



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Estudio de la función de HRP3 en la síntesis de hemozoína en *Plasmodium
falciparum*.

Trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller en Ciencias con
mención en Biología

AUTOR:

Daniela Nacarino Chavez

ASESOR:

Irene Delgado de la Flor Montauban, MSc. (UPCH)

CO-ASESOR:

Dionicia Gamboa Vilela, Ph. D. (UPCH)

Lima – Perú

2023

Estudio de la función de HRP3 en la síntesis de hemozoína en Plasmodium falciparum

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia

Trabajo del estudiante

<1%

2

www.med.uchile.cl

Fuente de Internet

<1%

3

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1%

4

repositorio.upch.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

5

repositorio.uautonoma.cl

Fuente de Internet

<1%

6

www.tdx.cat

Fuente de Internet

<1%

7

repositorio.unb.br

Fuente de Internet

<1%

8

lookformedical.com

Fuente de Internet

<1%

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
ESTADO DEL ARTE.....	3
I. Generalidades y biología de <i>Plasmodium falciparum</i>	3
Ciclo Biológico - fase intraeritrocitaria.....	3
II. Metabolismo del cofactor hemo	4
Biosíntesis <i>de novo</i> del hemo	5
Grupo hemo derivado del hospedero	6
III. Rol de la HRP2 en el metabolismo de la hemoglobina.....	7
Proteínas ricas en histidina 2 y 3	7
Regulación antioxidante y síntesis de hemozoína	8
Deleción simple y doble de genes <i>pfhrp2</i> y <i>pfhrp3</i>	10
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXOS	19

RESUMEN

A nivel global se han registrado 247 millones de casos de malaria en 84 países endémicos, siendo África el continente con una mayor prevalencia. Esta enfermedad infecciosa es causada por 5 especies de parásitos del género *Plasmodium* y se transmite vía mosquitos *Anopheles* spp. El responsable del paludismo severo es *Plasmodium falciparum*, el cual es la segunda especie más prevalente en la región amazónica del Perú. Durante su ciclo de vida intraeritrocitario, ocurre el mecanismo metabólico del grupo hemo. Este cofactor es crucial para su desarrollo y principalmente derivado de la digestión de la hemoglobina. Cuando se encuentra en altas concentraciones, es regulado por reacciones antioxidantes con proteínas, como la proteína rica en histidina 2 (HRP2), para convertir las fracciones hemo tóxicas a hemozoina a través de una biocristalización. La HRP2 se usa en el diagnóstico, pero no se sabe de manera completa su rol biológico, importancia, ni tampoco se han realizado estudios enfocados en su proteína homóloga HRP3.

La investigación sobre la HRP2 y HRP3 en el metabolismo de la hemoglobina es muy limitada. Un estudio registró que la interrupción del gen *pfhrp2* altera esta vía metabólica durante los estadios intraeritrocitarios, de manera que los niveles de transcripción de las enzimas involucradas fueron reducidos. Sin embargo, no se ha verificado de manera conjunta con el gen *pfhrp3*, ni se ha asociado con el fitness del parásito.

El presente proyecto busca determinar si la HRP3 tiene la misma función que HRP2 de sintetizar la hemozoina durante el metabolismo de la hemoglobina, y si la disminución de esta síntesis podría estar relacionada a la reducción del fitness cuando hay doble delección de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* de *P. falciparum*, reportado en un previo estudio.

Palabras clave: *P. falciparum*, HRP2, HRP3, proteína rica en histidina, hemozoina, hemoglobina.

ABSTRACT

Globally, 247 million cases of malaria have been recorded in 84 endemic countries, with Africa being the continent with the highest prevalence. This infectious disease is caused by five species of *Plasmodium* parasites and is transmitted via mosquitoes *Anopheles* spp. The principal responsible for severe malaria is *Plasmodium falciparum*, which is the second most prevalent in the Peruvian Amazon. During its intraerythrocytic life cycle, the metabolic mechanism of the heme group occurs. This cofactor is crucial for the development of the parasite and mainly derived from digestion of hemoglobin. When it is present in high concentrations, it is regulated by antioxidant reactions with proteins, such as histidine-rich protein 2 (HRP2), in order to convert toxic heme fractions to hemozoin through biocrystallization. HRP2 is usually used in diagnostics, but its biological role and importance are not fully studied, nor have studies focused on its homologous protein HRP3.

The research on HRP2 and HRP3 involved in hemoglobin metabolism is very limited. A recent study reported that disruption of the *pfhrp2* gene alters this pathway during intraerythrocytic stages, so that transcript levels of the enzymes involved were reduced. Despite this, it has not been verified with the *pfhrp3* gene, nor has it been associated with the parasite fitness.

The proposal of the present project is to determine whether HRP3 has the same function as HRP2 in the hemozoin synthesis during hemoglobin metabolism, and whether the decrease in this synthesis could be related to reduced fitness when there is a double deletion of the *P. falciparum* *pfhrp2* and *pfhrp3* genes, as reported in a previous study.

Keywords: *P. falciparum*, HRP2, HRP3, histidine-rich protein, hemozoin, hemoglobin.

ESTADO DEL ARTE

I. Generalidades y biología de *Plasmodium falciparum*

La malaria es una enfermedad infecciosa causada en el humano por 5 especies de parásitos del género *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. knowlesi* [1]. Su transmisión depende de la picadura del mosquito vector hembra *Anopheles* spp. que prevalece en países tropicales [2]. En el 2021 se registraron 247 millones de casos en 84 países endémicos, de los cuales las especies más frecuentes en América y Asia fueron *P. vivax* y *P. falciparum* [3]. Según un reciente reporte de la OMS (2022), se registró en el último año un incremento de dos millones de casos, demostrando que esta enfermedad sigue siendo un problema para la salud pública [1].

Plasmodium falciparum es el parásito que causa el paludismo severo y puede conllevar a la muerte del infectado si no es tratado en las primeras 24 horas. Se caracteriza por ocasionar malaria cerebral, dificultad respiratoria y anemia [1]. En el Perú se encuentra en la región amazónica, representando el 16.41% del total de casos detectados.

Ciclo Biológico - fase intraeritrocitaria

Los parásitos del género *Plasmodium* tienen un ciclo de vida complejo, ya que requieren de dos hospederos: el mosquito hembra y el humano [4]. Cuando ingresan al torrente sanguíneo vía el vector, por inyección de los esporozoítos, se alojan en el hígado para desarrollarse y multiplicarse [4]. En el hígado ocurre una reproducción asexual (fase extraeritrocitaria), donde se originan los merozoítos. Los merozoítos de *Plasmodium falciparum* se caracterizan por ser los más pequeños de todas las especies del género *Plasmodium* [5]. El complejo apical del parásito en este estadio es el responsable de la fase intraeritrocitaria, puesto que participan vesículas secretoras para la invasión de los eritrocitos, donde ocurre su división asexual hasta la maduración en forma de trofozoíto

y esquizonte. De esta manera, se vuelven a liberar merozoítos y repiten la infección para lograr su multiplicación [5,6]. Es esta la fase de la infección progresiva y la causante de la sintomatología [4].

Algunos merozoítos evolucionan a las formas sexuales denominadas gametocitos, los cuales serán ingeridos por el mosquito hembra *Anopheles* spp. para iniciar la reproducción sexual y desarrollar al ooquinetto en su tubo digestivo [4,6]. Este al dividirse asexualmente genera esporozoítos infectantes que comenzarán un nuevo ciclo (Anexo 1) [6].

II. Metabolismo del cofactor hemo

El hemo es un cofactor requerido para el crecimiento y viabilidad del parásito, siendo esencial para su supervivencia [7]. Además, tiene la capacidad de encontrarse en distintos estados como reducido y oxidado, de manera que pueden unirse a proteínas específicas para originar reacciones fundamentales propias del metabolismo celular oxidativo [7]. Entre estas están la respiración celular y conversiones redox mediadas por citocromos.

El suministro del hemo depende de las necesidades del parásito; especialmente es mayor cuando se encuentra en estadios de gametocitos [7]. También es importante durante la infección intraeritrocitaria, puesto que los parásitos necesitan energía para su rápida multiplicación y para ello requieren ATP constantemente. El hemo tiene la capacidad de aceptar y donar electrones durante el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, por lo que la vuelve a la fosforilación oxidativa dependiente de este cofactor [8]. Existen dos vías caracterizadas de obtención del hemo: biosíntesis *de novo* o de su entorno [7,8].

Biosíntesis *de novo* del hemo

Estudios muestran evidencia sobre que la vía de biosíntesis *de novo* del hemo es esencial y se da usualmente en los estadios de infección en el mosquito vector (esporozoítos) y en el hígado, mas no en la fase eritrocitaria [9]. Se han descrito las enzimas funcionales que son expresadas y participan en lugares específicos del parásito: en la mitocondria, el apicoplasto y citosol [7].

La vía se da inicio en la mitocondria con la formación del intermediario ácido aminolevulínico (ALA), llevado a cabo por una sintasa (ALAS). En el apicoplasto, el ALA se condensa por la enzima ácido aminolevulínico deshidratasa (ALAD) formando porfobilinógeno, el cual se volverá a condensar para formar hidroximetilbilano. Este es presuntamente sometido a la acción de uroporfirinógeno sintasa (UROS) (comprobado solo *in vitro*) y luego, su producto por uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD) para formar finalmente al coproporfirinógeno III. El cual, al ser liberado en el citosol, actúa con una enzima oxidasa (CPO) dando como resultado a protoporfirinógeno IX, que regresa a la mitocondria para ser nuevamente oxidado a protoporfirina IX. Finalmente, ocurre la inserción del hierro para formar el hemo por acción de la enzima ferroquelatasa (FC) (Anexo 2) [7]. Se estima que la concentración del hemo en el citoplasma del parásito es de 1 μ M, que estará listo para ser usado por citocromos de la cadena transportadora de electrones [8]. Para un eficaz proceso metabólico, las organelas (mitocondria y apicoplasto) se encuentran cercanas entre sí y se cree que en sus membranas poseen proteínas transportadoras o de unión para facilitar el tráfico de los intermediarios [7].

Se han realizado estudios en los que se llevaron a cabo delecciones y silenciamientos de genes que expresan las enzimas que participan en la biosíntesis *de novo* del hemo (a nivel de la mitocondria) y demostraron que no surgía efecto en el crecimiento del parásito. Solo

P. falciparum con deficiencia de ferroquelatasa (FC) mostró un crecimiento reducido [8]. Se sugiere que el parásito puede usar las enzimas del hospedero para su propio metabolismo cuando tiene deficiencia de enzimas que participan en la vía de biosíntesis *de novo* del hemo [7,8].

Grupo hemo derivado del hospedero

En la fase intraeritrocitaria, se necesita mayor cantidad de hemo por la dependencia del transporte mitocondrial de electrones para generar ATP [9]. Los eritrocitos se caracterizan por ser las células más ricas en hemo, por lo que el parásito aprovecha en obtenerlo de la hemoglobina digerida y metabolizarlo. Puede importar cerca del 80% de la hemoglobina del hospedero a su vacuola digestiva. Se sugiere que esta vacuola consiste en una vesícula destinada principalmente a la degradación de la hemoglobina, debido a que carece de fosfatasas lisosomales y glicosidasas, y tiene un pH estimado de 5.0-5.4 [10]. En ella actúan diversas proteasas aspárticas (plasmepsina I y II), cisteínicas (falcipaína) y metal-dependientes para hidrolizar el polipéptido de globina y adquirir al grupo prostético hemo [7]. De estas enzimas, se ha determinado que la plasmepsina I tiene un carácter esencial en el parásito [10].

La degradación de la hemoglobina comienza con la conversión de oxihemoglobina en metahemoglobina, junto con la producción de peróxido de hidrógeno. Posteriormente, la metahemoglobina es degradada y deja como subproducto a la ferri-protoporfirina IX (FePPIX, "hematina"). Los péptidos y aminoácidos que quedan de la hidrólisis son transportados al citosol, mientras que el hemo se acumula en la vacuola digestiva, pudiendo alcanzar una concentración de 0.5M [7]. El hemo debe ser regulado ya sea por acción de proteínas o algún otro mecanismo protector propio del parásito, puesto que en altas concentraciones es citotóxico y necesita ser atenuado [7,9]. Por ejemplo, puede

causar daños en las membranas, inhibir función de proteínas y enzimas importantes, y producir especies reactivas de oxígeno [7]. Algunas proteínas involucradas en la digestión de la hemoglobina son: la proteína de desintoxicación del hemo (HDP), falcipaina 2, plasmepsina II, plasmepsina IV, proteasa histoaspártica y las proteínas ricas en histidina [10].

El parásito refleja una estrategia de supervivencia, adaptando sus necesidades metabólicas y nutricionales según el hospedero y su entorno [9]. Es por ello por lo que las vías de adquisición del hemo se dan en distintos estadios y no al mismo tiempo, pero actúan complementariamente [7,9]. En el caso de la vía de biosíntesis *de novo*, tiene muy poca actividad o es inactiva durante la infección intraeritrocítica. Sin embargo, en un estudio se determinó que cuando ocurre una regulación a la baja de genes que codifican a proteínas ricas en histidina (HRP2) participantes en la digestión de la hemoglobina, sucede una regulación al alza de los genes que participan en la biosíntesis *de novo*. Por lo tanto, cuando una vía no funciona por algún problema en la expresión genética o de ausencia de genes, la otra vía proporciona el hemo al parásito [11].

III. Rol de la HRP2 en el metabolismo de la hemoglobina

Proteínas ricas en histidina 2 y 3

Durante el ciclo intraeritrocitario, *P. falciparum* libera 3 proteínas con alto contenido de histidina: proteínas ricas en histidina 1, 2 y 3 (HRP1, HRP2 y HRP3) [12]. Los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, que codifican a las HRP2 y HRP3, se encuentran en regiones subteloméricas de los cromosomas 8 y 13, respectivamente. Cada uno contiene dos exones y dos intrones. Las secuencias principales ricas en histidina se encuentran específicamente en el exón 2. No existen secuencias equivalentes a estos genes en otras especies causantes de malaria humana, por lo que no son esenciales en la supervivencia

del parásito [13]. Tanto HRP2 como HRP3 son genéticamente homólogas, puesto que tienen en común su composición a un 90%. Es por ello por lo que se sugiere que han resultado de la duplicación y divergencia a partir de una secuencia ancestral en común; sin embargo, aún no ha sido comprobado [12].

Pueden diferir en su peso, HRP2 con 35 kDa y HRP3 con 24 kDa [14]. La HRP2 es considerada como excelente biomarcador para el diagnóstico mediante pruebas de diagnóstico rápido, ya que fue caracterizada por su alta producción en la fase infecciosa. Con respecto a HRP3, puede ser detectada por reacción cruzada y se sugiere que también atribuye al potencial diagnóstico [13].

La HRP2 se caracteriza por tener una estructura proteica primaria poco compleja; sin embargo, al interactuar con el hemo parece adoptar una estructura alfa hélice [13]. Esto sugiere una importancia de la dinámica estructural en la funcionalidad de la proteína, la cual no se conoce por completo; pero se sabe que participa en la vacuola digestiva del parásito para su detoxificación y hay evidencia *in vitro* sobre su acción al suprimir la proliferación de linfocitos B y T [7,13].

En el ciclo asexual del parásito, las proteínas HRP2 y HRP3 son relativamente expresadas en altos niveles, acumulándose aproximadamente 10fg por parásito en la membrana del eritrocito [13]. En los estadios de anillo, esta proteína se encuentra como un collar sobre el citoplasma del parásito dentro del eritrocito infectado [13]. Por otro lado, se determinó en un estudio que HRP3 (recombinante) se encuentra en una concentración de 0.244 a 1000 ng/mL [12].

Regulación antioxidante y síntesis de hemozoína

Los parásitos del género *Plasmodium* deben degradar la hemoglobina con fines nutricionales o como mecanismo de defensa ante la citotoxicidad que se presenta a nivel

celular [7,11]. Pues, cuando los monómeros del hemo están desasociados, se altera la estructura intracelular del parásito y está sometido a estrés oxidativo. Específicamente, por la liberación de ferriprotoporfirina IX tóxica (FePPIX) y peróxido de hidrógeno [15]. Por ello, existe un mecanismo no enzimático de detoxificación en *Plasmodium falciparum* que involucra la reacción entre el peróxido de hidrógeno con glutatión para acumular el hierro. Asimismo, se convierte el hemo tóxico (FePPIX) en cristales insolubles de hemozoína que se concentran en la vacuola digestiva [7,10]. También es llamado “pigmento malárico” [10] y es detectable a partir de estadios de anillo tardío [7]. En este proceso de biocristalización actúan proteínas, como la HRP2, que se encargan de iniciar y acelerarlo [15]. Se pueden encontrar a nivel del citosol como en la vacuola digestiva [14]. La secuencia rica en histidina, propia de esta proteína, tiene la capacidad de unirse a FePPIX y cataliza la formación de la β -hematina (cristal de la hemozoína) [14]. Gracias a esta estrategia de biocristalización, el parásito tiene la capacidad de evitar la toxicidad generada y continuar su ciclo de vida exitosamente. De igual manera, el complejo FePPIX-HRP2 puede tener capacidad peroxidasa [15]. Se propone en estudios que otras proteínas ricas en histidina podrían estar involucradas también en este proceso, como la HRP3 [10,14]. Además, es notorio que HRP2 no es esencial, ya que las otras especies de *Plasmodium* generan hemozoína por acción de otras proteínas a pesar de carecer de *pfhrp2* [7]. Otra proteína de la que se observó actividad inductora de cristalización *in vitro* fue la HDP, participante también de la degradación de la hemoglobina [10].

La hemozoína tiene una morfología específica y que difiere de la de otros organismos [7]. Sus cristales insolubles consisten en dímeros recíprocos de protoporfirina férrica (Fe^{3+}) [7], los cuales se unen por enlaces entre el oxígeno del carboxilato de un hemo y el ión férrico central del siguiente hemo [10]. Se hipotetiza que la biocristalización ocurre

dentro de la vacuola digestiva principalmente, pero también se propone que se lleve a cabo en balsas lipídicas propias de las vacuolas. No se conocen exactamente los mecanismos por los cuales se origina la hemozoína [10].

Existen fármacos que actúan en el metabolismo de la hemoglobina. Por ejemplo, la cloroquina está enfocada en unirse a los metabolitos tóxicos del hemo para prevenir la conversión de la hemozoína y generar toxicidad para conllevar a la muerte del parásito [11].

Deleción simple y doble de genes *pfhrp2* y *pfhrp3*

En el año 2010, se reportó por primera vez en Perú la simple y doble deleción de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en *P. falciparum* por generación de falsos negativos en las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) [2,16]. Se han registrado posteriormente en Asia y en África, generando complicaciones en el control de la malaria [13]. Este fenómeno ha sido estudiado para determinar por qué estas proteínas se están dejando de expresar y en qué beneficia o afecta al parásito, ya que se desconoce su funcionalidad [11,13].

Un estudio relevante de Yang et al. propuso investigar el efecto de la deleción simple del gen *pfhrp2* en el metabolismo de la hemoglobina de *P. falciparum*, para lo cual se interrumpió el loci donde se encuentra el gen *pfhrp2* por la herramienta CRISPR/Cas9 en parásitos *wild-type* 3D7. Se demostró según datos de secuenciamiento del transcriptoma (RNA-Seq) que los niveles de transcripción de PfHO (hemo oxigenasa) fue significativamente regulado a la baja, afectando al metabolismo del hemo. Sin embargo, los niveles de transcripción de los genes que participan en la biosíntesis *de novo* (ALAS y FC) fueron reguladas al alza; mientras que para PBGD (cataliza conversión de porfobilinógeno a hidroximetilbilano) y SPP (peptidasa de procesamiento estromal) fueron regulados a la baja. Esto significa que la vía del metabolismo de la hemoglobina

y la vía de biosíntesis *de novo* se ven afectadas en ausencia de *pfhrp2*, pero el parásito opta por activar otras enzimas de la vía o usar las del hospedero para que puedan actuar de forma cooperativa para la supervivencia del parásito [11].

Se sabe que *pfhrp2* y *pfhrp3* no son esenciales para el crecimiento de *P. falciparum*; sin embargo, se ha observado en un estudio el efecto en el fitness del parásito cuando estos genes son deletados de forma simple (individual) y conjunta por CRISPR/Cas9 [17]. Para la medición del fitness se utilizó un método de experimentos de competición directa con cultivos asexuales del parásito. Llegaron a la conclusión de que la delección simple de *pfhrp2* conllevó a un mayor costo en el fitness. Asimismo, la delección simple de *pfhrp3* también contribuía significativamente. Los parásitos con doble delección disminuyeron en un 10% cada 48 horas de ciclo asexual, indicando un crecimiento lento y un costo de fitness de 0.1 [17]. El estudio sugiere que probablemente se deba a la alteración del metabolismo y que se requiere de la complementación con nuevos estudios acerca de la funcionalidad de las proteínas HRP2 y HRP3. Por lo tanto, estos efectos solo se observan en el ciclo asexual del parásito, por lo que no se impacta su fitness en su ciclo sexual o exo-eritrocítico [17].

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Plasmodium falciparum es el agente responsable del cuadro severo de la malaria, que puede conllevar a la muerte en 24 horas [1]. Es por ello por lo que se requiere de investigación acerca de sus mecanismos biológicos y bioquímicos para la comprensión de la infección eritrocitaria y el desarrollo de estrategias terapéuticas. Sin embargo, este tipo de estudios son limitados.

La adquisición y metabolismo del hemo son necesarios para el desarrollo y supervivencia del parásito, pero se conoce poco sobre la funcionalidad de las proteínas y enzimas involucradas. HRP2 es una de las más estudiadas, ya que es la que se produce en altas cantidades durante la infección y es usada para el diagnóstico de *P. falciparum* [13]. En el estudio de Yang et al., se demostró que el metabolismo del hemo se ve influenciado a nivel transcripcional cuando el gen *pfhrp2* es interrumpido [11]. Sin embargo, no se ha comprobado el mismo efecto con HRP3, dada la posibilidad por su homología con HRP2. Esto podría ayudar a determinar si HRP3 también tiene un rol en la detoxificación del parásito y ver si tiene un efecto similar o distinto que HRP2. Por otro lado, en un reciente estudio se ha registrado un alto costo de fitness de *P. falciparum* en estadios asexuales con la doble y simple delección de *pfhrp2* y *pfhrp3* [17], pero no se asocia a que se deba por el impacto metabólico que podría estar sucediendo en la síntesis de hemozoina y que genera una citotoxicidad en el parásito que no le permita desarrollarse ni multiplicarse. Además, la edición genética de estos dos estudios tiene sus limitaciones, ya que el proceso experimental es complejo, no refleja la naturaleza del parásito y pueden verse involucradas secuencias que participen en la vía metabólica. Además, no se sabe si los efectos reportados en esta vía puedan ocurrir de la misma forma que en las cepas naturales del parásito que presentan delección simple de *pfhrp2* o *pfhrp3* y delección doble de *pfhrp2* y *pfhrp3*.

En este contexto, considerando estos antecedentes de la similitud estructural de las HRP2 y HRP3, y dado que el poco conocimiento registrado acerca de HRP3 son limitados y atribuidos a HRP2, se plantea responder la pregunta sobre si HRP3 tiene la misma función que HRP2 en la síntesis de hemozoína de *P. falciparum*. De manera complementaria, si esta hipótesis es comprobada, se propone verificar si la razón por la que el aumento de costo de fitness en cepas con doble deleción de genes *pfhrp2* y *pfhrp3* sea por una reducción de síntesis de hemozoína al no estar presentes estas proteínas y que, por lo tanto, puede estar relacionado a la reducción de la parasitemia.

Es importante la comprensión de las proteínas involucradas en el metabolismo del hemo y determinar cómo se desarrolla ante distintos entornos. Además, comprobar que HRP3 tiene la misma funcionalidad que HRP2 puede ayudar a entender su rol biológico y sus propiedades. De esta manera, complementa la explicación acerca de la ocurrencia natural de la deleción simple de *pfhrp3* en el parásito y su aumento en frecuencia en algunos países. Además, conlleva a determinar que existen otras vías involucradas en la protección del parásito ante el procesamiento de la hemoglobina. Ello promueve la generación de nuevos conocimientos acerca de estas vías de biosíntesis y metabolismo del hemo para el desarrollo de estrategias y nuevas vías de acción de fármacos.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

En primer lugar, la estrategia que se abordará para este proyecto consistirá en realizar cultivos de cepas de *P. falciparum* aisladas de pacientes provenientes de Loreto, las cuales serán cepas sin delección, con delección simple de *pfhrp2*, delección simple de *pfhrp3* y con doble delección de *pfhrp2* y *pfhrp3*. Estas provienen de muestras del laboratorio usadas en un estudio en el que han sido diagnosticadas por qPCR y caracterizadas a través de secuenciamiento del genoma completo por microsatélites [18]. Los resultados provistos de este estudio permitirán verificar que los parásitos sean clonales y no se diversifiquen genéticamente en la expresión de sus genes. Se presume que las mutaciones en bloque no expliquen cambios en el fitness debido a que no se ha encontrado desequilibrio de ligamiento en estas cepas [18]. Este sería un procedimiento diferente que permitirá obtener resultados con mayor certeza. Los cultivos deben ser sincronizados para que se encuentren en el mismo estadio de trofozoíto maduro y la parasitemia debe ser homogénea (medida por microscopía, parásitos/ μ L). Con estos cultivos, se llevan a cabo los siguientes procedimientos:

1. Estandarización de concentración de proteínas HRP2 y HRP3 de *P. falciparum*. Se aíslan las proteínas HRP2 y HRP3 a partir del cultivo de cepas sin delección por método de purificación con anticuerpos. Para la verificación, se realiza una electroforesis. De ser necesario, aplicar un método de concentración y purificación de las proteínas. La cuantificación se puede realizar con ELISA (con anticuerpos comerciales de HRP2) o mediante fluorometría, y es de forma independiente para cada proteína.
2. Análisis de afinidad de proteínas HRP2 y HRP3 con FePPIX. Se ha comprobado *in vitro* la afinidad entre HRP2-FePPIX; sin embargo, esta era recombinante [19]. Por lo que se propone que con las proteínas aisladas y concentradas se analice la afinidad *in vitro*

con FePPIX. Se podrá verificar con la formación de β -hematina visualizada con espectroscopia. Esta prueba confirma que HRP3 también participa en la conversión de hemozoína.

3. Estandarización y medición de concentración de hemozoína presente en cepas sin delección y en parásitos con delección simple y doble de *pfhrp2/3*. A partir de todos los cultivos, se extrae la hemozoína a través de un centrifugado y uso de columnas que contienen esferas magnéticas. Se realiza una serie de lavados para la purificación. Finalmente, la cuantificación de la hemozoína se mide por espectrofotometría, según la absorción de la longitud de onda que se lee a 405nm. Se construye una curva de calibración [20]. Se espera que la concentración de hemozoína cambie o se vea disminuida con la delección de *pfhrp3*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

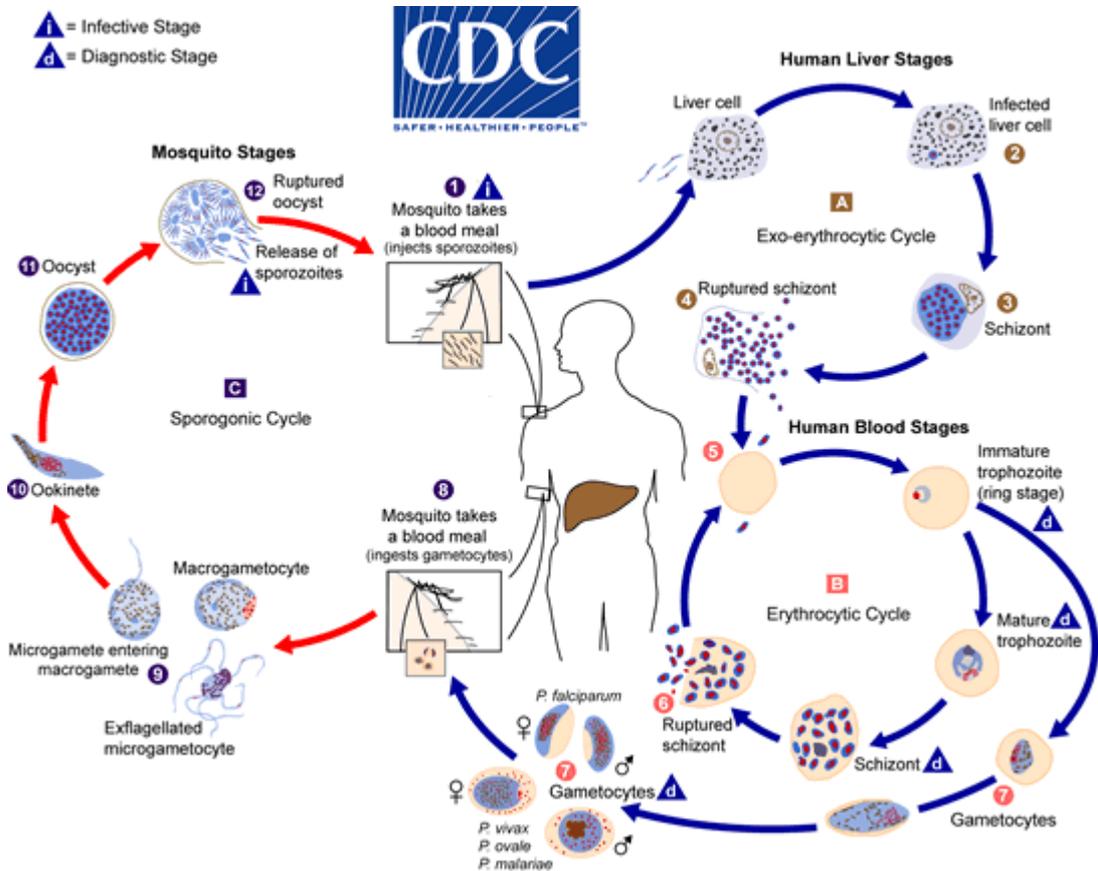
1. World Health Organization. World malaria report 2022. Ginebra, Suiza: World Health Organization; 2022.
2. Valdivia HO, Anderson K, Smith D, Pasay C, Salas CJ, Braga G, et al. Spatiotemporal dynamics of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3 deletions in Peru. *Sci Rep.* 2022;12(1):19845. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-23881-8>
3. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* 2017;16(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>
4. Spencer L, Gómez A, Collovini E. Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium*. *Bionatura.* 2016;1(2). Disponible en: <https://dx.doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.9>
5. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today.* 2000;16(10):427–33. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01755-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01755-5)
6. CDC-Centers for Disease Control, Prevention. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. 2009. Disponible en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
7. Sigala PA, Goldberg DE. The peculiarities and paradoxes of *Plasmodium* heme metabolism. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:259–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103537>

8. Goldberg DE, Sigala PA. *Plasmodium* heme biosynthesis: To be or not to be essential?. PLS Pathogens.2017;13(9). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006511>
9. Sigala PA, Crowley J, Henderson J, Goldberg DE. Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. eLife. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.09143>
10. Coronado L, Nadovich C, Spadafora C. Malarial Hemozoin: From target to tool. Biochim Biophys Acta. 2014; 1840(6): 2032–2041. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.009>
11. Yang Y, Tang T, Feng B, Li S, Hou N, Ma X, et al. Disruption of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 may affect haem metabolism in the blood stage. Parasit Vectors. 2020;13(1):611. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-04460-0>
12. Poti KE, Sullivan DJ, Dondorp AM, Woodrow CJ. HRP2: Transforming malaria diagnosis, but with caveats. Trends Parasitol. 2020;36(2):112–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.004>
13. Palani B. Quantification of Histidine-Rick Protein 3 of *Plasmodium falciparum*. Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy. 2018;37(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1089/mab.2017.0068>
14. Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M, Tilley L. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. Molecular & Biochemical Parasitology. 2001;115:77-86. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00271-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00271-7)

15. Mashima R, Tilley L, Siomos M-A, Papalexis V, Raftery MJ, Stocker R. Plasmodium falciparum histidine-rich protein-2 (PfHRP2) modulates the redox activity of ferri-protoporphyrin IX (FePPIX): peroxidase-like activity of the PfHRP2-FePPIX complex: PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY OF THE PfHRP2-FePPIX COMPLEX. J Biol Chem. 2002;277(17):14514–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109386200>
16. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, Sanchez L, Cnops L, Gillet P, et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of pfrp2 gene deletions and cross-reactions. PLoS One. 2012;7(8):e43094. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043094>
17. Nair S, Li X, Nkhoma SC, Anderson T. Fitness costs of pfrp2 and pfrp3 deletions underlying diagnostic evasion in malaria parasites. bioRxiv. 2022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/2022.02.11.480127>
18. Figueroa E. Identificación de huellas de selección en *Plasmodium falciparum* de la Amazonía Peruana [Tesis de Maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2023. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/13593/Identificacion_FigueroaIldfonso_Erick.pdf?sequence=1
19. Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Goldberg DE. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. Science. 1996;271(5246):219–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.271.5246.219>
20. Neyra V. & Carrera C. P.O.E. Extracción, Purificación y Cuantificación de Hemozoína de *Plasmodium falciparum*. IMTAvH-UPCH. 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Esquema del ciclo biológico de *Plasmodium* spp.



Anexo 2. Esquema de la vía de biosíntesis *de novo* del hemo en *Plasmodium falciparum*.

