



**PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE
INVASIÓN A ERITROCITO PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS DE LIGANDOS
PfEBA Y PfRh DE LA CEPA FCB2 DE *Plasmodium falciparum***

ZULMA JULIETH FLÓREZ ARENAS

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:
Bacteriólogo y laboratorista clínico

Asesor interno

Mauricio Humberto Rodríguez Panduro

Esp. en Estudios Amazónicos

Asesor externo

Mónica Ararat Sarría

MD. MSc. en Genética Humana

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BGOTÁ D.C., OCTUBRE DE 2019**

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico por completo a mi familia, a mi madre, a mi hermano, a mi tío, los cuales me dieron la oportunidad y la motivación para estudiar esta carrera y así mismo estar a puertas de culminarla, siempre pusieron su fe en mí y lo menos que puedo hacer es retribuir todo el esfuerzo que hicieron, viéndome como una profesional. Dedico especialmente este trabajo a mi padre y a mi tío, que, aunque ya no estén, sé que se sienten orgullosos de mí, siempre me quisieron ver como una profesional del campo de la salud, es y siempre serán el motor de mi vida, lo que me lleva siempre a superarme y dar lo mejor de mí.

AGRADECIMIENTOS

No me alcanzan las palabras para describir lo agradecida que estoy con cada una de las personas que siempre me apoyaron y acompañaron en todo este proceso. En primer lugar, agradezco a mi asesora externa Mónica por abrirme las puertas a FIDIC y enriquecer mis conocimientos más allá de lo relacionado con el tema tratado en este trabajo, también por todo el esfuerzo y dedicación que tomó para acompañarme en la culminación del mismo, darme motivación, exigirme y hacerme ver que, aunque difícil, el campo de la investigación es verdaderamente enriquecedor a nivel personal. También agradezco a todas las personas que conocí en FIDIC, especialmente a Sandra y Milena, que me brindaron apoyo siempre que lo necesité e igualmente estuvieron pendientes de este proceso. A mi asesor Mauricio, que más que un asesor se convirtió en un consejero, en un apoyo, en un amigo, por estar siempre pendiente del proceso de formación y tomarse el tiempo en varias ocasiones para revisar y discutir temas concernientes a la investigación. Finalmente, pero no menos importantes, a mi mamá, a mi hermano, a mi tío, por darme la oportunidad de formarme en esta carrera, de no perder la fé en mí y darme los empujones necesarios cuando me sentía derrotada, a mi mejor amiga por ayudarme en la redacción de este proyecto, y a todos mis amigos y compañeros que siempre están ahí para subirme la moral. Infinitas gracias a todos y cada una de las personas que estuvieron involucrados en todo este proceso, este es el resultado final de un esfuerzo conjunto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. ANTECEDENTES	17
4. MARCO REFERENCIAL.....	22
4.1. Generalidades	22
4.2. Sintomatología y clasificación de la malaria	22
4.3. Epidemiología	24
4.4. Ciclo biológico del parásito	25
4.4.4. Vías alternas de invasión.....	28
4.5. Métodos de determinación del fenotipo de invasión	32
4.5.1. RT-qPCR	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Tipo de estudio	36
5.3. Variables.....	36
5.4. Cultivo de parásitos	36
5.5. Extracción de ARN, ADNg y síntesis de ADNc	37
5.6. Estandarización de la técnica RT- qPCR	38
6. RESULTADOS	41

6.1. Cuantificación de las muestras de ADN y ARN.....	41
6.2. Electroforesis de los genes de los genes pertenecientes a las familias <i>PfRh</i> y <i>PfEBA</i>	42
6.3. PCR tiempo real.....	43
6.4. Determinación parcial del perfil transcripcional de cada gen.....	47
7. DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES.....	53
ANEXOS	54
REFERENCIAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de malaria reportados en Colombia en el 2018 discriminados por población en riesgo.....	25
Figura 2. Interacciones receptor-ligando que tienen lugar durante el proceso de invasión del merozoito al eritrocito.....	28
Figura 3. PCR.....	32
Figura 4. Comportamiento de una amplificación de qPCR típica.....	33
Figura 5. Estadios de <i>P. falciparum</i> durante el ciclo eritrocitario	37
Figura 6. Electroforesis de los genes pertenecientes a la familia <i>Pfeba</i> y <i>Pfrh</i> y <i>PfAMA1</i> en ADNc de FCB2	42
Figura 7. Estandarización de sondas para cada uno de los genes de estudio incluyendo el gen normalizador con su respectivo control negativo.	44
Figura 8. Curvas de estandarización para los genes de la familia <i>PfEBA</i>	45
Figura 9. Curvas de estandarización de los de la familia <i>PfRh</i>	46
Figura 10. Curva de estandarización del gen normalizador <i>PfAMA-1</i>	47
Figura 11. Expresión relativa de los genes pertenecientes a las familias <i>PfEBA</i> y <i>PfRh</i> con respecto al gen normalizador <i>PfAMA1</i>	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los genes pertenecientes a la familia <i>PfEBA</i> , <i>PfRh</i> y <i>PfAMA-1</i>	29
Tabla 2. Secuencia de los cebadores y sonda con su respectivo fluoróforo y apagador diseñados para cada gen.	39
Tabla 3. Concentración y calidad de las muestras de ADNc obtenidas de las cepas FCB2 y 3D7.....	41
Tabla 4. Concentración y calidad de las muestras de ADNg obtenidas de las cepas FCB2 y 3D7.....	41
Tabla 5. Expresión relativa de los genes pertenecientes a las familias <i>PfEBA</i> y <i>PfRh</i> .	47

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de la concentración y la temperatura óptima de amplificación para las sondas de cada uno de los genes	54
Anexo 2. Montaje de placas para la cuantificación de los genes pertenecientes a la familia PfebA y PfRh en ADNc más las diluciones seriadas de ADNg para cada gen..	55
Anexo 3. Electroforesis de los genes pertenecientes a la familia PfEBA y PfRh y PfAMA-1 en ADNc de la cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i>	55

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CeITOS	Proteína para el atravesamiento de células de ooquinetes y esporozoitos (del inglés Cell Traversal Protein for Ookinets and Sporozoite)
CK2	Casein quinasa
CR1	Receptor del complemento 1 (del inglés Complement Receptor 1)
CyRPA	Antígeno protector rico en cisteína (del inglés Cysteine-rich Protein Antigen)
DBP	Proteínas de unión a Duffy (del inglés Duffy Binding Proteins)
FCB2	<i>P. falciparum</i> cepa falciparum Colombia Bogotá 2
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
FVO	<i>P. falciparum</i> cepa falciparum Vietnam Oak-Knoll
GEST	Proteína de egreso del gametocito y atravesamiento del esporozoito (del inglés Gamete Egress and Sporozoite Traversal Protein)
GP	Glicoforina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HABP	Péptido de unión de alta afinidad (del inglés High Affinity Binding Peptide)
IFA	Inmunofluorescencia
MSP	Proteína de superficie del merozoito (del inglés Merozoite Surface Protein)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

PfAMA-1	Antígeno apical de membrana 1 de <i>P. falciparum</i> (del inglés Apical Membrane Antigen 1)
PfEBA	Antígeno de unión a eritrocito de <i>P. falciparum</i> (del inglés Erythrocyte Binding Antigen)
PL	Fosfolipasa
PfRh	Proteína homóloga de unión a reticulocito de <i>P. falciparum</i> (del inglés Reticulocyte Binding Homologue)
PvRBP	Proteína de unión a reticulocito de <i>P. vivax</i> (del inglés Reticulocyte Binding Protein)
Ripr	Proteína que interactúa con Rh5 (del inglés Rh5 interacting protein)
RON	Proteína del cuello de la roptria (del inglés Rhoptry Neck Protein)
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa reversa (del inglés Reverse Transcription Quantitative PCR)
SPECT	Proteína esencial para atravesamiento de células (del inglés Sporozoite Protein Essential for Cell Traversal)
TLP	Proteína similar a TRAP

**PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS DE
INVASIÓN A ERITROCITO PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS DE LIGANDOS
PfEBA Y PfRh DE LA CEPA FCB2 DE *Plasmodium falciparum***

RESUMEN

Plasmodium falciparum, es el parásito causante de malaria asociado a la mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Es un problema de salud pública cada vez más difícil de tratar, debido especialmente al aumento de resistencia por parte del parásito a los antimaláricos actuales; por esta razón es necesaria la búsqueda de nuevas herramientas en pro del control y la erradicación de la enfermedad principalmente enfocadas al desarrollo de vacunas eficaces. Para esto es indispensable la caracterización de proteínas que puedan ser blancos potenciales, como lo son los ligandos de invasión, correspondientes a las familias de antígenos de unión a eritrocito (PfEBAs) y proteínas homólogas de unión a reticulocito (PfRHs), ya que múltiples estudios de expresión transcripcional de los genes que codifican para estos ligandos, han demostrado que son esenciales en el proceso de invasión al eritrocito y que su expresión varía entre diferentes cepas y aislados. Por este motivo, el presente proyecto determinó de manera parcial el perfil transcripcional de genes pertenecientes a estas dos familias, cuantificando su expresión transcripcional mediante la técnica RT-qPCR, en una cepa autóctona de Colombia. Con los resultados obtenidos, se espera dar pie a futuros estudios comparativos con otras cepas del parásito, para así mejorar la comprensión de los fenotipos que utiliza *P. falciparum* en el proceso de invasión al eritrocito y así mismo buscar métodos para bloquear dicha invasión.

Palabras clave: *Malaria, Plasmodium falciparum, Ligandos de invasión, PfRHs, PfEBAs, RT-qPCR.*

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es un problema de salud pública, que para el año 2017 causó alrededor de 219 millones de casos, presentando 435.000 muertes secundarias a esta enfermedad, especialmente en población ubicada en zonas endémicas del planeta (regiones tropicales y subtropicales)^{1,2}. A pesar de la implementación de programas de control y prevención de la enfermedad, en los últimos años se ha observado un estancamiento en la disminución de su incidencia³; por tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos mecanismos de control, medicamentos antimaláricos y el desarrollo de vacunas efectivas, teniendo en cuenta los factores asociados al vector (Alimentación, picadura, comportamiento reproductivo, entre otras) al componente humano (inmunología, demografía, cultura, características socioeconómicas), al entorno (temperatura, humedad, hidrografía, etc.) y especialmente al parásito, ya que es bien sabido que buena parte del problema se debe al aumento de la resistencia por parte de este a los antimaláricos existentes^{2,4}.

La variabilidad antigénica, asociada al fenotipo de invasión del parásito durante el proceso de invasión al eritrocito, es uno de los obstáculos que se presentan para el desarrollo exitoso de vacunas⁵. Por ende, el estudio de la expresión transcripcional de proteínas involucradas en este proceso, permite el análisis del fenotipo de invasión del parásito. Un punto clave en esta aproximación, es el estudio de genes que codifican para los principales ligandos involucrados en las vías alternas de invasión del merozoito al eritrocito, correspondientes a las familias de proteínas Antígeno de unión a eritrocito (PfEBA) y proteínas homólogas de unión a reticulocito (PfRh), los cuales, además de ser vitales en conjunto para una invasión exitosa, se ha demostrado que varían su expresión de una cepa a otra, otorgándoles diferentes fenotipos de invasión⁶⁻⁸.

Es conocido que los parásitos se adaptan a la población en la que se encuentra, presentando cambios transcripcionales y fenotípicos, por lo que estos varían entre cepas;

actualmente, existen diversas cepas de *P. falciparum* extensamente caracterizadas, especialmente 3D7 (derivada de NF54), algunas otras de origen africano (FCR-3, Uganda Palo alto-FUP), asiático (W2mef, Dd2, FVO) y algunas americanas (7G8, HB3 y Santa Lucía). En nuestro país, desde 1982 se ha utilizado la cepa *falciparum* Colombia Bogotá 2 (FCB2) como modelo en varias investigaciones y ensayos tanto a nivel nacional como internacional⁹⁻¹³, sin embargo, esta cepa no se encuentra completamente caracterizada.

Por este motivo, en el presente proyecto se determinó el perfil transcripcional de los genes de la familia *PfEBA* y *PfRh*, resolviendo la pregunta ¿cuál es el perfil transcripcional de los principales genes involucrados en el proceso de invasión a eritrocitos de la cepa FCB2 de *P. falciparum*?, haciendo parte del proyecto de caracterización de la cepa FCB2 llevado a cabo en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), siendo de importancia para la posterior utilización de esta cepa como referente de *P. falciparum* en el país.

Este conocimiento permitirá el análisis comparativo de la expresión génica con cepas de otras regiones, ayudando a profundizar en el estudio de los fenotipos de invasión del parásito y como estos pueden variar dependiendo de la diversidad fenotípica de la población expuesta a cada una de estas cepas; además, este trabajo dará las bases para futuros estudios, como el análisis de los mecanismos de adaptación de la cepa a cambios en el hospedero, tratamiento con enzimas o anticuerpos, interrupciones genéticas, entre otros, contribuyendo en el campo del desarrollo de vacunas y tratamientos antimaláricos con énfasis en la población colombiana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar el perfil transcripcional de los genes pertenecientes a las familias de ligandos de invasión a eritrocito *Pfeba* (*Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*) y *Pfrh* (*Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5*) de la cepa FCB2 de *P. falciparum* en estadios de esquizonte, por medio de la técnica RT-qPCR.

2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de RT-qPCR para el análisis de la expresión transcripcional de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* de la cepa FCB2 de *P. falciparum*.
- Cuantificar mediante RT-qPCR, la expresión de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* de la cepa FCB2 de *P. falciparum*.
- Describir el perfil transcripcional de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5*, de la cepa FCB2 de *P. falciparum* en el estadios de esquizonte.

3. ANTECEDENTES

La malaria (del italiano “*mala aria*” = mal aire), también conocida como paludismo (del latín “*pallus*” = pantano) o fiebre del pantano¹⁴, es una enfermedad que se conoce desde tiempos antiguos, siendo descrita por la civilización egipcia, mesopotámica, griega, los antiguos chinos y los hindúes; sin embargo, su etiología era un misterio y se atribuía a miasmas de los pantanos¹⁵. En 1879, Robert Koch, Edwin Klebs y Corrado Tomassi-Crudeli acreditaron la enfermedad a una bacteria a la que denominaron *Bacillus malariae*¹⁶.

No fue hasta el año 1880 donde Charles Louis Alphonse Laveran atribuyó la malaria a un parásito^{15,16}, seguido de los descubrimientos de Camillo Golgi, en 1886, quien observó que los intervalos de ruptura de los eritrocitos y liberación de los parásitos coincidían con los picos de fiebre característicos de la enfermedad¹⁶. En 1890 se hizo la primera clasificación de estos parásitos, que incluía a *Haemamoeba vivax*, *Laverania malariae* y *Haemamoeba malariae*, hoy en día conocidos con el nombre de *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* respectivamente¹⁵.

En 1897, Ronald Ross, concluyó que los mosquitos son los vectores de la malaria aviar y Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli y Camillo Golgi determinaron que los mosquitos del género *Anopheles* transmiten la malaria humana^{15,16}. Más adelante, en 1948, H.E. Shortt y C.C. Garnham, descubrirían los estadios tisulares del parásito en el hígado de monos y humanos¹⁶.

En 1975, Dvorak et al¹⁷ observaron la invasión del merozoito de *P. knowlesi* al eritrocito mediante microscopía de interferencia, donde determinaron a grandes rasgos los pasos involucrados en la misma; sin embargo, se desconocía cuál era el mecanismo que utilizaba el parásito para deformar la membrana eritrocitaria e invaginarse en esta, y cuáles eran los receptores o ligandos involucrados¹⁷.

Estudios posteriores establecieron la importancia del ácido siálico presente en las glicoforinas de la membrana del eritrocito durante el proceso de invasión; también

describieron que eritrocitos deficientes de glicoforina A (GpA) o glicoforina B (GpB), y eritrocitos tratados con neuraminidasa y/o tripsina eran resistentes a la invasión¹⁸⁻²⁰.

En 1985, Camus et al²¹ describieron una proteína de 175 kDa que se ligaba al ácido siálico, a la que se denominó Antígeno de Unión a Eritrocito de *P. falciparum* (PfEBA) 175, de la cual, en 1992, se describió su estructura, encontrando una alta similitud con proteínas de unión a Duffy (DBP) de *P. vivax* y *P. knowlesi*, en su dominio C-terminal²² y en 1994, se determinó que se unía específicamente a GpA mediante dominios ricos en cisteína^{23,24}.

En 2001, gracias a los estudios de Adams et al²⁵ se asociaron a la familia PfEBA, las proteínas MAEBL, EBL-1, PfEBA140(BABL) Y PfEBA181(JESBEL) ya que poseían una estructura génica multi-exón parecida entre ellas y a PfEBA175, además sus secuencias de aminoácidos tenían un similitud de 30 a 40%. En 2003 se determinó que PfEBA140 se ligaba a la glicoforina C (GpC)²⁶ y PfEBA181 a un receptor "X" en una vía resistente a tripsina y sensible a quimotripsina²⁷.

Por otro lado, en el año 2000 se inició la identificación de las proteínas pertenecientes a la familia de proteínas homólogas de unión a reticulocito de *P. falciparum* (PfRh). Las proteínas PfRh2a y PfRh2b fueron descritas por Rayner et al²⁸, mediante la comparación con la proteína de unión a reticulocito 2 de *P. vivax* (PvRBP2) y la proteína de roptria de 235 kDa de *P. yoelii*, sugiriendo además que estas habían sido resultado de una duplicación, ya que observaron que tenían en común una secuencia de nucleótidos de más de 8 kb²⁸. El papel de estas PfRhs (PfRh2a-PfRh2b) en invasión fue estudiado un año más tarde por Triglia et al²⁹, mediante el uso de anticuerpos anti-PfRh2a/2b, los cuales fueron efectivos en la inhibición de la invasión de la cepa 3D7 a eritrocitos.

En 2001, Rayner et al³⁰ describió PfRh1, como una proteína ortóloga de PvRBP1, determinando además, que se unía a su receptor de forma dependiente de ácido siálico y que cumplía un papel importante en la invasión en una vía resistente a tripsina³⁰. Otro miembro de esta familia se reportó el mismo año, PfRh3, pero a diferencia de los anteriores, este se transcribía pero no se traducía, por lo que se consideró un pseudogen³¹.

En 2002, Blair et al³², probó por primera vez la técnica de RT-qPCR para medir la expresión de genes del parásito en sus diferentes estadios de la fase eritrocitaria; en este caso se estudiaron los genes *Pfeba175*, *pebl* (*Pfeba165*), *Pfebl-1*, *baebl* (*Pfeba140*), *maebl* y *jesebl* (*Pfeba181*), genes descritos parcialmente en estudios previos²⁵. Los resultados obtenidos mostraron que *Pfebl-1* se expresa en esquizontes intermedios y *maebl* se expresa durante todo los estadios eritrocitarios del parásito, ambos disminuyendo su expresión en los esquizontes maduros, lo que sugiere que estas dos proteínas tienen un papel en el desarrollo del merozoito, mientras que *Pfeba175*, *Pfeba140* y *Pfeba181* se expresan en los esquizontes maduros, reafirmando que están implicados en el proceso de invasión, a diferencia de las otras dos^{25,32}. También se propuso que existen promotores que permiten la expresión de estos genes en estadios específicos del parásito³².

Ese mismo año (2002), los estudios de Taylor y colaboradores⁷ probaron que la expresión de las proteínas implicadas en invasión a eritrocito, (específicamente PfRh2a, PfRh2b Y PfRh1), variaba entre las diferentes cepas de *P. falciparum*; para esto utilizaron las cepas 3D7 (Derivada de NF54), T996 (Tailandia) y FCB1 (Colombia), realizando análisis de secuencia génica y de expresión y localización de proteínas mediante el uso de Western Blot e inmunofluorescencia (IFA). Los resultados de estos experimentos demostraron la variación a nivel de secuencia, cantidad y ubicación de las proteínas estudiadas en cada cepa⁷.

Mientras tanto, Kaneko et al, describió un quinto miembro de la familia PfRh, al que denominó PfRh4, que al igual que las otras PfRhs se expresaba en el extremo apical del merozoito en las diferentes líneas de *P. falciparum* y posiblemente cumplía un papel en la invasión alternativa al eritrocito³³. Más adelante, se estudió la cepa Dd2 de *P. falciparum* (Indochina. Ácido siálico dependiente), en la que se observó una sobre expresión de PfRh4 cuando esta era cultivada en eritrocitos tratados con neuraminidasa, lo que le permitía invadir estos eritrocitos; esto mostró la importancia de PfRh4 en el cambio de invasión dependiente de ácido siálico a la invasión independiente de ácido

siálico³⁴. Años después, en 2010, Tham y colaboradores determinaron que este ligando se unía al Receptor de Complemento 1 (CR1) del eritrocito³⁵.

En 2005, Triglia et al³⁶, determinó que PfRh1 juega un papel en la invasión dependiente de ácido siálico, concordante con estudios previos que indican que PfRh1 se une a un receptor “Y” sensible a neuraminidasa y resistente a tripsina y quimotripsina^{30,37}. Esto indicó que PfRh1 junto a PfEBA140 y PfEBA175, están involucrados en la invasión ácido siálico dependiente. También se concluyó que parásitos que no expresan PfRh2a y PfRh2b, pero si PfRh1, usan vías ácido siálico dependientes y viceversa³⁶.

Años más tarde, en 2011, Sahar desveló que las proteínas PfRh2a/b estaban involucradas en la invasión ácido siálico independiente, tripsina resistente y quimotripsina sensible³⁸, siendo PfRh2b más crucial que PfRh2a^{29,37,38}. También confirmó que estas PfRhS sufren un procesamiento proteolítico mediado por proteasas y subtilisinas durante la invasión, generando tres fragmentos de diferentes tamaños reconocibles por anticuerpos que son capaces de disminuir la tasa de invasión de cepas de *P. falciparum* ácido siálico independientes³⁸.

La última proteína descrita, perteneciente a esta familia, se denominó PfRh5 y fue descrita en 2009 por Baum et al³⁹, como una proteína pequeña codificada en el cromosoma 4 del parásito junto a PfRh4. Se determinó que PfRh5 al igual que las demás PfRHs, se almacena en las roptrias y juega un papel importante durante la invasión a eritrocito, sin embargo, esta carece de dominio transmembrana y no se puede realizar la delección del gen que codifica para esta proteína (*PfRh5*), evidenciando su papel fundamental en la supervivencia del parásito³⁹.

En 2011, se determinó que la proteína basigina, perteneciente al grupo sanguíneo Ok, era el receptor de PfRh5 en el eritrocito⁴⁰. Este mismo año, también se describió la proteína que interactúa con PfRh5 (Ripr), la cual está involucrada en invasión a eritrocito, ya que forma un complejo con PfRh5, sin embargo ninguna de las dos posee dominio transmembranal⁴¹. En 2015, se encontró una nueva pieza del complejo, un antígeno protector rico en cisteína (CyRPA) que forma parte del complejo PfRh5 –Ripr⁴² y en 2017, se describió P113, como una proteína de superficie de merozoito anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que interactúa con el dominio N-terminal de PfRh5, siendo

importante en la formación del complejo al proporcionar un mecanismo de liberación para que PfRh5 pueda desanclarse del merozoito⁴³.

Dentro de las cepas pertenecientes a *P. falciparum*, en nuestro país se describió en 1982 la cepa FCB2 (*falciparum* Colombia Bogotá 2), en el estudio de Espinal y colaboradores⁴⁴, donde se realizó el primer acercamiento a la caracterización de esta cepa, aislada de un paciente de San Martín, Meta, junto con otras 7 cepas obtenidas de diferentes partes de Colombia. Con los resultados de esta investigación, se determinó que la cepa FCB2 era resistente a cloroquina y sensible a quinina, presentaba una alta producción de gametocitos y no formaba nodulaciones en los eritrocitos⁴⁴.

A partir de lo descrito por Espinal⁴⁴, la cepa FCB2 se ha utilizado en algunas investigaciones, como la realizada en 2006 por Garavito y colaboradores⁹, donde se probó la actividad antimalárica de las plantas *Abuta grandifolia*, *Acacia farnesiana*, *Acnistus arborescens*, *Calea prunifolia* Kunth (*Asteraceae*), *Croton leptostachyus*, *Piper cumanense*, *Piper holtonii* y *Xylopia aromatica* contra esta cepa⁹. En 2013, se realizó un estudio similar, donde García-Huertas y colaboradores¹⁰ probaron el efecto citotóxico y Anti-malárico de *Solanum nudum*.

En 2008, Arango y colaboradores¹¹, utilizaron FCB2 como control junto a NF54 (Holanda), en un análisis de susceptibilidad in vitro de aislados clínicos a antipalúdicos, donde se confirmó la susceptibilidad previamente descrita para esta cepa⁴⁴. De igual manera, en 2013, FCB2 fue utilizada como control en un estudio que buscaba determinar los fenotipos de invasión de aislados clínicos de Colombia, Brasil y Perú, en eritrocitos tratados con enzimas, para compararlos con los fenotipos ya conocidos de cepas de referencia (7G8, HB3, Dd2, W2mef, 3D7) y aislados de África e India, sin embargo en este estudio no se describió el fenotipo de invasión de FCB2¹².

Por otra parte, en 2011, Curtidor y colaboradores¹³, utilizaron la cepa FCB2, junto con otras cepas del parásito, para la determinación de péptidos de unión de alta afinidad (HABPs), en la búsqueda de nuevos blancos del parásito en estadio de esporozoito para el desarrollo de vacunas.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Generalidades

La malaria o paludismo es una enfermedad de distribución mundial, causada por parásitos del género *Plasmodium*, perteneciente al phylum Apicomplexa, del que hacen parte otros patógenos humanos como *Toxoplasma gondii*, y *Cryptosporidium parvum*, entre otros^{45,46}, todos caracterizados por ser parásitos intracelulares obligados⁴⁶ y cuyos zoitos poseen vesículas secretoras en su extremo apical: las roptrias y los micronemas, que secretan su contenido hacia el polo apical y los gránulos densos que lo secretan en otras partes de la superficie del zoito en respuesta a señales específicas^{47,48}; estos orgánulos son los encargados de producir moléculas indispensables para el reconocimiento, adherencia e invasión a su célula blanco⁴⁸.

Dentro del género *Plasmodium*, se conocen 6 especies causantes de enfermedad en el ser humano: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* y *P. ovale wallikeri*, siendo *P. falciparum* la especie predominante y que mayor mortalidad produce a nivel mundial^{5,46,49}.

4.2. Sintomatología y clasificación de la malaria

Inicialmente, la malaria se presenta como una enfermedad febril, acompañada de síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, fatiga, náuseas, dolor muscular, articular, entre otros^{5,50}. Con el tratamiento antimalárico adecuado los síntomas disminuyen junto con la carga parasitaria del individuo, sin embargo, en algunos casos, cuando dicho tratamiento no es administrado o no se completa, dependiendo del estado inmunológico del paciente, la enfermedad puede progresar hasta volverse severa e incluso ocasionar la muerte⁵. Por lo anterior, la malaria puede clasificarse en malaria no complicada y malaria severa.

4.2.1. Malaria no complicada

Es la malaria que no presenta signos severos o disfunción orgánica. Se determina con test parasitológicos positivos y sintomatología que incluye un periodo febril que dura de 6 a 8 horas, cada 48 horas, acompañados de periodos en los que el paciente presenta escalofrío y temblor, junto con síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, fatiga, malestar, dolores musculares, entre otros^{5,50}. Los picos de fiebre se presentan especialmente cuando los estadios parasitarios se sincronizan⁵¹.

4.2.2. Malaria severa

Cuando la malaria no complicada no es tratada, el tratamiento es inefectivo o no se completa, especialmente en malaria por *P. falciparum*, la enfermedad progresa hasta volverse severa. Se diagnostica así cuando hay un aumento de la parasitemia (más de 10%)⁵⁰, sumado a uno o más de los siguientes síntomas: acidosis metabólica, anemia severa, hipoglicemia, falla renal aguda, edema agudo de pulmón, convulsiones, postración, sangrado y shock^{50,51}. *P. falciparum*, al tener la capacidad de secuestrarse en la microvasculatura, puede producir potencialmente malaria cerebral o malaria severa^{5,51}.

4.3. Epidemiología

4.3.1. A nivel mundial

Según el Reporte anual de malaria de 2018 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017, se estimaron 219 millones de casos de malaria en todo el mundo. A partir de 2015 se observó que no hubo avances significativos en la reducción de casos³. África es el continente más afectado, presentando para 2017 la mayor cantidad de casos (92%), seguida de Asia sudoriental (5%) y el mediterráneo (2%). *P. falciparum* fue la especie predominante en la mayoría de zonas endémicas, a excepción de América, donde el 74,1% de los casos fueron causados por *P. vivax*³.

En 2017, se estimaron 435.000 muertes a nivel mundial, siendo el continente africano el que presentó mayor mortalidad (93%) y los niños menores de 5 años los más afectados (66% de mortalidad)³.

4.3.2. Malaria en Colombia

Colombia es un país que posee una transmisión endémico/epidémica de malaria, debido al clima tropical y características geográficas que favorecen la proliferación del vector y la transmisión del parásito, además de la alta migración humana que contribuye a la propagación de la enfermedad, siendo las áreas rurales las más afectadas, especialmente en la Costa Pacífica, Urabá, Sinú, bajo Cauca, la Orinoquía y la Amazonía⁵².

Según el boletín de la 4 semana epidemiológica de 2019 del Instituto Nacional de Salud (INS)⁵³, en 2018 se notificaron 62.141 casos de malaria, donde predominaron los casos por *P. vivax* (50,1%) seguido de *P. falciparum* (47,9%); los departamentos de Chocó, Antioquia, Guainía y Amazonas fueron los más afectados, siendo la población

afrocolombiana la más afectada (40,4% de casos), además de que hubo un incremento del 138% de los casos procedentes del exterior, a comparación de 2017(Figura 1)⁵³.

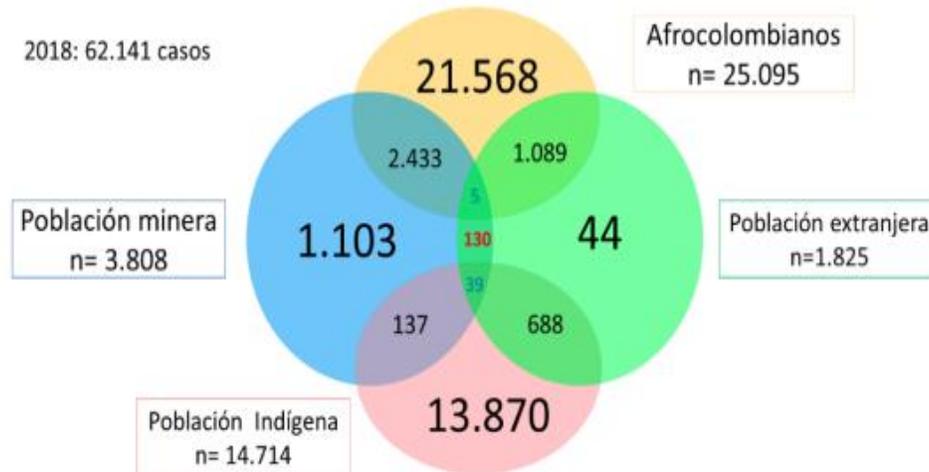


Figura 1. Número de casos de malaria reportados en Colombia en el 2018 discriminados por población en riesgo. Tomado de: Boletín de la 4 semana epidemiológica de 2019 del INS. Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2018

4.4. Ciclo biológico del parásito

El ciclo de vida de *Plasmodium* requiere un hospedero intermediario (animales vertebrados) en el cual desarrolla su etapa asexual y un hospedero definitivo, quien actúa también como vector (Mosquitos del género *Anopheles*) donde desarrolla su ciclo sexual⁴⁶.

4.4.1. Ciclo sexual

Los estadios infectivos del parásito para el mosquito son los gametocitos maduros, los cuales son absorbidos por este cuando se alimenta de sangre⁵. Los gametocitos se diferencian a gametos en el intestino del mosquito, donde se da la fertilización entre un macrogameto y un microgameto, para formar un cigoto diploide que se desarrolla en

ooquinate invasivo, el cual migra al intestino medio y se convierte en un ooquiste, del que se liberarán esporozoitos infecciosos (formas móviles del parásito) que migran a las glándulas salivales del mosquito para ser inyectados en un hospedero intermediario cuando el mosquito se vuelve a alimentar⁴⁶.

4.4.2. Ciclo extraeritrocitario

El estadio infeccioso para el humano es el esporozoito, el cual es inyectado en la dermis por el mosquito hembra infectado cuando este se alimenta de sangre^{5,13,46,50}. El esporozoito, con ayuda de la proteína similar a TRAP (TLP), busca penetrar el vaso sanguíneo más cercano para circular hasta el hígado, donde debe atravesar la barrera sinusoidal, con ayuda de la proteína del esporozoito esencial para atravesar (SPECT), SPECT2, la proteína de recorrido celular para ookinetes y esporozoitos (CeITOS), fosfolipasa (PL) y la proteína de egreso de gametos y de atravesamiento de esporozoitos (GEST)⁵. El esporozoito invade y forma una vacuola parasitófora en el hepatocito utilizando como receptores, las proteínas CD81 y B1 del hepatocito^{5,54}. En los hepatocitos infectados, el parásito se desarrolla de la forma de esporozoito a esquizonte hepático, el cual presenta un proceso de esquizogonia, produciendo hasta 40.000 merozoitos por hepatocito infectado, que son liberados al torrente sanguíneo^{5,50}.

4.4.3. Ciclo intraeritrocitario

Los merozoitos en torrente sanguíneo, invaden eritrocitos mediante una serie de pasos que requieren interacciones moleculares, transducción de señales y rapidez para evitar la respuesta inmune⁴⁵, siendo este proceso el causante de la sintomatología de la enfermedad^{55,56}

La invasión comienza con el primer contacto del merozoito al eritrocito, mediado por la unión reversible de las proteínas de superficie del merozoito (MSP) con la proteína banda 3 del glóbulo rojo^{45,47}. Estos contactos forman olas de deformación en la membrana del eritrocito, que permiten que el merozoito reoriente su polo apical hacia esta, dando lugar

a la formación de uniones entre receptores del eritrocito y ligandos del merozoito pertenecientes a la familia de proteínas PfEBA Y PfRh^{5,45}.

Cuando el polo apical se reorienta, se forma una unión estrecha, mediada principalmente por la unión del antígeno apical de membrana 1 (PfAMA-1) con el complejo de proteínas del cuello de la roptra (RON), las cuales se translocan del merozoito a la membrana del eritrocito⁴⁵. Este complejo PfAMA1-RON2 permite la liberación del contenido de las roptrias, contribuyendo a la formación de la vacuola parasitófora a medida que el parásito se internaliza en el eritrocito impulsado por su motor actina-miosina^{45,48}. Este proceso de internalización se da mientras se degradan los enlaces previamente formados, por acción de proteasas romboidales (Figura 2)^{45,57}. Cuando el parásito se invagina, hay una fusión de la membrana del eritrocito con el extremo posterior del merozoito y este queda sellado en la vacuola parasitófora y el eritrocito, causando una equinocitosis transitoria, en donde el eritrocito se contrae y genera proyecciones^{5,46}.

Una vez establecida la infección, el merozoito comienza a desarrollarse a través de las etapas de anillo, trofozoito y esquizonte, dentro del cual se replica, produciendo de 16 a 32 merozoitos, que son liberados, posterior a la ruptura de la membrana del eritrocito hospedador^{45,46}. Estos nuevos merozoitos invadirán a los eritrocitos circulantes, perpetuando así el ciclo eritrocitario⁴⁶. Durante este ciclo, una pequeña porción de merozoitos es comprometida a diferenciarse a gametocito (desarrollo sexual) mediante regulación epigenética y la activación del factor de transcripción AP2-G, cuando este se expone a ciertos factores tanto del hospedero (nivel de hemoglobina, inmunidad, tratamiento antimalárico) y/o del parásito (densidad, diversidad genética de la infección o infección mixta), entre otros^{58,59}; los estadios más jóvenes de gametocitos (I-IV) se secuestran en médula ósea hasta desarrollarse a estadio V, los cuales se secuestran en sangre periférica, volviéndose infectivos para el mosquito hembra del género *Anopheles*⁵⁹.

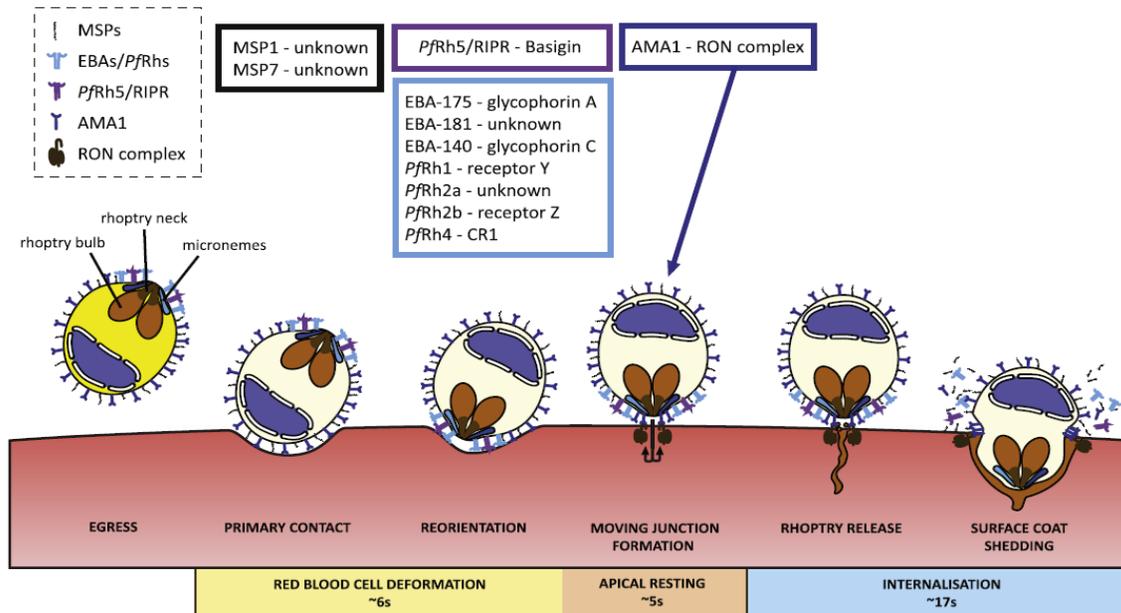


Figura 2. Interacciones receptor-ligando que tienen lugar durante el proceso de invasión del merozoito al eritrocito. (Tomado de Harvey et al.)

4.4.4. Vías alternas de invasión

Los ligandos pertenecientes a las familias PfEBA (PfEBA140, PfEBA165, PfEBA175 y PfEBA181)^{8,60} y PfRh (PfRh1, PfRh2a, PfRh2b, PfRh3, PfRh4 y PfRh5)⁸ están involucrados en el proceso de invasión de *P. falciparum* al eritrocito, y se caracterizan por ser proteínas funcionalmente redundantes, lo cual, permite al parásito modular la expresión de las mismas, concediéndole la capacidad de adaptarse a la variabilidad de receptores de los eritrocitos y permitiéndole invadir eritrocitos de cualquier edad, a diferencia de *P. vivax*⁴⁵.

Estos ligandos permiten al parásito invadir, bien sea en una vía dependiente de ácido siálico donde actúan PfEBA175, PfEBA140, PfEBA181 y PfRh1, los cuales requieren restos de ácido siálico en los receptores eritrocitarios para poder interactuar^{36,47,61}, o en una vía independiente de ácido siálico mediada principalmente por PfRh4⁴⁷ (tabla 1), además de tener funciones de señalización posterior a los pasos de invasión⁵.

Tabla 1. Características de los genes pertenecientes a la familia PfEBA y PfRh y PfAMA-1

Familia	Proteína	Ubicación en el merozoíto	Ubicación cromosómica	Peso	Receptor	Dependencia a A.S.	Comportamiento con enzimas
EBA	EBA175	Micronemas	7	175kDa	Glicoforina A	dependiente	NsTsCr
	EBA140	Micronemas	13	140kDa	Glicoforina C	dependiente	NsTsCr
	EBA181	Micronemas	1	181kDa	Proteína 4.1	dependiente	NsTrCs
RH	RH1	Roptrias	4	350kDa	Receptor "y"	dependiente	Ns
	RH2a	Roptrias	13	3130 a.a.	Receptor "z"	independiente	NrCsTr
	RH2b	Roptrias	13	3170 a.a.	Receptor "z"	independiente	NrCsTr
	RH4	Roptrias	4	220 kDa	Cr1	independiente	NrTs
	RH5	Roptrias	4	63 kDa	Basigina	independiente	NrCrTr
	AMA1	Micronemas	11	83kDa	RON2	independiente	

4.4.4.1. PfEBA175.

Es una proteína de 175 kDa, la cual se libera de los micronemas en respuesta a un aumento de Ca^{2+} citosólico, producido cuando el merozoito sale del eritrocito y detecta la baja concentración de K^+ en el plasma sanguíneo⁵. Este ligando, se une a los epítopes de sialoglicano de la Glicoforina A del eritrocito mediante su región RII, en una vía dependiente de ácido siálico, sensible a tripsina y resistente a quimotripsina⁴⁷. Además de esto, PfEBA175 tiene funciones señalizadoras, ya que al unirse a GpA, desencadena la liberación del contenido de las roptrias⁵.

Estudios recientes han demostrado que la unión de anticuerpos a GpA produce una disminución en la deformación de la membrana del eritrocito⁴⁷ y también se ha evidenciado que la unión PfEBA175-GpA desencadena una respuesta biofísica en el eritrocito, produciendo una desestabilización del citoesqueleto del eritrocito⁶².

4.4.4.2. PfEBA140

Es una proteína de 140 kDa que se liga a GpC, en una vía ácido siálico dependiente, sensible a tripsina y resistente a quimotripsina. Aún no se sabe con exactitud cuáles son

sus sitios de unión, pero, según algunos estudios, lo más probable es que la Región II de PfEBA140 se una al Glicano N de GpC⁶³⁻⁶⁵.

Esta unión no se ha visto relacionada con la deformación de la membrana del eritrocito, pero la unión de anticuerpos a GpC se ha visto relacionada a la exposición de fosfatidilserina en eritrocitos normales⁶⁶.

4.4.4.3. PfEBA181

A pesar de que aún se desconoce el receptor exacto de esta proteína en la membrana del eritrocito, se sabe que interactúa con la proteína 4.1⁶⁷ en una vía dependiente de ácido siálico, resistente a tripsina y sensible a quimotripsina. Al interactuar con la proteína 4.1, la cual una tiene relación directa con la espectrina y la actina, desestabiliza el citoesqueleto del eritrocito⁶⁷.

4.4.4.4. PfRh1

PfRh1 es una proteína de 350 kDa⁶⁴, que se almacena en las roptrias del merozoito y se liga a un receptor “y” en una vía dependiente de ácido siálico, resistente a tripsina y quimotripsina³⁶. Múltiples estudios han revelado que esta proteína tiene un papel fundamental en la señalización con Ca²⁺, permitiendo la liberación del contenido de los micronemas, incluyendo a PfEBA175⁶⁸, y está implicada en la fosforilación de la cola citoplasmática de PfRh4 por casein kinasa 2 (CK2), necesaria para la invasión mediada por PfRh4-CR1⁶⁹.

4.4.4.5. PfRh2a/b

Estas proteínas, se codifican en el cromosoma 13 y se almacenan en roptrias, miden aproximadamente 9 kb, de las cuales poseen 8 kb en común, teniendo 2700 aminoácidos comunes en su ectodominio; esta similitud indica que se produjeron por un evento de duplicación³⁸. Aún se desconoce a qué receptor se ligan, ni se sabe con exactitud que función cumplen, sin embargo, se sabe que tienen un fenotipo independiente de ácido

siálico, sensible a tripsina y resistente a quimotripsina; PfRH2b resulta ser más indispensable que PfRh2a y se ha visto que en cepas con expresión baja o nula de PfRh1, estas se expresan en mayor cantidad^{36,38}.

4.4.4.6. PfRh4

Es una proteína de 220 kDa⁶⁴, la cual se almacena en las roptrias y se une a CR1 en una vía independiente de ácido siálico y sensible a tripsina. Esta proteína es esencial en la ruta independiente de ácido siálico además de la variación reversible del fenotipo de invasión^{47,70}, como en el caso de la cepa Dd2 que normalmente es ácido siálico dependiente y cuando invade eritrocitos tratados con neuraminidasa se adapta a invadir en una ruta independiente a ácido siálico (Dd2(NM)) mediante la sobre expresión de esta proteína³⁴.

4.4.4.7. PfRh5

A diferencia de las demás, PfRh5 es una proteína más pequeña (63 kDa) sin dominio transmembranal^{39,64}, por lo que necesita la unión combinada de PfRipr⁴¹, CYRpa⁴² y P113⁴³ para poder anclarse al merozoito y cumplir su función, además se sabe que PfRh5 interactúa directamente con la basigina del eritrocito en una vía independiente de ácido siálico^{39,40,47}. Por otra parte, esta proteína, a diferencia de las demás PfRh5, no se puede interrumpir genéticamente, lo que demuestra un rol vital en la supervivencia del parásito³⁹.

Además de un rol esencial en la invasión a eritrocito, la unión PfRh5-Basigina es capaz de desencadenar una señal de Ca²⁺, que resulta en la fosforilación de proteínas del citoesqueleto del eritrocito, además de estar relacionado con la señalización para la liberación de PfEBAs y posiblemente mediar la pre formación de la unión estrecha de PfAMA1 –RON2 y preceder la liberación del contenido de las roptrias^{49,71}.

4.5. Métodos de determinación del fenotipo de invasión

4.5.1. RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular, la cual permite la amplificación de un segmento específico de ADN a partir de una plantilla de ADN o ARN, mediante la adición de una polimerasa de ADN térmicamente estable, dNTPs (trifosfatos de desoxinucleosidos) magnesio, cebadores y una solución tampón⁷². Para la amplificación, la muestra es sometida a cambios de temperatura en un termociclador donde en primer lugar se debe denaturar el ADN molde a una temperatura de 92 a 98°C, seguido del anillamiento de los cebadores directo y reverso con las dos hebras de ADN separadas a una temperatura entre 55 a 72°C, finalmente se lleva a cabo la extensión, donde actúa la polimerasa agregando dNTPs a la nueva cadena, a una temperatura de ~72°C; este ciclo se repite de 25 a 40 veces, dando como resultado una amplificación exponencial del ADN (figura 3)^{72,73}.

Polymerase chain reaction - PCR

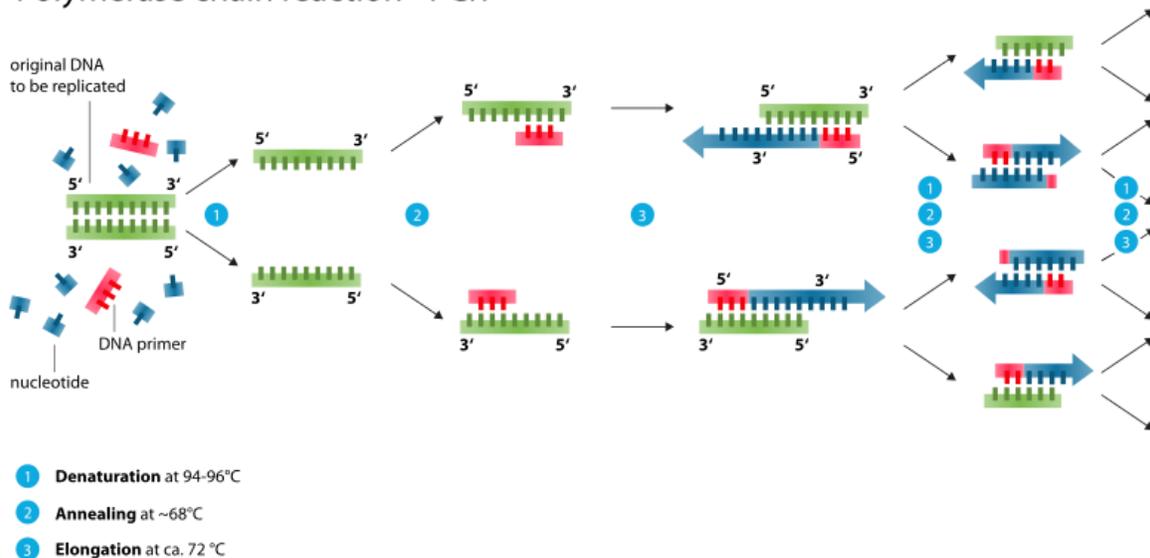


Figura 3. PCR. La PCR es una técnica molecular que permite la amplificación de un fragmento específico de ADN, donde intervienen un ADN molde, una polimerasa de ADN, dNTPs, magnesio, cebadores y una sustancia tampón, los cuales se someten a variaciones de temperatura que permitan la denaturación, anillamiento y extensión para formar nuevas hebras de ADN por cada ciclo de manera exponencial.

Tomado de: Society of Mucosal Immunology (2014)

Esta técnica tiene una amplia gama de aplicaciones como lo son el diagnóstico de enfermedades, la detección de mutaciones, secuenciación de ADN, identificación humana, entre otros⁷². También es útil para la medición de expresión génica, mediante la utilización de ADNc sintetizado a partir de ARNm, este tipo de PCR se denomina RT-PCR (del inglés Reverse transcription PCR); sin embargo, no es una prueba cuantitativa ya que al igual que la PCR convencional, la amplificación se observa mediante la formación de bandas en electroforesis⁷². Usando sondas específicas fluoromarcadas como Taqman® o tintes intercalantes como SYBR® Green, es posible realizar cuantificaciones precisas en PCR tiempo real (qPCR del inglés Quantitative PCR), ya que estas permiten detectar las amplificaciones mediante fluorescencia. En la PCR tiempo real, se puede observar claramente la amplificación exponencial del ADN, precedida de una fase inicial en la cual aún no hay fluorescencia detectable, seguida de una fase de lineal y de meseta o plateau que indica el agotamiento de los componentes de la PCR (figura 4)^{72,74}.

El ciclo donde comienza la fase exponencial se denomina valor C_T (del inglés threshold cycle o ciclo umbral), el cual permite determinar la expresión de un gen (cuantificación relativa) o de varios genes al tiempo (cuantificación absoluta)⁷².

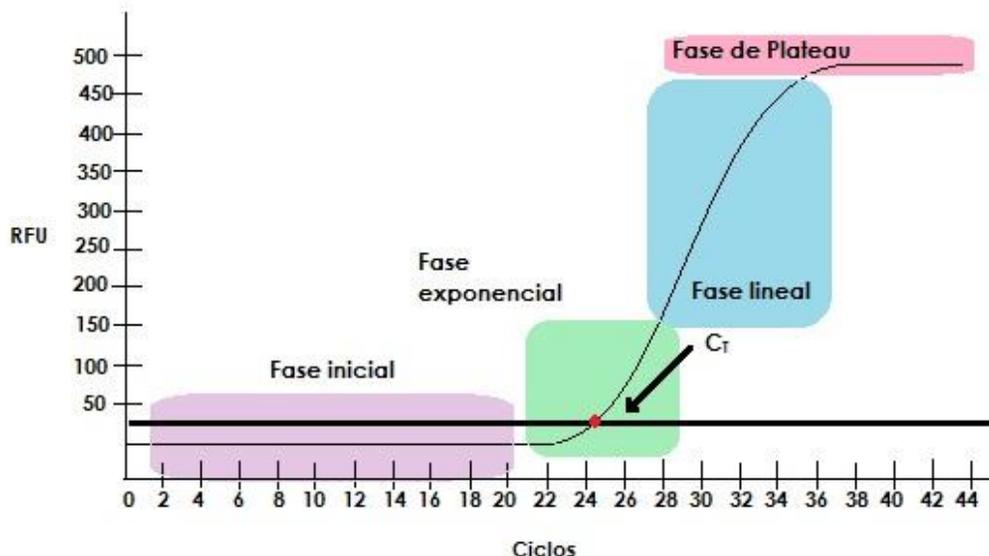


Figura 4. Comportamiento de una amplificación de qPCR típica. Esta se compone de una fase inicial, una fase exponencial, fase lineal y una fase de meseta o plateau. El valor C_T es el ciclo donde comienza la fase exponencial.

Esta metodología ya se ha utilizado previamente para la cuantificación de expresión de los genes de las familias *Pfeba* y *Pfrh*, siendo Blair el primero en utilizarla para este propósito midiendo la expresión de genes de la familia *Pfeba* en diferentes estadios eritrocitarios del parásito utilizando como modelo la cepa 3D7³². A partir de esto, múltiples estudios han utilizado RT-qPCR para el análisis comparativo de expresión de estos genes entre aislados clínicos de zonas endémicas de malaria y cepas de referencia^{6,12,75} o cambios de expresión génica relacionados a factores del hospedero⁷⁶, también se ha utilizado para determinar los posibles fenotipos de invasión de aislados y cepas y cambios transcripcionales (switch) de estos genes mediante el uso de eritrocitos tratados enzimáticamente^{34,70,77}.

4.5.2. Otros métodos

Otro de los métodos más utilizados para la determinación del fenotipo de invasión es la comparación *in vitro* de la invasión del parásito a eritrocitos sanos y eritrocitos tratados enzimáticamente^{12,34,75,78}; las enzimas utilizadas para este método son la Neuraminidasa, que remueve el ácido siálico de las glicoforinas, la tripsina, la cual realiza proteólisis de receptores como GpA y la quimotripsina que realiza la proteólisis de GpC⁷⁵, lo que bloquea la unión del receptor a su respectivo ligando; un ligando se considera sensible a la enzima cuando, posterior al tratamiento no es capaz de unirse a su receptor en el eritrocito y se ve afectada la invasión a este (Tabla 2), de esta manera se puede determinar el fenotipo de invasión de una cepa parasitaria y así mismo se pueden presumir las posibles proteínas involucradas en este.

Tabla 2. Sensibilidad de los genes pertenecientes a las familias *PfEBA* y *PfRH* al tratamiento enzimático de los eritrocitos. Tomado de Bowyer et al. (2015)

RBC Receptor	GYP A	GYP B	GYP C	E	Y	Z	Z	CR1	BSG
Merozoite Ligand	EBA175	EBL-1	EBA140	EBA181	Rh1	Rh2a	Rh2b	Rh4	Rh5
Neuraminidase	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Trypsin	S	R	S	R	R	R	S	S	R
Chymotrypsin	R	S	R	S	S	R	S	S	R

La sensibilidad o resistencia de estos ligandos a los tratamientos enzimáticos, se puede determinar por medio de ensayos de invasión posterior al tratamiento enzimático de los eritrocitos, analizados mediante citometría de flujo^{75,79,80}, ya que por medio de esta, se pueden diferenciar los eritrocitos sanos de los parasitados mediante el uso de colorantes de ADN y así comparar la parasitemia de eritrocitos sin tratamiento enzimático contra eritrocitos tratados con neuraminidasa, tripsina o quimotripsina; igualmente este método se puede utilizar para la medición de la inhibición de invasión por anticuerpos dirigidos a ligandos específicos⁷⁹.

Otros métodos utilizados, aunque con menor frecuencia, son de carácter más molecular, como los microarreglos, usados en ensayos de invasión para comparar la expresión de un gen entre una cepa cultivada en eritrocitos normales y una cepa cultivada en eritrocitos tratados enzimáticamente^{34,81}, la secuenciación de ARN para observar cambios en la secuencia génicas entre cepas y aislados^{22,34}, e inmunológicos como Blots utilizados para determinar la presencia de las proteínas PfEBA y PfRH en cepas de *P. falciparum* mediante el uso de anticuerpos e inmunofluorescencia para observar la cantidad y la ubicación de estas proteínas en los merozoitos y esquizontes utilizando anticuerpos fluoromarcados^{34,77,82}.

Para este tipo de estudios, generalmente se utilizan 2 o más de las técnicas mencionadas anteriormente.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

El presente estudio fue de tipo descriptivo experimental.

5.2. Población y muestra

La población utilizada para esta investigación fue de parásitos FCB2 de *P. falciparum* en estadio de esquizonte procedentes de cultivo *in vitro* con una parasitemia aproximada del 3-4% y la muestra de estudio fue el ARN obtenido de los mismos.

5.3. Variables

5.1.1. Variables independientes

Expresión individual de los genes *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* en la cepa FCB2 de *P. falciparum*.

5.1.2. Variables dependientes

Perfil transcripcional de los ocho genes involucrados en invasión a eritrocito de la cepa FCB2 de *P. falciparum*.

5.4. Cultivo de parásitos

Teniendo en cuenta la metodología propuesta por Trager y Jensen⁸³, las cepas FCB2 y 3D7⁸⁴ (cepa control) fueron cultivadas con eritrocitos O+, procedentes de sangre periférica de personas sanas, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de plasma, 25ul de hipoxantina 0,1M (sigma), 25ul de HEPES 1M (sigma) y 250ul de gentamicina

50ug/mL (invitrogen), y se mantuvieron en una atmósfera de O₂ al 5%, CO₂ al 5% y N al 90% a 37°C, con cambios de medio cada 48 horas.

Para la sincronización de los cultivos, se utilizó sorbitol (sigma) al 5%, siguiendo la metodología recomendada por Radfar⁸⁵ cuando la mayoría de parásitos se encontraban en estadio de anillo de 6 horas, buscando así obtener esquizontes aproximadamente a las 40 horas posteriores (figura 5).

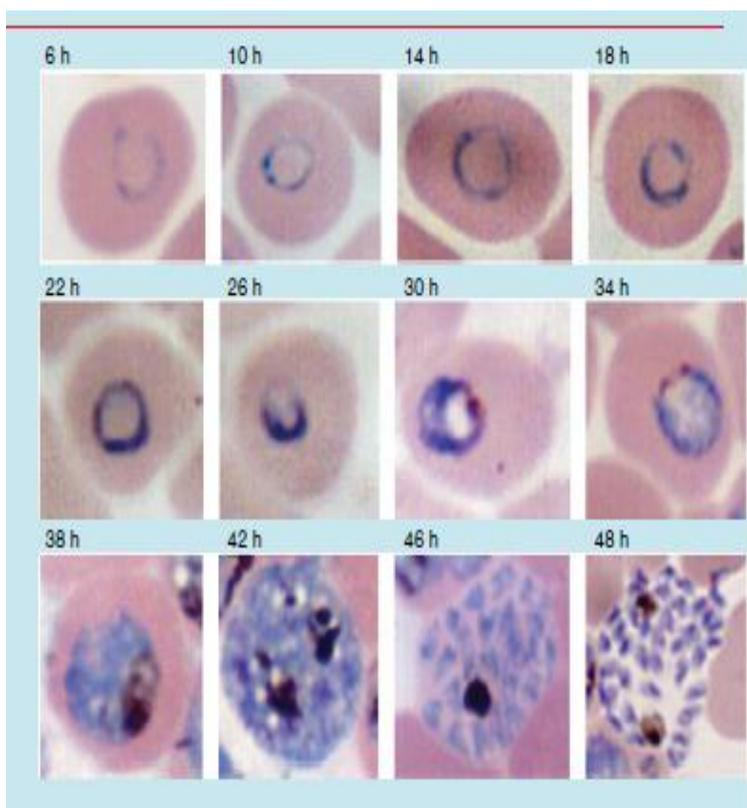


Figura 5. Estadios de *P. falciparum* durante el ciclo eritrocitario (Tomado de Radfar et al, 2009)

5.5. Extracción de ARN, ADNg y síntesis de ADNc

A partir del cultivo sincronizado de parásito, a una parasitemia de 3 a 5% en estadio de esquizonte, se tomaron alícuotas con el fin de extraer ácidos nucleicos. Los eritrocitos parasitados fueron lisados utilizando Saponina (sigma) al 0,2% en tampón fosfato salino

(PBS). El ARN total de los mismos, se extrajo mediante el método de TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen) y el método Fenol-Cloroformo, o mediante la utilización del kit ISOLATE II RNA/DNA/Protein (Bioline), con el cual también se extrajo ADNg, siguiendo las instrucciones del fabricante⁸⁶; las muestras de ARN fueron tratadas con el kit DNase I amplification grade (Invitrogen) para digerir el ADNg contaminante y a partir de estas se realizó la síntesis de ADNc con el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante⁸⁷ y sometiéndola a un ciclo térmico de 50°C durante 50 minutos y 85°C por 5 minutos.

Todo el material genético obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando la placa μ Drop™ Plate (Thermo Fisher Scientific) en el espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda (λ) de 260nm. Para determinar la pureza de estos, se dividió la absorbancia (A) $A_{\lambda 260\text{nm}}$ entre $A_{\lambda 280\text{nm}}$ y para detectar posibles contaminantes provenientes del proceso de extracción se dividió $A_{\lambda 260\text{nm}}$ entre $A_{\lambda 230\text{nm}}$ ⁸⁸.

5.6. Estandarización de la técnica RT- qPCR

6.4.1. Diseño de cebadores y sondas

Los cebadores y sondas para los 8 genes de estudio, fueron diseñados con el software Primer3Web (https://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm), teniendo como referencia, la secuencia genómica de la cepa 3D7 de *P. falciparum* obtenida de <https://protists.ensembl.org/index.html>; las secuencias de los cebadores y sonda de PfAMA1 se hicieron a partir de lo reportado por Nery en 2006⁸⁹; las secuencias obtenidas se muestran en la tabla 2.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores y sonda con su respectivo fluoróforo y apagador diseñados para cada gen.

Gen	Cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Sonda
Pfeba140	Directo	ACCGGGTCCITGTTCTAGAGA	CY5 – AAGCGAGGGTCAATCAAGCATTCCCT – BHQ2
	Reverso	TCTTCATTACTTTTCCCATTCTAGA	
Pfeba175	Directo	TGTACGAAAAGGGAATTTGATGATCC	CY5 – CAGAAAAGGAGGCTTTTCAAGTATGCCA – BHQ2
	Reverso	ACTCCTTCAGAACTTTGATATTTGGC	
Pfeba181	Directo	ACATGTTCTGAAGACAAAAGGT	CY5-TGCCGGGGTGGTATAAATAGCC-BHQ2
	Reverso	AAAAGCAGAATCATTTAAATTAGAATCG	
Pfrh1	Directo	TGATAATAATTATGAACCTACCCCTTCA	CY5 – CTTACATGGGTAACGGTAGTAACTCGA – BHQ2
	Reverso	AATACCGTTTTCTCTCTCGATAG	
Pfrh2a	Directo	ACAGAATCAACTAAAAGATCAGGAACA	FAM – ACAGCAGGAAGTGTAGCTTTATGTGTGT – BHQ1
	Reverso	ACATCATCATTCCGTTCAAAGCT	
Pfrh2b	Directo	AGTCTATCAGCAATGCGTATGA	FAM – TGACCAACGTGATGCTAGTAGTCATGGT – BHQ1
	Reverso	CCATATGAATGTCGCTACCAACA	
Pfrh4	Directo	TGCCTATAACTCAACAGCAACTT	FAM – TGAGGAGGAAAATGAAATGGGATATGGCA – BHQ1
	Reverso	TGTCTTGTCTCTATGGTGGT	
Pfrh5	Directo	AGTCTCTACATATGGAAAAGTGT	FAM – ATGAAACATATGACAAAAGTAAAAGT – BHQ1
	Reverso	CGGTTTCATCATCTGTCTCTTCA	
Pfama1	Directo	GGATTATGGGTCGATGGAAATTGTG	HEX – CCGAAGCACTCAATTCA – BHQ1
	Reverso	CATAATCTGTAAATGTTGTTTATGTTAGGTTGAT	

6.4.2. PCR punto final

Para determinar la efectividad y las concentraciones de cebadores requeridas para la amplificación de cada gen, se realizaron PCRs punto final utilizando la enzima GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega). Cada reacción contó con un volumen final de 10 ul, que corresponden a 5 ul de Master mix, cebadores a una concentración de 0,75 uM y 1 ul de ADN (con una concentración de aproximadamente 100ng/ul). Las condiciones de termociclado fueron 95°C por 2 minutos para la denaturación inicial, 95°C por 15 segundos para la denaturación en cada ciclo, 55°C por 1 minuto para el anillamiento, 75°C por 30 segundos para la extensión, 45 ciclos y 72°C por 2 minutos para la extensión final. Estos parámetros se determinaron teniendo como base el inserto de la enzima⁹⁰.

Para la electroforesis, se añadieron 5 ul de los productos de PCR obtenidos en cada pozo y se utilizaron 3ul del Marcador de Peso Molecular Hyperladder V (Bioline) como guía para determinar el peso de cada producto. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 3% teñido con Sybr safe (invitrogen) con Tris Acetato-EDTA (TAE) 1X y se corrió en una cámara ENDURO™ Gel XL Electrophoresis System (Labnet Inc.) a 120V

por 20 minutos. Las bandas obtenidas fueron observadas en un fotodocumentador MiniBis (DNR Bio-Imaging Systems).

6.4.3. qPCR

La concentración necesaria de cada sonda y la temperatura óptima para obtener curvas de amplificación, se determinó mediante qPCR. Se siguió un protocolo similar al utilizado para realizar la PCR punto final, más la adición de sonda a una concentración de 0,5M. Las condiciones de termociclado fueron las mismas que para la PCR punto final, pero en este caso se utilizó el termociclador CFX real-time PCR (Bio-rad) para observar la amplificación en tiempo real mediante el Software CFX Maestro (Biorad) (Anexo 1).

6.4.4. Medición de la expresión transcripcional de los genes

Para la medición de la expresión transcripcional de los ocho genes mediante RT-qPCR, se elaboraron curvas de calibración para cada gen, incluido el normalizador (*Pfama-1*), utilizando diluciones seriadas 1:5, 1:10, 1:100, 1:250 Y 1:500 del ADNg de FCB2 y 3D7 a partir de una concentración inicial de aproximadamente 100ng/ul. El ADNc de 3D7 se utilizó como control positivo, la muestra objeto de estudio fue el ADNc de FCB2. Cada experimento se hizo por triplicado (Anexo 2).

6.4.5. Análisis de datos

Para determinar la expresión de cada gen, se tuvieron en cuenta las eficiencias de reacción y R^2 obtenidos para cada curva de estandarización, utilizando el software CFX Maestro Software (Biorad) para verificar que todos los datos obtenidos fueran comparables entre ellos; luego de esto, se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ ⁷² en el cual se calcula la expresión relativa de cada gen en comparación al gen normalizador (*Pfama-1*). Los resultados obtenidos se graficaron en diagramas de barras en Excel, para facilitar la interpretación de los mismos.

6. RESULTADOS

6.1. Cuantificación de las muestras de ADN

Se determinó la concentración y la calidad del material genético extraído (ADNg y ADNc) de las cepas FCB2 y 3D7 mediante espectrofotometría, la cual se basa en la capacidad de absorbancia de la muestra. Por cada muestra se obtuvieron aproximadamente 30ul de material genético y para la cuantificación se utilizaron 2ul. En las tablas 4 y 5 se observa la concentración y calidad de cada una de las muestras de ADNc y ADNg utilizadas para los experimentos siguientes.

Tabla 4. Concentración y calidad de las muestras de ADNc obtenidas de las cepas FCB2 y 3D7

Cepa	Concentración ng/ul	Calidad	
		260/230	260/280
FCB2 1	99,1	1,67	0,86
FCB2 2	149,8	1,69	0,34
3D7 1	96	1,55	1,03
3D7 2	135,2	1,71	0,68

Tabla 5. Concentración y calidad de las muestras de ADNg obtenidas de las cepas FCB2 y 3D7

Cepa	Concentración ng/ul	Calidad	
		260/230	260/280
FCB2 1	19,3	1,33	0,24
FCB2 2	6,3	2,62	0,19
3D7 1	2,8	2,5	0,02
3D7 2	5,6	2,35	0,5

Un ADN con pureza optima debe tener un valor 260/280 entre 1,8 a 2.0, en este caso, todas las muestra presentaron un valor inferior, lo que indica una posible contaminación con fenoles y/o proteínas; con respecto al cociente 260/230, el valor para considerar puro un ADN se encuentra entre 1,5 a 2,2, rango en que casi todas las muestras se encontraron, lo que descarta contaminación por sales o carbohidratos⁸⁸.

6.2. Electroforesis de los genes de los genes pertenecientes a las familias *PfRh* y *PfEBA*

La presencia de los genes *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* y su transcripción en esquizontes de la cepa FCB2 se determinó mediante RT-PCR, usando cebadores específicos para cada uno. Para todos los genes se obtuvieron productos superiores a 100pb, siendo *Pfeba140* el producto con mayor peso molecular como se observa en la figura 6. En el anexo 3 se observa la electroforesis obtenida para el control 3D7.

Los genes *Pfeba181*, *Pfrh1* y *Pfrh2a* presentaron bandas de mayor intensidad a comparación de las otras, lo que en un principio puede significar una mayor transcripción de estos genes con respecto a los demás.



Figura 6. Electroforesis de los genes pertenecientes a la familia *Pfeba* y *Pfrh* y *Pfama-1* en ADNc de FCB2

6.3. PCR tiempo real

En primer lugar, se estandarizó la concentración de sonda requerida para cada uno de los genes a amplificar. Todos los genes presentaron una buena señal de amplificación con una concentración de 0,5 uM, de sonda; además, se pudieron realizar q-PCR dúplex amplificando genes con sondas de espectros diferente (Cy5 y FAM), en una misma reacción con un volumen final de 15 uL (Figura 7).

Luego de esto, se realizaron diluciones seriadas de ADNg de FCB2 1:10, 1:100, 1:250 y 1:500 por triplicado para cada uno de los genes a estudiar para poder elaborar curvas de estandarización como se observa en las figuras 8-10.

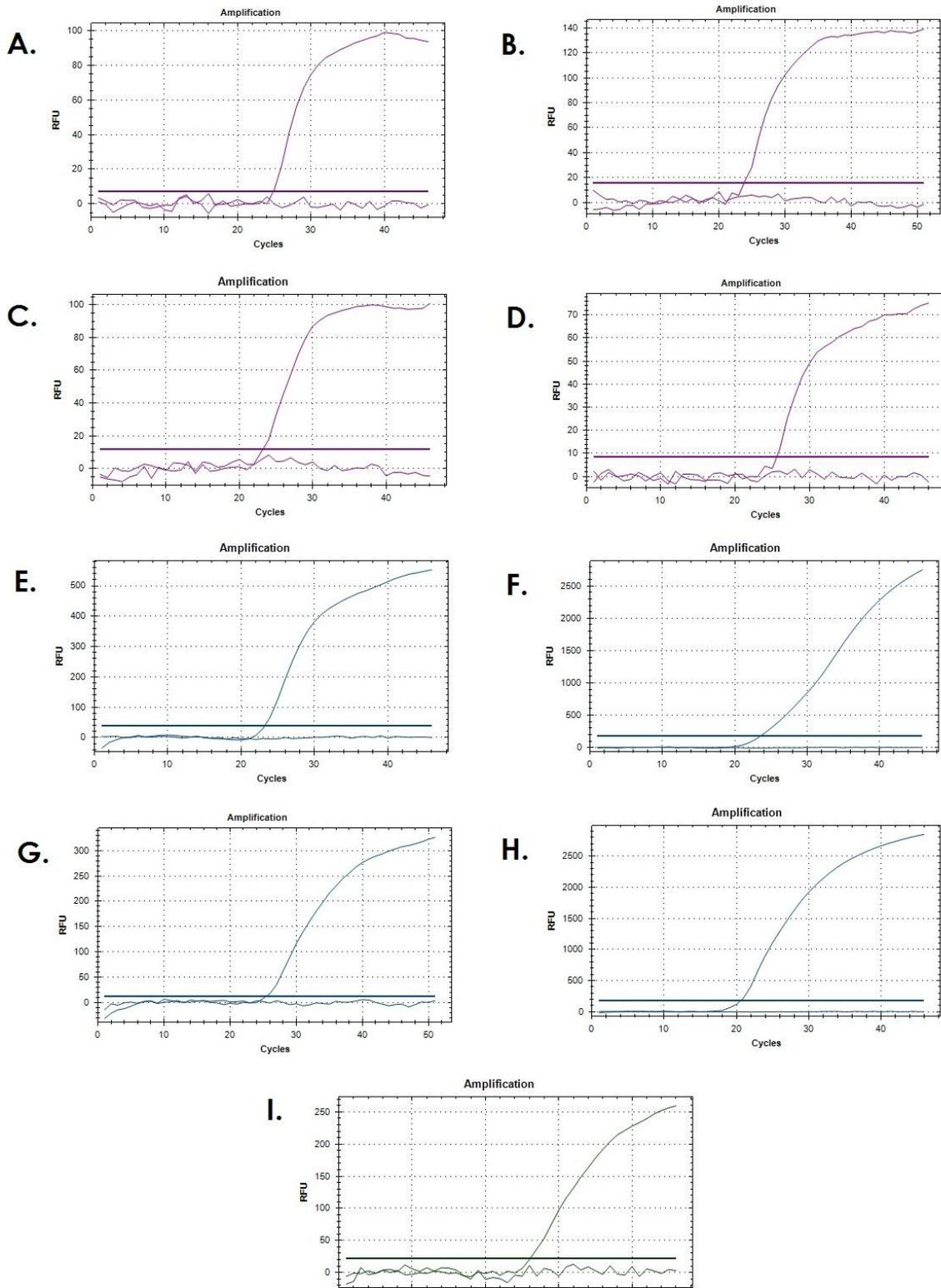


Figura 7. Estandarización de sondas para cada uno de los genes de estudio incluyendo el gen normalizador con su respectivo control negativo. A) *Pfeba175* (Cy5). B) *Pfeba140* (Cy5). C) *Pfeba181* (Cy5). D) *Pfrh1* (Cy5). E) *Pfrh2a* (FAM). F) *Pfrh2b* (FAM). G) *Pfrh4* (FAM). H) *Pfrh5* (FAM). I) *Pfama-1*(HEX). Los genes *Pfrh2a* y *Pfeba181* se amplificaron simultáneamente en una PCR dúplex con volumen final de 15 μ l

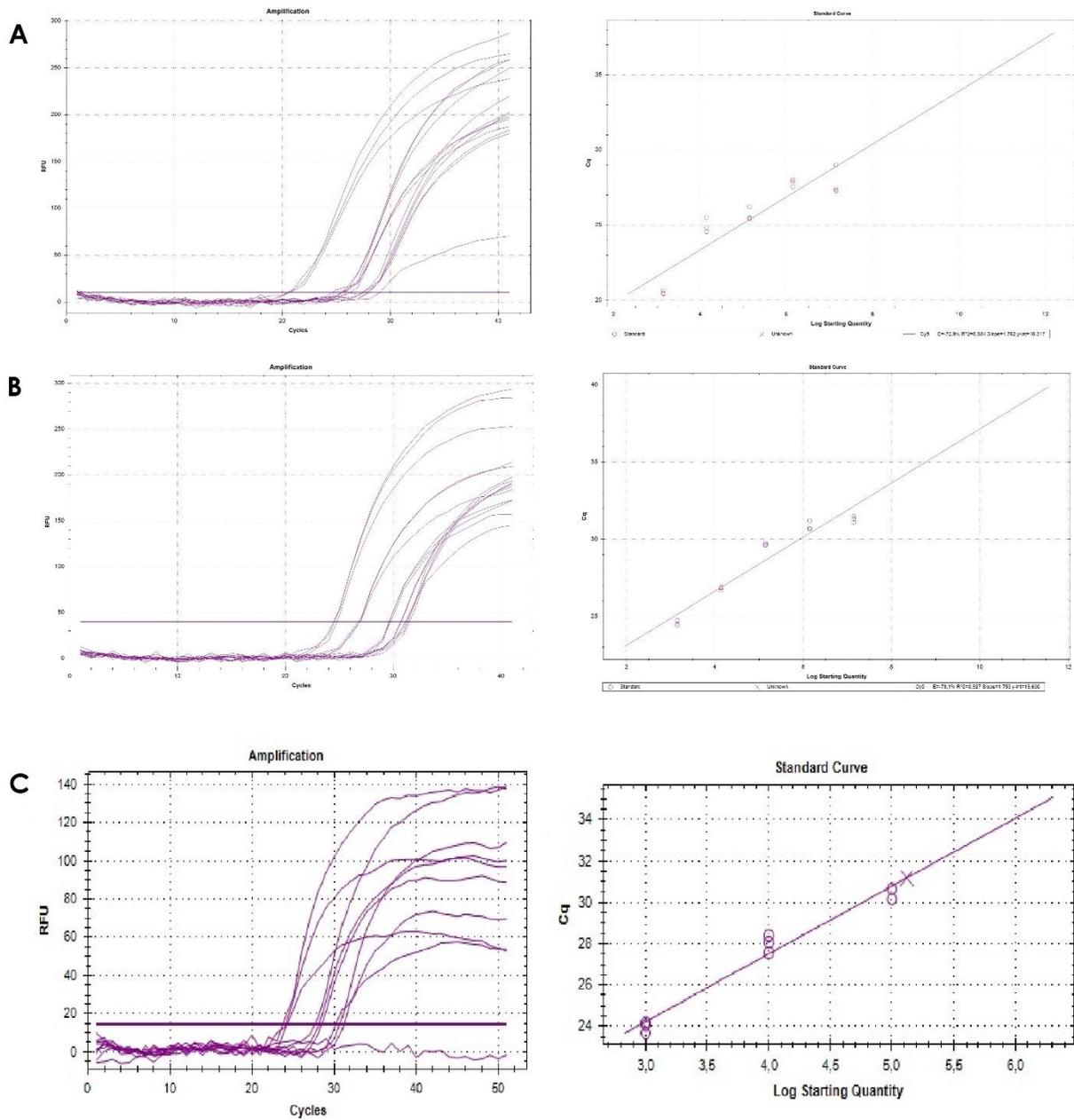


Figura 8. Curvas de estandarización para los genes de la familia Pfeba. A) Curva de estandarización para el gen Pfeba 175 (Cy5). $E=72,9$. $R^2=0,834$. B) Curva de estandarización para el gen Pfeba140 (Cy5). $E=73,1$. $R^2=0,927$. C) Curva de estandarización para el gen Pfeba181 (Cy5). $E=50,5$. $R^2=0,966$

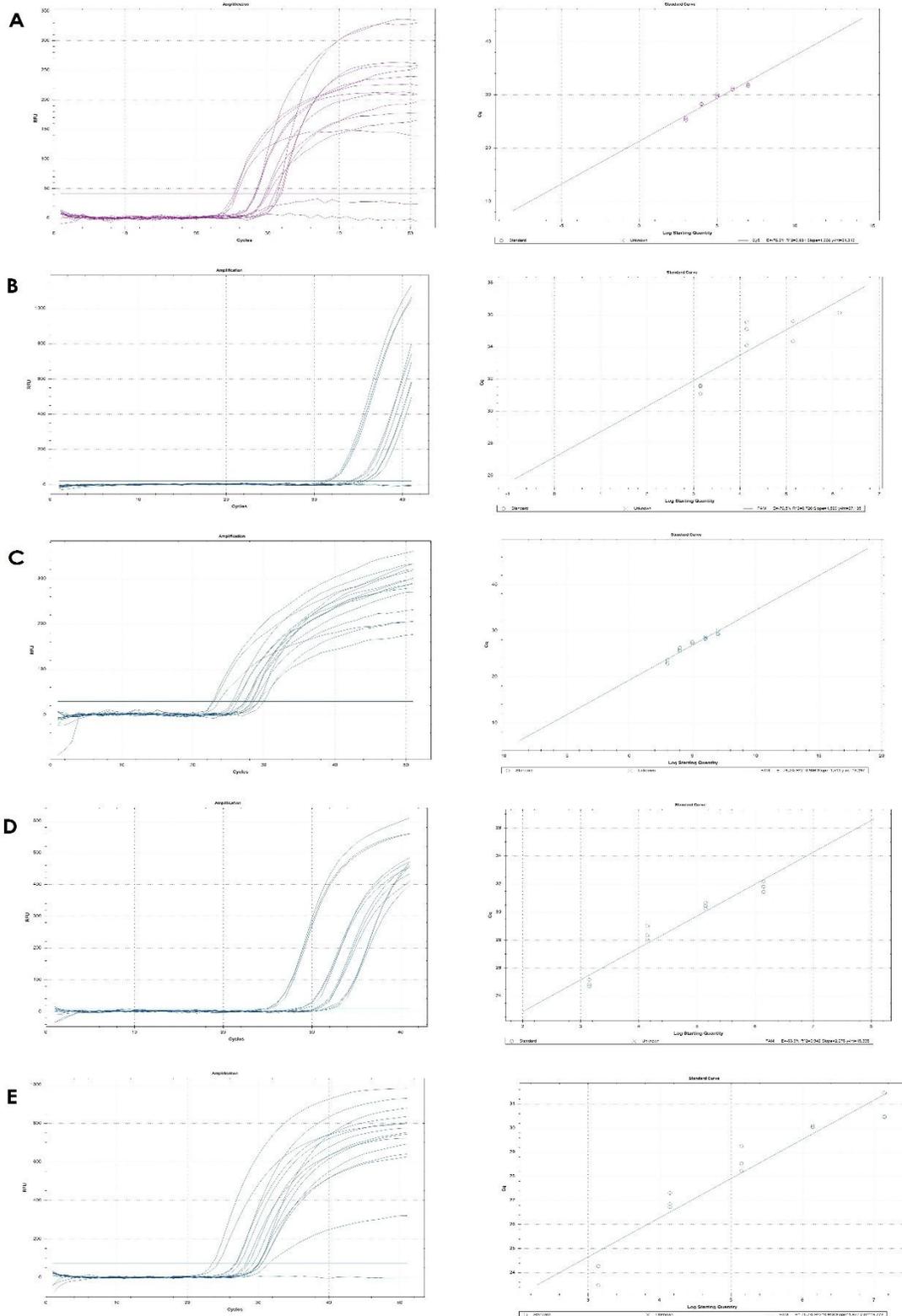


Figura 9. Curvas de estandarización de los genes de la familia *PfRh*. A) Curva de estandarización para el gen *PfRh1*. $E=76,2\%$. $R^2=0,93$. B) Curva de estandarización de *PfRh2a*. $E=76,5\%$. $R^2=0,72$. C) Curva de estandarización de *PfRh2b*. $E=78,2\%$. $R^2=0,936$. D) Curva de estandarización de *PfRh4*. $E=63,6\%$. $R^2=0,942$. E) Curva de estandarización de *PfRh5*. $E=75,7\%$. $R^2=0,913$.

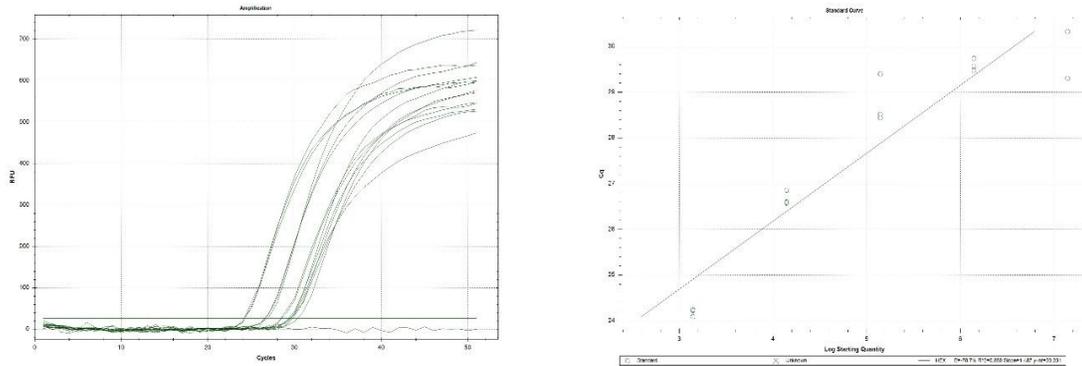


Figura 10. Curva de estandarización del gen normalizador *Pfama-1*. $E=78.7\%$. $R^2=0,88$.

6.4. Determinación del perfil transcripcional de cada gen

Para determinar la expresión de cada uno de los 8 genes, se tuvo en cuenta que las eficiencias de todas las curvas de estandarización fueran similares, a continuación, se promediaron los diferentes Cts obtenidos de cada gen en los diferentes experimentos (3) y a estos se les restó el Ct promedio del gen normalizador (Tabla 5), los valores obtenidos se graficaron en un diagrama de barras en donde el 0 represente el valor Ct del gen normalizador (figura 11).

Tabla 6. Expresión relativa de los genes pertenecientes a las familias *Pfeba* y *Pfrh*. Esta se calculó obteniendo la diferencia entre el Ct promedio obtenido para cada gen con el Ct obtenido del gen normalizador (*Pfama-1*).

Genes	Ct promedio	Expresión relativa
<i>Pfeba175</i>	24,755	3,085
<i>Pfeba140</i>	29,145	-1,305
<i>Pfeba181</i>	27,45	0,39
<i>Pfrh1</i>	25,46	2,38
<i>Pfrh2a</i>	28,01	-0,17
<i>Pfrh2b</i>	25,39	2,45
<i>Pfrh4</i>	27,5	0,34
<i>Pfrh5</i>	22,5	5,34
<i>Pfama-1</i>	27,84	

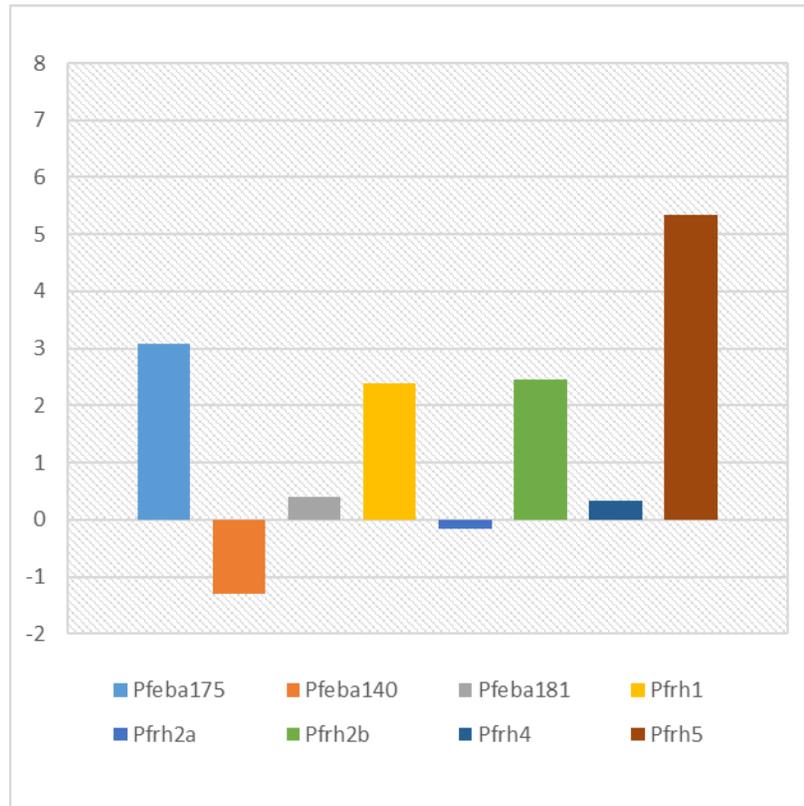


Figura 11. Expresión relativa de los genes pertenecientes a las familias PfEBA y PfRh con respecto al gen normalizador PfAMA1

7. DISCUSIÓN

FCB2 es una cepa de *Plasmodium falciparum* autóctona de Colombia que se ha utilizado como referente en múltiples estudios investigativos tanto nacional como internacionalmente^{11-13,21}; sin embargo, no se ha realizado una caracterización completa de esta cepa. El presente estudio, es el primero en aproximarse a la caracterización transcripcional enfocado a la fase de invasión intraeritrocitaria por medio de la determinación de la expresión de los genes involucrados en la invasión por vías alternas del parásito al eritrocito.

En primer lugar, para el desarrollo de este trabajo fue necesaria la estandarización de la técnica molecular RT-qPCR, lo cual implicó el mayor desafío, ya que, para esta, es necesaria la elección de un kit comercial que se adapte correctamente a las necesidades de la investigación. Para este caso fueron probadas varias enzimas diferentes, tanto individuales como en formato Master Mix; sin embargo, el kit GoTaq® Probe QPCR Master Mix de Promega fue el que mejor resultados arrojó, ya que a diferencia de las demás, con este se logró obtener una buena amplificación de cada uno de los genes, en un periodo de tiempo más corto, por lo que fue el kit utilizado para el resto del estudio. Por otro lado, el diseño de cebadores para el caso de *P. falciparum* implica una dificultad ya que es bien sabido, que posee un genoma rico en Adenina (A) y Timina (T)⁹¹, por lo que los cebadores elegidos para cada gen fueron diseñados teniendo en cuenta dichas condiciones.

Seguido a esto, se procedió a realizar la qPCR con ADNg buscando obtener la amplificación en tiempo real de cada gen mediante el uso de sondas TaqMan, ya que proporcionan resultados más confiables al ser más específicas que otras sustancias como lo son los intercalantes de ADN.

El paso a seguir fue la realización de curvas de estandarización con ADNg para cada uno de los genes, un punto clave para la determinación del perfil transcripcional de estos. Para esto, se utilizó ADNg obtenido de diferentes cultivos de parásitos de la cepa FCB2. Cabe resaltar que una de las mayores dificultades durante este proceso fue la no

obtención de curvas con R^2 ideales (es decir un valor mínimo de 0,96), además de una baja eficiencia de reacción (E), causada especialmente por la diferencia entre los valores Ct obtenidos entre las réplicas de cada punto de la curva de estandarización, esto debido a posibles errores de pipeteo o la baja calidad de las muestras de ADN utilizadas, lo que produjo que la técnica tuviera una baja reproducibilidad; no obstante, la mayoría de eficiencias obtenidas en cada curva fueron muy similares, por lo que aun así se prosiguió con el estudio, sin embargo, es necesario continuar con el trabajo de estandarización, en búsqueda de obtener mejores eficiencias de reacción y R^2 con el objetivo de obtener resultados reproducibles.

Se hicieron varios ensayos donde se amplificó el ADNc de la cepa FCB2 junto a las diluciones seriadas de ADNg; a partir de estos ensayos, para cada gen se obtuvieron diferentes Cts con valores similares, los cuales se promediaron para obtener un valor Ct único, para luego ser normalizado con el gen *PfAMA-1* (tabla 6), obteniendo así una expresión relativa de cada gen con relación a *PfAMA-1*, la cual se graficó en un diagrama de barras (figura 11).

Al ser el primer estudio en aproximarse a la caracterización del perfil transcripcional de estos genes en la cepa FCB2, no es posible comparar los resultados obtenidos con otros estudios, sin embargo se puede comparar la estandarización de la técnica Rt-qPCR, ya que es una técnica que se ha utilizado en varios estudios de expresión de estos genes en particular, especialmente en la cepa 3D7^{7,32}, Dd2³⁴ y aislados clínicos^{6,12,60,75}. En todos estos casos, el protocolo de estandarización ha sido muy similar desde el cultivo, la extracción de ARN y la síntesis del ADNc; se ha utilizado una cuantificación relativa a un gen normalizador mediante el método $\Delta \Delta Ct$, siendo *PfAMA-1* previamente utilizado para este propósito en los estudios de Nery et al⁸⁹ y Gomez-Escobar et al⁹², además, en algunos de estos, también se optó por la utilización de sondas tipo TaqMan^{32,92}. Por otra parte, las condiciones de termociclado utilizadas en este estudio son muy similares a las utilizadas en los estudios ya mencionados, siendo el diseño de los cebadores y la utilización de diferentes tipos de Taq Polimerasas la diferencia más significativa entre el presente y los estudios previos, lo que se puede ver reflejado en la variación de eficiencia y reproducibilidad de la técnica.

En la figura 11 se observa el resultado final al que se quería llegar en este estudio, es decir, el perfil transcripcional de los genes involucrados en la invasión a eritrocito que presentan los merozoitos de la cepa FCB2 de *P. falciparum*. A partir de esto, se puede empezar a develar la ruta de invasión que utiliza esta cepa; en primer lugar, se observó una mayor transcripción de los genes pertenecientes a la familia *PfRh* a comparación de los pertenecientes a la familia *PfEBA*, lo que en un inicio puede indicar que esta cepa invade en una ruta independiente de ácido siálico por ende, resistente a la neuraminidasa, como es el caso de la cepa 3D7; el resultado obtenido es comparable y concordante con el estudio realizado por Lopez-Perez y colaboradores¹², en donde se caracterizó el fenotipo de invasión de 6 aislamientos colombianos, de los cuales 5 eran resistentes a la neuraminidasa, lo que puede significar que FCB2 es un buen referente de *P. falciparum* en el país al tener un comportamiento similar a los aislados estudiados.

Cabe destacar que la alta transcripción de un gen no significa siempre una traducción proporcional o simplemente que haya traducción (como es el caso de los pseudogenes *PfRh3*^{39, 93} y *PfEBA165*^{56, 89}), así que a pesar de que exprese los 8 genes analizados en el presente estudio, no significa que todos se traduzcan en la misma cantidad; por esto mismo, con este trabajo no se puede determinar con exactitud cuál es el fenotipo de invasión de esta cepa si no simplemente hacer una aproximación mediante la determinación de los genes que se expresan en mayor cantidad, por lo que es necesario, complementar este trabajo con ensayos de invasión de esta cepa a eritrocitos tratados con neuraminidasa, tripsina y quimotripsina mediante métodos como la citometría de flujo.

Como se ha mencionado ya, la redundancia funcional de las proteínas que traducen estos genes, permite al parásito adaptarse a las condiciones del hospedero, además de evadir la respuesta inmune, silenciándolos y activándolos mediante mecanismos epigenéticos⁷⁷, por lo que es probable que la cepa FCB2 sea un ejemplo de la adaptación de *P. falciparum* no solamente a un hospedero en particular si no en general a la población colombiana. A futuro, sería ideal realizar análisis comparativos no solamente con cepas de referencia de otras zonas endémicas de malaria, si no con aislados obtenidos de diferentes regiones de Colombia, determinando el fenotipo de invasión de

cada uno de estos, para poder establecer si los fenotipos de FCB2 y los aislados se correlacionan y verdaderamente esta cepa puede ser un buen referente de *P. falciparum* en Colombia. Así mismo, se pueden realizar estudios poblacionales en zonas endémicas del país, para correlacionar el comportamiento fenotípico de esta cepa con las características propias de la población colombiana, siempre con miras a desarrollar mecanismos de control y erradicación de la enfermedad para disminuir los casos de morbilidad y mortalidad en el país.

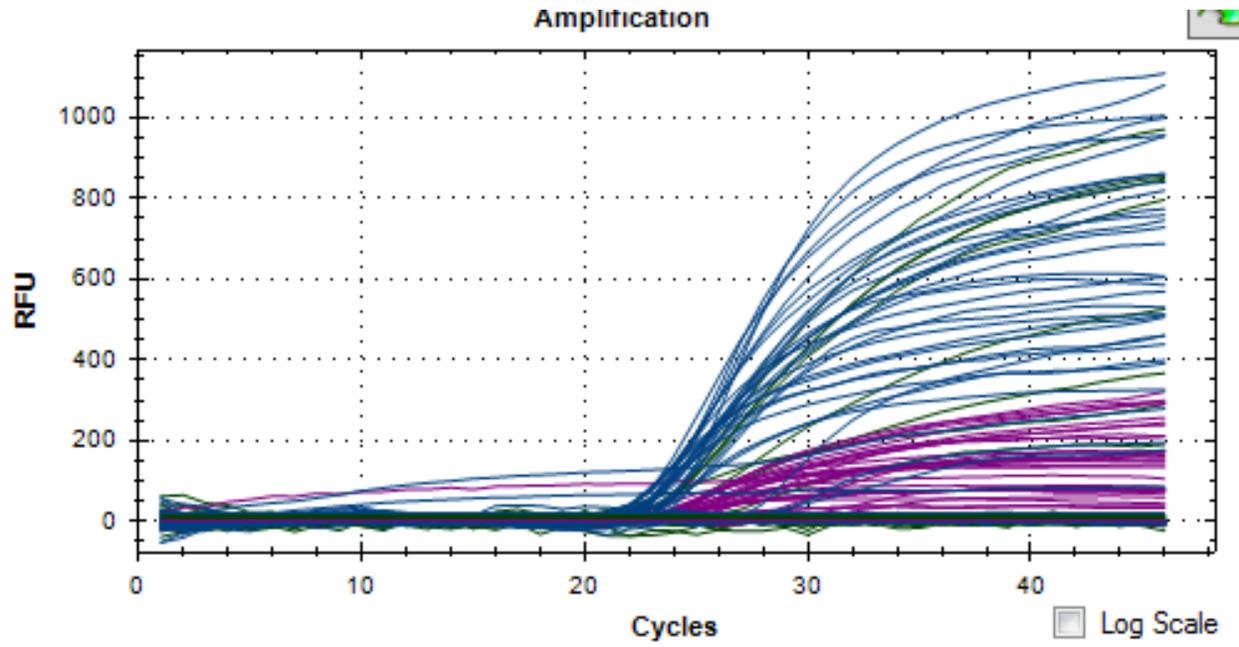
8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se estandarizó la técnica RT-qPCR para los ocho genes de estudio, sin embargo, es necesario optimizar la técnica para obtener resultados reproducibles.

Mediante la técnica RT-qPCR, se pudo determinar que efectivamente, en los merozoitos de la cepa FCB2 se transcriben todos los genes de estudio, al igual que lo hacen los merozoitos de otras cepas como 3D7, (utilizada en este caso como control positivo), lo que confirma que estos genes son usados por la cepa conjuntamente para la invasión exitosa del merozoito al glóbulo rojo, además de esto, se observó que algunas bandas eran más fuertes que otras y que hay Cts inferiores a otros, lo que indica que no todos los genes se expresan de igual manera.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, en donde se observó un predominio los genes pertenecientes a la familia *Pfrh* en comparación a *Pfeba*, se puede comenzar a indagar que esta cepa invade en una vía independiente de ácido siálico, hipótesis que puede ser confirmada con ensayos de invasión a eritrocitos tratados enzimáticamente.

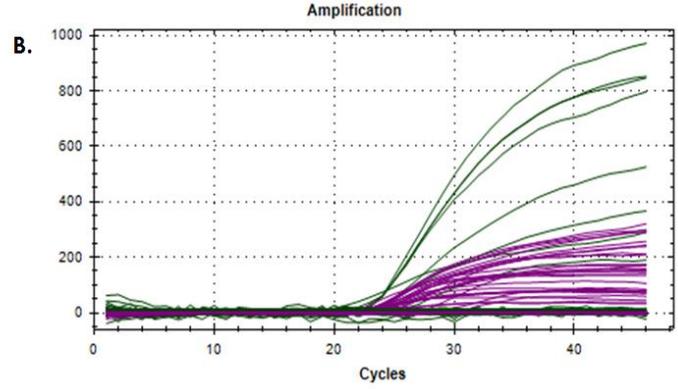
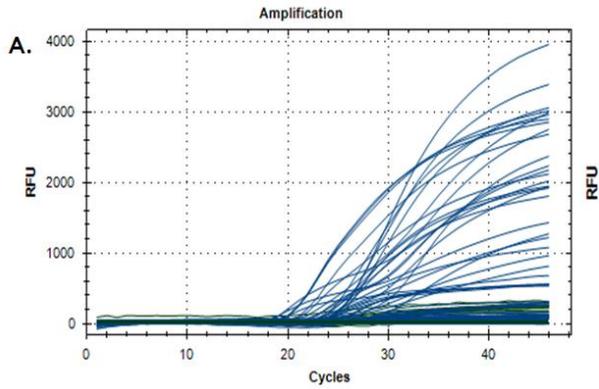
ANEXOS



FAM HEX Cy5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	65,0	Unk								
B	64,5	Unk								
C	63,3	Unk								
D	61,4	Unk								
E	59,0	Unk								
F	57,0	Unk								
G	55,7	Unk								
H	55,0	Unk								

Anexo 1. Determinación de la concentración y la temperatura óptima de amplificación para las sondas de cada uno de los genes



Anexo 2. Montaje de placas para la cuantificación de los genes pertenecientes a la familia *Pfeba* y *PfRh* en ADNc más las diluciones seriadas de ADNg para cada gen. A) Montaje de la placa 1: genes *PfRh* (fluoroforo FAM) más *Pfama-1* (fluoroforo HEX). B) Montaje de la placa 2: genes *PfEBA* más *PfRH1* (fluoroforo FAM) más *Pfama-1* (fluoroforo HEX).



Anexo 3. Electroforesis de los genes pertenecientes a la familia *PfEBA* y *PfRh* y *PfAMA-1* en ADNc de la cepa 3D7 de *P. falciparum*.

REFERENCIAS

1. WHO. Paludismo [Internet]. 2018 [cited 2019 May 5]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Muñoz M, Suarez D, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Rh1 high activity binding peptides inhibit high percentages of Plasmodium falciparum FVO strain invasion. *Vaccine*. 2013;31(14):1830–7.
3. WHO. World Malaria Report. 2018. ISBN 978 92 4 156469 4. [Internet]. 2018. Available from: www.who.int/malaria
4. Castro MC. Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication : The Role of the Environment. 2017;
5. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* [Internet]. 2016;167(3):610–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
6. Tarr SJ, Díaz-Ingelmo O, Stewart LB, Hocking SE, Murray L, Duffy CW, et al. Schizont transcriptome variation among clinical isolates and laboratory-adapted clones of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1–13.
7. Taylor HM, Grainger M, Holder AA. Variation in the expression of a *Plasmodium falciparum* protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infect Immun* [Internet]. 2002;70(10):5779–89. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128319&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CA. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in Plasmodium falciparum. *PLoS One*. 2012;7(1).
9. Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):460–2.
10. García-huertas P, Pabón A, Arias C, Blair S. Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de Solanum nudum con actividad anti- Plasmodium. 2013;78–87.

11. Arango E, Carmona-fonseca J, Blair S. Susceptibilidad in vitro de aislamientos colombianos de Plasmodium falciparum a diferentes antipalúdicos. 2008;19(18):213–23.
12. Lopez-Perez M, Villasis E, Machado RLD, Póvoa MM, Vinetz JM, Blair S, et al. Plasmodium falciparum Field Isolates from South America Use an Atypical Red Blood Cell Invasion Pathway Associated with Invasion Ligand Polymorphisms. PLoS One [Internet]. 2012;7(10):e47913. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0047913>
13. Curtidor H, Vanegas M, P. Alba M, E. Patarroyo M. Functional, Immunological and Three-Dimensional Analysis of Chemically Synthesised Sporozoite Peptides as Components of a Fully-Effective Antimalarial Vaccine. Curr Med Chem. 2011;18(29):4470–502.
14. Hulse JH. Biotechnologies: Past history, present state and future prospects. Trends Food Sci Technol. 2004;15(1):3–18.
15. Cox FEG. History of discovery of malaria parasites & vectors(171). 2010;(Figure 1):1–9.
16. Sherman IW. Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. 1998. 565 p.
17. Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of Erythrocytes by Malaria Merozoites. Source Sci New Ser [Internet]. 1975;187(4178):748–50. Available from: <http://www.jstor.org/stable/173>
18. Pasvol G, Jungery M, Weatherall DJ, Parsons SF, Anstee DJ, Tanner MJA. Glycophorin As a Possible Receptor for Plasmodium Falciparum. Lancet. 1982;320(8305):947–50.
19. Pasvol G. Receptors on red cells for Plasmodium falciparum and their interaction with merozoites. Vol. 307, Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 1984. p. 189–200.
20. Perkins ME. Binding of glycophorins to Plasmodium falciparum merozoites. Mol Biochem Parasitol. 1984;10(1):67–78.
21. Camus D, Hadley TJ. A Plasmodium falciparum Antigen That Binds to Host Erythrocytes and Merozoites. Adv Sci. 1985;230(4725):553–6.
22. Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1992;89(15):7085–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1496004><http://www.pubmedcentral.nih.gov/artic>

render.fcgi?artid=PMC49650

23. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* [Internet]. 1994 Jun 24;264(5167):1941–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8009226>
24. Dolan SA, Proctor JL, Alling DW, Okubo Y, Wellems TE, Miller LH. Glycophorin B as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 1994 Mar;64(1):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078523>
25. Adams JH, Blair PL, Kaneko O, Peterson DS. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2002;17(6):297–9.
26. Lobo C-A. Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baeb1). *Blood* [Internet]. 2003 Jun 1;101(11):4628–31. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-10-3076>
27. Gilberger T-W, Thompson JK, Triglia T, Good RT, Duraisingh MT, Cowman AF. A Novel Erythrocyte Binding Antigen-175 Parologue from *Plasmodium falciparum* Defines a New Trypsin-resistant Receptor on Human Erythrocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Apr 18;278(16):14480–6. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M211446200>
28. Rayner JC, Galinski MR, P. I, Barnwell JW. Two *Plasmodium falciparum* genes express merozoite proteins that are related to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(17):9648–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16919/>
29. Triglia T, Thompson J, Caruana SR, Delorenzi M, Speed T, Cowman AF. Identification of Proteins from *Plasmodium falciparum* That Are Homologous to Reticulocyte Binding Proteins in *Plasmodium vivax*. 2001;69(2):1084–92.
30. Rayner JC, Vargas-Serrato E, Huber CS, Galinski MR, Barnwell JW. A *Plasmodium falciparum* Homologue of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein (PvRBP1) Defines a Trypsin-resistant Erythrocyte Invasion Pathway. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Dec 3;194(11):1571–82. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.194.11.1571>

31. Taylor HM, Triglia T, Thompson J, Sajid M, Fowler R, Wickham ME, et al. Plasmodium falciparum Homologue of the Genes for Plasmodium vivax and Plasmodium yoelii Adhesive Proteins, Which Is Transcribed but Not Translated. Infect Immun [Internet]. 2001;69(6):3635–3645. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98354/>
32. Blair PL, Witney A, Haynes JD, Moch JK, Carucci DJ, Adams JH. Transcripts of developmentally regulated Plasmodium falciparum genes quantified by real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(10):2224–31.
33. Kaneko O, Mu J, Tsuboi T, Su XZ, Torii M. Gene structure and expression of a Plasmodium falciparum 220-kDa protein homologous to the Plasmodium vivax reticulocyte binding proteins. Mol Biochem Parasitol. 2002;121:275–8.
34. Gaur D, Furuya T, Mu J, Jiang L Bin, Su XZ, Miller LH. Upregulation of expression of the reticulocyte homology gene 4 in the Plasmodium falciparum clone Dd2 is associated with a switch in the erythrocyte invasion pathway. Mol Biochem Parasitol. 2006;145(2):205–15.
35. Tham W, Wilson DW, Lopaticki S, Schmidt CQ, Tetteh-quarcoo PB. Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. 2010;107(40):17327–32.
36. Triglia T, Duraisingh MT, Good RT, Cowman AF. Reticulocyte-binding protein homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by Plasmodium falciparum. 2005;55:162–74.
37. Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, et al. Phenotypic variation of Plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. Embo J. 2003;22(5):1047–57.
38. Sahar T, Reddy KS, Bharadwaj M, Pandey AK, Singh S, Chitnis CE, et al. Plasmodium falciparum reticulocyte binding-like homologue protein 2 (PfRH2) is a key adhesive molecule involved in erythrocyte invasion. PLoS One. 2011;6(2).
39. Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - An essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. Int J Parasitol [Internet]. 2009;39(3):371–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.006>

40. Crosnier C, Bustamante L, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2011;480(7378):534–7.
41. Chen L, Lopaticki S, Riglar DT, Dekiwadia C, Uboldi AD, Tham W-H, et al. An EGF-like Protein Forms a Complex with PfRh5 and Is Required for Invasion of Human Erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Blackman MJ, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011 Sep 1;7(9):e1002199. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002199>
42. Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Jan 27;112(4):1179–84. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1415466112>
43. Galaway F, Drought LG, Fala M, Cross N, Kemp AC, Rayner JC, et al. P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of *Plasmodium falciparum* RH5. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Feb 10;8:14333. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms14333>
44. Espinal, Carlos. Moreno, Edith. Guerra, patricia. De la Vega P. Aislamiento Y Caracterizacion De Cepas Colombianas De *Plasmodium Falciparum*. 1982;2(3).
45. Harvey KL, Gilson PR, Crabb BS. A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* [Internet]. 2012;42(6):567–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.011>
46. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham WH, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017;22(2):232–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>
47. Satchwell TJ. Erythrocyte invasion receptors for *Plasmodium falciparum* : new and old. *Transfus Med*. 2016;26(2):77–88.
48. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: Biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;117(1):11–25.
49. Weiss GE, Gilson PR, Taechalerpaisarn T, Tham WH, de Jong NWM, Harvey KL, et al. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand

- Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLoS Pathog* [Internet]. 2015;11(2):1–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>
50. Thillainayagam M, Ramaiah S. Mosquito, malaria and medicines – A review. *Res J Pharm Technol*. 2016;9(8):1268–76.
 51. Carvajal venus zenith meliza, Martinez CND, Vergara JMA. Memorias © 2012 - 2013. *Minist Prot Soc*. 2013;(la malaria en colombia):7–46.
 52. Padilla JC, Uribe GÁ, Araújo RM, Narváez PC, Valencia SH. Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2011;106 Suppl(Suppl 1):114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881765><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4830684>
 53. Semanal BE. Comportamiento de la notificación malaria 2018. 2019;(2). Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Malaria 2017.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/Malaria%202017.pdf)
 54. Rodrigues CD, Hannus M, Prudêncio M, Martin C, Gonçalves LA, Portugal S, et al. Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2008 Sep;4(3):271–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131280800231X>
 55. Dankwa S, Chaand M, Kanjee U, Jiang RHY, Nobre L V., Goldberg JM, et al. Genetic Evidence for Erythrocyte Receptor Glycophorin B Expression Levels Defining a Dominant *Plasmodium*. *Immunotherapy*. 2017;85(10):1–15.
 56. Tham WH, Healer J, Cowman AF. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012;28(1):23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.002>
 57. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol Rev*. 2016;40(3):343–72.
 58. Delves MJ, Straschil U, Ruecker A, Miguel-Blanco C, Marques S, Dufour AC, et al. Routine in vitro culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nat Protoc* [Internet]. 2016;11(9):1668–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.096>

59. Henry NB, Sermé SS, Siciliano G, Sombié S, Diarra A, Sagnon N, et al. Biology of *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratio and implications in malaria parasite transmission. *Malar J* [Internet]. 2019;1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2707-0>
60. Persson KEM, McCallum FJ, Reiling L, Lister NA, Stubbs J, Cowman AF, et al. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest*. 2008;118(1):342–51.
61. Ararat-sarria M, Patarroyo MA, Curtidor H, Richard D. Parasite-Related Genetic and Epigenetic Aspects and Host Factors Influencing *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. 2019;8(January):1–15.
62. Koch M, Wright KE, Otto O, Herbig M, Salinas ND, Tolia NH, et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 175 triggers a biophysical change in the red blood cell that facilitates invasion . *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(16):4225–30.
63. Mayer DCG, Jiang L, Achur RN, Kakizaki I, Gowda DC, Miller LH. The glycophorin C N-linked glycan is a critical component of the ligand for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte receptor BAEBL. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006 Feb 14;103(7):2358–62. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0510648103>
64. Patarroyo ME, Alba MP, Rojas-Luna R, Bermudez A, Aza-Conde J. Functionally relevant proteins in *Plasmodium falciparum* host cell invasion. *Immunotherapy* [Internet]. 2017;9(2):131–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28128713><http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt-2016-0091>
65. Zerka A, Olechwiec A, Rydzak J, Kaczmarek R, Jaskiewicz E. Baculovirus-expressed *Plasmodium reichenowi* EBA-140 merozoite ligand is host specific. *Parasitol Int* [Internet]. 2016 Dec;65(6):708–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576916301817>
66. Head DJ, Lee ZE, Poole J, Avent ND. Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br J Haematol* [Internet]. 2005 Apr;129(1):130–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2005.05407.x>
67. Lanzillotti R, Coetzer TL. The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the

- Plasmodium falciparum EBA-181 protein. Malar J [Internet]. 2006 Dec 6;5(1):100. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-5-100>
68. Gao X, Gunalan K, Yap SSL, Preiser PR. Triggers of key calcium signals during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. Nat Commun [Internet]. 2013;4:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3862>
 69. Tham W-H, Lim NTY, Weiss GE, Lopaticki S, Ansell BRE, Bird M, et al. Plasmodium falciparum Adhesins Play an Essential Role in Signalling and Activation of Invasion into Human Erythrocytes. Blackman MJ, editor. PLOS Pathog [Internet]. 2015 Dec 22;11(12):e1005343. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005343>
 70. Stubbs J. Molecular Mechanism for Switching of P. falciparum Invasion Pathways into Human Erythrocytes. Science (80-) [Internet]. 2005 Aug 26;309(5739):1384–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1115257>
 71. Aniwah Y, Gao X, Hao P, Meng W, Lai SK, Gunalan K, et al. P. falciparum RH5-Basigin interaction induces changes in the cytoskeleton of the host RBC. Cell Microbiol [Internet]. 2017 Sep;19(9):e12747. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12747>
 72. Stephenson FH. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. Cell. 2003. 302 p.
 73. Society for Mucosal Immunology. PCR: The Polymerase Chain Reaction [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 10]. Available from: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/>
 74. Integrated DNA Technologies. qPCR Application Guide. 4th ed. Belgium; 2015.
 75. Bowyer PW, Stewart LB, Aspeling-Jones H, Mensah-Brown HE, Ahouidi AD, Amambua-Ngwa A, et al. Variation in Plasmodium falciparum erythrocyte invasion phenotypes and merozoite ligand gene expression across different populations in areas of malaria endemicity. Infect Immun. 2015;83(6):2575–82.
 76. Valmaseda A, Bassat Q, Aide P, Cisteró P, Jiménez A, Casellas A, et al. Host age and expression of genes involved in red blood cell invasion in Plasmodium falciparum field isolates. Sci Rep. 2017;7(1):1–9.
 77. Cortés A, Carret C, Kaneko O, Yim Lim BYS, Ivens A, Holder AA. Epigenetic Silencing of Plasmodium falciparum Genes Linked to Erythrocyte Invasion. PLoS Pathog [Internet].

- 2007;3(8):e107. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030107>
78. Viewi O, Hadley TI, Klotz FW, Miller LH. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. *Viewi*. 1986;451–77.
 79. Bei AK, Duraisingh MT. Measuring Plasmodium falciparum Erythrocyte Invasion Phenotypes Using Flow Cytometry. In 2015. p. 167–86. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2815-6_14
 80. Theron M, Hesketh RL, Subramanian S, Rayner JC. An adaptable two-color flow cytometric assay to quantitate the invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum parasites. *Cytom Part A* [Internet]. 2010 Nov;77A(11):1067–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20972>
 81. Hayton K, Gaur D, Liu A, Takahashi J, Henschen B, Singh S, et al. Erythrocyte Binding Protein PfRH5 Polymorphisms Determine Species-Specific Pathways of Plasmodium falciparum Invasion. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2008;4(1):40–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677973/>
 82. Mu J, Seydel KB, Bates A, Su X. Recent Progress in Functional Genomic Research in Plasmodium falciparum. 2010;(301):279–86.
 83. Trager W, B JJ. Human malaria parasites in Continuous culture. 1976.
 84. BEI Resources Repository, NIAID, NIH: Plasmodium falciparum, Strain 3D7, MRA-102, contributed by Daniel J. Carucci. [Internet]. Available from: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIParasiticProtozoa/MRA-102.aspx>
 85. Radfar A, Méndez D, Moneriz C, Linares M, Marín-García P, Puyet A, et al. Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1899–915.
 86. Bionline. ISOLATE II RNA Plant Kit [Internet]. 2018. Available from: https://www.bionline.com/au/downloads/dl/file/id/1204/isolate_ii_ma_plant_kit_protocol.pdf
 87. Invitrogen. SuperScript™ III Reverse Transcriptase. Thermo Fisher. 2004.
 88. Regalado A. Banco Nacional De Adn Carlos Iii. 2005;6. Available from: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
 89. Nery S, Deans A, Mosobo M, Marsh K, Rowe JA, Conway DJ. Expression of Plasmodium

- falciparum genes involved in erythrocyte invasion varies among isolates cultured directly from patients. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(2):208–15.
90. Promega. GoTaq® Probe qPCR Master Mix. 2012.
 91. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* [Internet]. 2002 Oct;419(6906):498–511. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature01097>
 92. Gomez-escobar N, Amambua-ngwa A, Walther M, Okebe J, Ebonyi A, Conway DJ. Erythrocyte Invasion and Merozoite Ligand Gene Expression in Severe and Mild *Plasmodium falciparum* Malaria. 2010;201:444–52.
 93. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. Vol. 124, *Cell*. 2006. p. 755–66.