



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

Giselle Aparicio Rodríguez

Daniela Catalina Bareño Niño

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá

2020



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

Giselle Aparicio Rodríguez

Daniela Catalina Bareño Niño

Edith del Carmen Hernández Rojas

Asesora interna

Laura Alejandra Ricaurte Contreras

Asesora externa

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá

2020

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedicamos a Dios, a nuestra familia, en especial a Natalia Bareño y a Luz Helena Rodríguez, a nuestros amigos y a todas las personas que estuvieron presentes en los momentos de mayor dificultad, estamos llenas de amor inmenso y agradecemos el apoyo de cada uno de ustedes durante este proceso.

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 en especial 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, de igual modo al investigador Darwin Andrés Moreno quien apporto toneladas de conocimiento bajo una pedagogía excelente y por último a la profesora Edith del Carmen Rojas que encamino la mejor presentación y contenido que pudo tener este trabajo.

RESUMEN

Plasmodium sp. es el causante de malaria una de las enfermedades más antiguas, el cual contiene todo un sistema de invasión mediada por proteínas secretadas por diferentes organelos presentes en su estructura, estas proteínas aunque bien caracterizadas y estudiadas, en gran proporción las de especies que concurren en un cuadro clínico en humanos no están cubiertas por procesos de investigación en un 100% por lo que es necesario y la obtención de esas proteínas faltantes de manera *in vitro* bajo sistemas de expresión y ese es el propósito de este trabajo, pues es un aporte continuo de gran amplitud investigativa que otorga resultados significativos para la comprensión de la misma y a su vez propone un adelanto en procesos de mitigación en la especie *Plasmodium vivax*

En este estudio se obtuvo de manera recombinante la proteína PvTRAMP fragmentada en una porción conservada y una variable de *Plasmodium vivax* empleando un sistema de expresión procariota *Escherichia coli*, con un posterior enriquecimiento de reticulocitos humanos a los cuales tiene tropismo y con estos por primera vez fueron realizados ensayos de unión que esclarecen la actividad de dicha proteína y favorecen comprensión de su papel en la invasión, ya que es una proteína que se encuentra en el merozoito lo cual nos indica que puede tener un papel revelador en la invasión a células diana.

Se determinó que en efecto los fragmentos variable y conservado de la proteína PvTRAMP poseen capacidad de unión tanto a reticulocitos humanos como a glóbulos rojos maduros, dejando abierta una línea de investigación útil en la propuesta de dicha proteína como componente candidato a la vacuna contra el cuadro malárico causado por *Plasmodium vivax*

ABSTRACT

Plasmodium sp. It is the cause of malaria one of the oldest diseases, which contains a whole system of invasion mediated by proteins secreted by different organisms present in its structure, these proteins although well characterized and studied, in large proportion the species of species that concur in a clinical picture in humans they are not covered by research processes 100% for what is necessary and the obtaining of those missing proteins in vitro under expression systems and that is the purpose of this work, as it is a contribution continuum of great investigative breadth that provides significant results for its understanding and in turn proposes an advance in mitigation processes in the *Plasmodium vivax* species.

In this study, the TRAMP protein fragmented into a conserved portion and a *Plasmodium vivax variable* are obtained recombinantly using a prokaryotic expression system *Escherichia coli*, with a subsequent enrichment of human reticulocytes to which it has tropism and with these for the first time they were They carried out binding assays that clarify the activity of this protein and promote understanding of its role in invasion, since it is a protein found in the merozoite, which indicates that it may have a revealing role in invading target cells.

Indeed, it was determined that the variable and conserved fragments of the PvTRAMP protein possess non-specific binding capacity for both human reticulocytes and mature red blood cells, leaving open a useful line of research in the proposal of said protein as a candidate component of the vaccine against the malaria picture caused by *Plasmodium vivax*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. OBJETIVOS
 - 2.1. GENERAL
 - 2.2. ESPECIFICO
3. ANTECEDENTES
4. MARCO TEÓRICO
 - 4.1 MALARIA
 - 4.2 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL DE MALARIA
 - 4.3 *Plasmodium spp*
 - 4.3.1 MECANISMO DE INVASIÒN
 - 4.3.2 CICLO DE VIDA
 - 4.4 GENERALIDADES DE *Plasmodium vivax*
 - 4.5 CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL Y PROTEÍNAS DE *Plasmodium spp*
 - 4.6 PROTEÍNA TRAMP
5. METODOLOGÍA
 - 5.1 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO CONSERVADA Y VARIABLE DEL GEN *pvtramp*
 - 5.1.1 MUESTRAS
 - 5.1.2 DISEÑO DE CEBADORES
 - 5.1.3 PCR CONVENCIONAL
 - 5.2 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO CONSERVADO Y FRAGMENTO VARIABLE DE *pvtramp* AL VECTOR pET32b+
 - 5.3 TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS JM109 Y SECUENCIACIÓN
 - 5.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS BL21-DE3
 - 5.5 VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PvTRAMP POR MEDIO DE WESTERN BLOT.
 - 5.6 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD USANDO RESINA DE NÍQUEL.
 - 5.7 OBTENCIÓN DE RETICULOCITOS HUMANOS
 - 5.8 DETERMINACIÓN DE UNIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PvTRAMP A RETICULOCITOS HUMANOS

- 6. RESULTADOS**
 - 6.1 AMPLIFICACIÓN DE LA FRAGMENTO CONSERVADO Y FRAGMENTO VARIABLE DEL GEN *pvtramp***
 - 6.2 VERIFICACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN POR MEDIO DE PCR DE COLONIA.**
 - 6.3. ANALISIS DE LA SECUENCIACIÓN ENVIADA POR MACROGEN**
 - 6.4. WESTERN BLOT PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE LA PROTEINA EXPRESADA**
 - 6.4.1 EXPRESION PILOTO**
 - 6.4.2 EXPRESION POR HORAS**
 - 6.4.3 EXPRESION A GRAN ESCALA**
 - 6.5 PURIFICACIÓN DE *Pv*TRAMP-RC Y *Pv*TRAMP-RV POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD USANDO RESINA DE NÍQUEL**
 - 6.6 ANALISIS DE UNION DE LA PROTEÍNA *Pv*TRAMP A RETICULOCITOS HUMANOS**
- 7. DISCUSIÓN**
- 8. CONCLUSIONES**
- 9. RECOMENDACIONES**
- 10. BIBLIOGRAFIA**
- 11. ANEXOS**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores para la amplificación *pvtramp-rc* y *pvtramp-rv*.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para fragmentos de *pvtramp*

Tabla 3. Condiciones de amplificación para PCR de colonia.

Tabla 4. Cuantificación de *pvtramp-rc* y *pvtramp-rv*

Tabla 5. Porcentajes de unión de los fragmentos de TRAMP y controles.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium spp*
- Figura 2.** Representación esquemática de PvTRAMP
- Figura 3.** Amplificación de los fragmentos del gen PvTRAMP
- Figura 4.** Verificación de obtención de clones
- Figura 5.** Alineamiento de secuencia teórica frente a secuenciación obtenida de clones positivos
- Figura 6.** Expresión piloto verificada en Western-blot
- Figura 7.** Expresión por horas verificada en Western-blot.
- Figura 8.** Expresión a gran escala en el tiempo de máxima expresión de cada fragmento
- Figura 9.** Fragmentos purificados de PvTRAMP verificados en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie
- Figura 10.** Diálisis de la proteína PvTRAMP
- Figura 11.** Enriquecimiento de reticulocitos humanos
- Figura 12.** Selección de la población objeto de estudio
- Figura 13.** Esquema del porcentaje de unión los fragmentos de TRAMP y sus controles

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento de la secuencia teórica de *pvtramp-rv* frente a la secuencia obtenida de Macrogen

Anexo 2. Electroferograma de la secuencia directa de una colonia positiva para *pvtramp-rc*.

Anexo 3. Electroferograma de la secuencia reversa de una colonia positiva para *pvtramp-rc*.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad de gran interés en la salud pública, debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad que generan, principalmente en países en vía de desarrollo¹ Esta enfermedad es causada por la picadura de un mosquito hembra, del género *Anopheles*², la cual inocula protozoarios pertenecientes al Phylum *Apicomplexa* del género *Plasmodium*, y cinco especies son las responsables de causar la enfermedad en humanos; *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*³, pero es *P. vivax* la responsable de más del 40% de los casos fuera África y es la especie con mayor distribución en Asia, América central y del Sur⁴ En Colombia, se estima que el 65-70% de casos de malaria son causados por esta especie y alrededor del 80% en las Américas⁵

En regiones endémicas de malaria *P. vivax* es de difícil manejo, control y eliminación debido a las diferencias biológicas entre esta especie y *P. falciparum*.⁶ Esto se da por una menor densidad parasitaria por parte de *P. vivax* ya que prefieren la infección de glóbulos rojos inmaduros (reticulocitos) que tiende a estar presentes en sangre periférica en tan solo un 1%⁷, son parasitemias bajas que no logran ser detectadas, y por lo tanto no son tratadas, resultando en una mayor transmisión a los mosquitos, incrementado por el desarrollo de gametocitos (formas sexuadas) en etapas más tempranas del desarrollo de la infección en

comparación con *P. falciparum*,⁸ también se resalta una capacidad de crecimiento más rápida en el vector y a más bajas temperaturas.

Plasmodium vivax tiene la capacidad de desarrollo de hipnozoitos (formas hepáticas latentes) produciendo recaídas con el tiempo, además de una inmunidad natural adquirida de manera temprana en el avance de la infección en comparación con *Plasmodium falciparum*.⁹

Por mucho tiempo se pensó que la el cuadro clínico de *Plasmodium vivax* era benigno en términos de gravedad de la enfermedad comparándolo con *Plasmodium falciparum* y este concepto ha hecho que la malaria causada por *P.vivax* se torne a una enfermedad desatendida potencialmente grave, de manera particular en el sudeste asiático y en américa del sur⁹ con una carga importante sobre la morbilidad y la mortalidad en las poblaciones afectadas¹⁰. El obstáculo mayor se ha encontrado en el cultivo *in vitro* continuo de los reticulocitos, que aún no ha sido resuelto.

En el estado intra-eritrocito, se conoce que durante la invasión del merozoito a su célula diana ocurren diferentes etapas: contacto inicial y reorientación hacia el polo apical, formación de una unión fuerte e irreversible y finalmente la invasión.¹¹ Este proceso se controla mediante interacciones entre múltiples ligandos del parásito, localizados en la superficie o secretados por organelos apicales (roptrias, micronemas o gránulos densos) con receptores afines en las células huésped de manera ordenada^{12,13}. Considerando este tipo de moléculas esenciales como componentes en una vacuna que inhiba el proceso de invasión de *P. vivax* a los reticulocitos, y teniendo en cuenta la alta variabilidad genética que presenta esta especie¹⁴, es importante identificar aquellas regiones conservadas y así evitar respuestas inmunes alelo-específicas^{15, 16}.

De particular interés, la proteína de merozoito apical asociada con la trombospondina de *Plasmodium vivax* (PvTRAMP), es una molécula importante ya que se transcribe y se expresa al final de ciclo intra-eritrocítico, con una localización inicial en el extremo apical del parásito y más tarde en la superficie del mismo. Además, es reconocida por sueros de pacientes infectados por *P. vivax*, indicando que es identificada por el sistema inmune durante una infección natural¹⁷. Recientemente, en un estudio en curso, investigadores de FIDIC encontraron por análisis de polimorfismo que PvTRAMP contiene una región conservada y una región variable, sin embargo, se desconoce si se unen a reticulocitos. En vista de lo anterior, en el presente estudio se propuso obtener de forma recombinante el fragmento conservada y variable de la proteína PvTRAMP para evaluar la capacidad de interactuar con sus células diana. Adicionalmente, se emplearon reticulocitos de humanos adultos para asemejar las condiciones durante una infección natural. Este es el primer estudio de interacción celular para esta proteína en *Plasmodium vivax*.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

- Determinar si la proteína TRAMP en su fracción conservada y variable de *Plasmodium vivax* presenta capacidad de unión a reticulocitos humanos adultos

2.2 ESPECÍFICOS

- Obtener clones recombinantes para los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP de *Plasmodium vivax*.
- Expresar los fragmentos conservado y variable de la proteína TRAMP empleando un sistema procariota.
- Evaluar la capacidad de unión de los fragmentos conservado y variable de la proteína recombinante TRAMP de *P. vivax* a reticulocitos de humanos adultos.

3. ANTECEDENTES

En el año 2002 fue identificada una proteína conservada con dominios TSR en *Plasmodium*, se demostró que es liberada de los orgánulos superficiales en orientación apical de los merozoítos. En los primeros esquizontes intraeritrocitarios, PTRAMP se localiza conjuntamente con AMA-1,¹⁸ una proteína de membrana integral de Tipo 1 que es una de las principales candidatas a la vacuna. Sin embargo, a diferencia de AMA-1 u otras proteínas orgánulos apicales de merozoíto descritas, se indica que PTRAMP se libera en la superficie del merozoíto antes de la ruptura del esquizonte lo que aumenta la posibilidad de que pueda tener un papel análogo con el dominio TSR de esporozoito, en determinación de la morfología invasiva y móvil.¹⁹

En el año 2010 se realizó el estudio de identificación y caracterización de la proteína apical de merozoíto relacionada con trombospondina *Plasmodium vivax* (PvTRAMP), proteína que está presente de manera homóloga en *Plasmodium falciparum* la cual se encuentra jugando un papel activo en la fase eritrocítica²⁰, Tanto el esporozoito como el merozoíto presentan un complejo apical que secreta su contenido durante la invasión a las células del hospedador. Este estudio determinó que El homólogo de PfTRAMP en *P. vivax*, denominado PvTRAMP, es un antígeno largo de 340 aminoácidos codificado por un exón único que podría tener un papel potencial en la cito adherencia, como lo indica la presencia de una repetición de homología estructural del dominio de trombospondina (TSR).²¹ De acuerdo con su perfil de transcripción y expresión, PvTRAMP se ubica inicialmente en el extremo apical del parásito y más tarde en la superficie del parásito. El PvTRAMP recombinante es reconocido por sueros de pacientes infectados, por lo tanto, indica que es atacado por el sistema inmunitario durante una infección natural con *P. vivax*.²²

En etapas tales como anillos y trofozoítos en los que las roptrias aún no se han formado, *PfTRAMP* se encuentra en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. *PfTRAMP* se localiza en las roptrias de los merozoítos una vez que se forman en esquizontes tardíos. Hay informes de algunas proteínas asociadas a roptrias como RAMA, que, como *PfTRAMP*, se expresan en etapas tempranas que incluyen anillos y trofozoítos²³

Múltiples estudios han investigado una o pocas proteínas de merozoito de *P. vivax*, pero aún no se ha reunido una biblioteca completa de ecto dominios completos de proteínas de superficie de merozoíto, micronemas y roptrias para estudios funcionales²⁴. Para construir una biblioteca de este tipo en el 2015 fueron seleccionadas 39 proteínas que se conoce o predice, se localizan en la superficie de los organelos apicales de los merozoítos con base a estudios publicados de *P. vivax* y *P. falciparum*.²⁵ Fue posible expresar 37 de estas proteínas como ecto dominios recombinantes, incluidos varios miembros de las familias de proteínas MSP y 6-cisteína, proteínas adicionales relacionadas con la invasión y / o ancladas a GPI, así como varias proteínas sin homólogos de *P. falciparum*. El nivel éxito del 95% conseguido en la expresión las proteínas de merozoíto de *P. vivax* a niveles utilizables para estudios bioquímicos es comparable a esfuerzos similares para expresar las proteínas de merozoíto de *P. falciparum*²⁶

En el 2018 se creó un depósito estructural computacional confiable de información bautizada *Pvax* DB, que es integralmente designada a todas las propuestas investigativas que incluyen el desarrollo de fármacos proteicos y candidatos a vacunas como promesa de erradicación de la Malaria favorecida o constatada por proteínas específicas de *Plasmodium vivax*. *PvaxDB* proporciona una secuencia extensa, estructura, sitio de unión a ligando e información funcional.²⁷ Esta herramienta representa una nueva etapa a campo abierto en la investigación de alternativas terapéuticas y preventivas a infecciones por *P. vivax* que promete ser bastante útil.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 MALARIA

La Malaria o Paludismo es una enfermedad parasitaria de clima tropical y subtropical que abarca manifestaciones tanto agudas como crónicas y se encuentra ampliamente distribuida en 91 países del mundo, particularmente en África.⁴ Es transmitida por la picadura de las hembras de mosquito del género *Anopheles*² La infección causada por las especies de *Plasmodium* generan unos cuadros febriles acompañados con síntomas específicos para malaria, los síntomas empiezan a parecer después del periodo de incubación el cual dura entre 7 a 30 días posterior a la picadura,²² aunque algunas veces la infección puede ser asintomática, con sintomatología leve, un cuadro clínico complicado o puede causar la muerte.²⁸ Cuando se genera un cuadro sintomático en el paciente los principales síntomas de malaria son fiebre la cual puede presentar o no un patrón, escalofrío y sudoración, acompañados o no de cefalea, emesis, diarrea, malestar general, mialgias, decaimiento, entre otros²⁹.

4.2 CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL DE MALARIA

El filo Apicomplexa está constituido por más de 300 géneros y abarca más de 5000 especies³⁰ algunos de ellos son considerados con gran importancia médica y económica, como *Toxoplasma gondii*, que causa toxoplasmosis de humanos y animales; o *Eimeria tenella*, el agente causante de la coccidiosis de pollo y *Plasmodium sp*, el agente causante de la malaria;. Todos estos protistas unicelulares son parásitos intracelulares obligados y dependen en diferentes grados de sus células huésped para obtener nutrientes.³¹ A excepción de algunos gametocitos morfológicamente no tienen flagelos ni cilios³² Sus estadios celulares muestran varias características conservadas: son células alargadas y

polarizadas, su forma se mantiene mediante un conjunto de microtúbulos que se extienden longitudinalmente, y su polo anterior contiene vesículas secretoras³³, como túbulos, anillo polar, roptrias y micronemas, estos últimos son organelos necesarios para la motilidad, la adhesión celular al huésped, la invasión celular de las células huésped y el establecimiento de la vacuola parasitofora debido a que contienen productos en forma de proteínas necesarias para esto³²

4.3 *Plasmodium spp*

El parásito *Plasmodium spp* es un patógeno de registro mundial que se desarrolla en un ciclo de vida complejo, llegando al huésped vertebrado mediante un mosquito hembra vector del género *Anopheles*,² este parásito requiere la formación de tres estadios invasivos; merozoito, oocineto y esporozoito para que durante las etapas específicas distintos tipos de células sean invadidas. Ingresados en el huésped los esporozoitos de la saliva del mosquito infectan a los hepatocitos para continuar por el ciclo asexual que tiene lugar en la sangre.³⁴

4.3.1 MECANISMO DE INVASIÓN

El modelo para la entrada de células de naturaleza apicomplexa implica una invasión activa usando un motor de actina-miosina. Esto implica el fenómeno de treadmilling de miosina sobre actina polimerizada conectada a los ligandos de la superficie de la célula apicomplexa, lo que provoca un movimiento interno del patógeno sin una respuesta o participación de la célula huésped³⁵

Sin embargo, patógenos protozoarios intracelulares obligados, rompen estas reglas casi universales. Estos parásitos, a diferencia de los agentes infecciosos bacterianos o virales, están equipados con su propia fuerza motora actina-miosina³⁶ que no solo potencia su motilidad (llamada deslizamiento) sino que también proporciona la fuerza mecánica para penetrar activamente en las células huésped³⁷

Este sistema conservado actúa como una forma de cinta transportadora que empuja al parásito hacia la célula huésped mientras que las interacciones receptor-ligando (unidas internamente al motor del parásito) se conducen hacia atrás³⁵.

La invasión de eritrocitos ocurre a través de un complejo proceso de múltiples etapas que involucra numerosas interacciones de la proteína del huésped parásito 30 y una secreción de orgánulos de parásitos asociados a la invasión y formación de la vacuola parasitofora única dentro de la cual reside el parásito y se desarrolla³⁸

El proceso rápido se divide tradicionalmente en cuatro etapas distintas, definidas tanto por imágenes en vivo como por estudios de imágenes ultra estructurales: (I) fijación inicial del merozoito, (II) reorientación del merozoito hacia su extremo apical, (III) formación de un estrechamiento o unión móvil e (IV) invasión completa y sellado de la vacuola parasitofora.³⁹

4.3.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida del parásito se da en dos fases, la esporogónica o sexual y la esquizogónica o asexual, dividiéndose a su vez en fase exoeritrocítica y fase eritrocítica⁴⁰ (Figura 1). El ciclo sexual o esporogónico se da cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* ingiere los gametocitos de un huésped infectado los cuales evolucionan a gametocito macho y hembra se fecundan y generan un cigoto⁴⁰ el cual pasará a oocinetos móviles y viajarán hasta el epitelio intestinal del mosquito exactamente en la lámina basal y se transformarán en ooquistes para finalmente producir muchos esporozoitos. Estos esporozoitos viajan por la hemolinfa del parásito y llegan a las glándulas salivales y es por esto que al alimentarse de la sangre de un huésped se liberan los esporozoitos⁴¹ el ciclo asexual o esquizogónico se divide en dos fases las cuales son la fase eritrocítica que se inicia con la picadura del mosquito del género *Anopheles* el cual liberará la fase infecciosa que es el esporozoito que viaja hasta la corriente sanguínea con dirección al hígado⁴², allí invadirán los hepatocitos en donde se transforman a esquizontes y posteriormente se liberan merozoitos⁴³

Se debe tener en cuenta que en el caso de *Plasmodium vivax* algunos esquizontes pueden quedar como hipnozoitos o esquizontes durmientes que pasado un cierto tiempo puede volver a activarse quedando como esquizonte y posteriormente pasar a merozoitos⁴⁴

Finalmente en la fase eritrocítica al ser infectado el reticulocito el parásito pasa por varios estadios como lo son el anillo, trofozoito y esquizonte maduro y este último va a infectar a más reticulocitos para que sean liberados más merozoitos repitiéndose el ciclo⁴³ es crucial

tener en cuenta que algunos merozoitos cambian o evolucionan a gametocitos los cuales son la forma infectante la para la mosquita *Anopheles*⁴⁰

Dentro del eritrocito, los parásitos se encuentran en una vacuola parasitófora donde pueden seguir dos vías de desarrollo: crecer y diferenciarse en esquizontes productores de nuevos merozoitos, que invaden a otros eritrocitos, o producir formas sexuales: gametocitos macho y hembra, como ya se mencionó.⁴⁵

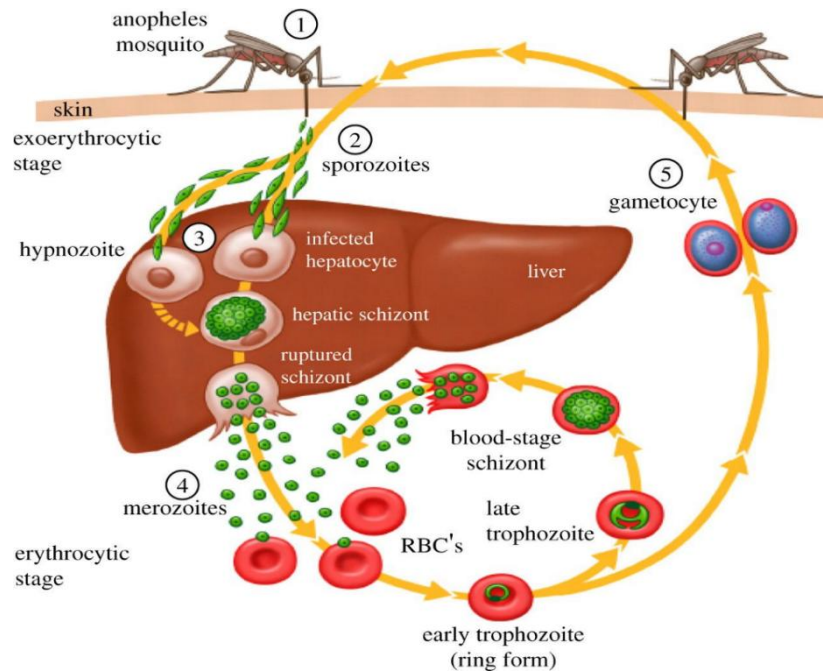


Imagen obtenida de:

https://co.pinterest.com/pin/706220785288117948/?nic_v1=laDOR8tflL4UwRF2Rpn8nVOK1LOicUdVogP0EkqKcyoPeMsmalPG2hGrEvyPZEIAom

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*

1. Picadura del mosquito hembra 2. Esporozoitos siendo inoculados al torrente sanguíneo del huésped. 3. Colonización de esporozoitos en el hígado, formando esquizontes (multiplicación asexual). 4 Merozoitos colonizadores de glóbulos rojos (Fase eritrocítica). Dentro de los eritrocitos, los parásitos se reproducen en forma asexual (esquizogonia),¹² esta multiplicación es responsable por los síntomas. 5. Algunos parásitos, dentro de los glóbulos rojos, se transforman en gametocitos, que son las formas sexuales de Plasmodium. Cuando el mosquito *Anopheles* ingiere la sangre infectada, los gametocitos se diferencian en su intestino y reinician, por reproducción sexual, el ciclo biológico. Entre dos y cuatro días más tarde (depende de la especie de Plasmodium), el ciclo se repite⁵⁵.

4.4 GENERALIDADES DE *Plasmodium vivax*

A pesar de considerarse como un cuadro clínico de naturaleza auto limitada capaz de desarrollar un cuadro benigno, cada vez hay más pruebas de que la gravedad de la

enfermedad a nivel de carga general e impacto económico de *Plasmodium vivax* ha sido subestimada.⁴⁶

Existen 2 aspectos determinantes que condicionan el control y eliminación de la malaria por *Plasmodium vivax*, primero esta su capacidad de producción de hipnozoitos desde etapas hepáticas latentes que tienden a durar entre 6 y 11 meses favoreciendo las recaídas.⁴⁷ luego gracias a su producción continua y temprana de gametocitos se efectúa un alto poder de transmisión, teniendo un índice mayor de infección de los mosquitos y un ciclo de desarrollo más corto dentro estos en comparación con otras especies de *Plasmodium spp*⁴⁸. Dicho esto, se facilita la transmisión de *P. vivax* por mosquitos estacionales, con temperaturas considerablemente más, aumentando de manera significativa la distribución global de este parásito en regiones templadas.⁴⁹ La dificultad que deviene del estudio de esta especie en particular es que debido al tropismo que tiene por los glóbulos rojos inmaduros, siendo de difícil manejo y mantenimiento de un cultivo de estas células in vitro, aun mas por el hecho de que es incluso a los niveles menos desarrollados de esta célula (estadios I, II y III), mas no prontos a madurar. Por ello su estandarización ha resultado sumamente complicada⁵⁰

4.5 CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL Y PROTEÍNAS DE *Plasmodium spp*

Los micronemas son organelos que se encuentran en la parte apical del merozoito su cantidad varía dependiendo la especie, sin embargo, en *Plasmodium* representan un tamaño menor con una longitud de 120 nm con apariencia de sacos.⁵¹ Se cree que este organelo juega un papel crucial en la invasión de eritrocitos⁵² y en el secuestro de receptores de la superficie celular lo que implicaría una invasión del sistema inmune debido a que se reduciría la exposición del receptor a los sueros inmunes⁵³

Dentro de los micronemas hay dos familias de proteínas juegan un papel central en el proceso de invasión a los eritrocitos como lo son los ligandos de unión a Duffy, los cuales tienen un dominio rico en cisteínas en la región II⁵⁴ y dentro de estas se encuentran las proteínas de unión a Duffy presentes en *P. knowlesi* y *P. vivax*.⁵¹ Dentro de los ligandos DBL (unión a Duffy) hay presencia de estas proteínas en *P. vivax*,⁵⁵ los antígenos de unión

a eritrocitos conformadas por EBA-140, -175 y 181 y el ligando de unión a eritrocitos-1 presente en *P. falciparum*⁵⁶. AMA-1, también presente en este organelo, está involucrada en la formación de la unión fuerte en complejo con algunas proteínas RONs⁵⁷. Otra familia de antígenos que hacen parte de los micronemas son las proteínas de unión a reticulocitos 1 y 2, las cuales le confieren la especificidad a *P. vivax* de invadir reticulocitos en este⁵⁸, solo se han descrito seis proteínas presentes en este organelo: DBP, AMA-1, MSP-5, PvTRAMP y RBP-1a, 1b.⁵⁹

Las roptrias están localizadas en el polo apical y tienen una longitud aproximada de 550 x 250 nm.⁶⁰ Son organelos gemelos, que están unidos a una membrana en forma de pera y contiene unos conductos alargados que coinciden en el extremo plano de la prominencia apical del merozoito en formación⁶⁰. Las roptrias están compuestas por dos regiones en donde hay proteínas diferentes con roles diferentes en el proceso de invasión una es el cuello de las roptrias en donde encontramos proteínas que están involucradas en la adhesión parásito-célula diana antes y durante la invasión⁶², en esta región de las roptrias se encuentran las proteínas homólogas de *P. vivax* que se unen a reticulocitos: Rh1, Rh2a, Rh2b, Rh4 y Rh5⁶¹ y una región basal rica en lípidos en donde no hay proteínas homólogas lo que indicaría que es una adaptación de este organelo para invadir a su célula diana y allí encontramos proteínas como las proteínas de las roptrias de bajo peso molecular -1, -2 y -3 y el complejo de alto peso molecular⁶², es importante tener en cuenta que esta zona compuesta por lípidos permite la formación de la vacuola parasitófora⁶⁰ la cual permite que se desarrolle el ciclo de vida del parásito.³⁹

Los gránulos densos son vesículas membranosas de forma esférica con un tamaño aproximado de 80 nm de diámetro y se localizan en el citoplasma del merozoito en el espacio comprendido entre las roptrias y el núcleo⁶³. Después de la invasión a los glóbulos rojos, dichos gránulos se translocan a la superficie del merozoito y descargan su contenido por exocitosis dentro de la vacuola parasitófora, generando unas protuberancias que se extienden en el citoplasma de la célula invadida.⁶⁴ Específicamente se ha demostrado que los gránulos densos durante la invasión de los eritrocitos por los merozoitos liberan su contenido en el espacio de la vacuola parasitófora y posteriormente se mueven a los canales

en forma de dedos de la membrana de la vacuola³⁹. En los gránulos densos encontramos proteínas como RESA, la cual interacciona con la espectrina del glóbulo rojo presuntamente para poder proteger la membrana de este y no cambie de forma⁶⁵, también se encuentra RIMA que se expresa en estadios de esquizontes maduros y merozoitos libres, pero su función es desconocida⁶⁶ y finalmente SUB-1 y SUB-2. La SUB- está asociada con el procesamiento de varias moléculas asociadas a la superficie del merozoito como la proteína de superficie de merozoito -1, -6 y -7 MSP, del inglés Merozoite Surface Protein a las cuales se les atribuye las interacciones de baja afinidad entre el merozoito y la célula. En *P. vivax*, a la fecha no se han descrito proteínas presentes en estos organelos.⁶⁷

4.6 PROTEÍNA TRAMP

PTRAMP se localiza conjuntamente en los primeros esquizontes intraeritrocíticos con AMA-1, una proteína de membrana integral de Tipo 1 que es una de las principales candidatas a la vacuna. El gen *pvtramp* se encuentra en un segmento cromosómico de 3.120.417 pb, *PvTRAMP* y posee un dominio transmembrana C-terminal (TM)⁶⁸. Contrario a su homólogo en *PfTRAMP* (41kDa) *PvTRAMP* (39kDa) es 12 residuos más corto, es un antígeno largo de 340 aminoácidos codificado por un solo exón que podría tener un papel potencial en la citoadherencia y en su extremo N-terminal posee una región hidrófoba, que es consistente con un péptido señal⁶⁹. En *PvTRAMP* el péptido señal de sitios de escisión se encuentra entre los aminoácidos 20 y 21 mientras que en *PfTRAMP* que se encuentra entre los aminoácidos 24 y 25¹⁷.

Estudios han detectado un único dominio TSR en *PvTRAMP*. Este dominio TSR tiene un valor de significación alta y se extiende desde el residuo 234 a 284, ubicado por lo tanto cerca del dominio TM. En general, tiene aproximadamente 50-60 aminoácidos de longitud y contiene 12 o más residuos altamente conservados y típicamente separados que comprenden 6 cisteínas (C), 2 a 3 triptófanos (W) y 2 argininas (R)⁷⁰ Bajo la técnica de desarrollo de estructuras cristalinas se ha evidenciado que este dominio se divide en dos subgrupos (1 y 2) dependiendo de los reordenamientos entre las cisteínas conservadas y la disposición de los residuos aromáticos, que determinan el plegamiento de la hélice principal en la estructura de la proteína⁷¹.

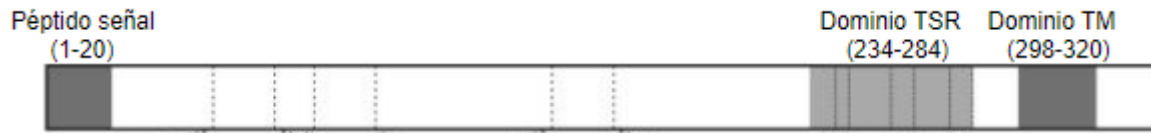


Figura 2. Representación esquemática de PvTRAMP que indica las localizaciones del péptido señal predicho y el dominio transmembrana (ambos en gris oscuro), así como el dominio TSR (gris claro).

Imagen tomada de Monguí A, *et al.* 2010¹⁷.

Los TSR se encargan de mediar una amplia variedad de interacciones adhesivas durante el desarrollo celular, la unión y la migración y la remodelación del tejido a través de la unión a ligandos de células y matrices que incluyen fibronectina, plasminógeno, metaloproteasas de matriz, sulfato de heparán, CD36 y otros proteoglicanos⁷².

Es importante mencionar que la función principal de este dominio reside en su motivo amino terminal que media la unión a los glicosaminoglicanos (GAG); Una característica que se asocia con la capacidad de invasión de las proteínas del parásito que contienen dominios TSR^{73,74}.

En otros estudios se ha determinado que *PvTRAMP*, codifica un TSR que se asemeja más al subconjunto de TSR del Grupo 1 caracterizado en las proteínas de mamíferos trombospondina, Properdina e inhibidor de la angiogénesis cerebral⁷⁵.

5. METODOLOGIA

5.1 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO CONSERVADO Y VARIABLE DEL GEN *pvtramp*

5.1.1 MUESTRAS: La Muestra de ADN genómico de *Plasmodium vivax* empleado en la investigación fue obtenido por investigadores de la FIDIC lugar donde se realizó este trabajo (previamente procesado y con condiciones establecidas).

5.1.2 DISEÑO DE CEBADORES: Los cebadores específicos fueron previamente diseñados en FIDIC (**Tabla 1**) y se emplearon para amplificar el fragmento conservado (*pvtramp-rc*) y el fragmento variable (*pvtramp-rv*) del gen que codifica la proteína PvTRAMP. La selección de dichos fragmentos fue realizada previamente por análisis de diversidad y selección natural por investigadores de la Fundación Instituto de inmunología de Colombia (FIDIC).

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

Tabla 1. Cebadores para la amplificación del gen fragmentado en *pvtramp-rc* y *pvtramp-rv*.

5.1.3 PCR CONVENCIONAL

El ADN genómico se empleó como plantilla en reacciones de PCR de 25 μ L que contenía: 1X de la enzima de alta fidelidad Fushion HSII High Fidelity Master mix/Hifi (Thermo Scientific™), 0,5 μ M de cebador directo, 0,5 μ M de cebador reverso y agua ultra pura para llevar a volumen de reacción.

Las condiciones de amplificación en ambos casos se relacionan en la **tabla 2**.

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

Tabla 2. Condiciones de amplificación para fragmentos de *pvtramp*

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% empleando TAE 1X teñido con SYBR SAFE (intercalante para ácidos nucleicos) por medio del fotodocumentador (MiniBIS Pro).

Los amplicones obtenidos fueron purificados por medio de un kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), según las condiciones del fabricante. La extracción del plásmido pET32b+ (Novagen) de células de *Escherichia coli*, se realizó empleando el kit comercial Zyppy Plasmid mini prep kit. La cantidad de ADN de los

fragmentos purificados y del plásmido, así como posible contaminación con proteínas o fenoles se evaluó empleando una placa de cuarzo μ Drop™ Plate, analizada en el equipo Multiskan go (Thermo Scientific™) en el que se estudiaron tres longitudes de onda: 260 nm para conocer la cantidad de ADN en $\mu\text{g}/\text{mL}$, 230 nm para evaluar fenoles o sales (no contaminado con absorbancias de 1,7 o superior) y 280 nm para proteínas (no contaminado entre absorbancias de 1,8 a 2).

5.2 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO CONSERVADO Y FRAGMENTO VARIABLE DE *pvtramp* AL VECTOR pET32b+

Posteriormente, tanto los productos purificados como el plásmido pET32b+ se digirieron con las enzimas de restricción MscI y AvaI (Promega) de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. En resumen, se digirió 1 μg de cada producto utilizando 3 μL del buffer cutSmart (10x), 1 μL de cada enzima (10U/ μL) y agua ultrapura para aforar a un volumen final de 25 μL . La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C y después se inactivó a 80°C durante 20 min. Cada proceso se validó por medio de geles de agarosa al 1,5%.

Pasado este tiempo, cada fragmento fue ligado de manera independiente al vector con ayuda de la enzima T4 ligasa, según los parámetros del programa NeBioCalculator⁷⁶. Para ello, se empleó una relación 1:5 (100 ng de vector y 500 ng de cada producto), 2 μL de buffer T4 (10x), 0,5 μL de T4 ligasa (30U/ μL) y se llevó a un volumen final de 20 μL con agua ultrapura. Las condiciones de incubación fueron 3h a 22°C, 15h a 4°C, seguido de una inactivación a 70°C por 10 min.

5.3 TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS JM109 Y SECUENCIACIÓN

Cada plásmido recombinante (*pvtramp-rc* + pET32b+ y *pvtramp-rv* + pET32b+) se transformó por choque térmico de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial en células *E. coli* JM109 (Invitrogen). Se validó que las colonias que crecieron tuvieran incorporado el plásmido recombinante mediante PCR empleando 0,5 μL (2,5U) de la enzima Biolasa (Bioline), 0,5 μM de cebador directo (pET32b-D: CGGTGAAGTGGCGGCAA) y 0,5 μM del reverso (pET32b-R:

CCAAGGGGTTATGCTAGT), 50mM de MgCl₂, 100mM de dNTP's, 10X del Buffer NH₄ y con agua ultrapura se llevó a un volumen final de 10µL por colonia, con las condiciones relacionadas en la tabla 3.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg	
Hibridación	56°C	1 min	35
Elongación	72°C	2 min	
Elongación final	72°C	5 min	1
Conservación	10°C	10 min	1

Tabla 3. Condiciones de amplificación para PCR de colonia.

Se realizó un gel de agarosa al 1,5% con las condiciones descritas anteriormente para conocer que colonias se encontraban en la altura esperada. Aquellas colonias que presentaron un tamaño esperado se inocularon en medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina (0,1 mg/mL) para extraerles el plásmido (empleando el kit comercial Zyppy[†] PlasmidMiniprep Kit) y confirmar la integridad del inserto, así como su correcta orientación en el vector, usando el método de Sanger (MACROGEN, Seoul, South Korea), con los cebadores empleados en la PCR de colonia.

El análisis de las secuencias se realizó mediante los electroferogramas recibidos y se compararon las secuencias con el gen *pvtramp* de la cepa de referencia Sal-I (insertado manualmente al vector pET32b+ utilizando el software Gene-Runner v3.05) usando la herramienta disponible en la web ClustalW NPS@.

5.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS BL21-DE3

Los plásmidos cuya integridad fue óptima por los análisis de secuenciación, fueron transformados por choque térmico a células *E. coli* BL21-DE3 cuya línea celular es ideal

para la expresión recombinante de proteínas, al contener un promotor T7 que permite la producción con alto rendimiento.

Se realizaron expresiones piloto de 10 mL en medio LB para determinar si las proteínas *PvTRAMP-RC* y *PvTRAMP-RV* se encontraban a la altura esperada (tabla 1).

Brevemente, las células crecieron en un inóculo inicial de 2mL de medio Luria Bertani (LB) suplementado con 0,1 mg/mL durante toda la noche a 37°C con 260 rpm. Al día siguiente, el cultivo se llevó a 10 mL de LB bajo las mismas condiciones de crecimiento durante 2h y 30min (hasta que alcanzaron la fase exponencial medido a una DO_{600} de 0,4), tiempo en el que se indujo la expresión de cada proteína con 1mM de IPTG durante 4h con las mismas condiciones de crecimiento. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 4.000rpm por 20 min y el pellet celular se trató con 100μL de buffer de extracción (urea a concentración 6M, imidazol 20 mM, Tris-Cl 10 mM, NaH_2PO_4 100 mM). El sobrenadante de cada expresión piloto se verificó por Western blot (WB), método explicado más adelante en el ítem 5.5.

Conociendo las colonias que expresan cada molécula a la altura esperada, se evaluó la expresión por horas, para determinar el tiempo en la cual se obtiene mejor cantidad de proteína. Para ello, se dejaron nuevamente inóculos pilotos (explicados anteriormente) bajo las mismas condiciones, con la salvedad de que antes de inducir se tomó una alícuota de 1mL, así como cada hora durante el tiempo de expresión. El pellet celular también se trató con buffer de extracción y se validó la expresión por WB.

Se seleccionaron las colonias que expresaron en mayor cantidad e integridad cada molécula para escalar los cultivos a 400 mL de LB suplementado con ampicilina (0,1 mg/mL), bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El tiempo de expresión para cada proteína varió dependiendo de la evaluación por horas. El pellet celular fue tratado con buffer de extracción suplementado con inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM, Iodoacetamida 100 mM y EDTA 500 mM) durante 16h a 4°C con 4 rpm. Pasado este tiempo, se recuperaron las células por centrifugación a 13.000 rpm durante una hora a 4°C.

Es importante mencionar que se expresó y se purificó P ν RBSA como control positivo en los ensayos de interacción, utilizando los clones en células BL21-DE3 almacenados en la genoteca de la FIDIC, siguiendo el protocolo descrito previamente.

5.5 VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE P ν TRAMP POR MEDIO DE WESTERN BLOT.

La confirmación de cada expresión, mencionado anteriormente, se realizó por Western blot y/o tinción de geles con azul de Coomassie. Los geles de poliacrilamida se realizaron a una concentración del 12%, para hacer visible la banda de corrido de gel se agregaron 20 uL de buffer laemly cada 10 uL de cada muestra y se dejaron 5 minutos en agua hirviendo, para el western blot se usaron membranas de celulosa y se transfirieron usando buffer de corrido en una cámara durante 2 horas a 10 voltios , posterior a eso se retiró el gel y se realizaron lavados a la membrana con PBS 1X +Tween 0.05 % , esta misma fue bloqueada usando leche al 5% para evitar uniones inespecíficas por 1 hora y se usaron anticuerpos Anti-histidinas acoplado a peroxidasa en dilución 1:4.500 (catalogue A7058, Sigma) durante 1 hora y 30 minutos y se revelaron . Para el Coomassie los geles fueron incubados por 6 minutos con azul de Coomassie y se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso para visualizar las bandas.

5.6 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD USANDO RESINA DE NÍQUEL.

Confirmado por WB la expresión de los fragmentos fueron incubados con resina Ni²⁺-NTA toda la noche a 4°C con 4 rpm. Seguidamente, las moléculas se purificaron por cromatografía de afinidad en fase sólida. En resumen, para eliminar de la resina uniones débiles o posibles contaminantes, se lavó inicialmente con 40 mL de buffer de lisis con tritón X-114 al 0,1%. Después se realizaron lavados con 20 mL de buffer urea 3M y 1M para disminuir las concentraciones de urea que contiene el buffer de lisis. Para renaturar las proteínas en la columna de cromatografía durante el proceso de purificación se continuó con la adición de 50 mL de buffer de renaturación (urea 1M, glutatión oxidado 0,1 mM y

glutación oxidado 1 mM, pH 7,2). Finalmente, para eluir las proteínas retenidas por afinidad en la resina se utilizaron 2 mL de concentraciones crecientes de imidazol en PBS1X (25, 50, 175, 100, 150, 200, 250 y 500 mM), las cuales fueron colectadas y validadas por WB y por tinción con azul de Coomassie.

Se unificaron aquellas fracciones más limpias o que presentaron una única banda y se dializaron rigurosamente en PBS1X, pH 7,2 en membranas de 6-8kD (Spectra pro) para retirarles el imidazol. Cuando las moléculas alcanzaron un pH 7 se cuantificaron utilizando el kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y la proteína albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de referencia.

5.7 OBTENCIÓN DE RETICULOCITOS HUMANOS

Las muestras de sangre de humanos adultos para el enriquecimiento de reticulocitos y posteriores ensayos de interacción se colectaron por profesionales de la salud de voluntarios de FIDIC. Brevemente, se tomaron 5mL de sangre en tubos Vacutainer BD (que contienen anticoagulante EDTA), se lavó 3 veces con PBS1X a 1500 rpm durante 5 min y se pasó dicha sangre por columnas de celulosa (CF11) para eliminar leucocitos y plaquetas. Se realizaron nuevamente lavados con las mismas condiciones y se incubaron diferentes alícuotas de 400µL de sangre con 20µL de microperlas magnéticas CD71+ (MACS), un receptor presente en los reticulocitos que se regula negativamente a medida que estas células maduran, durante 2 horas a 4°C con 4 rpm. Pasado este tiempo se realizó un lavado de 1mL con buffer de lavado (D-PBS 1X, 0,5 % de BSA y 2 µM de EDTA) y se recuperaron los reticulocitos empleando columnas XL de selección positiva (MACS) según las especificaciones del fabricante. El porcentaje de enriquecimiento se determinó mediante citometría de flujo empleando el reactivo reticount.

5.8 DETERMINACIÓN DE UNIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PvTRAMP A RETICULOCITOS HUMANOS

La unión de los fragmentos recombinantes de PvTRAMP-RC y PvTRAMP-RV a reticulocitos humanos, se evaluó por triplicado mediante citometría de flujo usando el citómetro FACSC Canto II (BD, San Diego, CA, USA), mientras que la proteína PvRBSA

se usó como control positivo de unión. Para ello, se incubaron los reticulocitos humanos con 2,5 μ M de cada proteína durante 16h a 4°C con 4 rpm. Posteriormente, cada muestra fue incubada por el anticuerpo monoclonal anti-His-APC de ratón (dilución 1:40) (MACS), durante 30min a 4° en oscuridad y sin agitación. Seguidamente, se realizó un lavado con PBS1X y se adicionaron 250 μ L de reticount.

La unión de cada molécula a los reticulocitos se cuantificó analizando 100.000 eventos en el citómetro. Las poblaciones se determinaron por complejidad (SSC) y tamaño (FSC), considerando las señales de excitación de APC (en función a la unión, por la etiqueta de histidinas) y de Alexa fluor 488 (en función al reticount). Los resultados obtenidos se analizaron en el software FlowJo V10.

6. RESULTADOS

6.1 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO CONSERVADO Y FRAGMENTO VARIABLE DEL GEN *pvtramp*

Al realizar la PCR y posterior verificación en geles de agarosa al 1.5% se obtuvieron dos bandas de 415 pb y 436 pb las cuales corresponden a la fragmento conservado y fragmento variable del gen *pvtramp* respectivamente como se observó en la Figura 3.

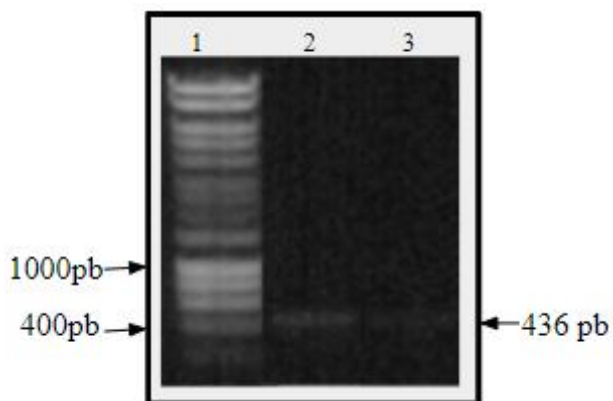


Figura 3. Amplificación de los fragmentos del gen *pvtramp*. carril 1: marcador de peso molecular 1Kb, carril 2: Amplificación de *pvtramp-rc*, carril 3: Amplificación de *pvtramp-rv*

Posteriormente la amplificación del fragmento conservado y variable del gen *pvtramp* fue cuantificada a 230 nm, 260 nm y 280 nm, los resultados se consignan en la Tabla 4.

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

Tabla 4. Cuantificación de *pvtramp-rc* y *pvtramp-rv*

6.2 VERIFICACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN POR MEDIO DE PCR DE COLONIA

Se transformaron con el inserto células de expresión JM109 y se realizó una PCR de colonia (Figura 4) usando los cebadores de pET32B+ obteniendo las bandas a la altura esperada de 618 pb para el fragmento conservada y 639 pb para el fragmento variable y se compararon con el vector pET32B+.

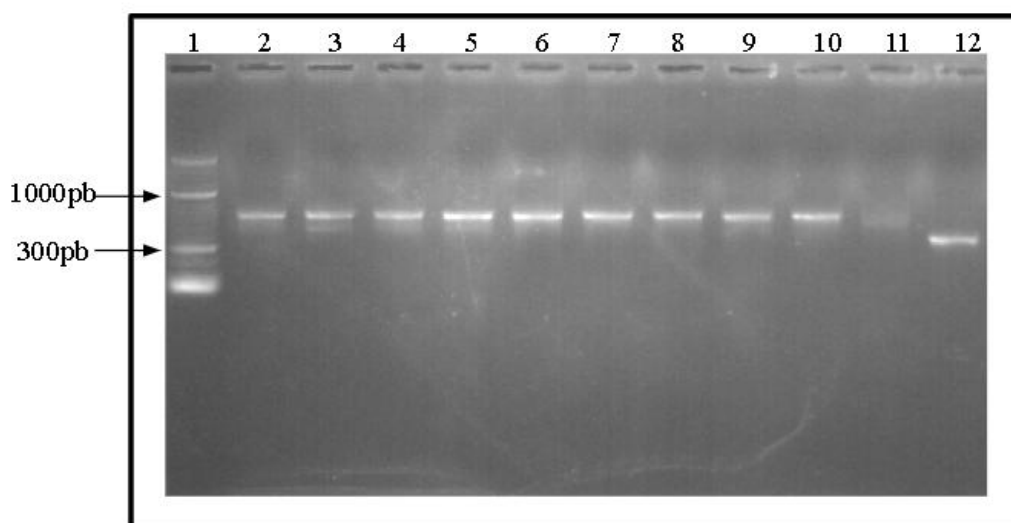


Figura 4. Verificación de obtención de clones. carril 1: marcador de 1Kb, carriles 2-6: Plásmido recombinante *pvtramp-rc*, carriles 7-11: Plásmido recombinante *pvtramp-rv*, carril 12: pET21b+ .

6.3. ANALISIS DE LA SECUENCIACIÓN ENVIADA POR MACROGEN

Se enviaron a secuenciar a MacroGen (Korea) por medio del método Sanger, los plásmidos de las colonias recombinantes que dieron a la altura esperada para cada fragmento.

Para validar la correcta inserción del gen que codifica para la región conservada y variable en su respectivo vector, es necesario comparar el resultado de la secuenciación enviada por

parte de Macrogen, con una secuencia de referencia (denominada como secuencia teórica). Esta secuencia fue construida realizando una digestión y ligación *in silico* al vector pET32b+, empleando el gen que codifica a la proteína PvTRAMP de la secuencia de la cepa de referencia Salvador I, tomada de plasmio DB (número de acceso: PVX_123575).

Para dicho análisis, es necesario evaluar la calidad de las secuencias tanto con el cebador directo y reverso con el que se enviaron a secuenciar, inicialmente por medio de los electroferogramas, los cuales deben presentar picos definidos a lo largo de la secuencia y sin ruido (Anexo 2 y 3). Posteriormente, se realiza un alineamiento en ClustalW NPS@ de las secuencias obtenidas por Macrogen con la secuencia teórica, y como se puede apreciar en la figura 5, la secuencia directa como la reversa del fragmento conservado coincide 100% con la teórica (las coincidencias se observan de color rojo). El alineamiento del fragmento variable se puede observar en el Anexo 1.

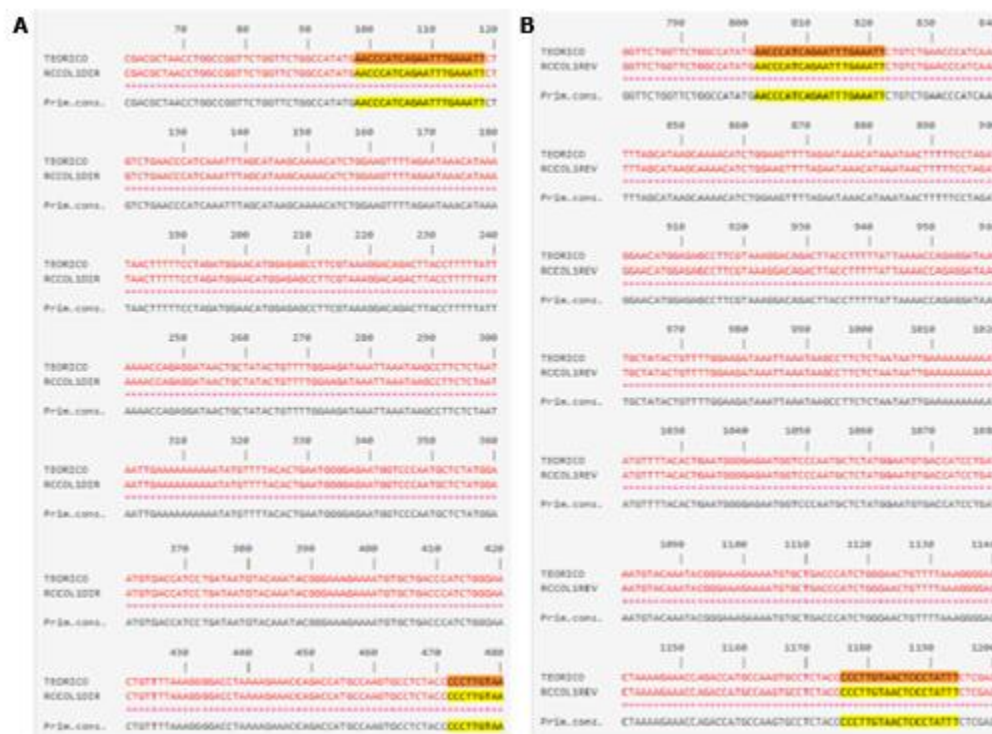


Figura 5. Alineamiento de secuencia teórica frente a secuenciación obtenida de clones positivos.
A. Secuencia directa de *pvtramp-rc* **B.** Secuencia reversa de *pvtramp-rc*. **Naranja:** Localización del respectivo cebador sobre la secuencia teórica **Amarillo:** Localización del respectivo cebador sobre la secuencia del clon enviado a Macrogen.

6.4 WESTERN BLOT PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE LA PROTEINA EXPRESADA

6.4.1 EXPRESIÓN PILOTO

Luego de la expresión piloto de 4 horas de duración para confirmar si los fragmentos *PvTRAMP- RC* y *PvTRAMP-RV* de la proteína *PvTRAMP* se encontraban al tamaño esperado, se verificó por Western-blot y como resultado se obtuvieron bandas de 32,32 kDa y 32,77 kDa respectivamente como se observa en la Figura 6.

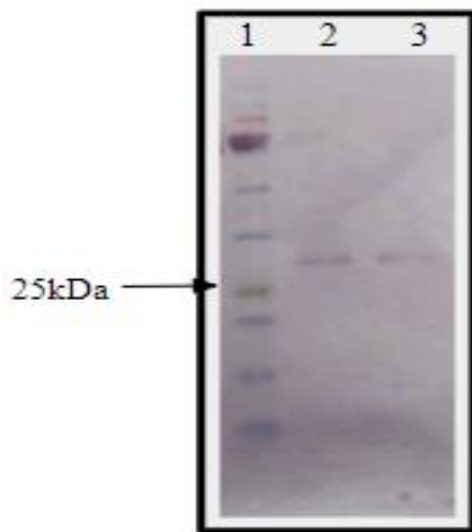


Figura 6. Expresión piloto verificada en Western-blot.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 11-245kDa. **Carril 2:** *PvTRAM-RC*. **Carril 3:** *PvTRAMP-RV*

6.4.2 EXPRESIÓN POR HORAS

Una vez confirmada tamaño en kDa se realizó una expresión alicuotando cada hora durante 4 horas la proteína desde la fase no inducida con el fin de identificar en cuál de las cuatro horas realiza su máxima expresión dando como resultado 3 horas para *PvTRAM-RC* y 2 horas para *PvTRAMP-RV* como se visualiza en la Figura 7.

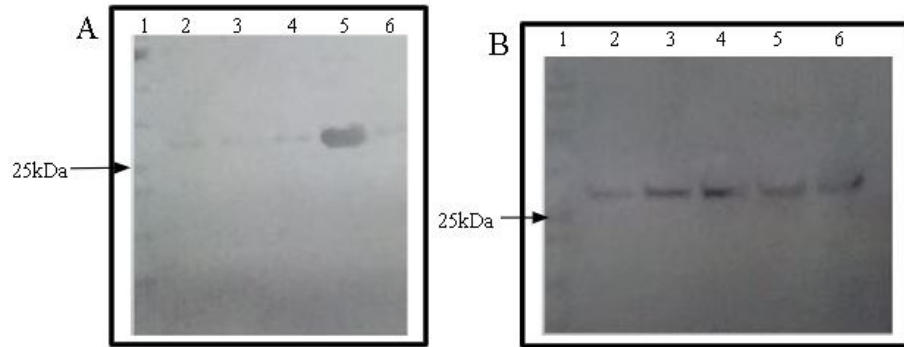


Figura 7. Expresión por horas verificada en Western-blot.

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

6.4.3 EXPRESIÓN A GRAN ESCALA

Una vez identificada la cantidad de tiempo óptima para obtener la máxima expresión de cada una de los fragmentos de la proteína se expresó con esas condiciones a gran escala como se explica en la metodología usando el tiempo ya mencionado para cada fragmento resultando en las bandas que se observan en la Figura 8.

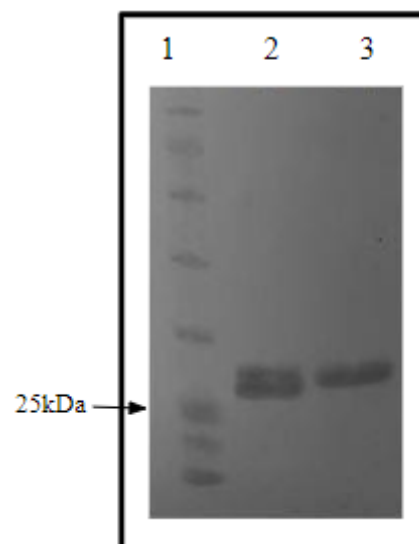


Figura 8. Obtención de cada fragmento mediante expresión a gran escala. Carril 1: Marcador molecular de 11-245kDa. **Carril 2:** *PvTRAMP-RC* (3 horas). **Carril 3:** *PvTRAMP-RV* (2 horas).

6.5 PURIFICACIÓN DE PvTRAMP-RC Y PvTRAMP-RV POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD USANDO RESINA DE NÍQUEL

Para verificar que las bandas hayan quedado intactas y del tamaño esperado de 20,32 kDa y 20,77 kDa PvTRAMP-RC y PvTRAMP-RV respectivamente se realizó un gel de poliacrilamida con tinción de Coomassie como se observa en la Figura 9.

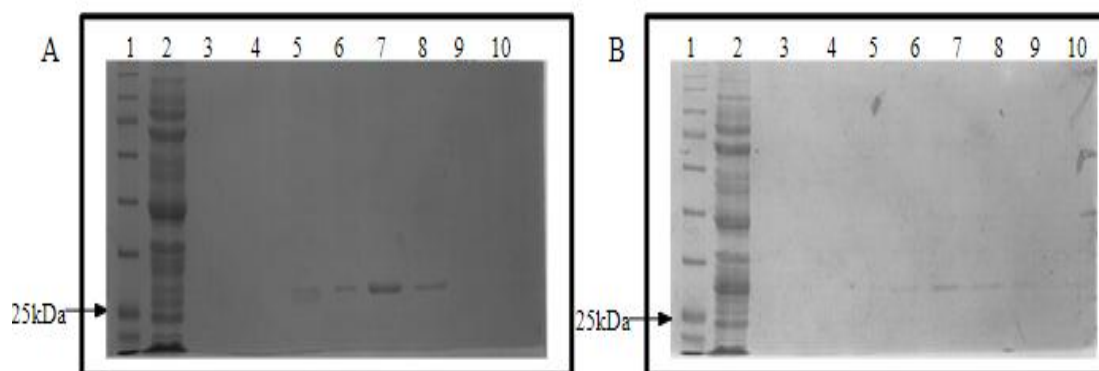


Figura 9. Fragmentos purificados de PvTRAMP verificados en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie A. PvTRAMP-RC B. PvTRAMP-RV, Carril 1. Marcador de 11-245kDa, Carril 2. Fracción no retenida de la purificación. Carril 3: 25mM Carril 4: 50 mM Carril 5: 75mM Carril 6: 100mM Carril 7: 150mM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

Resultado de la purificación la proteína obtenida mantuvo restos de imidazol, la eliminación de este por diálisis fue verificado por Western-blot (Figura 10.A) Para identificar que las bandas están presentes y la integridad de la proteína se encuentra intacta y un gel de poliacrilamida con tinción de azul de Coomassie (Figura 10.B) para verificar la limpieza de la proteína.

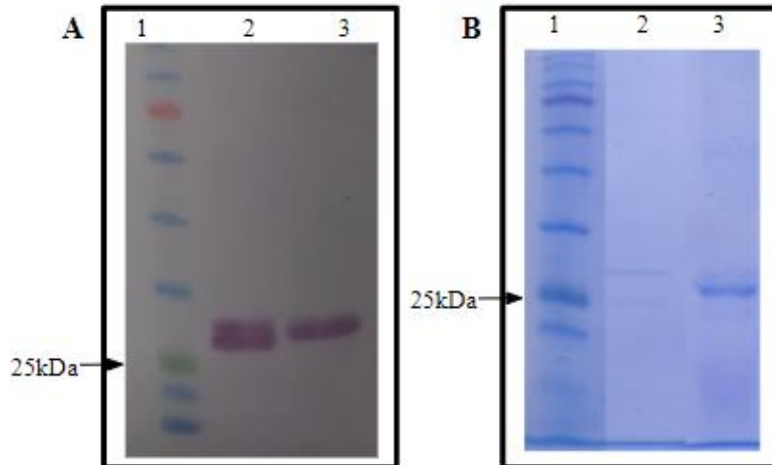


Figura 10. Diálisis de la proteína TRAMP. A. Western-blot B. Tinción de azul de Coomassie. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 11-245kDa, **Carril 2.** *PvTRAMP-RC*, **Carril 3.** *PvTRAMP-RV*

La cuantificación por curva con BSA, determinó que los ensayos de unión debían ser realizados bajo una concentración de proteína de 2.5 μM

6.6 ANALISIS DE UNION DE LA PROTEÍNA *PvTRAMP* A RETICULOCITOS HUMANOS

Inicialmente se verificó la obtención de reticulocitos proveniente de sangre humana por medio del reactivo Reticount como se muestra en la Figura 11, en donde se evidencia en azul el desplazamiento de población a medida que marcan positividad para reticulocitos, si se compara con la población sin marcar con Reticoun (curva roja). En esta imagen el porcentaje de enriquecimiento fue del 25%.

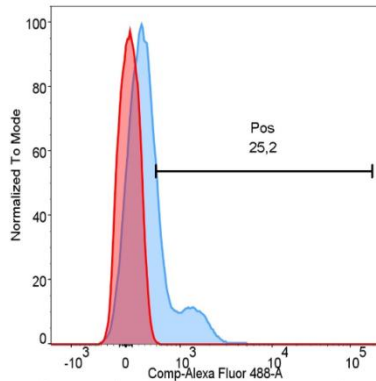


Figura 11. Enriquecimiento de reticulocitos humanos. Rojo: reticulocitos no marcados. **Azul:** reticulocitos marcados. **Pos:** positivos para reticulocitos sobre el total de las células

La verificación de la interacción entre la proteína y los reticulocitos ya obtenidos se realizó bajo la selección de la población óptima para evaluarlo. Esto se observa en la Figura 12. Para seleccionar la población que posteriormente será usada en los ensayos de unión se procedió con la discriminación de dupletas usando FSC-A (Dispersión frontal de área) vs. FSC-H (Dispersión frontal de altura) en donde se seleccionó la línea diagonal agrupada ya que todo lo que esté fuera de esta será una dupleta, en ellos existe de área y amplitud mientras que la altura permanece aproximadamente igual. (A). Luego se seleccionaron las células de nuestro interés que son los reticulocitos usando SSC-A (Dispersión lateral de área) vs. FSC-A ya que hay dispersión directa que nos indica el tamaño de la célula, mientras que la dispersión lateral se relaciona con la complejidad o granularidad celular (B) y finalmente tenemos una gráfica de densidad de parámetros que nos presenta un análisis más detallado donde podemos distinguir los reticulocitos por el marcador Alexa fluor 488A que reconoce el reticount y la proteína PvTRAMP usando el marcador APC-A ya que reconoce el tag de histidinas (C).

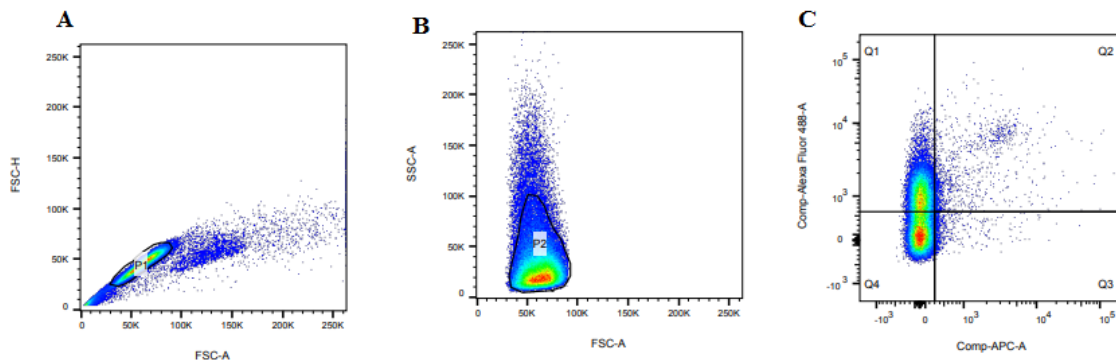


Figura 12. Selección de la población objeto de estudio. A. Eliminación de dupletas. **B.** Discriminación por complejidad y tamaño, **C. Q1.** Células positivas para reticulocitos. **Q3.** Células positivas para la proteína. **Q2.** Reticulocitos unidos a la proteína

Los ensayos de interacción analizados por citometría de flujo arrojaron los resultados consignados en la Tabla 5 y se esquematizan en la Figura 13, se evidencia una unión tanto a reticulocitos humanos como a glóbulos rojos maduros humanos tanto del fragmento conservado, se tienen control positivo y negativo RBSA y Tiorredoxina respectivamente

CONCENTRACION 2,5 μ 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

Tabla 5. Porcentajes de unión de los fragmentos de TRAMP y sus controles. TRAMP-RC: Región conservada de TRAMP. **TRAMP-RV:** Región variable de TRAMP. **RBSA:** Control positivo **TRX:** Tiorredoxina Control negativo.

Los resultados de la Tabla 5 son analizados en la figura 13, en esta imagen se aprecia el resultado de la exposición de reticulocitos a la proteína TRAMP, donde se muestra que el fragmento conservado tiene una reproducibilidad en los resultados obtenidos en cada

ensayo y muestra un porcentaje de unión más alto a reticulocitos en comparación a los glóbulos rojos maduros y el fragmento variable aunque presenta un porcentaje de unión más alto a los reticulocitos y a glóbulos rojos maduros los resultados obtenidos en los ensayos no son reproducibles indicándonos que esta interacción no es específica, finalmente tenemos los controles siendo el control negativo la tiorredoxina la cual es una molécula que está integrada en el vector pET32b+ que fue empleado para la expresión de los fragmentos de la proteína PvTRAMP y no muestra interacción entre glóbulos rojos y reticulocitos y el control positivo RBSA muestra un porcentaje de unión frente a los reticulocitos y no hay ninguna interacción con glóbulos rojos maduros.

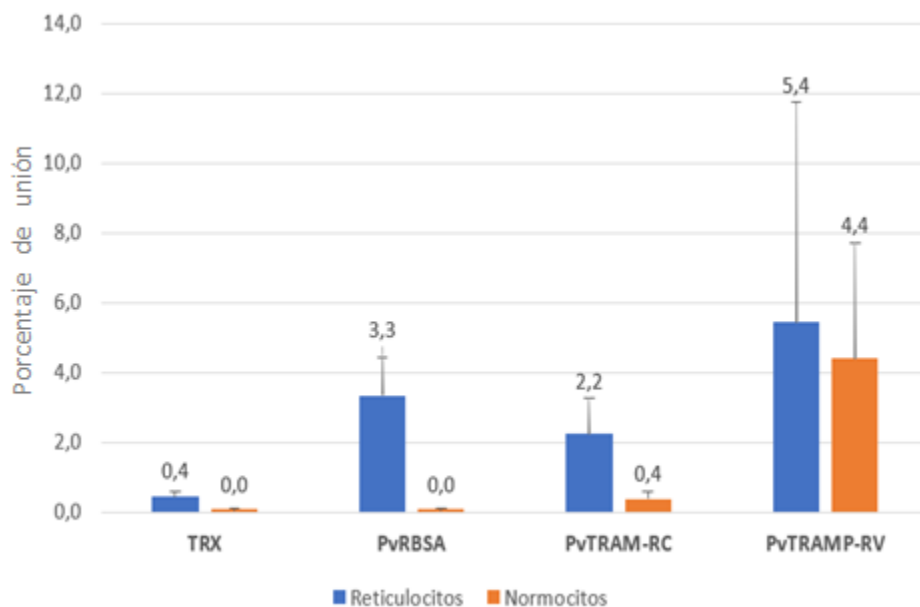


Figura 13. Esquema del porcentaje de unión de los fragmentos de TRAMP y de controles. TRX: Tiorredoxina control negativo. RBSA: Control positivo Azul: Reticulocitos. Naranja: Glóbulos rojos maduros.

7. DISCUSIÓN

El estudio y caracterización de las secuencias completas del genoma de *P. falciparum* y *P. vivax* y sus correspondientes perfiles en el área de transcriptómica^{77,78} y análisis del proteoma⁷⁹, han favorecido la construcción de un todo en base a interacción hospedero-parásito y proteína-proteína, la identificando proteínas involucradas en la invasión de parásitos a las células huésped, como las proteínas de los orgánulos apicales secretores y las proteínas de superficie de los parásitos en etapa sanguínea, no son hechos aislados sino que esto construye una correlación interactiva que abarcado de manera óptima en la actualidad está siendo un proceso clave para reducir, mitigar o incluso eliminar mediante una vacuna los cuadros clínicos causados por este parásito.⁸⁰ La proteína TRAMP de *Plasmodium vivax* ubicada en los merozoitos está involucrada en los procesos de unión/ invasión del parásito a las fracciones inmaduras del total de glóbulos rojos en sangre periférica, estableciendo estrategias importantes de evasión de respuesta inmune por la formación del merosoma que le confiere una ventaja significativa.⁸¹

El éxito inicial del trabajo comprendía de manera muy específica y necesaria la amplificación, mediante la replicación correcta del gen, esta amplificación tuvo éxito usando una enzima de alta fidelidad (Phusion Master Mix) la cual combinan bajas tasas de incorporación incorrecta con actividad de corrección de pruebas para dar una replicación fiel del ADN objetivo de interés.⁸² Además las condiciones usadas en cada fase de la amplificación fueron óptimas ya que debido a eso se obtuvo cantidad suficiente para continuar con el proceso de expresión recombinante.

El uso de la cepa BL21De3 de *Escherichia coli* favoreció de manera muy apropiada el proceso de producción, particularmente la expresión de la proteína de interés,⁸³ en este sistema la expresión basal sin el control adecuado logra impactar en el crecimiento de la célula huésped y reduce significativamente el rendimiento de la proteína, mientras que la inducción demasiado robusta puede dar lugar a cuerpos de inclusión,⁸⁴ al necesitar proteína a escala masiva el tema de la expresión basal no fue un problema de modo que no se

suprimió y resultó ser efectivo, por otro lado los cuerpos de inclusión fueron evitados por un lado con la concentración correcta de inductor IPTG⁸⁵, evaluándose este mismo por horas que resulta en un efecto visible sobre el tamaño de la banda en el Western Blot y por otro mediante la Tiorredoxina incorporada en el vector pET32b+ que se utilizó. LaVallie y colaboradores en investigaciones posteriores identificaron un sistema de expresión versátil utilizando la Tiorredoxina como socio de la fusión génica en bacterias, la fusión de la proteína de interés con la Tiorredoxina de *E. coli* (TrxA) ha demostrado ser especialmente útil evitando la formación de cuerpos de inclusión y aumentando la solubilidad de las proteínas heterólogas⁸⁶ Aunque la formación de cuerpos de inclusión puede suponer por un lado una disminución de la proteólisis en proteínas recombinantes y puede facilitar la purificación de las mismas; por otro lado requiere un re plegamiento in vitro que no siempre garantiza la conformación nativa de la proteína lo cual, supone una disminución del rendimiento y un encarecimiento del proceso⁸⁷. En otros estudios como “La construcción de fusión de Tiorredoxina permite la producción de alto rendimiento de metaloproteinasa de matriz activa soluble 8 (MMP-8) en Escherichia Coli” En donde para uso del vector pET-32Xa LIC que contiene Tiorredoxina en su extremo N-terminal lo cual apoya con éxito el uso de la Tiorredoxina como en el presente estudio. Se concluyó que la presencia de esta etiqueta de fusión permitió el plegamiento de MMP-8 (Metaloproteinasa de matriz 8) para generar cantidades en miligramos de la enzima catalíticamente activa al tiempo que evitó la acumulación en cuerpos de inclusión, facilitando la purificación por afinidad en un solo paso de la fracción soluble del lisado celular.⁸⁸

La proteína TRAMP recombinante fue obtenida mediante clonación en el vector de transcripción PET32b+ marcada con una etiqueta de 6 histidinas, un promotor T7 que sintetiza ARN a una velocidad mucho mayor que la polimerasa de *E. coli*⁸⁹ que a su vez utiliza etiquetas para favorecer la forma soluble y activa⁹⁰ de la proteína, un gen de resistencia a ampicilina que favorece el crecimiento en medios inoculados con este antibiótico para otorgarle un carácter selectivo, también fueron utilizadas las enzimas AVAI y MSCI presentes en su sitio de restricción para el corte y posterior clivaje del inserto. La transformación se hizo a las células de expresión *Escherichia coli* BL21 resultando en la expresión de proteínas de alta eficiencia pues el gen está bajo el control de un promotor T7 presente en el vector.⁹¹

Debido a esa expresión basal, es fundamental evaluar la expresión por horas para conocer el tiempo en el que la bacteria expresa una buena cantidad de la proteína y no se expone más del tiempo requerido a temperaturas altas, que la puedan afectar (degradar), ya que hay tres factores vitales para la síntesis de proteínas; la cantidad de ribosomas en funcionamiento, la tasa a la que funcionan los ribosomas y la tasa de degradación de las mismas y se ha determinado que toda la maquinaria ribosomal que controla estos procesos funciona a una temperatura constante de entre 25°C - 37°C, una exposición prolongada incluso a estas temperaturas afecta la tanto función ribosómica como el crecimiento en general. Las células de *Escherichia coli* crecen en un rango de temperatura que oscila entre los 40 °C, y la tasa de crecimiento celular en respuesta a un aumento de temperatura también va a aumentar, se establece como una reacción química con un rango de temperaturas de crecimiento óptimas, y esta relación se rompe tanto a altas como bajas temperaturas que aumenta en respuesta al aumento de temperatura como una simple reacción química en un rango normal central de sus temperaturas de crecimiento (20 a 37 ° C). Tanto a altas como a bajas temperaturas, esta relación se rompe.⁹² La temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es 37°C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, pero no significa que sea la temperatura óptima de producción de proteínas , se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E.coli* a 37 °C favorece la formación de cuerpos de inclusión , sin embargo a una temperatura más baja, cerca de los 30°C es posible aumentar el plegamiento de las proteínas obtenidas, siendo una alternativa adicional para futuras investigaciones, en orden de contrastar resultados, por ende se debe tener en cuenta que la temperatura es un factor muy importante en procesos metabólicos lo que afecta la transcripción y traducción de proteínas .⁸³

Para la extracción de las proteínas producidas por las células, se empleó Urea 6M, un detergente que une el hidrógeno presente en su estructura a cargas polarizadas como los grupos peptídicos, esta interacción debilita las interacciones moleculares de la proteína, a nivel de estructura secundaria y terciaria en general⁹³. Sin embargo, para evitar daños en el correcto plegamiento, es importante renaturar la proteína durante el proceso de purificación para mantener su integridad funcional y estructural, para ello en este estudio se empleó el glutatión oxidado/reducido para la formación de enlaces disulfuro nativos e isomerización

⁹⁴ de enlaces disulfuro no nativos, además de proteger de daños causados por estrés oxidativo. Estudios más recientes han sugerido que el Glutati6n podr3a tener un papel en asegurar que las oxidorreductasas del ret3culo endoplasm3tico que contiene una concentraci6n relativamente mayor de glutati6n oxidado se mantengan en un estado reducido para que puedan catalizar reacciones de reducci6n o isomerizaci6n,⁹⁵ por ende, formaci6n de enlaces disulfuro para replegar las prote3nas. Varios estudios han utilizado este m3todo para el replegamiento como es el caso de mon6meros de factor estimulante de colonias de macr6fagos humanos recombinantes una prote3na homodim3rica tambi3n ligada por enlaces disulfuro obteniendo resultados satisfactorios en este proceso que ha sido utilizado desde mucho tiempo atr3s ⁹⁶

La purificaci6n es un paso esencial para poder discriminar mol3culas producidas por la bacteria que no son de nuestro inter3s. Al obtener pl3smidos recombinantes (pET32b+ con el inserto de inter3s), corriente abajo se encuentra una etiqueta de seis histidinas que nos permiti6 realizar cromatograf3a de fase s6lida empleando resina de n3quel La columna de n3quel es el tipo de columna m3s utilizada para la cromatograf3a de afinidad con metal inmovilizado (IMAC)⁹⁷, se tienen opciones como la resina de cobalto, cobre y zinc, sin embargo la resina de n3quel proporciona un rendimiento mucho mayor de purificaci6n de una prote3na recombinante con una etiqueta de histidinas (6xHis) pues estas tienen una alta afinidad por el n3quel, mientras que otras prote3nas tienen baja afinidad o no tendr3n uni6n en absoluto. El uso de un tamp6n de lavado con una baja concentraci6n de imidazol eluy6 de manera 6ptima prote3nas d3bilmente unidas, las concentraciones ascendentes nos permiti6 obtener la prote3na etiquetada con histidinas de manera 3ntegra⁹⁸ una ventaja de usar esta columna es que la reacci6n de n3quel-histidina no depende de la estructura secundaria, por lo tanto se puede usar la columna para la purificaci6n de prote3nas desnaturalizadas.⁹⁹

Para evaluar la capacidad de estas prote3nas de interactuar con reticulocitos, es importante contar con una fuente de reticulocitos, sin embargo, son c3lulas que en sangre perif3rica no se encuentran en m3s del 2% .⁵⁰ Como alternativa, varios estudios han optado por emplear reticulocitos provenientes de sangre de cord6n umbilical, donde el porcentaje de dichas c3lulas se encuentra entre 7-8%. Estudios han demostrado que la calidad de los reticulocitos

de este origen es tan favorable en cuanto a integridad y recuento a que se ha implementado una inducción a la maduración con funciones terapéuticas¹⁰⁰ y en los ensayos referentes a la importancia de las regiones conservadas explicadas más adelante, fue utilizada sangre de cordón umbilical tanto en la caracterización proteína RBSA¹⁰³ como en la de GAMA⁶² ejemplificando la viabilidad de estas células, sin embargo el ensayo no es fiel a una condición natural de enfermedad, debido a que la infección se presenta en Sangre periférica. En esta investigación se logró obtener reticulocitos en más del 20% , a partir de sangre de humanos adultos, específicamente mujeres durante su ciclo menstrual, siendo este un resultado bastante significativo. Para ello, inicialmente se utilizó celulosa, técnica CF11 para depletar glóbulos blancos, siendo rápida y económica cuyos estudios demuestran que funciona atrapando leucocitos por exclusión de tamaño y / o interacciones entre grupos hidroxilo de celulosa y moléculas de superficie de leucocitos¹⁰¹ y la separación por medio de perlas que permitió etiquetar magnéticamente las células de linaje eritroide inmaduras presentes en sangre que expresan el antígeno CD71, antígeno de unión a la transferrina que se va perdiendo en la maduración de los glóbulos rojos, estas células que serán retenidas en una columna de afinidad magnética para separar y obtener óptimamente esta fracción celular⁹⁷

La unión demostrada resalta la significancia de las regiones conservadas. Siendo de naturaleza ortóloga las secuencias conservadas se mantienen para retener la estructura y función de las proteínas, cuando ocurren cambios en estas regiones tienden a ser muy sutiles reemplazando un aminoácido o ácido nucleico que es bioquímicamente similar¹⁰² por ello la importancia de esta secuencia con base a los resultados se da a la predicción que se genera por el carácter que se le confiere en la literatura., en estudios similares de caracterización e identificación realizados por Baquero y colaboradores en su tesis de posgrado se determinó que la región conservada de la proteína GAMA⁶² se unió de manera específica a los glóbulos rojos, de mismo modo con la proteína RBSA¹⁰³ caracterizada como una adhesina antigénica que cumple un papel en el proceso de unión del parásito al huésped por Camargo y colaboradores¹⁰³, que es en efecto el control positivo de unión en este trabajo y demuestra también la misma característica en su región conservada. Se determina entonces la participación de la región constante de TRAMP en el carácter reproducible de los resultados, ya que se hizo por triplicado y entre ellos se encontraron valores similares, caso contrario

ocurre con la región variable que, demostró afinidad, pero no un comportamiento homogéneo debido probablemente a una unión inespecífica los receptores por lo que se precisan estudios adicionales sobre esta región para confirmar esta hipótesis.

8. 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%.
- El fragmento recombinante de la región conservada de la proteína PvTRAMP demostró un mayor porcentaje de unión a reticulocitos y 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.

9. 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 postraduccionales 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.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. Tizifa T, Kabague A, McCan R, Van de Berg H, Van vugt M, Phiri K. Prevention Efforts for Malaria. *Current Tropical Medicine Reports*, 2018;5(1), 41–50
 2. White N, Pukrittayakamee S, Hien T, Faiz M, Mokuolu O, Dondorp A. Malaria. *Lancet*. 2014;383(9918):723-35.
 3. El informe mundial sobre el paludismo 2019 de un vistazo [Internet]. Organización mundial de la salud; 4 de diciembre de 2019 [Citado enero 21 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2019/es/>
 4. WHO. World Malaria Report. 2018
 5. World Health Organization. World Malaria Report 2017
 6. Baird J, Valecha N, Duparc S, White J, Precio N. Diagnóstico y tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax* . *Soy J Trop Med Hyg*. 2016; 95 (Supl. 6): 35–51.
 - 7 Preiser P, Kaviratne M, Shahid Khan S, Lawrence Bannister L, Jarra W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2000;. 2: 1461-1477
 - 8 Olliaro P, Barnwell J, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder- Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(Suppl 6):4–14
 - 9 Lacerda M, Zackiewicz C, Alecrim W, Alecrim M. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40:489–90.
 - 10 Recht, J, Siqueira A, Monteiro W, Herrera M, Herrera S, Lacerda M. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*,2017; 16(1).
 - 11 Cowman F, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*, 2012; 198(6), 961-971
 - 12 Weiss G, Crabb B, Gilson P. Overlaying molecular and temporal aspects of malaria parasite invasion. *Trends Parasitol*. 2016; 32:284–95.
 - 13 Gaur D, Chitnis C. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(4):422-428.

-
- 14 Neafsey D, Galinsky K, Jiang R, Young L, Sykes S, Saif S. The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2012;44(9):1046-50.
- 15 Ellis R, Sagara I, Doumbo O, Wu Y. Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: current status and the way forward. *Hum Vaccin.* 2010;6(8):627-34.
- 16 Garzón D. Identificación de señales de selección natural en genes de *Plasmodium vivax* que codifican proteínas involucradas en el proceso de invasión para determinar su potencial uso en una vacuna antimalárica [Tesis de doctorado]. Bogotá: Universidad del Rosario; 2019.
- 17 Monguí A, Angel D, Moreno D, Villarreal S, Almonacid H, Vanegas M, Patarroyo M. Identification and characterization of the *Plasmodium vivax* thrombospondin-related apical merozoite protein. 2010; *Malaria Journal*, 9(1), 283.
18. Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 2002; 70:5751–8
- 19 Green, J.L., Hinds, L., Grainger, M., Knuepfer, E., and Holder, A.A. *Plasmodium* thrombospondin related apical merozoite protein (PTRAMP) is shed from the surface of merozoites by PfsUB2 upon invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 2006 150: 114–117
- 20 Siddiqui F, Dhawan S, Singh S, Singh B, Gupta P, Pandey A, Chitnis C. A thrombospondin structural repeat containing rhoptry protein from *Plasmodium falciparum* mediates erythrocyte invasion. *Cellular Microbiology*, 2013;15(8), 1341–1356.
- 21 Naitza S, Spano F, Robson K, Crisanti A. La familia de proteínas relacionadas con la trombospodina de los parásitos Apicomplexan: los engranajes de la maquinaria de invasión celular. *Parasitol hoy*. 1998; 14: 479-484.
- 22 Monguí A, Angel D, I., Moreno-Perez, D. A., Villarreal-Gonzalez, S., Almonacid, H., Vanegas, M., & Patarroyo, M. A. Identification and characterization of the *Plasmodium vivax* thrombospondin-related apical merozoite protein. 2010; *Malaria Journal*, 9(1), 283.
- 23 Topolska A, Lidgett A, Truman D, Fujioka H, Coppel R. Characterization of a membrane associated rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 2004; 279: 4648–4656
- 24 Chen J, Jung J, Wang Y, Ha K, Lu F. Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays. *J Proteome Res*, 2010; 9: 6479–648

-
- 25 Hostetler J, Sharma S, Bartholdson S, Wright G, Fairhurst R, Rayner J. A Library of Plasmodium vivax Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2015; 9(12), e0004264.
- 26 Crosnier C, Wanaguru M, McDade B, Osier F, Marsh K. A library of functional recombinant cell-surface and secreted P. falciparum merozoite proteins. Mol Cell Proteomics, 2003; 12: 3976–3986.
- 27 Singh A, Kaushik R, Kuntal H, Jayaram B. PvaxDB: a comprehensive structural repository of Plasmodium vivax proteome. Database, 2018.
- 28 Knudson A. Perfil clínico y parasitológico de la malaria por Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax no complicada en Córdoba, Colombia. Rev. Fac. Med. 2015; Vol. 63 No. 4: 595-607
- 29 Tobón A. Signos de peligro en el paciente con malaria. Biomedica, 2009; 29 320-9
- 30 Seeber F, Soldati D. Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa. International Review of Cell and Molecular Biology
- 31 Ginger L. Niche metabolism in parasitic protozoa. Phil. Trans. R. Soc. B, 2006 361, 101–118.
- 32 Morrissette N, Sibley L. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002; 66(1), 21–38
- 33 Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Ménard R. Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: The Junction Conundrum. PLoS Pathog, 2014 10 (9): e1004273
- 34 Cowman A, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: biología y enfermedad. Cell, 2016; 167 (3), 610–624
- 35 Koch M, Baum J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. Cellular Microbiology, 2016; 18(3), 319–329.
- 36 Heintzelman M. Gliding motility in apicomplexan parasites. Semin Cell Dev Biol, 2015; 46: 135–142
- 37 Adams J, Hudson D, Torii M, Ward G, Wellems T, Aikawa M, Miller L. The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. Cell, (1990) 63(1), 141–153.

-
- 38 Lingelbach K, Joiner K. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111(Pt 11) 1998, 1467–1475
- 39 DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA. Papel de la membrana de la vacuola parasitófora de Leishmania y Plasmodium en su permeabilidad, ruta secretoria y salida de estos parásitos. GLADYS THALIA CORTES CANTIN.[internet]. disponible en :<http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/Proyecto.xhtml?idProyecto=11019>
- 40 Calderón M. Genotipia de Plasmodium vivax y su importancia en el manejo y control de la malaria en la amazonia peruana. [Tesis doctorado]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006. 51 p.
- 41 Castro R, Rodríguez M. Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. *Salud Publica Mex* 2009;51 supl 3:S395-S402.
- 42 Kumar H, Tolia N. Getting in: The structural biology of malaria invasion. *PLoS Pathog*, 2019; 15(9): e1007943
- 43 Magdalena Plebanski. *Malaria.ciencia*. vol, 68 n:1,2017
- 44 Adams J, Mueller I. The Biology of Plasmodium vivax . *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*,2017; 7(9), a025585
- 45 Castro I, Rodríguez MC. Análisis proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. *Salud pública de México*. 2009;51(3):S395-S402.
- 46 Price R, Tjitra E, Guerra, Yeung S, White J, Anstey N. Vivax malaria: Neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*, 2007; 77: 79–87
- 47 White N, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol*, 2012; 80: 113–150.
- 48 Mueller I, Galinski M, Baird J, Carlton J, Kochar D, Alonso P, del Portillo H. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, 2009; 9: 555–566
- 49 Gething P, Van Boeckel T, Smith D, Guerra C, Patil A, Snow R, Hay S. Modelling the global constraints of temperature on transmission of Plasmodium falciparum and P. vivax. *Parasit Vectors*,2011; 4: 92
- 50 Bermudez M, Moreno D, Arevalo G, Curtidor H, Patarroyo A. Plasmodium vivax in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. *Malar J*; 2018, 17:301
- 51 Bannister L, Mitchell G. The fine structure of secretion by Plasmodium knowlesi merozoites during red cell invasion. *J Protozool*, 1989; 36(4):362-7

-
- 52 Kappe S, Curley P, Noe A, Dalton P, Adams J. Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria *Molecular and Biochemical Parasitology*,1997; 89(1), 137–148
- 53 Adams J, Hudson, Torii M, Ward G, Wellems T, Aikawa M, Miller L. The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*,1990; 63(1), 141–153.
- 54 Rydzak J, Kaczmarek R, Czerwinski M, Lukaszewicz J, Tyborowska J, Szewczyk B. The baculovirus-expressed binding region of Plasmodium falciparum EBA-140 ligand and its glycophorin C binding specificity. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115437.
- 55 Wertheimer SP, Barnwell JW. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Experimental parasitology*. 1989;69(4):340-50
- 56 Adams JH, Blair PL, Kaneko O, Peterson DS. An expanding ebl family of Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol*. 2001;17(6):297-9
- 57 . Zuccala ES, Gout AM, Dekiwadia C, Marapana DS, Angrisano F, Turnbull L, et al. Subcompartmentalisation of proteins in the rhoptries correlates with ordered events of erythrocyte invasion by the blood stage malaria parasite. *PLoS One*. 2012;7(9):e46160.
- 58 Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites. *Cell*. 1992;69(7):1213-26.
- 59 Han JH, Lee SK, Wang B, Muh F, Nyunt MH, Na S, et al. Identification of a reticulocyte specific binding domain of Plasmodium vivax reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain. *Sci Rep*, 2016;6:26993.
- 60 . Kats LM, Black CG, Proellocks NI, Coppel RL. Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol*. 2006;22(6):269-76.
- 61 Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. *Nature*. 2011;480(7378):534-7
- 62 Baquero L. Identificación y Caracterización del Antígeno de Micronemas con Anclaje a GPI de Plasmodium vivax (PvGAMA) y Determinación de la Unión a Reticulocitos Humanos. [Tesis Posgrado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2017. 89 p.
- 63 Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124(4):755-66.

64 Gonzalez V, Combe A, David V, Malmquist NA, Delorme V, Leroy C, et al. Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009;5(3):259-72

65 Culvenor JG, Day KP, Anders RF. Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect Immun*. 1991;59(3):1183-7.

66 Trager W, Rozario C, Shio H, Williams J, Perkins ME. Transfer of a dense granule protein of Plasmodium falciparum to the membrane of ring stages and isolation of dense granules. *Infect Immun*. 1992;60(11):4656-61

67 O'Donnell RA, Blackman MJ. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):422-7

68 Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicción de la topología de proteínas transmembrana con un modelo oculto de Markov: aplicación para completar genomas. *J Mol Biol*. 2001; 305 : 567-580

69. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Mejor predicción de péptidos señal: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 2004; 340 : 783–795

70 Dubremetz JF, García-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Organelos apicales e invasión de células huésped por Apicomplexa. *Int J Parasitol*. 1998; 28 : 1007-1013

71 Thompson J, Cooke RE, Moore S, Anderson LF, Janse CJ, Waters AP. PTRAMP; una proteína de merozoito apical relacionada con trombospondina de Plasmodium conservada. *Mol Biochem Parasitol*. 2004; 134 : 225–232.

72 Silverstein RL. The face of TSR revealed: an extracellular signaling domain is exposed. *J Cell Biol* 2002;159:203–6.

73 Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A. El dominio A y el motivo relacionado con la trombospondina de Plasmodium falciparum TRAP están implicados en el proceso de invasión de las glándulas salivales de mosquitos. *Embo J*. 1999; 18 : 5195–5204.

74 Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, Menard R. La invasión de esporozoitos de Plasmodium en células de insectos y mamíferos está dirigida por el mismo sistema de doble unión. *Embo J*. 2002; 21 : 1597–16064

75 Tan K, Duquette M, Liu JH, Dong Y, Zhang R, Joachimiak A, et al. Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication. *J Cell Biol* 2002;159:373–82

76 <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>

77 Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. El transcriptoma del ciclo de desarrollo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 2003; 1 : E5.

78 Bozdech Z, Mok S, Hu G, Imwong M, Jaidee A, Russell B, Ginsburg H, Nosten F, Day NP, White NJ, Carlton JM, Preiser PR. El transcriptoma de *Plasmodium vivax* revela divergencia y diversidad de la regulación transcripcional en parásitos de la malaria. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos.* 2008; 105 : 16290-16295

79 Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, Gardner MJ, Holder AA, Sinden RE, Yates JR, Carucci DJ. Una visión proteómica del ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. *Naturaleza.* 2002; 419 : 520-526.

80 Arevalo G. Estudio de interacciones hospedero-patógeno y proteína-proteína en *Plasmodium Vivax* : evaluación de las proteínas del cuello de roprotrias -2, -4 y -5 y del antígeno apical de membrana-1. [Tesis Doctorado]. Bogotá: Universidad del Rosario; 2018.

81 Prudêncio M, Mota M. To Migrate or to Invade: Those Are the Options. *Cell Host Microbe.* 2007; 2: 286-288.

82 Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix. [Internet] Thermo Scientific. 2018; [Citado 2020 Marzo 18]. Disponible en https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0016316_Phusion_Hot_Start_II_High_Fidelity_PC_R_Master_Mix_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUGh1c2lvbiBib3QgU3RhcncQgSUkgSGlnaC1GaWRlbGl0eSBQO1IgTWFzdGVyIE1peA

83 García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Cruz O. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor* 2013;22(2):30-39

84 Perry Chou C. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;76:521–32

85 Gronenborn B. Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 1976;148:243-50.

86 LaVallie E, DiBlasio E, Kovacic S, Grant K, Schendel P, McCoy J. A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. coli* Cytoplasm. *Nature Biotechnology*, 1993; 11(2), 187–193.

87 Jana, S. y Deb, J.K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 289–298.

-
- 88 McNiff M, Haynes E, Dixit N, Gao F, Laurence J. Thioredoxin fusion construct enables high-yield production of soluble, active matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2016; 122, 64–71.
- 89 Plasmid Files [Internet] Snap Gene. [Citado 2020 Marzo 18]. Disponible en: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET and duet vectors \(novagen\)&plasmid=pET-32b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET%20and%20duet%20vectors%20(novagen)&plasmid=pET-32b(%2B))
- 90 Lee S, Kim S, Lee T. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013; 18(10), 1165–1207.
- 91 Iyer S, Karig D, Norred S, Simpson M, Doktycz M. Multi-Input Regulation and Logic with T7 Promoters in Cells and Cell-Free Systems. *PLoS ONE*, 2013; 8(10), e78442.
- 92 Farewell A, Neidhardt F. Effect of Temperature on In Vivo Protein Synthetic Capacity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1998. p 4704–4710
- 93 Rossky P. Protein denaturation by urea: Salt and bond. *National Academy of Sciences*, 2008; 105(44), 16825–16826.
- 94 Chakravarthi, S, Jessop C, Bulleid, J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Reports*, 2006; 7(3), 271–275
- 95 . Chakravarthi S, , Bulleid, J. Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway. *J Biol Chem*. 2004; 279(38):39872-9.
- 96 Tran-Moseman A, Schauer N, De Bernandez E. Renaturation of *Escherichia coli*-Derived Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Protein Expression and Purification*, 1999; 16(1), 181–189. doi:10.1006/prep.1999.1074
- 97 MACS [Internet]. Miltenyi Biotec. CD71 MicroBeads. Disponible en: [file:///C:/Users/user/Desktop/DS CD71%20MicroBeads human 130-046-201.pdf](file:///C:/Users/user/Desktop/DS%20CD71%20MicroBeads%20human%20130-046-201.pdf)
- 98 . BIORAD [Internet]. Columnas de níquel y resina de níquel. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/featured/en/nickel-columns-nickel-resin.html>
- 99 Bornhorst J, Falke J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 245–254.
- 100 Varela M, Menezes A, Perez D, Gamez A, Segui J, Izquierdo N, Martinez J, Becerra C, Portillo H. Proteomics study of human cord blood reticulocyte-derived exosomes. *Scientific Reports*, 2018; 8(1).

101 Venkatesan M, Amaratunga C, Campino S, Auburn S, Koch O, Lim P, Uk S, Soacheat D, Kwiatkowski D, Fairhurst R, Plowe C. Venkatesan, M., Amaratunga, C. Using CF11 cellulose columns to inexpensively and effectively remove human DNA from Plasmodium falciparum-infected whole blood samples. *Malaria Journal*,2012; 11(1), 41

102 Ivan H, Jimin P, Nick V. Defining and predicting structurally conserved regions in protein superfamilies. *Bioinformatics*, 2012; 29(2), 175–181.

103 Camargo A. Determinación de la diversidad genética de la proteína RBSA de Plasmodium vivax y sus regiones de interacción con reticulocitos humanos. [Tesis Posgrado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2018.

11. ANEXOS

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">310</th> <th style="width: 10%;">320</th> <th style="width: 10%;">330</th> <th style="width: 10%;">340</th> <th style="width: 10%;">350</th> <th style="width: 10%;">360</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG</td> <td>TCCGAGAAATTT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>AA-GAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG</td> <td>TCCGAGAAATTT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG</td> <td>TCCGAGAAATTT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">370</th> <th style="width: 10%;">380</th> <th style="width: 10%;">390</th> <th style="width: 10%;">400</th> <th style="width: 10%;">410</th> <th style="width: 10%;">420</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC</td> <td>CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC</td> <td>CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>AAAAGG2AAAATACCAACTAC2TTTTGCAGTTGTC</td> <td>CAAAAAAATGA2AATTACAAAATC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">430</th> <th style="width: 10%;">440</th> <th style="width: 10%;">450</th> <th style="width: 10%;">460</th> <th style="width: 10%;">470</th> <th style="width: 10%;">480</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGCAAGCGGCACAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGCAAGCGGCACAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGCAAGCGGCACAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">490</th> <th style="width: 10%;">500</th> <th style="width: 10%;">510</th> <th style="width: 10%;">520</th> <th style="width: 10%;">530</th> <th style="width: 10%;">540</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT</td> <td>ACCTGGTAATCAAGAAATTCG</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT</td> <td>ACCTGGTAATCAAGAAATTCG</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>GA2TCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTAC2TA</td> <td>ACTGGTAATCAAGAAATTC2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">550</th> <th style="width: 10%;">560</th> <th style="width: 10%;">570</th> <th style="width: 10%;">580</th> <th style="width: 10%;">590</th> <th style="width: 10%;">600</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT</td> <td>CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT</td> <td>CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT</td> <td>CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">610</th> <th style="width: 10%;">620</th> <th style="width: 10%;">630</th> <th style="width: 10%;">640</th> <th style="width: 10%;">650</th> <th style="width: 10%;">660</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT</td> <td>CGTTGGCAATTCCTCCA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT</td> <td>CGTTGGGCAATTCCTCCA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT</td> <td>CGTTGG2GGCAATTCCTCCA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">670</th> <th style="width: 10%;">680</th> <th style="width: 10%;">690</th> <th style="width: 10%;">700</th> <th style="width: 10%;">710</th> <th style="width: 10%;">720</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT</td> <td>AAAAAAGCACTTGAAGTAT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT</td> <td>AAAAAAGCACTTGAAGTAT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>TAC2AAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT</td> <td>AAAAAAGCACTTGAAGTAT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">730</th> <th style="width: 10%;">740</th> <th style="width: 10%;">750</th> <th style="width: 10%;">760</th> <th style="width: 10%;">770</th> <th style="width: 10%;">780</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA</td> <td>AAGCTCGAGCACCACCAC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_DIR</td> <td>AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA</td> <td>AAGCTCGAGCACCACCAC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		310	320	330	340	350	360	TEORICO	AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT					RV_COL1_DIR	AA-GAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT					Prim. cons.	AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT						370	380	390	400	410	420	TEORICO	AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC					RV_COL1_DIR	AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC					Prim. cons.	AAAAGG2AAAATACCAACTAC2TTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGA2AATTACAAAATC						430	440	450	460	470	480	TEORICO	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA					RV_COL1_DIR	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA					Prim. cons.	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA						490	500	510	520	530	540	TEORICO	GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT	ACCTGGTAATCAAGAAATTCG					RV_COL1_DIR	GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT	ACCTGGTAATCAAGAAATTCG					Prim. cons.	GA2TCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTAC2TA	ACTGGTAATCAAGAAATTC2						550	560	570	580	590	600	TEORICO	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC					RV_COL1_DIR	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC					Prim. cons.	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC						610	620	630	640	650	660	TEORICO	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGGCAATTCCTCCA					RV_COL1_DIR	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGGGCAATTCCTCCA					Prim. cons.	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGG2GGCAATTCCTCCA						670	680	690	700	710	720	TEORICO	TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT					RV_COL1_DIR	TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT					Prim. cons.	TAC2AAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT						730	740	750	760	770	780	TEORICO	AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAGCACCACCAC					RV_COL1_DIR	AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAGCACCACCAC					<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">730</th> <th style="width: 10%;">740</th> <th style="width: 10%;">750</th> <th style="width: 10%;">760</th> <th style="width: 10%;">770</th> <th style="width: 10%;">780</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>TCCGAGAAATTTAAAAGGCA</td> <td>AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT</td> <td>CAAAAAATGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>TCCGAGAAATTTAAAAGGCA</td> <td>AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT</td> <td>CAAAAAATGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>TCCGAGAAATTTAAAAGGCA</td> <td>AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT</td> <td>CAAAAAATGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">790</th> <th style="width: 10%;">800</th> <th style="width: 10%;">810</th> <th style="width: 10%;">820</th> <th style="width: 10%;">830</th> <th style="width: 10%;">840</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT</td> <td>AGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT</td> <td>AGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT</td> <td>AGGCGCAGGTAGC</td> <td>CAACTAGGG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">850</th> <th style="width: 10%;">860</th> <th style="width: 10%;">870</th> <th style="width: 10%;">880</th> <th style="width: 10%;">890</th> <th style="width: 10%;">900</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT</td> <td>CTTACTACATAACTACCTGGTA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT</td> <td>CTTACTACATAACTACCTGGTA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT</td> <td>CTTACTACATAACTACCTGGTA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">910</th> <th style="width: 10%;">920</th> <th style="width: 10%;">930</th> <th style="width: 10%;">940</th> <th style="width: 10%;">950</th> <th style="width: 10%;">960</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG</td> <td>AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG</td> <td>AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG</td> <td>AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">970</th> <th style="width: 10%;">980</th> <th style="width: 10%;">990</th> <th style="width: 10%;">1000</th> <th style="width: 10%;">1010</th> <th style="width: 10%;">1020</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG</td> <td>ACTTTAATTTCTCGTTGGT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG</td> <td>ACTTTAATTTCTCGTTGGT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG</td> <td>ACTTTAATTTCTCGTTGGT</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">1030</th> <th style="width: 10%;">1040</th> <th style="width: 10%;">1050</th> <th style="width: 10%;">1060</th> <th style="width: 10%;">1070</th> <th style="width: 10%;">1080</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT</td> <td>ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT</td> <td>ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT</td> <td>ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">1090</th> <th style="width: 10%;">1100</th> <th style="width: 10%;">1110</th> <th style="width: 10%;">1120</th> <th style="width: 10%;">1130</th> <th style="width: 10%;">1140</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TEORICO</td> <td>ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT</td> <td>AAAATCTGCAGATGTA</td> <td>AAGCTCGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>RV_COL1_REV</td> <td>ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT</td> <td>AAAATCTGCAGATGTA</td> <td>AAGCTCGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prim. cons.</td> <td>ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT</td> <td>AAAATCTGCAGATGTA</td> <td>AAGCTCGAG</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		730	740	750	760	770	780	TEORICO	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG				RV_COL1_REV	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG				Prim. cons.	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG					790	800	810	820	830	840	TEORICO	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG				RV_COL1_REV	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG				Prim. cons.	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG					850	860	870	880	890	900	TEORICO	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA					RV_COL1_REV	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA					Prim. cons.	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA						910	920	930	940	950	960	TEORICO	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA					RV_COL1_REV	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA					Prim. cons.	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA						970	980	990	1000	1010	1020	TEORICO	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT					RV_COL1_REV	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT					Prim. cons.	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT						1030	1040	1050	1060	1070	1080	TEORICO	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC					RV_COL1_REV	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC					Prim. cons.	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC						1090	1100	1110	1120	1130	1140	TEORICO	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG				RV_COL1_REV	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG				Prim. cons.	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG			
	310	320	330	340	350	360																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	AA-GAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	AAAGAGTTCTCGACGCTAACCTG6CCGGTCTGGTTCTGGCCATATG	TCCGAGAAATTT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	370	380	390	400	410	420																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	AAAAGGCAAAATACCAACTACATTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGAGAAATACAAAATC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	AAAAGG2AAAATACCAACTAC2TTTTGCAGTTGTC	CAAAAAAATGA2AATTACAAAATC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	430	440	450	460	470	480																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	GTGACGTTAGAACC6GAGTCCGAGTAGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGCAAGCGGCACAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	490	500	510	520	530	540																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT	ACCTGGTAATCAAGAAATTCG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	GAGTCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTACATAACT	ACCTGGTAATCAAGAAATTCG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	GA2TCCGATGTTAACGAAAAGAGTTCTTACTAC2TA	ACTGGTAATCAAGAAATTC2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	550	560	570	580	590	600																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	CAATTTACAAATGAAAAGTTTTAGAAATATATTCT	CAAGGAAAGAAATGTTAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	610	620	630	640	650	660																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGGCAATTCCTCCA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGGGCAATTCCTCCA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	CATTTAGTGTAACTCTACATAGGGGACTTTAATTTCT	CGTTGG2GGCAATTCCTCCA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	670	680	690	700	710	720																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	TACGAAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	TAC2AAGTAAATTAATTTTGGTATAATGGCAGGAAAT	AAAAAAGCACTTGAAGTAT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	730	740	750	760	770	780																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAGCACCACCAC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_DIR	AATAATTATAATCGTTTTGCTAAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAGCACCACCAC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	730	740	750	760	770	780																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
RV_COL1_REV	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Prim. cons.	TCCGAGAAATTTAAAAGGCA	AAATACCAACTACATTTTGCAGTTGCT	CAAAAAATGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
	790	800	810	820	830	840																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
RV_COL1_REV	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Prim. cons.	AATTACAAAATCGTACGTTAGAACC6GAGTCCGAGT	AGGCGCAGGTAGC	CAACTAGGG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
	850	860	870	880	890	900																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_REV	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	CAAGCGGACAAGAGTCCGATGTTAACAGAAAAGAGT	CTTACTACATAACTACCTGGTA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	910	920	930	940	950	960																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_REV	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	ATCAAGAATTCGCAATTTACAAATGAAAAGTTTTAG	AAGTATATTCCTCAAAGGAAGAA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	970	980	990	1000	1010	1020																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_REV	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	AATGTTAAAAGCATTAGTGTAACTCTACATAGGGG	ACTTTAATTTCTCGTTGGT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1030	1040	1050	1060	1070	1080																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
RV_COL1_REV	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Prim. cons.	GGCAATTCCTCATACGAAGTAAATTAATTTTGGT	ATAATGGCAGGAAATAAAAAAGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	1090	1100	1110	1120	1130	1140																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TEORICO	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
RV_COL1_REV	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Prim. cons.	ACTTGAAGTATAATAATATAATATCGTTTTGCT	AAAATCTGCAGATGTA	AAGCTCGAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											

Anexo 1. Alineamiento de la secuencia teórica de *pvtramp-rv* frente a la secuencia obtenida de Macrogen. A. Secuencia directa de *pvtramp-rv* B. Secuencia reversa de *pvtramp-rv*. Naranja: Localización del respectivo cebador sobre la secuencia teórica. Amarillo: Localización del respectivo cebador sobre la secuencia del clon enviado a Macrogen.



Anexo 2: Electroferograma de la secuencia directa de una colonia positiva para *pvtramp-rc*.



Anexo 3: Electroferograma de la secuencia reversa de una colonia positiva para *pvtramp-rv*.