



# Determinación de la unión a reticulocitos humanos de los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*

Giselle Aparicio Rodriguez  
Daniela Catalina Bareño Niño



# **Determinación de la unión a reticulocitos humanos de los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax***

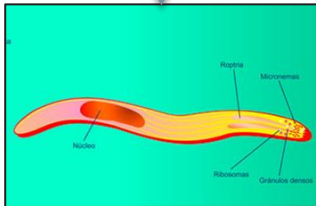
Asesora interna: **EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS MSC**  
Asesora externa: **LAURA ALEJANDRA RICAURTE CONTRERAS MSC ( C )**

# INTRODUCCIÓN

*Anopheles spp.*



<https://metode.es/los-porques-de-metode/por-que-solo-pican-los-mosquitos-hembra.html>



<http://revistabionatura.com/plasmodium.html>

Esporozoito estadio infeccioso

5 especies del parásito intracelular obligado *Plasmodium spp* que infecta a humanos.

*P. falciparum*

*P. ovale*

*P. malariae*

*P. knowlesi*

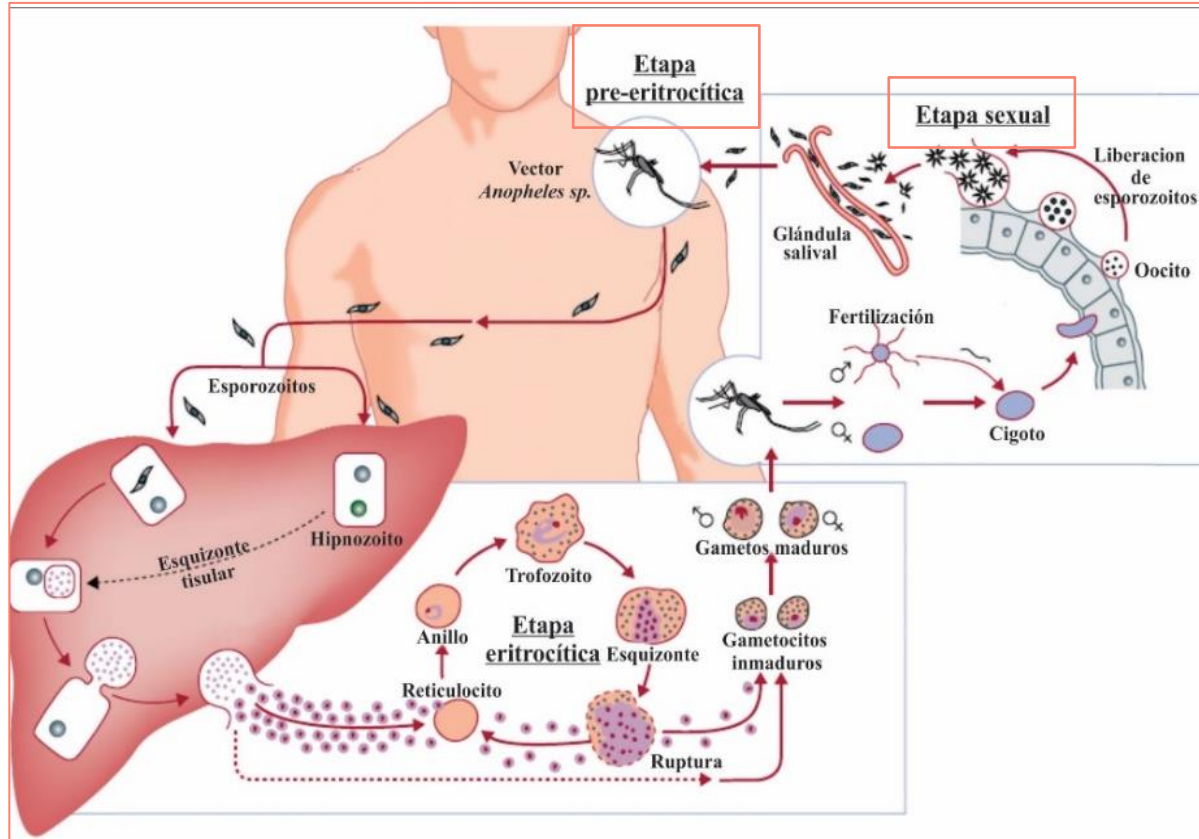
*P. vivax*



<https://es.wikivoyage.org/wiki/Am%C3%A9rica>

Asia y América central y del sur  
Colombia 60-75% de los casos  
80 % en América

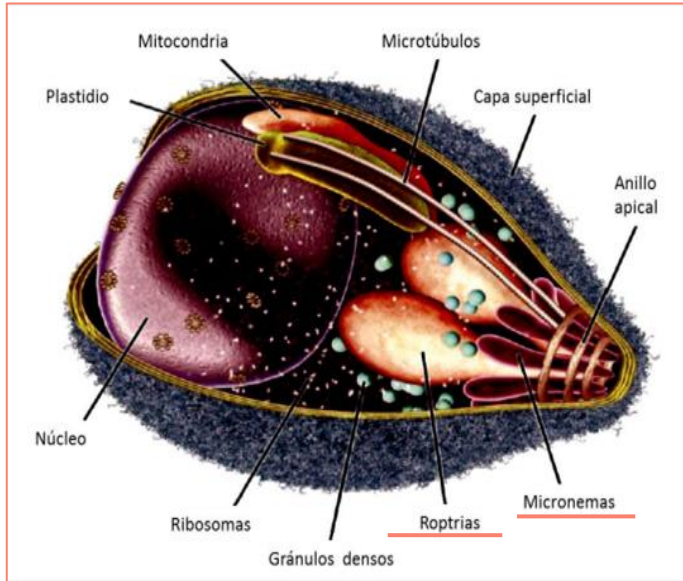
# CICLO DE INVASIÓN



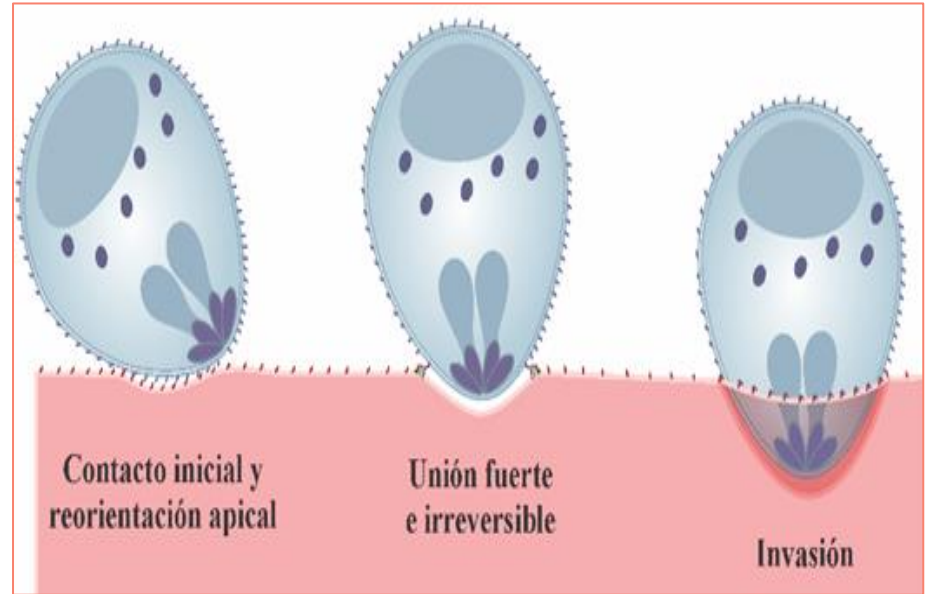
Particularidades

- Hipnozoitos
- Formación rápida de gametocitos
- Infecta reticulocitos

# MECANISMO DE INVASIÓN



<http://bdigital.unal.edu.co/56609/7/LuisA.Baquero2017.pdf>



<http://bdigital.unal.edu.co/56609/7/LuisA.Baquero2017.pdf>

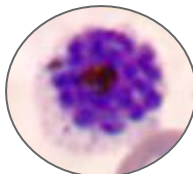
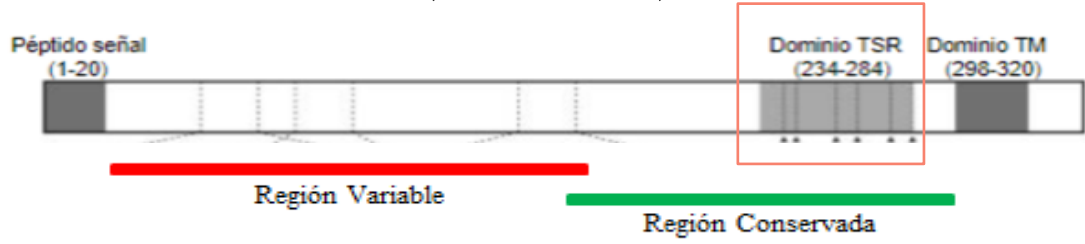
Proteínas candidatas a vacuna

CSP, TRAP, MSP-1  
AMA-1, GAMMA,  
RBSA

TRAMP

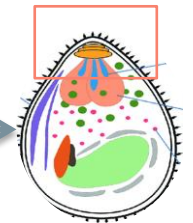
# PROTEÍNA APICAL DEL MEROZOÍTO RELACIONADA A LA TROMBOSPONDINA (TRAMP)

39 kDa



[https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/M-R/Malaria/vivax/body\\_malariadfvivschiz](https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/M-R/Malaria/vivax/body_malariadfvivschiz)

Esquizontes intraeritrocitarios



<https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-09/Seminario%207%20Apicomplexa%202019.pdf>

Proteína de micronemas

confiriendo una mejor especificidad de unión célula-huésped



<https://www.mimatherapeutics.com/valor-diagnostico-del-recuento-de-reticulocitos-en-sangre/>

*Pv*TRAMP caracterizada no ensayos de unión a reticulocitos

# OBJETIVOS

## General

Determinar si la proteína TRAMP en sus fracciones conservada y variable de *Plasmodium vivax* presenta capacidad de unión a reticulocitos humanos adultos.

# OBJETIVOS

## Específicos

**1.** Obtener clones recombinantes para los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*

**2.** Expresar los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP empleando un sistema procariota.

**3.** Evaluar la capacidad de unión de los fragmentos conservado y variable de la proteína recombinante TRAMP de *P. vivax* a reticulocitos de humanos adultos.



# METODOLOGÍA



# 1. Obtener clones recombinantes para los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*

Muestra

ADN genómico de  
*Plasmodium vivax*

PCR

Diseño de cebadores

Fragmentos	Secuencia de los cebadores	Tamaño del producto (pb)	Masa molecular (kD)
<i>pvtramp-rc</i>	Directo: TTCTGGCCATATGAACCCATCAGAATTGAAATT	415	15,2
	Reverso: TCCCTCGAGAAATAGGGAGTTACAAGGG		
<i>pvtramp-rv</i>	Directo: TTCTGGCCATATGTTCCGAGAAATTTAAAAGGCA	436	16,7
	Reverso: TCCCTCGAGCTTACATCTGCAGATTTTAG		

Cebadores para la amplificación del gen fragmentado en *pvtramp-rc* y *pvtramp-rv*.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	3min	1
Desnaturalización	98°C	10 s	
Hibridación	56°C	45sg	35
Elongación	72°C	1 min	
Elongación final	72°C	5min	1
Conservación	10°C	10min	1

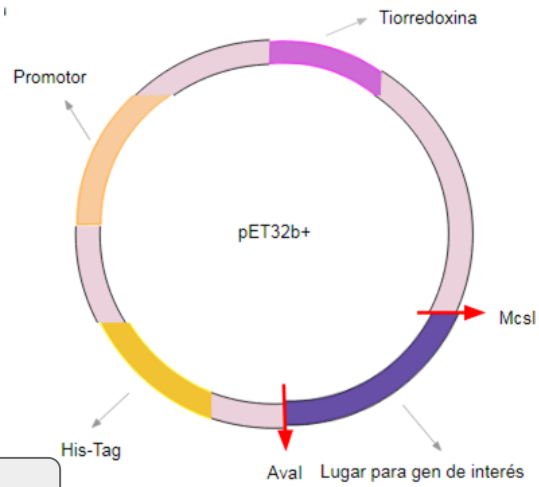
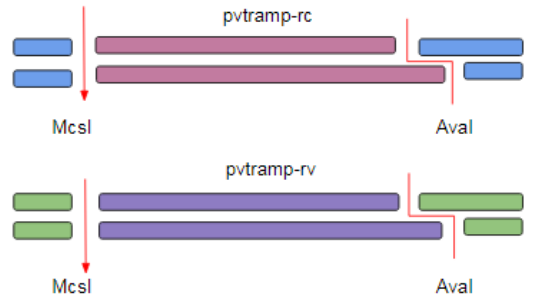
Condiciones de amplificación para fragmentos de *pvtramp*

Gel de agarosa

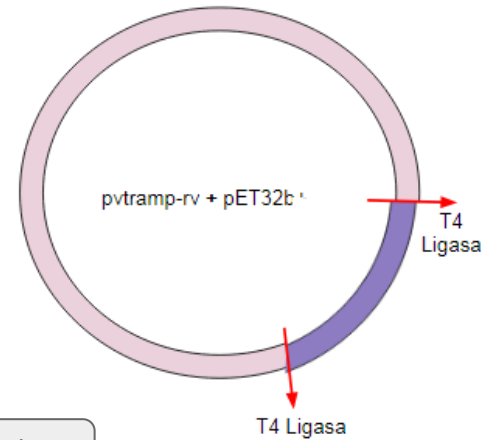
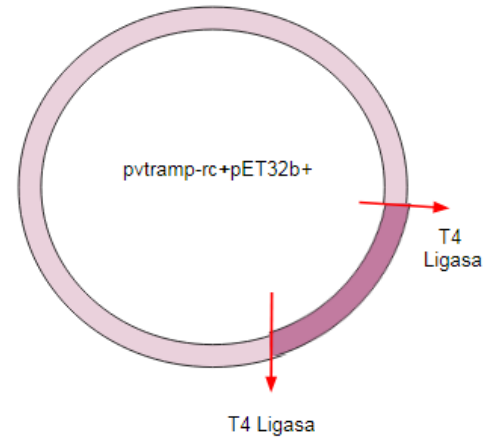
Purificación

Extracción de plásmido

# 1. Obtener clones recombinantes para los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*



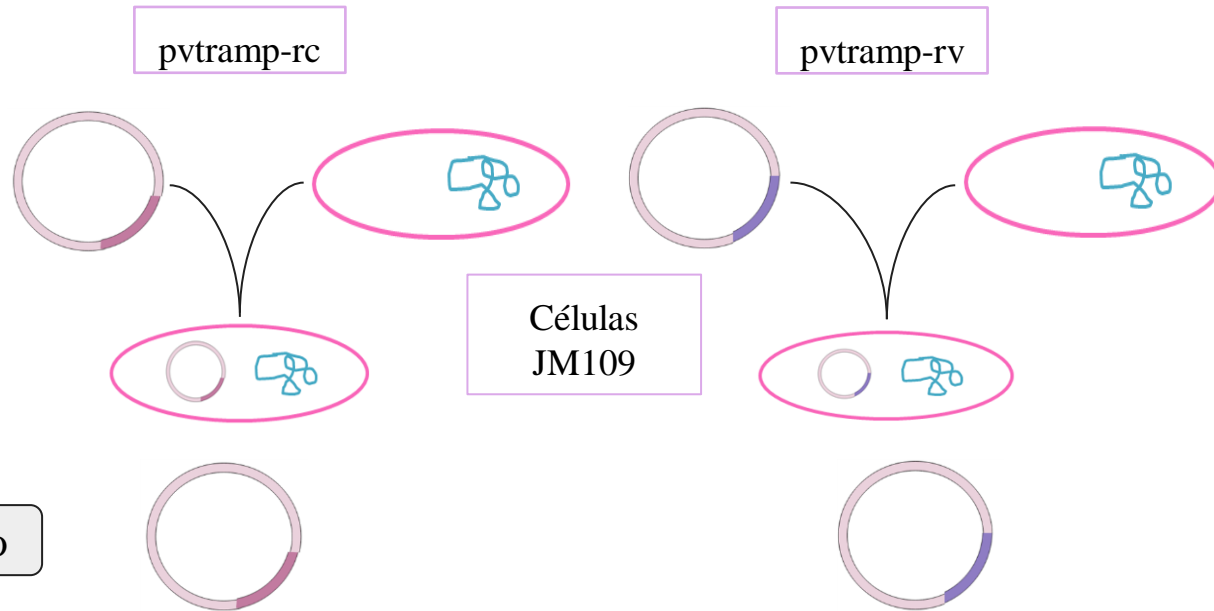
Digestión



Ligación

# 1. Obtener clones recombinantes para los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*

Transformación



Extracción de Plásmido

PCR

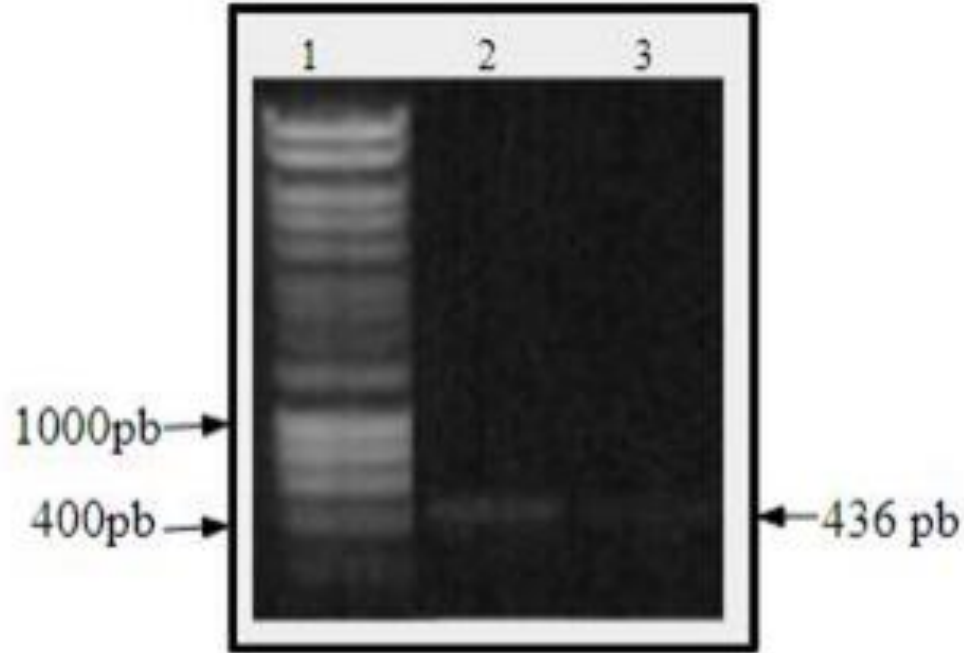
Gel de  
agarosa

Secuenciación por  
sanger

web ClustalW  
NPS@.

# RESULTADOS

## Amplificación



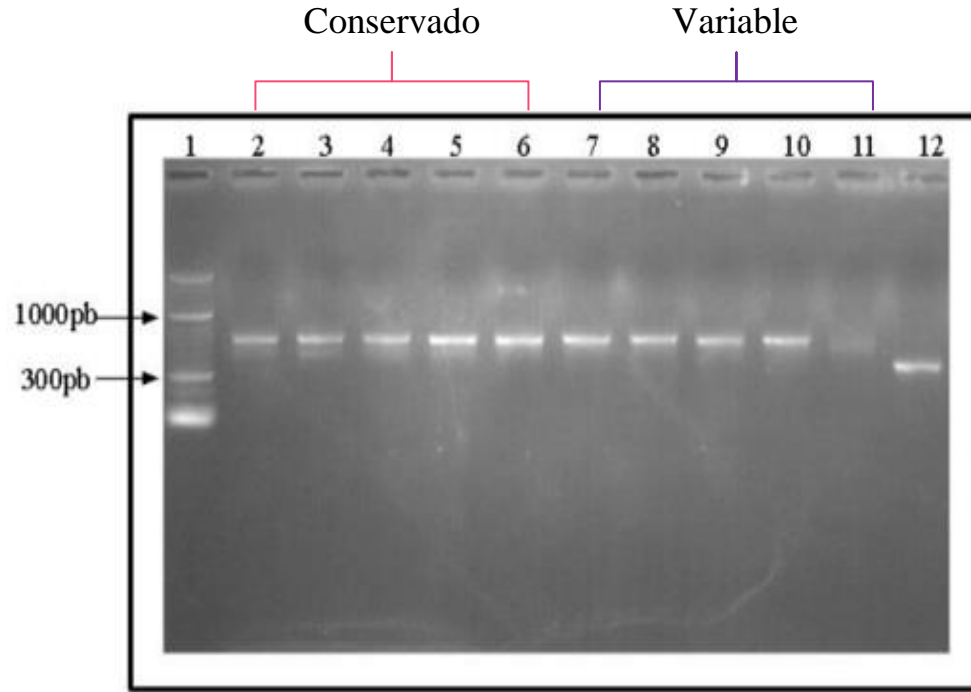
### Amplificación de los fragmentos del gen *pvtramp*.

1: marcador de peso molecular 1Kb, 2: Amplificación de *pvtramp-rc*,

3: Amplificación de *pvtramp-rv*

# RESULTADOS

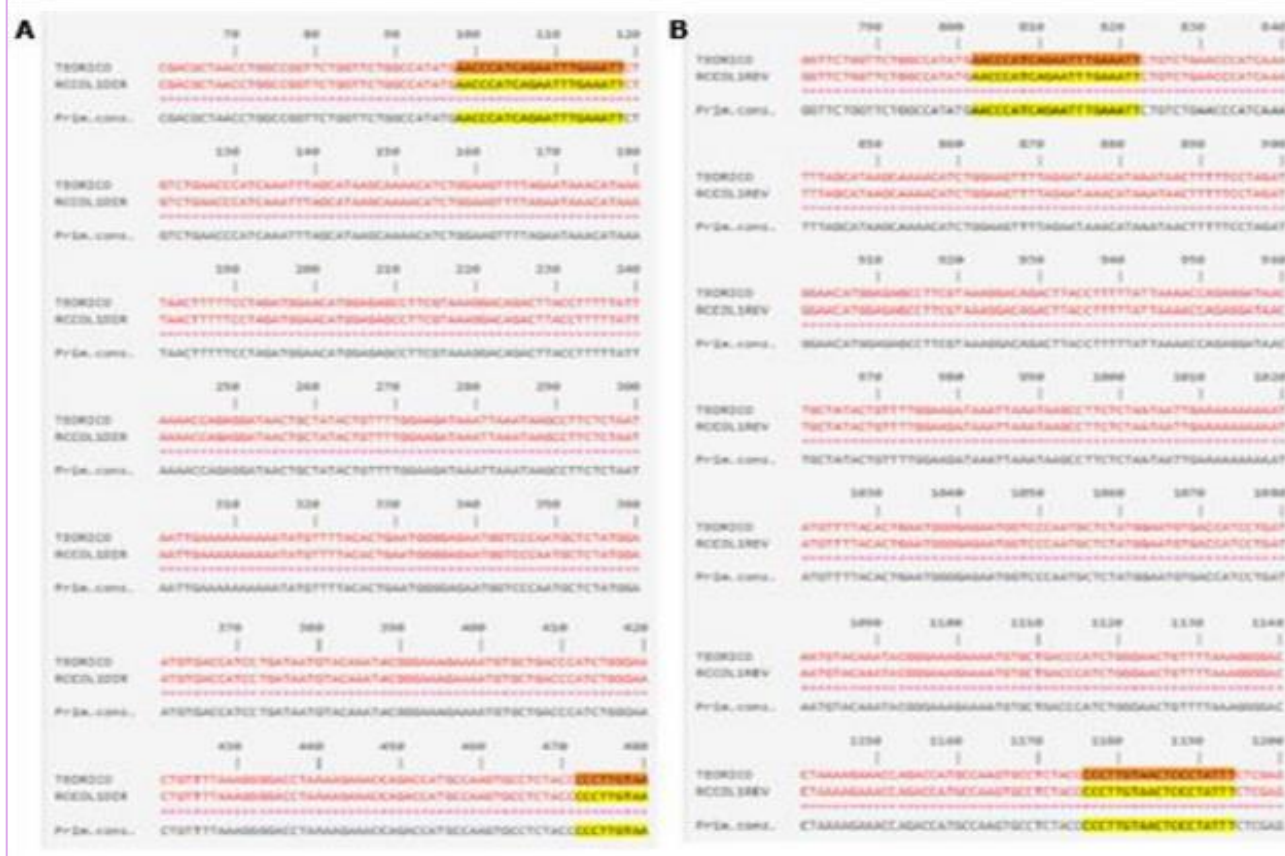
## Clones



**Verificación de obtención de clones. 1:** marcador de 1Kb, **2-6:** Plásmido recombinante pvtramp-rc, **7-11:** Plásmido recombinante pvtramp-rv, **12:** pET21b+ .

# RESULTADOS

Clustal w



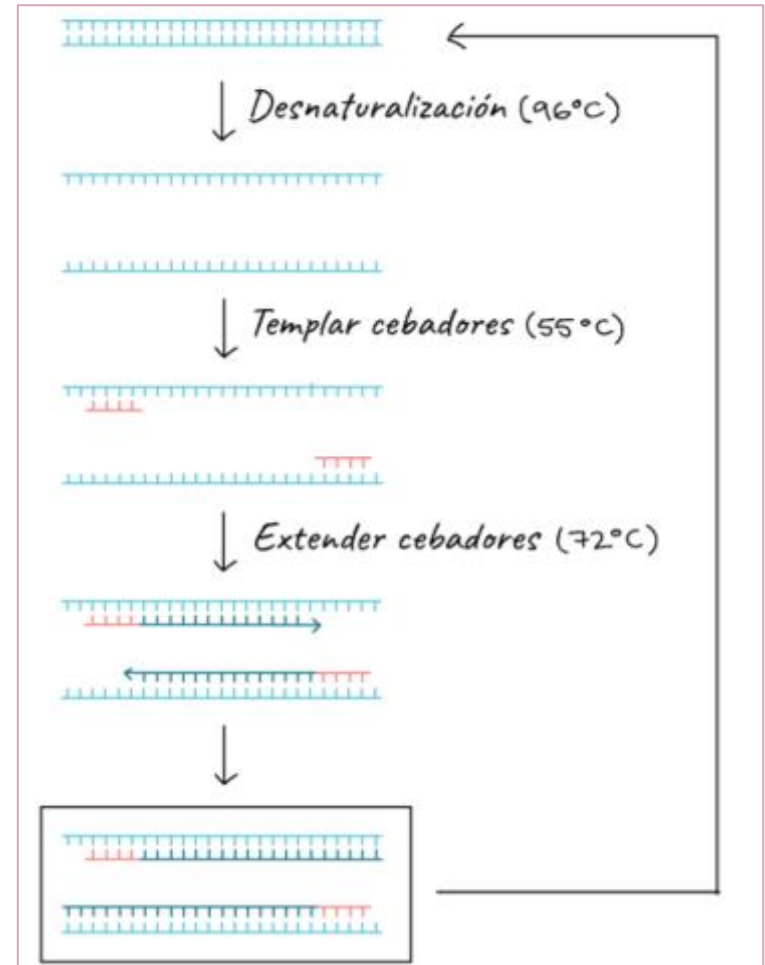
**Alineamiento de secuencia teórica frente a secuenciación obtenida de clones positivos** **A.** Secuencia directa de pvtramp-rc **B.** Secuencia reversa de pvtramp-rc. **Naranja:** Localización del respectivo cebador sobre la secuencia teórica **Amarillo:** Localización del respectivo cebador sobre la secuencia del clon enviado a Macrogen.

# DISCUSIÓN



Cantidad suficiente

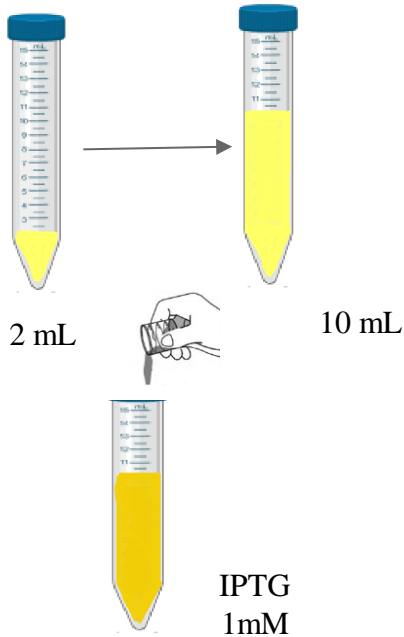
Mongui y Cols,  
Bogotá ,2010.





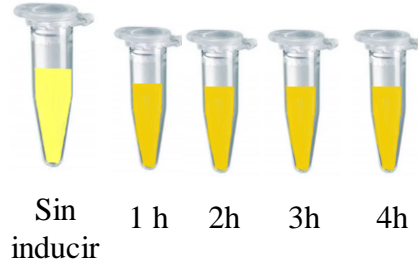
## 2. Expresar los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP empleando un sistema procariota

### Expresión piloto



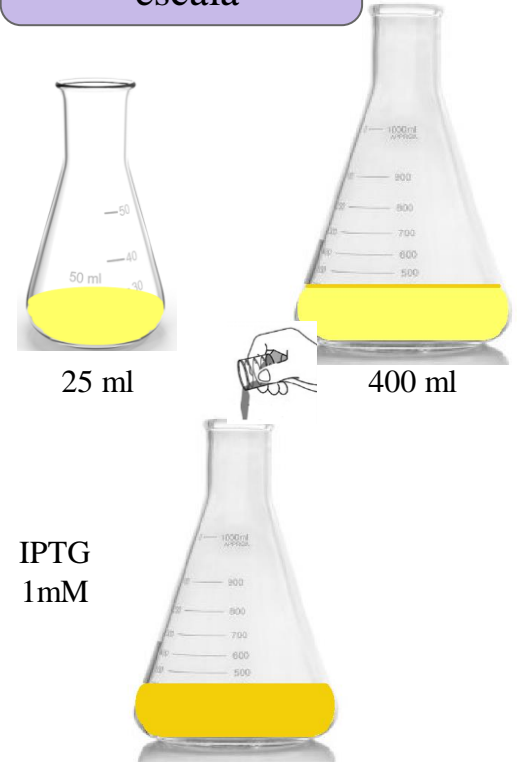
<https://biorender.com/icon/lab-and-objects/tubes-and-vials/falcon-tube-15ml-half/>

### Expresión por horas



<https://www.fishersci.es/shop/products/eppendorf-tube-5ml-9/p-4669177>

### Expresión a gran escala



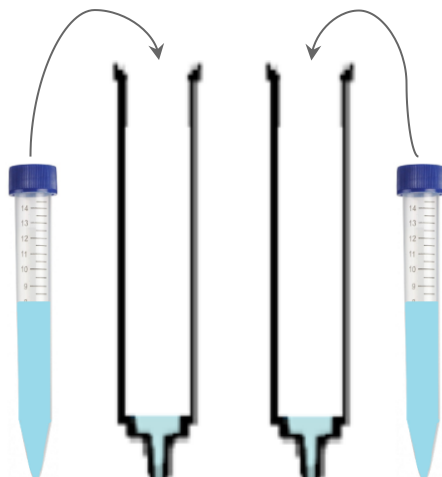
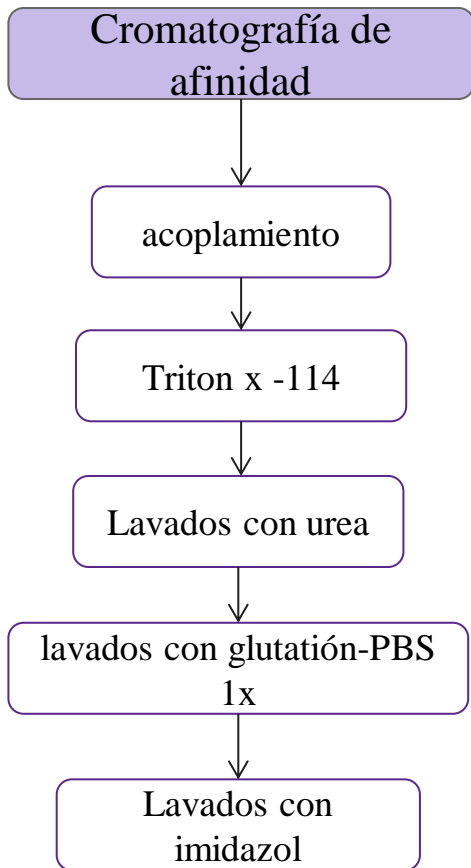
IPTG  
1mM

<http://carcismedical.mx/product/matriz-erlenmeyer-de-vidrio-1000ml/>

Lisis

Western-  
blot

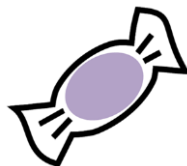
## 2. Expresar los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP empleando un sistema procariota



<https://biorender.com/icon/lab-and-objects/tubes-and-vials/falcon-tube-15ml-half/>

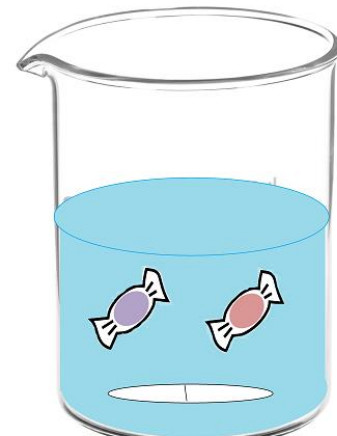


PvTRAMP-RC



PvTRAMP-RV

<http://www.ultracoloringpages.com/es/p/caramelo-p%C3%A1gina-de-colorrear/de6844c55065ddb0a8e0d5dfdf4fc217>



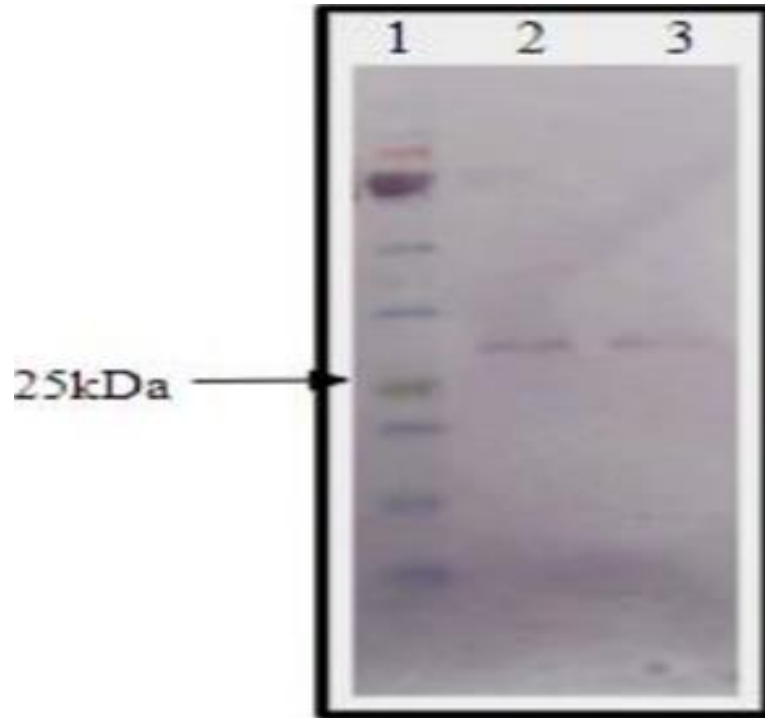
[https://www.bhphotovideo.com/c/product/231378-REG/Photographers\\_Formulary\\_09\\_0095\\_Glass\\_Beaker\\_600ml.html](https://www.bhphotovideo.com/c/product/231378-REG/Photographers_Formulary_09_0095_Glass_Beaker_600ml.html)

Coomassie

Western blot

# RESULTADOS

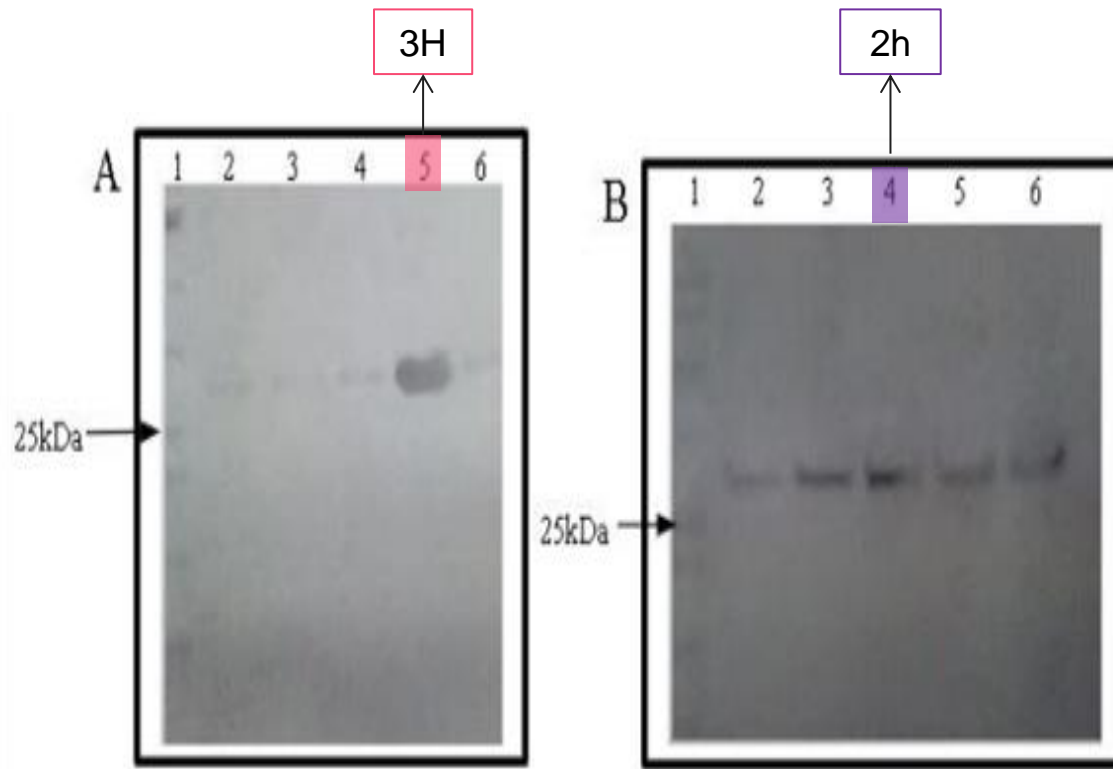
Expresión piloto



**Expresión piloto verificada en Western-blot. 1 1:** Marcador de peso molecular de 11-245kDa. **2:** *Pv*TRAM-RC. **3:** *Pv*TRAMP-RV

# RESULTADOS

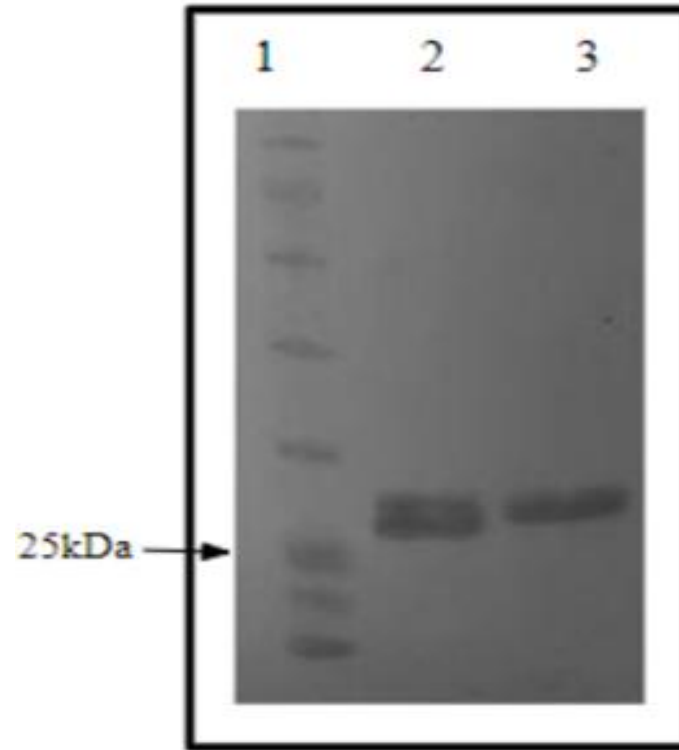
Expresión  
por horas



**Expresión por horas verificada en Western-blot .A. PvTRAM-RC. B. PvTRAMP-RV. 1:** Marcador de peso molecular de 11-245kDa. **1 2:** Expresión basal. **3:** Una hora. **4:** Dos horas. **5:** Tres horas. **6:** Cuatro horas

# RESULTADOS

Expresión a gran escala



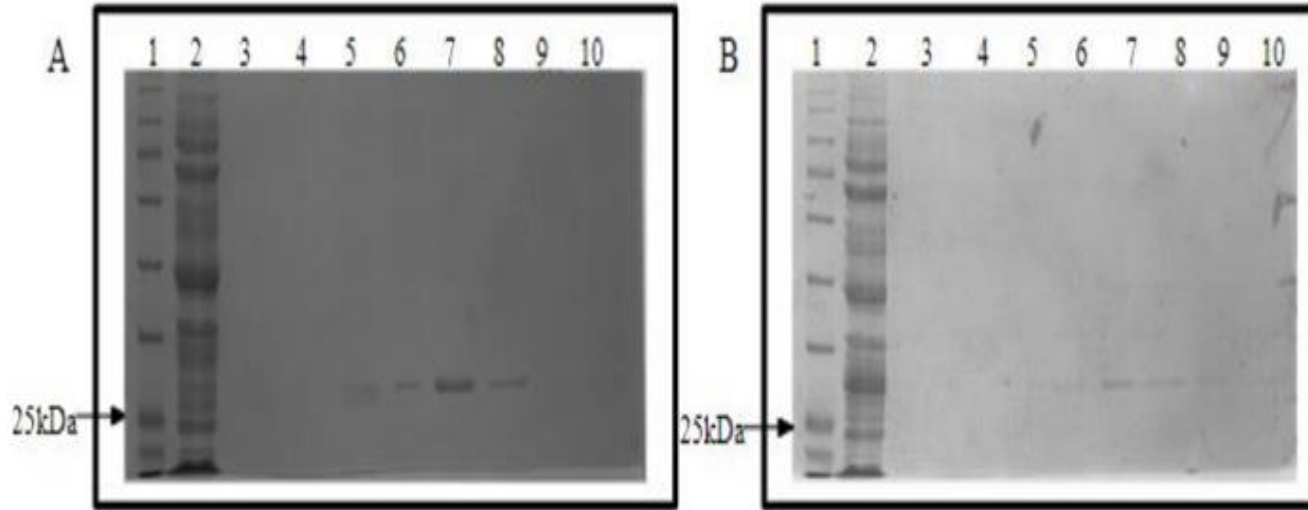
**Obtención de cada fragmento mediante expresión a gran escala.**

**1:** Marcador molecular de 11-245kDa. **2:** PvTRAMP-RC (3 horas).

**3:** PvTRAMP-RV (2 horas).

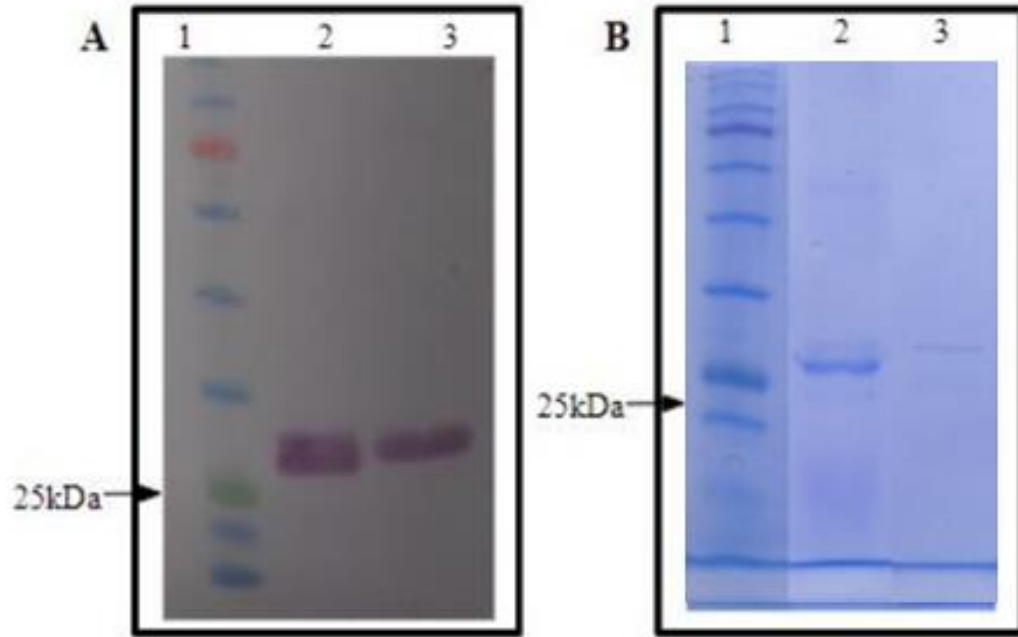
# RESULTADOS

## Cromatografía de afinidad



**Fragmentos purificados de PvTRAMP verificados en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie** **A.** *PvTRAMP-RC* **B.** *PvTRAMP-RV*, **1.** Marcador de 11-245kDa, **2.** Fracción no retenida de la purificación. **3:** 25mM **4:** 50 mM **5:** 75mM **6:** 100mM **7:** 150mM **8:** 200mM **9:** 250mM **10:** 500mM

## Diálisis



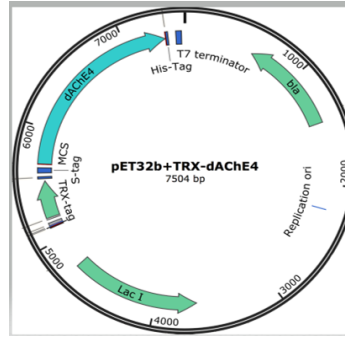
**Diálisis de la proteína TRAMP. A.** Western-blot **B.** Tinción de azul de Coomassie. **1.** Marcador de peso molecular 11-245kDa, **2.** *Pv*TRAMP-RC, **3.** *Pv*TRAMP-RV

# DISCUSIÓN



No hubo problemas de rendimiento

pET32B+



<https://www.addgene.org/83917/>

Temperatura

afecta la transcripción y traducción de proteínas

> 37 °C favorece formación de cuerpos de inclusión

< 37 °C Mejor plegamiento de proteínas

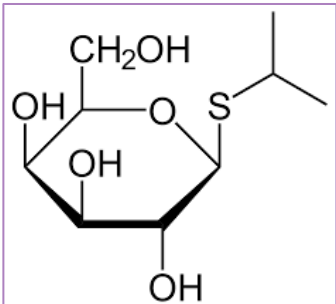
Farewell y Cols. Michigan. 1998

McNiff y Cols. Kansas. 2016

Tiorredoxina

Promotor T7

Resistencia a ampicilina



IPTG

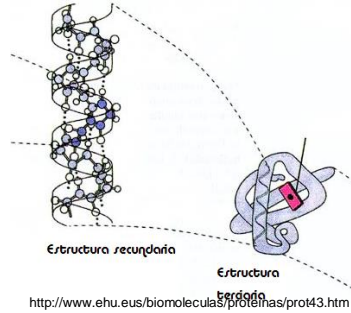
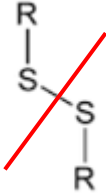
<https://www.scbt.com/es/p/iptg-dioxane-free-367-93-1>



# DISCUSIÓN

Urea 6M

Debilita las interacciones moleculares

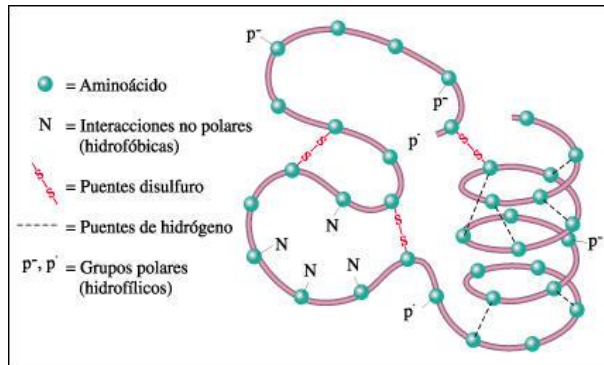


Glutacion oxido-reducido

Replegar proteínas

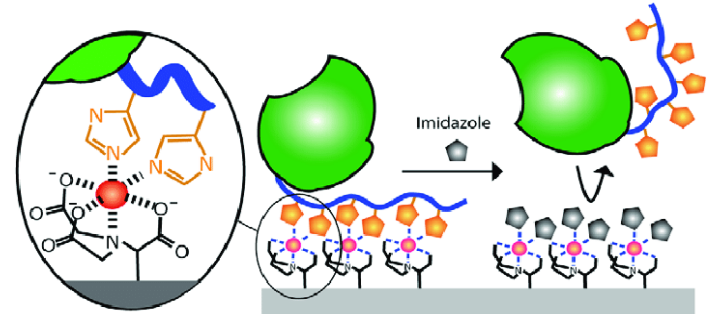
Enlaces disulfuro

Tran Moseman y Cols.  
Massachusetts  
1999

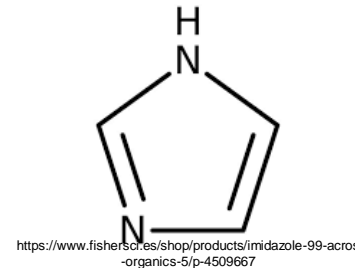


Resina de níquel

Rendimiento mayor



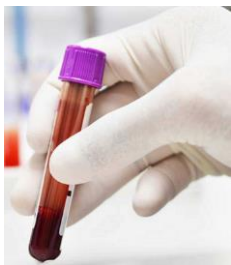
Imidazol



**Altas concentraciones:**  
Obtención de la proteína etiquetada con histidinas de manera íntegra

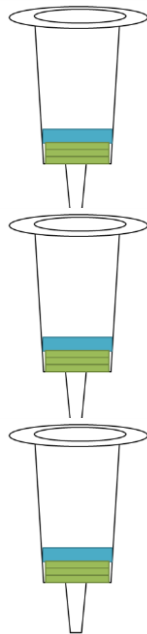
### 3. Evaluar la capacidad de unión de los fragmentos conservado y variable de la proteína recombinante TRAMP de *P. vivax* a reticulocitos de adultos humanos

Muestras

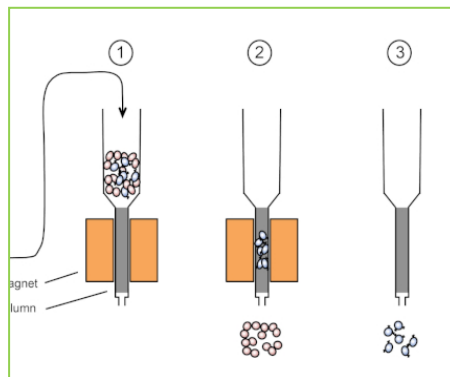


[https://www.freepik.es/fotos-premium/tubos-recogida-sangre-vacutainer-tubo-sangre-edta-prueba-cbc-laboratorio\\_2139398.htm](https://www.freepik.es/fotos-premium/tubos-recogida-sangre-vacutainer-tubo-sangre-edta-prueba-cbc-laboratorio_2139398.htm)

CF11

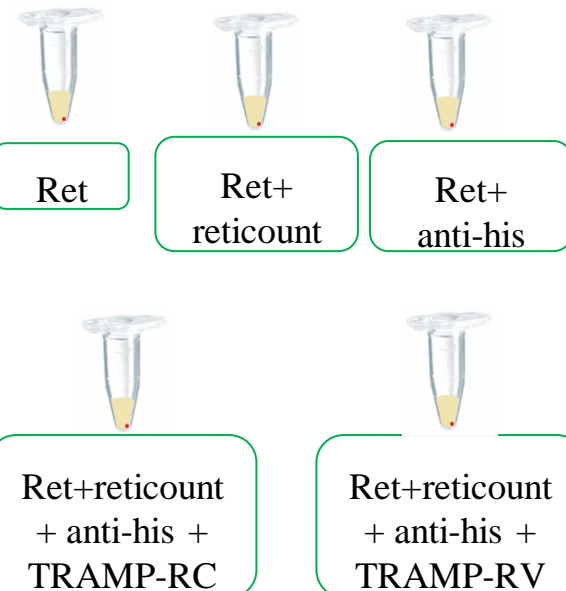


Perlas magnéticas



<https://www.jove.com/science-education/10495/clasificacin-de-celulas-activadas-magneticas-macs-aislamiento-de?language=Spanish>

Ensayos de unión

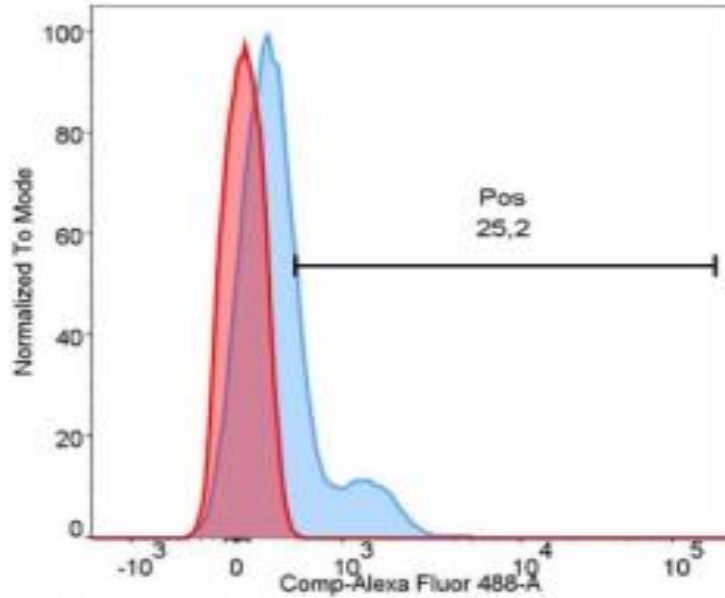


<https://www.fishersci.es/shop/products/eppendorf-tube-5ml-9/p-4669177>

Citometría de flujo

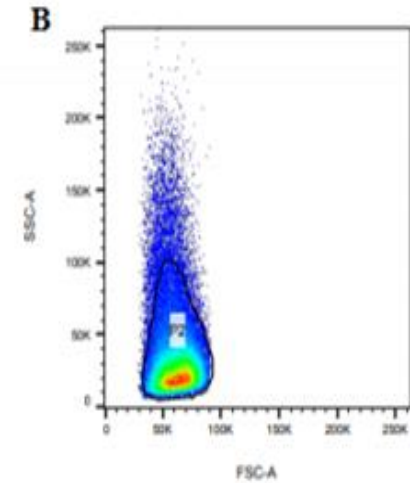
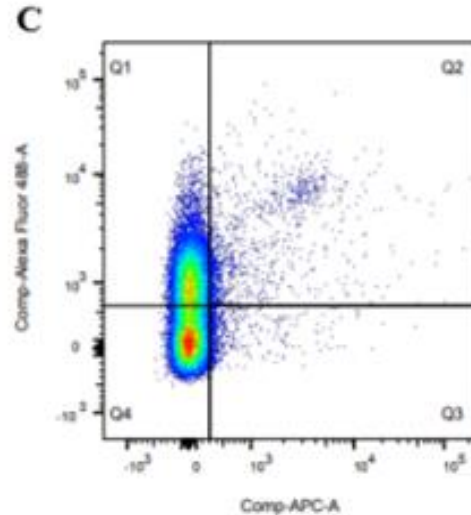
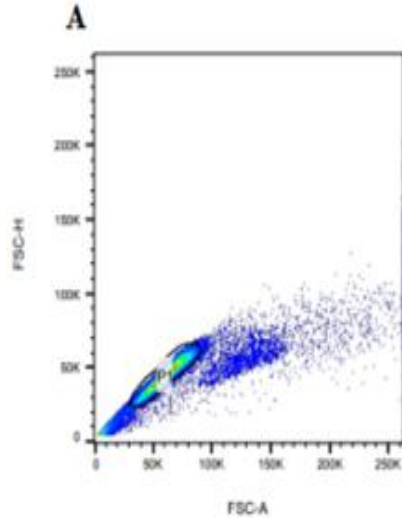
# RESULTADOS

## Enriquecimiento

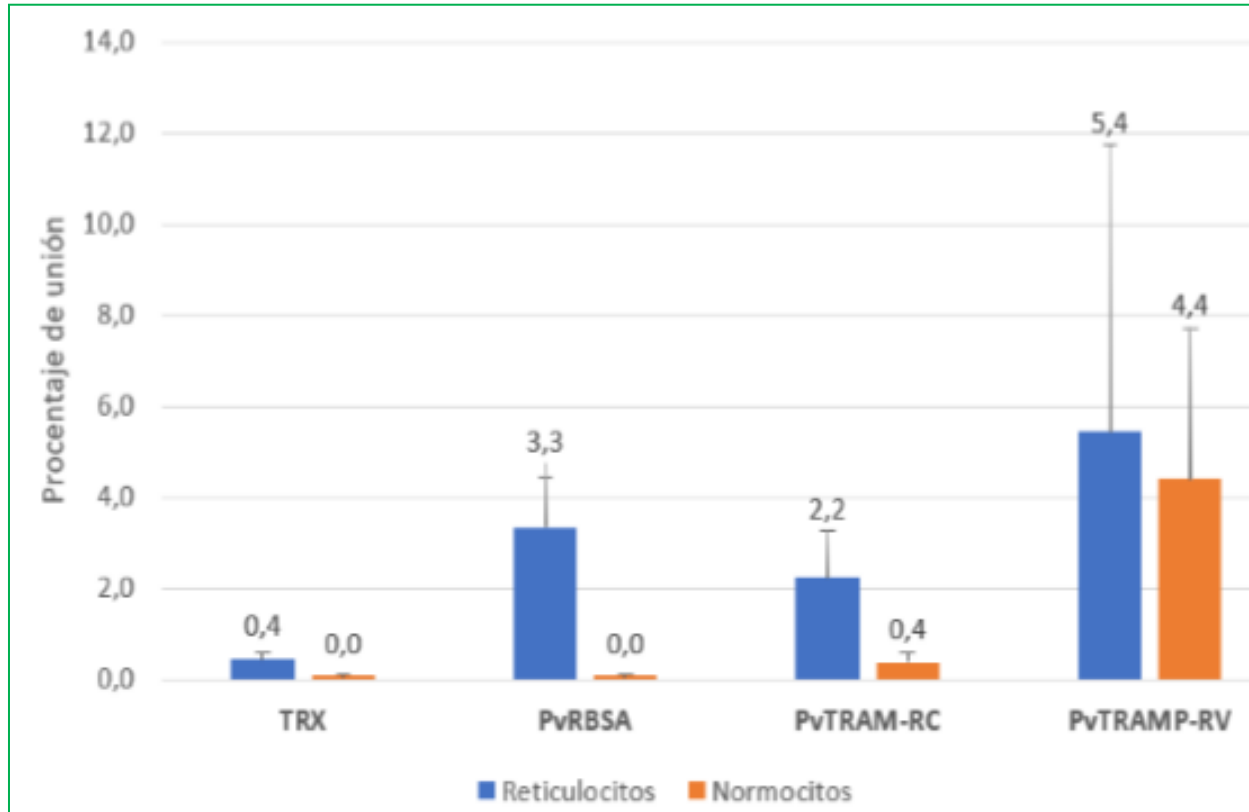


**Enriquecimiento de reticulocitos humanos . Rojo:** reticulocitos no marcados. **Azul:** reticulocitos marcados. **Pos:** positivos para reticulocitos sobre el total de las células

## Ensayos de unión



**Selección de la población objeto de estudio** **A.** Eliminación de dupletas. **B.** Discriminación por complejidad y tamaño, **C.** **Q1.** Células positivas para reticulocitos. **Q3.** Células positivas para la proteína. **Q2.** Reticulocitos unidos a la proteína



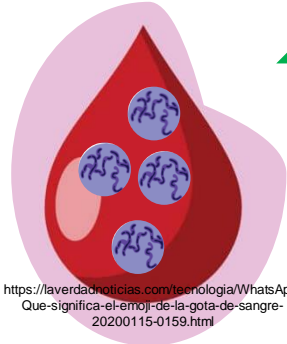
**Esquema del porcentaje de unión de los fragmentos de TRAMP y de controles.** **TRX:** Tiorredoxina control negativo. **RBSA:** Control positivo **Azul:** Reticulocitos. **Naranja:** Glóbulos rojos maduros.

# DISCUSIÓN

## Obtención de Reticulocitos

Sangre periférica 2%  
sangre de cordón umbilical 7-8 %

Camargo y Cols.  
Bogota  
2018

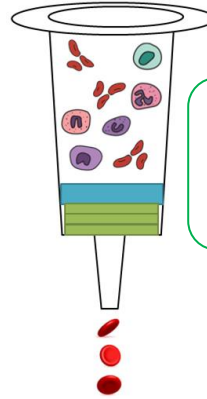


20%

**EFFECTIVO**

<https://laverdadnoticias.com/tecnologia/WhatsApp-Que-significa-el-emoji-de-la-gota-de-sangre-20200115-0159.html>

## Técnica CF11

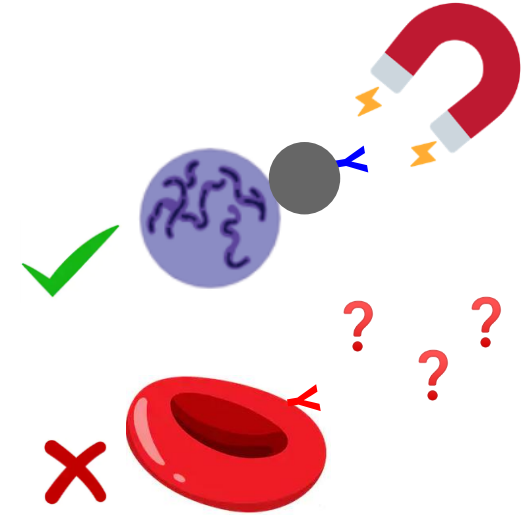


Rápida  
Económica  
Efectiva

-interacción entre grupos hidroxilo de celulosa y moléculas de superficie de leucocitos

Sripawat y Cols.  
Singapur  
2009

## Perlas magnéticas CD71



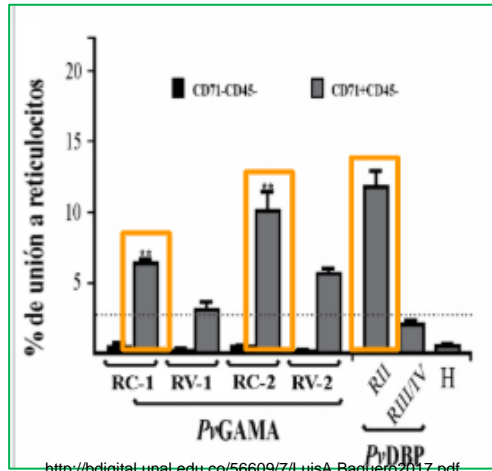
<https://es.vexels.com/png-svg/vista-previa/145077/ilustracion-de-globulos-rojos>

# DISCUSIÓN

Regiones conservadas

estructura  
y función de las proteínas

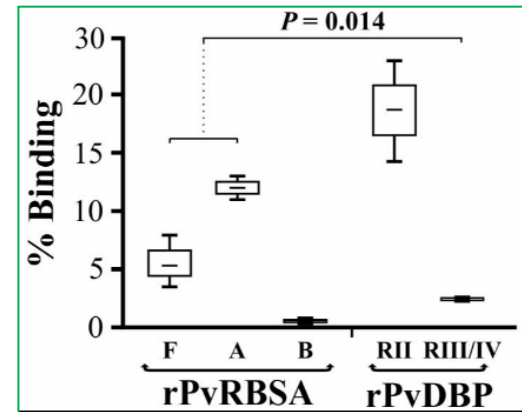
Proteína *PvGAMA*



<http://bdigital.unal.edu.co/56609/7/LuisA.Baquer62017.pdf>

Baquero y Cols.  
Bogotá  
2017

Proteína *PvRBSA*



<http://bdigital.unal.edu.co/70315/1/Tesis%20RBSA%20Final.pdf>

Camargo y Cols.  
Bogotá  
2018

# CONCLUSIONES

---

- Las células JM109 en conjunto con el vector pET32B+ son compatibles en la producción de clones a partir del ADN extraído, en relativamente poco tiempo.
- El tiempo de expresión máxima difiere entre las dos regiones obteniendo una hora clave( 3 horas) para la región conservada , mientras que la región variable no exhibe cambios en la expresión durante las 4 horas.
- Tras el enriquecimiento se pudo obtener 25.2% de reticulocitos de sangre humana adulta teniendo en cuenta que en sangre periférica solo hay 1 - 2%.



# CONCLUSIONES

---

- El fragmento recombinante de la región conservada de la proteína PvTRAMP demostró un porcentaje de unión a reticulocitos de forma constante, indicando su uso como un posible blanco de acción para el diseño de métodos de control contra malaria causada por *Plasmodium vivax*.
- El fragmento recombinante de la región variable demostró un porcentaje de unión a reticulocitos no constante sugiriendo que esta región de la proteína no podría ser utilizada dentro de los candidatos a vacuna pero sería de gran utilidad en estudios de polimorfismo.
- Es la primera vez que se demuestra unión de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax* a células humanas específicamente reticulocitos como células blanco.

# RECOMENDACIONES

---

- Para posteriores estudios es importante evaluar la obtención de la proteína recombinante de *PvTRAMP* en un sistema eucariota para comprender si esta tiene modificaciones pos-traduccionales y si al compararla con la proteína obtenida en el sistema procariota también puede unirse a reticulocitos humanos.
- Determinar la viabilidad celular por citometria de flujo en posteriores estudios.
- Realizar curva de saturación para determinar la especificidad de unión de los fragmentos recombinantes a células tipo reticulocitos.

# AGRADECIMIENTOS

---

- Un agradecimiento enorme a Dios, que hizo de nosotras lo necesario para llevar a cabo este proyecto
- A nuestra familia, amigos y parejas que estuvieron presentes hasta el final.
- Un agradecimiento especial a los miembros del grupo funcional de Biología Molecular de la Fundación Instituto de inmunología de Colombia pues fueron quienes hicieron posible que se llevara a cabo esta investigación.
- A Laura Ricaurte Contreras una persona muy inteligente y maravillosa quien guio nuestro trabajo por provechosos dos años y fue parte absolutamente fundamental de nuestro proceso.
- Al investigador Darwin Andrés Moreno quien aporto toneladas de conocimiento bajo una pedagogía excelente.
- Por último a la profesora Edith del Carmen Hernández que encamino la mejor presentación y contenido que pudo tener este trabajo.

¡¡MUCHAS  
GRACIAS !!

**#sinCiencia**  
no hay futuro





FRAGMENTOS	230nm	280nm	260nm	260/230	260/280	[ ] 260
<i>pvtramp-rc</i>	0,0633	0,0420	0,0752	1,18	1,79	75,2 µg/ml
<i>pvtramp-rv</i>	0,0445	0,0335	0,0596	1,33	1,77	59,6 µg/ml

CONCENTRACION 2,5 $\mu$ M		PORCENTAJE DE UNIÓN %		
TRAMP-RC	RETICULOCITOS	1.69	1.63	3.4
	NORMOCITOS	0.3	0.6	0.2
TRAMP-RV	RETICULOCITOS	1.56	12.7	2.04
	NORMOCITOS	7.24	0.75	5.2
RBSA	RETICULOCITOS	4.2	2.1	3.7
	NORMOCITOS	0.1	0	0
TRX	RETICULOCITOS	0.3	0.6	0.4
	NORMOCITOS	0	0	0

