento, apariencia granular y desprendimiento entre las 48h y las 120 h post infección debido al inicio de la expresión de las proteínas virales, ensamblaje y gemación de la partícula viral, que continuó con la expresión tardía del gen de interés bajo el control del promotor de la polihedrina y muerte celular entre las 120 h y 168 h post infección. Los cambios morfológicos y de densidad más

evidentes se dieron luego de las 72 h cuando el virus ya se encuentra en la expresión de las proteínas junto al ensamblaje de la partícula viral (figura 14).



168 h
P.I.

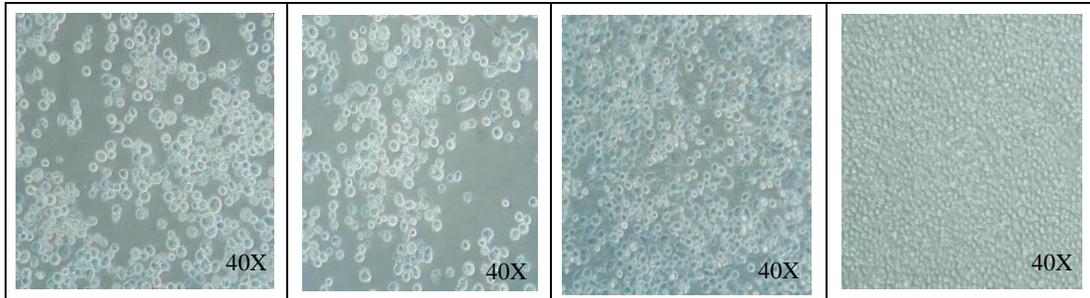


Figura 14. Efecto citopático en células Sf9 infectadas con Baculovirus recombinante. Se observa un cambio en la morfología (aumento del tamaño, apariencia granular y signos de lisis) y una disminución en la densidad celular con el paso de las horas después de la infección, las células no infectadas (control negativo) presentan un cambio de morfología de alargada a redonda debido a su continuo crecimiento y espacio limitado. P.I.: Post-Infección; I: Infección; h: hora.

Posterior a la infección, la presencia de la proteína se confirmó tratando las células con buffer laemmlii y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE. La visualización de la proteína fue posible por Western Blot (ver 4.10) utilizando anticuerpo Anti-Histidinas que se unió a la cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. Se obtuvo una banda de ≈ 75 kDa correspondiente al ectodominio PvTRAP (nombrada como rPvTRAP) y una banda de ≈ 40 kDa correspondiente a el dominio vW y TSR (nombrada como rPvTRAP-TSR) (Figura 15).

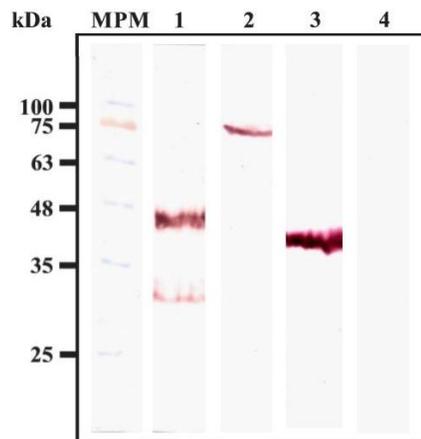


Figura 15. Expresión de rPvTRAP y rPvTRAP-vW-TSR. Western Blot de la expresión de rPvTRAP y rPvTRAP-TSR. 1. Control positivo: expresión en baculovirus de un fragmento de la proteína PfAMA; 2. Expresión de rPvTRAP con un peso ≈ 75 kDa; 3. Expresión de rPvTRAP-TSR con un peso ≈ 40 kDa, 4. Control negativo: Células Sf9 transfectadas sin vector. MPM: Marcador de peso molecular BLUEstain Protein Ladder.

Una vez se confirmó la expresión de rPvTRAP, la proteína fue extraída de los cuerpos de oclusión utilizando buffer de lisis (ver 4.9) y fue purificada empleando una resina de Ácido

Nitriloacético-Niquel (Ni-NTA) a la que se unió la cola de histidinas de la proteína y posteriormente se eluyó con imidazol. Se realizó Dot Blot y Western Blot para confirmar la presencia y peso de la proteína purificada. (Figura16)

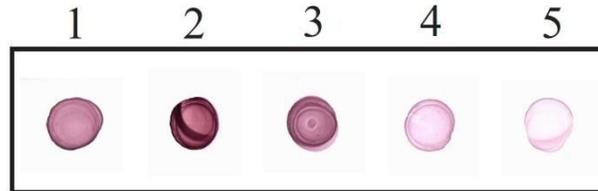


Figura 16. Purificación de rPvTRAP. Dot Blot de la purificación, 1-5 fracciones de rPvTRAP purificada, las fracciones 1, 2 y 3 presentan mayor concentración de la proteína.

Para confirmar la presencia de una única banda luego de la purificación, las fracciones con la mayor cantidad de proteína se unieron y se realizó tinción con azul de coomassie, donde se observó una única banda correspondiente a rPvTRAP (Figura 17)

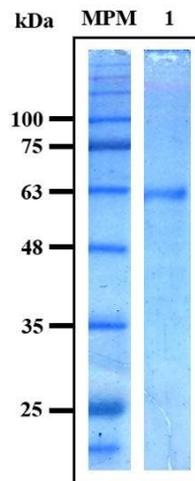


Figura 17. Pureza de rPvTRAP. Tinción de coomassie. 1- se observa una única banda de 63 kDa correspondiente a rPvTRAP. MPM: Marcador de peso molecular BLUEstain Protein Ladder.

5.4. La rPvTRAP se une a la línea celular hepática ATCC® HB-8065

La actividad de unión se realizó sobre células de origen hepático que corresponden a las células blanco de *Plasmodium*. Del total de eventos obtenidos el 94% correspondían a células vivas (viabilidad celular monitorizada con PI). Sobre estas células se encontró que la proteína se unía a las células hepáticas alrededor de un 6.15% (Figura 18).

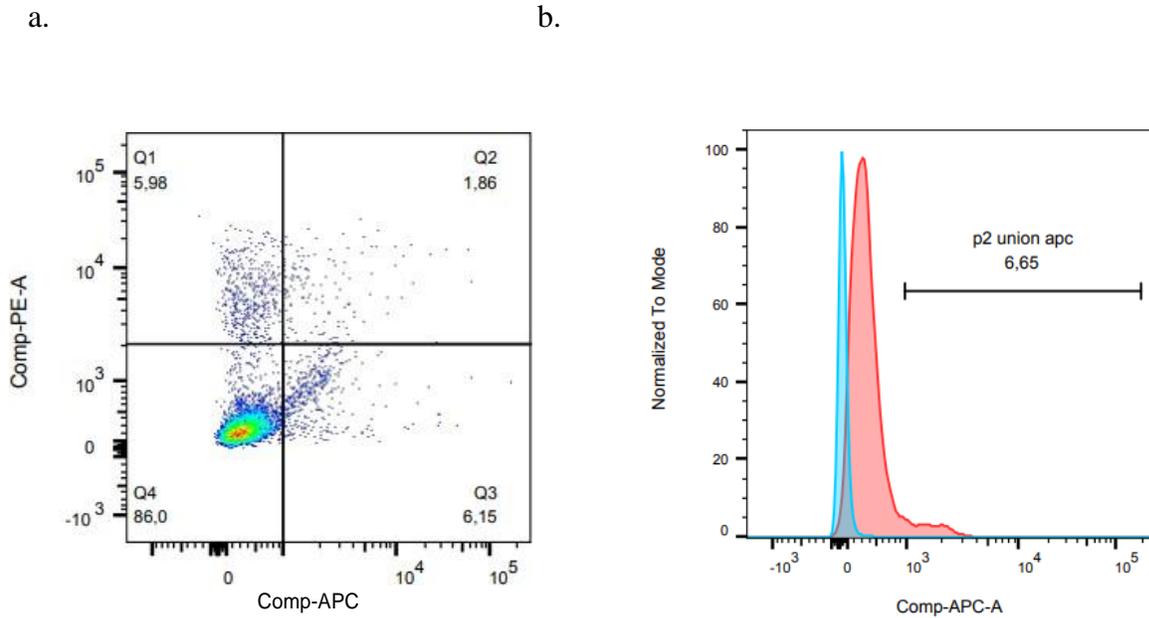


Figura 18. Unión de rPvTRAP a HepG2 cells medido por citometría de flujo de unión (a) Dot plot de la unión de la proteína a hepatocitos, en el eje de las abscisas se muestra la señal obtenida con al anticuerpo anti-histinas acoplado al fluorocromo APC mientras que, en el eje de las ordenadas se muestra la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio, Q1= Células muertas (5.98%), Q2= Células muertas con anticuerpo antihistidinas unido, que correspondió solo al 1.86%, Q3= Células vivas con anticuerpo antihistidinas unido, que corresponde a la unión total de la proteína a las células hepáticas (6.15%), Q4= Células vivas (86.0%). b. Histograma de la unión de la proteína a hepatocitos. Se muestra la sobreposición de la señal emitida de células HepG2 sin proteína (color aguamarina) y las células en presencia de proteína recombinante (color rojo). Un desplazamiento hacia la derecha respecto al control negativo indica interacción proteína-célula.

DISCUSIÓN

El proceso de invasión de los apicomplexa está mediado por la interacción entre las proteínas presentes en la superficie de los diferentes estadios parasitarios durante el ciclo de vida y receptores en la superficie de las células diana; convirtiendo a dichas interacciones en un punto clave en el desarrollo de vacunas o medicamentos contra malaria. Como se ha descrito anteriormente la proteína TRAP en especies como *P. falciparum* es una de las proteínas más importantes del esporozoito por ser necesaria para que se de la invasión a los hepatocitos, siendo este el primer paso en el establecimiento de la infección.³⁰ TRAP es una proteína conservada en los parásitos apicomplexa, que se caracteriza por la presencia de uno o más dominios de repetición de trombospondina tipo I (TSR) y/o un dominio A similar al Factor von Willebrand, además de un dominio de cola citoplasmática con un residuo de triptófano subterminal que cumple un papel importante en la localización de la proteína en los micronemas y en la invasión al permitir la conexión con el motor actina miosina del parásito.⁵⁰

Se han descrito proteínas presentes en *Plasmodium* como CSP que comparten dominios funcionales con TRAP, así como también sus homólogos en otros apicomplexa como la proteína micronemal 2 en *Toxoplasma gondii* (TgMIC2), la proteína micronemal 2 en *Neospora caninum* (NcMIC2), la proteína adhesiva relacionada con TSP en *Cryptosporidium* (TRAP-C1), la proteína micronemal-1 en *Eimeria tenella* (EtMIC1) y la proteína anónima relacionada con trombospondina en *Babesia bovis* (BbTRAP) y *Babesia gibsoni* (BgTRAP); que también cumplen un papel importante en la invasión a sus células diana.⁵⁰

A pesar de los avances en el estudio de estas y demás proteínas el panorama en el desarrollo de una vacuna contra *Plasmodium vivax* se ha visto retrasado en comparación con *Plasmodium falciparum*, esto debido principalmente a que *Plasmodium vivax* presenta características biológicas particulares, como el desarrollo de hipnozoitos en el hígado y su preferencia a invadir exclusivamente eritrocitos inmaduros (reticulocitos). Esto último se ha convertido en un gran obstáculo en el mantenimiento de un cultivo continuo *in vitro* estandarizado debido a que estas células son frágiles, de maduración rápida y representan solo del 1-2% del total de glóbulos rojos

de sangre periférica humana en un adulto, resultando difícil su obtención.⁵¹ Adicionalmente, los estudios en *Plasmodium vivax* son menos por ser una especie con bajas tasas de mortalidad en comparación con *P. falciparum*. Sin embargo *P. vivax* tiene una alta tasa de morbilidad que tiene como consecuencia la incapacidad del paciente para desempeñarse en sus actividades cotidianas y que se ve reflejado en su desarrollo y calidad de vida como individuo y que representa un problema para la sociedad. Por otro lado, se conoce poco acerca de los estadios extraeritrocitarios debido en gran parte a la ausencia de un sistema conveniente para cultivar estas etapas *in vitro* y la ardua y costosa obtención de una colonia de mosquitos que permita el desarrollo de esporozoítos, además de las implicaciones que representa el desarrollo de hipnozoítos en estudios de inhibición del desarrollo del parásito en el hepatocito.

Por consiguiente, desde que en 1977 Itakura y colaboradores⁵² expresaron por primera vez con éxito una hormona de mamífero en *E. coli*, el uso de sistemas heterólogos para la expresión de proteínas recombinantes se convirtió en la mejor alternativa para estudios de estructura y función de proteínas *in vitro* de una manera más sencilla. Es por esto, que el presente estudio tuvo como objetivo la generación de la proteína anónima relacionada con trombospondina de *Plasmodium vivax* recombinante (rPvTRAP) que posteriormente se incubo con células hepáticas para evaluar su interacción y así comprender más a cerca del proceso de invasión del esporozoito y el papel que cumple esta proteína en una especie de *Plasmodium* que afecta significativamente la salud de países latinoamericanos y sudasiáticos como lo es *P. vivax*.

Dentro de los métodos utilizados en este estudio se encuentra la expresión de la proteína rPvTRAP utilizando el sistema de expresión de Baculovirus. A pesar de que los sistemas de expresión procarióticos presentan ventajas frente al sistema de Baculovirus por su rápida tasa de crecimiento, costo relativamente bajo y facilidad de manipulación genética, estos sistemas no pueden realizar las modificaciones postraduccionales como glicosilación, acilación, fosforilación y formación de enlaces disulfuro requeridas para el plegado adecuado de la proteína en su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, alterando su función biológica.⁵³ En contraste, el sistema de expresión de Baculovirus tiene ventajas como la incorporación de genes de gran tamaño, altos niveles de expresión proteica utilizando promotores como el de la polihedrina y la

capacidad de realizar modificaciones postraduccionales con un correcto plegamiento de la proteína y una conformación muy similar a la nativa, lo que permite asegurar condiciones *in vitro* con una proteína funcional lo más cercanas a las que se dan *in vivo* en el parásito.^{40,44,45}

En este estudio se logró obtener baculovirus recombinantes a través de un proceso de doble transformación celular. En un primer paso se obtuvo un vector que contenía el inserto de interés y los elementos necesarios para permitir la generación viral en una segunda bacteria de *E. coli*. Allí la presencia del ADN del báculo, junto a un plásmido ayudador permitió la transposición del inserto dentro del genoma del báculo. El uso del ADN del báculo y de un lípido catiónico permitió el ingreso del ADN viral a las células de insecto para la producción viral. Los virus producidos que incorporaron los genes de *pvtrap* y *pvtrap-vw-ts*r fueron expresados bajo el control del promotor de polihedrina. Una vez las células fueron transfectadas el efecto citopático se presentó después de las 72 horas (figura 11), lo que fue interpretado como una señal de la expresión de la proteína, sin embargo para la estandarización y optimización de la expresión se tuvo en cuenta el inicio de la producción de virus brotantes y el inicio de la expresión de proteínas bajo el control del promotor de polihedrina durante la fase muy tardía que se da entre las 24 y 96 horas post infección⁵⁴, esto permitió la obtención de stocks virales de alto título y un producto recombinante de alta calidad sin presencia de degradación.

El gen *pvtrap* amplificado de 1407 pb (Figura 5b) codificó para un polipéptido correspondiente a la rPvTRAP, que se observó por Western Blot como una única banda de 70 kDa (Figura 12). Aunque el peso molecular esperado del ectodominio completo de PvTRAP es de aproximadamente 53kDa, nosotros encontramos un peso superior al esperado. Previos estudios con PvTRAP expresada en *E. coli* mostraron un peso aproximado de 66kDa. Los mismos resultados han sido reportados para la migración de la proteína PfTRAP, lo que sugiere que, TRAP presenta una migración anómala debido probablemente a su composición proteica. Se ha reportado que la presencia de repeticiones de aminoácidos pueden generar migraciones anómalas en geles de SDS-PAGE. La rPvTRAP purificada se unió a células HepG2 (Figura 14) lo que confirma su función biológica además de la correcta expresión de la proteína. Previos estudios en *P. falciparum* han mostrado que la proteína PfTRAP interactúa con glicoconjugados

presentes en la membrana de la célula hepática. Así mismo se ha descrito que *Pf*TRAP también interactúa específicamente con la Fetuína y con la integrina $\alpha\beta3$ sobre el hepatocito⁵⁵, lo que muestra la capacidad de esta proteína para establecer interacciones de tipo receptor-ligando^{8,11}. En otros Apicomplexa como *Babesia*, se ha reportado que *Bb*TRAP y *Bg*TRAP en *Babesia*, se expresan y localizan en el extremo apical de merozoitos y los anticuerpos dirigidos al ectodominio de *Bb*TRAP inhiben la invasión a eritrocitos *in vitro*.⁵⁰ Nuestros resultados se ajustan con la participación de TRAP de *P. vivax* en su interacción con la célula hospedera que sugiere un correcto plegamiento de la proteína utilizando el sistema de expresión de Baculovirus que fue capaz de realizar modificaciones postraduccionales obteniéndose resultados que concuerdan con los obtenidos por otros autores sobre la unión de TRAP.³²

Finalmente de esta investigación se obtuvo por primera vez la secuencia en ácidos nucleicos y aminoácidos de la *Pv*TRAP de la cepa VCG-1. Esta presentó cambios con una de las cepas de referencia de *P. vivax* denominada *Pv*P01 de origen Asiático. Los cambios obtenidos podrían estar relacionados con la distribución geográfica y con la posible función de distracción inmune como ha sido reportado para otros antígenos en malaria.

Los resultados obtenidos en esta investigación no solo representan un aporte al entendimiento del proceso y mecanismos de invasión del esporozoito de *P. vivax* al hepatocito, también da una idea de los posibles procesos que se dan con los homólogos de la proteína en otros apicomplexa

7. CONCLUSIONES

- El sistema de expresión de Baculovirus permite la expresión de proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales con un correcto plegamiento que le permite a la proteína llevar a cabo su función biológica *in vitro*.
- Las células Sf9 derivadas de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* son adecuadas para la infección con Bacmidos recombinantes, para la expresión de proteínas recombinantes, bajo el control del promotor de la polihedrina.
- La rPvTRAP purificada se une a receptores presentes en la superficie de la línea celular hepática ATCC® HB-8065, confirmando su función biológica e importancia en el proceso de invasión.
- La PvTRAP de la cepa VCG-1 presentó cambios en comparación con una de las cepas de referencia de *P. vivax* denominada PvP01 de origen Asiático, debido posiblemente a la distribución geográfica y a mutaciones que usa para la distracción del sistema inmune en el hospedero.

8 REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud [internet]. [Consultado 14 de Septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. World Health Organization. World Malaria Report 2018 [Internet]. [Consultado 20 de Enero de 2019]. Available in: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/es/>
3. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 [Cited 10 Mar. 2019]; 279(10):9490-6. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676185>
4. Pradel G, Garapaty S, Frevert U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 [Cited 10 Mar. 2019]; 45(3):637-51. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139612>
5. Neghina R, Neghina, AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a Journey in Time: In Search of the Lost Myths and Forgotten Stories. *Am J Med Sci*. [Internet].2010 [Cited 16 Sep. 2018];340(6):492-498. Available in: <https://www.amjmedsci.org>
6. Richards WHG. Vaccination against sporozoite challenge. A review *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* [Internet].1977 [Cited 16 Sep.2018];71(4):279-280. Available in: <https://academic.oup.com>
7. Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, et al. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet*. [Internet]. 1987 [Cited 17 Sep. 2018];6(1):1277-1281. Available in: <https://www.thelancet.com>
8. Müller HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J* [Internet].1993 [Cited 17 Sep. 2018];12(7):2881-2889. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392935>
9. Templeton TJ, Kaslow DC. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. [Internet].1997 [Cited 18 Sep. 2018];84(1):13-24. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041517>
10. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson K, Janse CJ, Bistoni F, et al. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary gland. *EMBO J* [Internet].1999 [Cited 19 Sep. 2018];18(19):5295-5203. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508153>

11. Akhouri RR, Bhattacharyya A, Pattnaik P, Malhotra P, Sharma A. Structural and functional dissection of the adhesive domains of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochem. J* [Internet]. 2004 [Cited 20 Sep. 2018];12(7):815–822. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224115/>
12. Ogunbanwo JA, Pendyala PR, Malhotra P, Chauhan VS. Expression, Purification and Characterization of a Recombinant *Plasmodium Vivax* Thrombospondin Related Adhesive Protein (PvTRAP). *Int J Biomed Sci.* [Internet]. 2006[Cited 21 Sep. 2018]; 2(3): 251–259. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614606/>
13. Patarroyo ME, Cifuentes G, Rodríguez R. Structural characterisation of sporozoite components for a multistage, multi-epitope, anti-malarial vaccine. *Int J Biochem Cell Biol.* [Internet]. 2008 [Cited 21 Sep. 2018];40(3):543–557. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997122>
14. Nazeri S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. *Acta trop* [Internet]. 2017 [Cited 22 Sep. 2018]; 173:45–54. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28549910>
15. National Center for Biotechnology Information [internet]. [Cited 10 Mar. 2019]; Available in: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5820&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle
16. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* [Internet].2006 [Cited 10 Mar. 2019]; 124(4):755-66. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497586>
17. Thapar RK, Saxena A, Devgan A. Congenital Malaria. *Med J Armed Forces India.* [Internet].2011 [Cited 10 Mar. 2019]; 64(2): 185–186. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4921569/>
18. Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisof Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malar J.* [Internet]. 2018 [Cited 17 Mar. 2019];17(36). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5771189/>
19. Ministerio de Salud y Protección – Federación Médica Colombiana. Malaria memorias. [internet]. [Consultado 17 Marzo 2019]. Available in: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/memorias_malaria.pdf
20. Organización mundial de la salud. Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030. [Internet]. [Consultado 17 de Marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/es/>
21. Instituto Nacional de Salud-INS. Informe de evento malaria, Colombia, 2017. [Internet]. [Consultado 17 de Marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Malaria%202017.pdf>

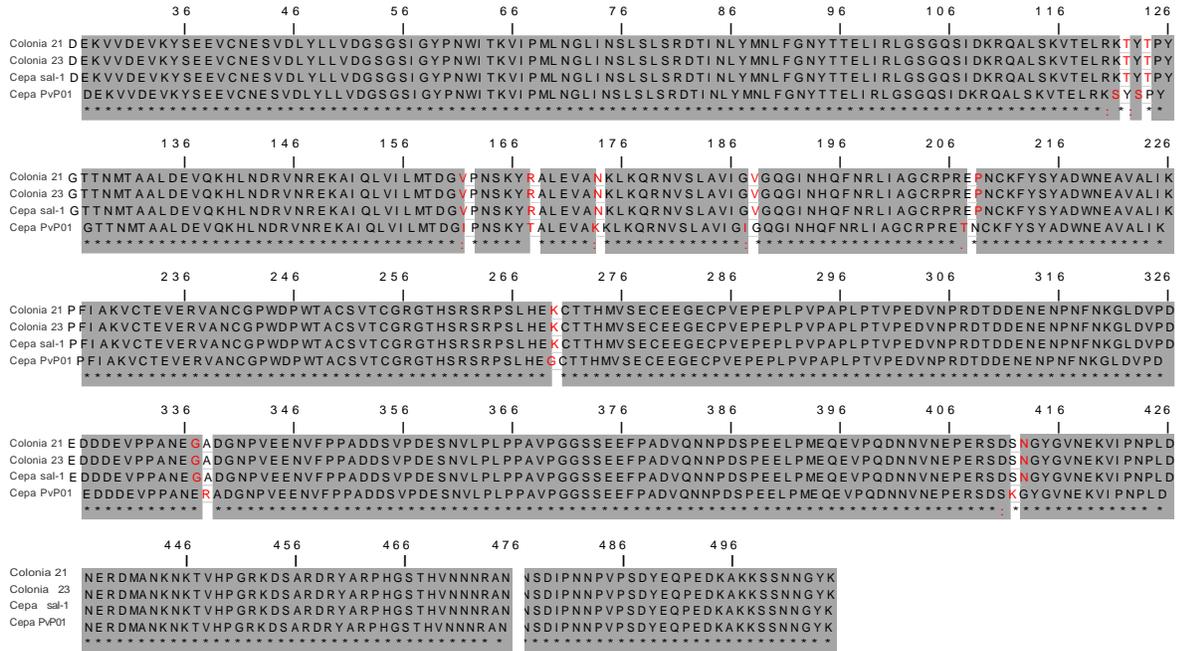
22. Instituto Nacional de Salud-INS. Protocolo para vigilancia en salud pública de malaria. [Internet]. [Consultado 17 de Marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud%20P%C3%BAblica/Ola%20invernal/Protocolo%20Vigilancia%20MALARIA.pdf>
23. Instituto Nacional de Salud-INS. Boletín epidemiológico semanal (Semana epidemiológica 04, del 20 al 26 de enero de 2019). [Internet]. [Consultado 17 de Marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%204.pdf>
24. Agencia de Noticias de la Universidad Nacional – Unimedios. Malaria amenaza el Pacífico colombiano. El espectador. 19 Nov 2018; sec salud. [Internet]. [Consultado 24 de Marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.elespectador.com/noticias/salud/malaria-amenaza-el-pacifico-colombiano-articulo-824392>
25. Silvia Blair. Retos para la eliminación de la malaria en Colombia: un problema de saber o de poder. Biomedica [Internet]. 2012 [Consultado 24 de Marzo de 2019];32(supl):131–148. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/598/874>
26. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: implications for vaccine design. Clin Microbiol Rev. [Internet]. 2006 [Cited 31 Mar. 2019]; 19(4):686-707. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17041140>
27. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. Cell [Internet]. 1997 [Cited 31 Mar. 2019]; 90(3):511-22. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267031>
28. Miles BM. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. Parasitol Res. [Internet]. 2011 [Cited 31 Mar. 2019]; 108(1):247-52. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924610>
29. Castellanos A, Arévalo-Herrera , Restrepo N, Gulloso L, Corradin G, Herrera S. Plasmodium vivax thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. Mem Inst Oswaldo Cruz. [Internet]. 2007 [Cited 31 Mar. 2019]; 102(3):411-6. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568948>
30. Robson KJ, Frevert U, Reckmann I, Cowan G, Beier J, Scragg IG, et al. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of Plasmodium falciparum: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. EMBO J.. [Internet]. 1995 [Cited 31 Mar. 2019]; 14(16):3883-94. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664729>
31. McCormick CJ, Tuckwell DS, Crisanti A, Humphries MJ, Hollingdale MR. Identification of heparin as a ligand for the A-domain of Plasmodium falciparum thrombospondin-related adhesion protein. Molecular and Biochemical Parasitology. [Internet]. 1999 [Cited 07 Apr. 2019]; 100(1):111-24. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685199000523>

32. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, Ménard R. Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J*. [Internet]. 2002 [Cited 07 Apr. 2019]; 21(7): 1597–1606. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC125935/>
33. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 [Cited 07 Apr. 2019]; 198(6):961-71. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986493>
34. Centro de Control y Prevención de Enfermedades. [Internet]. [Consultado 07 de Abril de 2019]. Available in: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
35. Abyntek. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes [internet]. [Consultado 07 de Abril 2019]. Disponible en: <http://www.abyntek.com/sistemas-de-expresion-de-proteinas-recombinantes/>
36. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. [Internet]. 2002 [Cited 14 Apr. 2019]; 35(Pt 2):91-105. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916451>
37. Kishwar HK . Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Adv Pharm Bull*. [Internet]. 2013 [Cited 14 Apr. 2019]; 3(2): 257–263. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3848218/>
38. Drago ME , Sainz T. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. [Internet]. 2006 [Consultado 18 de Abril de 2019]; 37(1): 38–44. Available in: <https://www.redalyc.org/html/579/57937106/>
39. Dyson MR. Fundamentals of Expression in Mammalian Cells. *Adv Exp Med Biol*. [Internet]. 2016 [Cited 18 Apr. 2019]; 896:217-24. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165328>
40. Nettleship JE, Assenberg R, Diprose JM, Rahman-Huq N, Owens RJ. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J Struct Biol*. [Internet]. 2010 [Cited 18 Apr. 2019]; 172(1):55-65. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153433>
41. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. [Internet]. 2005 [Cited 19 Apr. 2019]; 172(1):55-65. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862464>
42. Khancorresponding KH. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Adv Pharm Bull*. [Internet]. 2013 [Cited 19 Apr. 2019]; 3(2): 257–263. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3848218/>
43. Hye-Seong K, Soo-Dong W, Woo-Jin K, Jae-Young C, Seok-Kwon K. High-level expression of a foreign gene by a recombinant baculovirus with an expanded host range. *Cytotechnology*. [Internet]. 2000 [Cited 20 Apr. 2019]; 32: 87–92. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3449685/>

44. Chambers AC, Aksular M, Graves LP, Irons SL, Possee RD, King LA. Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci.* [Internet]. 2018 [Cited 20 Apr. 2019]; 91:5.4.1-5.4.6. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29516481>
45. Miller LK. Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.* [Internet]. 1998 [Cited 21 Apr. 2019]; 42:177-99. Available in: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.42.100188.001141?journalCode=micr>
46. Verne A, Luckow, Summers MD. Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors. *Bio/Technology.* [Internet]. 1998 [Cited 21 Apr. 2019]; 6: 47–55. Available in: <https://www.nature.com/articles/nbt0188-47>
47. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol.* [Internet]. 2005 [Cited 21 Apr. 2019]; 23(5):567-75. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15877075>
48. Kitts PA, Ayres MD, Possee RD. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1990 [Cited 21 Apr. 2019]; 18(19): 5667–5672. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332298/>
49. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. *Invitrogen.* [Internet] [Cited 22 Apr. 2019]. Available in: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
50. Morahan BJ, Wang L, Coppel RL. No TRAP, no invasion. *Trends Parasitol.* [Internet]. 2009 [Cited 24 Aug. 2019]; 25(2):77-84. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101208>
51. Bermúdez M, Moreno DA, Arévalo G, Curtidor H, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. *Malaria Journal.* [Internet]. 2018 [Cited 24 Aug. 2019]; 17: 301. Available in: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2456-5>
52. Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* [Internet]. 1977 [Cited 24 Aug. 2019]; 9(198):1056-63. Available in: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2456-5>
53. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* [Internet]. 2007 [Cited 24 Aug. 2019]; 127(3): 335-347. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165606006237>
54. *Invitrogen. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques* [Internet]. [Cited 24 Aug. 2019]. Available in: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>

55. Dundas K, Shears MJ, Sun Y, Hopp CS, Crosnier C, Metcalf T, et al. Alpha-v–containing integrins are host receptors for the Plasmodium falciparum sporozoite surface protein, TRAP. Proc Natl Acad Sci U S A. [Internet]. 2018 [Cited 20 Sep. 2019]; 9:283. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5924908/>

ANEXO



Anexo 1. Alineamiento del ectodominio de PvTRAP entre las colonias obtenidas y las cepas de *P. vivax* Sal-1 y PvP01. Alineamiento de las secuencias de las colonias 21 y 23 del plásmido pFastBac-*pvtrap* de la cepa VCG-1 y las cepas Sal-1 y PvP01. Los aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias se encuentran en gris; los aminoácidos que presentan cambios entre las cepas están señalados en color rojo (Ver tabla 2). En la parte inferior del alineamiento se indica el grado de similitud entre las secuencias de las cepas donde: (*) indica aminoácidos idénticos, (:) indica alta similitud, (.) indica baja similitud y los que no tienen nada indican ninguna similitud.