



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EXPRESIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS: RETICULOCYTE-BINDING
HOMOLOGUE-2B (RH2B), ERYTHROCYTE
BINDING ANTIGEN 175 (EBA175) Y
MEROZOITE SURFACE PROTEIN 10
(MSP10) DE *Plasmodium falciparum* COMO
MARCADORES SEROLÓGICOS PARA
MALARIA EN LA REGIÓN AMAZÓNICA
PERUANA.**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Jorge Eduardo Bendezú Eguis

Lima-Perú

2017

Asesora

Dionicia Gamboa Vilela. PhD

Dedicatoria:

Dedico el presente trabajo a mi familia y amigos del laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, así como a los pacientes y donantes que aceptaron contribuir en los diferentes proyectos de investigación del laboratorio de malaria. También de una forma especial para Sandra Morales Ruiz por su enorme paciencia y apoyo durante todos estos años de trabajo.

Agradecimientos:

Agradezco a todo el grupo Malaria (Beronica Infante, Katherine Garro y Oscar Nolasco) por su apoyo en el desarrollo del presente trabajo y aportes críticos. Agradezco de forma especial a la Dra. Dionicia Gamboa por su guía y apoyo, de la misma forma a MSc. Elizabeth Villasis por contribuir al presente trabajo con los ensayos de cultivos parasitarios y ensayos con los anticuerpos e inhibición de la invasión los cuales formaron parte de sus trabajos de maestría.

Agradezco a la empresa FARVET SAC (Farmacológicos veterinarios SAC) por permitirme completar actividades de este proyecto en sus instalaciones, así como al Dr. Manolo Fernández Díaz por su guía y consejos.

Fuentes de financiamiento:

El presente trabajo de investigación fue financiado gracias al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato 178-FINCyT-IB-2013.

Tabla de contenidos

Capítulo 1	pp 1
Introducción	
Planteamiento de la Investigación	
Planteamiento del Problema	
Marco Teórico	
Justificación del estudio	
Objetivos	
 Capítulo 2	
Búsqueda bibliográfica de potenciales antígenos seroreactivos y su importancia en la baja transmisión de la malaria <i>falciparum</i> en el Perú.	
	23
 Capítulo 3	
Clonación y expresión de las proteínas: Merozoite surface protein 10, reticulocyte-binding homologue-2b y Erythrocyte binding antigen 175 de <i>Plasmodium falciparum</i> utilizando el sistema de expresión de células de insecto – Sf9.	
	42
 Capítulo 4	
Selección de péptidos para producción de anticuerpos que permitan la identificación de proteínas noveles de interés local: Aplicaciones en agentes infecciosos.	
	78
 Capítulo 5	
Alta sero-reactividad de la proteína PfMSP10 de <i>Plasmodium falciparum</i> en sueros de individuos infectados con malaria en la amazonia peruana.	
	119

Capítulo 6

140

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anexos

Experimentos suplementarios y secuencias:

Capítulo 3 155

Capítulo 4 167

Capítulo 5 199

RESUMEN

En la región Amazónica Peruana se viene demostrando la existencia de individuos asintomáticos infectados con parásitos *Plasmodium falciparum*, además de la presencia de parásitos que carecen del gen *pfhrp2* que codifica a la proteína que es utilizada para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido. Por lo que la búsqueda de nuevas herramientas para el control de la malaria ocasionada por *P.falciparum* es de suma importancia, dentro de este contexto la búsqueda de marcadores serológicos plantean una alternativa atractiva para regiones como la amazonia peruana. Para esto se identificaron y expresaron 3 proteínas de *P.falciparum* (PFRH2B (región única), PFEBA175 (RIII-IV) y PFMSP10 (completa)) de forma recombinante en células de insecto. De todas las proteínas expresadas, rMSP10 presentó una mayor reactividad frente a sueros de individuos infectados con *P. falciparum* frente aquellos infectados con *P. vivax*. Además, mediante el uso de programas bioinformáticos se seleccionaron 9 péptidos de los cuales 2 (MSP10-1 y MSP10-2) presentaron reactividad en sueros de individuos infectados. Estos resultados nos indicaría el potencial uso de PFMSP10 como marcador serológico para la identificación de infecciones, medición de la exposición e identificación de zonas de transmisión que permitan contribuir a los programas de control de la malaria *falciparum* en la región Amazónica.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, marcador serológico, PFRH2B, PFEBA175, PFMSP10, péptidos, Amazonía peruana.

ABSTRACT

In the Peruvian Amazon region the presence of asymptomatic individuals infected with *Plasmodium falciparum* parasites has been demonstrated, in addition to the presence of parasites that lack the *pfhrp2* gene that codes for the protein that is used for rapid diagnostic tests. Therefore, the search for new tools for the malaria control is an important issue for regional control programs. In this context, the use of serological markers presents an attractive alternative for regions such as the Peruvian Amazon. For this, three *P.falciparum* proteins (PFRH2B (unique region), PFEBA175 (RIII-IV) and PFMSP10 (complete protein) were expressed in insect cells (Sf9). Of all the expressed proteins, rMSP10 showed a higher reactivity against sera from *P.falciparum* infected individuals than those infected with *P. vivax*. In addition, nine peptides were selected using bioinformatics software, of which two (MSP10-1 and MSP10-2) showed reactivity in sera from infected individuals. These results would indicate the potential use of PFMSP10 as a serological marker for the identification of infections, exposure measurement and identification of transmission zones that would contribute to the control programs of malaria *falciparum* in Amazon region.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, serological marker, PFRH2B, PFEBA175, PFMSP10, péptides, Peruvian Amazon región.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
GR	Glóbulos rojos.
GRI	Glóbulos rojos infectado.
GRI _s	Glóbulos rojos infectados.
PDR	Prueba de diagnóstico rápido para malaria.
PfHRP2	Gen de Proteína rica en histidina II de <i>P.falciparum</i> .
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PfRh2b	<i>P. falciparum</i> reticulocyte-binding homologue-2b.
PfEBA175	Erythrocyte binding antigen 175.
PfMSP10	Merozoite surface protein 10.
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
INA	Inmunidad natural adquirida.
NCBI	Base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
3D7	Cepa estándar de <i>P.falciparum</i> .
EGF	Epidermal growth factor.
MSP	Proteína de superficie del estadio merozoito de <i>P.falciparum</i> .
LB	Luria Broth.
SOC	Medio para transformación bacteriana.
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> .
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
Bluo-gal	halogenated indolyl-galactoside.
BSA	Albumina serica bovina.
DAB	3,3'-diaminobenzidine
iMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography.
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
MOI	Multiplicidad de infección.
TOI	Tiempo de infección.
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.
HRP	Peroxidasa de rábano
ng	Nanogramos.
rMSP10	Forma recombinante de PfMSP10.
rRh2b	Forma recombinante de PfRh2b.
rEBA175	Forma recombinante de PfEBA175.
SDS -PAGE	Electroforesis en gel de policrilamida.
OD	Densidad óptica a 450nm.
Pool+	Mezcla de sueros de pacientes infectados con parásitos <i>P.falciparum</i> .
Pool-	Mezcla de sueros de donantes sanos.
BLANK	Blanco de placa de ELISA.
mAb	Anticuerpo monoclonal.
pAb	Anticuerpo policlonal.
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
PBS	Buffer fosfato salino.
100g	100 gravedades.
cut-off	Punto de corte para estimar seroreactividad.
FASTA	Formato de secuencias de nucleótidos o aminoácidos.
MPT	Modificaciones postraduccionales.
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindo.
RII	Denota región II.
Sym	Individuo sintomático para malaria falciparum.
Asy	Individuo asintomático para malaria falciparum.
PFMSP10-1	Denota el péptido 1 para la proteína MSP10.
RH2B-1	Denota el péptido 1 para la proteína RH2B.
EBA175-1	Denota el péptido 1 para la proteína EBA175.
PvMSP1	Proteína MSP1 de <i>P.vivax</i> .

Lista de Figuras

Capítulo 1:

Figura 1.1- Países con transmisión activa de paludismo entre los años 2000 y 2015. Tomado de Reporte mundial de malaria – OMS.

Figura 1.2- Mapa de incidencia de malaria por distritos Perú 2015. (A) Casos de infecciones con *P. vivax*. (B) Casos de infecciones con *P. falciparum*. Tomado del Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología del MINSA.

Figura 1.3.-Ciclo de vida de *Plasmodium spp.* Figura tomada y modificada de Griffith et al.

Figura 1.4. Moléculas del hospedero que interactúan con la proteína PfEMP1 del glóbulo rojo infectado. Figura tomada de Penman *et al.*

Figura 1.5.- Formación de roseta y cito adherencia en los capilares sanguíneos. Tomado y modificado de Chen *et al.*

Figura 1.6.- El resultado clínico de las infecciones con *P.falciparum* en África depende de múltiples factores, los cuales incluyen al parásito, el hospedero, aspectos geográficos y sociales. La convergencia de estos factores permite resultados clínicos que van desde infección asintomática hasta la complicación de la enfermedad y la muerte. Tomado y adaptado de Miller et al.

Figura 1.7. Heterogeneidad de los reservorios asintomáticos en zonas de alta transmisión y zonas de baja transmisión. Figura tomada de Torres 2015.

Figura 1.8.- Variación de los títulos de anticuerpos generados contra los marcadores serológicos según estos sean utilizados (infección, exposición y protección) en el tiempo (meses). Figura tomada y modificada de King *et al.*

Figura 1.9.- Izquierda. Descripción esquemática de la producción de vacunas utilizando el sistema de expresión en células de insecto. Figura tomado de Mena et al. Derecha. Literatura buscada en base de datos científicas en donde se empleó el sistema de expresión de células de insecto. Los años de invención de la tecnología (1983), el inicio de la comercialización de la primera vacuna animal con esta tecnología (1999), la primera vacuna humana (2007) y su primer uso como vector de terapia génica (2007) son indicadas por las flechas. Figura tomada de Van oers *et al.*

Figura 1.10.- Contribución de factores parasitarios y del hospedero en la problemática existente en la Región Amazónica para los programas de control de malaria.

Capítulo 2:

Ninguna.

Capítulo 3:

Figura 3.1.- Esquema del vector pFastBacTM Dual modificado con las inserciones de los genes pfmsp10 nativo y codon optimizado. His: Cola de histidina; SV40: terminador SV40 de poli-adenilización. HindIII/BamHI y EcorI: Son los sitios de restricción en donde se insertaron los genes.

Figura 3.2.- Análisis de la proteína PfMSP10 utilizando TMHMM v. 2.0 server para identificar las regiones trans-membrana y péptido señal en los 525 aa de la proteína. Las predicciones están en líneas rojas: 1 – 26 aa (1 – 78 nt) y 507-525 aa (1,519-1,575bp). El servidor está disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

Figura 3.3.- Gen *pfmsp10* codón optimizado (79 – 1518 nucleótidos). Letras subrayadas representan los nucleótidos que codificaran la cola de histidinas.

Figura 3.4.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa la liberación del inserto de 1,440 pb aprox. En el carril 1: vector pFastBacTMDual con el gen nativo *pfmsp10* sin digerir y el carril 2: el mismo vector digerido con EcorI y HindIII. Carril 3: vector pFastBacTMDual con el gen optimizado *pfmsp10* sin digerir y en el carril 4: el mismo vector digerido con BamHI y HindIII. Carril 5: marcador DNA fago lambda/HindIII (pb).

Figura 3.5.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa los productos de PCR utilizando primers para *pfmsp10* y el ADN extraído de los sobrenadantes de cultivos Sf9 (baculovirus recombinantes). Carril 1 y 2: baculovirus obtenido con el vector que contiene el gen nativo de *pfmsp10*; carril 3 y 4: baculovirus obtenido con el vector que contiene el gen nativo de *pfmsp10* optimizado. Marcador de 1Kb.

Figura 3.6.- Membrana de nitrocelulosa de WB utilizando anti-6his. Carril 1: Lisado celular Sf9 a partir de baculovirus con el gen *pfmsp10* optimizado; carril 2: Lisado celular Sf9 con el gen *pfmsp10* nativo; carril 3: Marcador de peso molecular para proteínas (KDa). La flecha negra indica rMSP10 (56kDa).

Figura 3.7.- Membrana de nitrocelulosa de WB utilizando anti-6his. Eluídos obtenidos del proceso de purificación con Imidazol: Carril 1: 50 mM; carril 2: 150 mM; carril 3: 200 mM; carril 4: 250 mM; carril 5: Lisado células Sf9 sin infectar, carril 6: Lisado celular Sf9 a partir de baculovirus con el gen *pfmsp10* optimizado; carril 7-9: Lavados de la columna.

Figura 3.8.- SDS-PAGE de los eluídos obtenidos de la purificación empleando columnas de IMAC. Carril M: marcador de proteínas; carril 1: Flow trough; carril 2 – 6: eluidos; carril 7: lavado; carril 8: lisado original; carril 9: lisado de células sanas Sf9.

Figura 3.9.- Liberación del inserto rRh2b del plásmido pFastBacdual. Digestión realizada con las enzimas BamHI y MefI. Carril M: Marcador de peso molecular lambda/HindIII; carril 1: plásmido digerido y con el inserto liberado de 1400 pb aproximadamente (indicado por la flecha azul); carril 2: Plásmido recombinante sin digerir.

Figura 3.10.- A. Cromatogramas obtenidos de la reacción de secuenciamiento del plásmido pfastbacdual que contiene rRh2b. Los marcos negros indican la secuencia del promotor de polihedrina del vector de expresión pFastBacdual; marcos rojos indican la secuencia correspondiente a la cola 6-his; marcos azules indican el inicio de la secuencia del gen rh2b (Glu2701), las secuencias en fondo negro indican ATG o codón de inicio (vistas del programa Sequencher). B. Secuencias colocadas en el programa Snapgene para verificar el marco de lectura después del codón de inicio ATG.

Figura 3.11.- Ensayo de PCR realizado a P0 y P1 obtenidos tras la transfección de células Sf9 con el plásmido conteniendo rRh2b. Carril 1: PCR con ADN genómico extraído de P0; carril 2: PCR con ADN genómico extraído de P1; carril 3: pFastBacdual™ con el gen *pfmrh2b*. M: Marcador de peso molecular lambda/HindIII. La flecha indica el peso molecular de 1400 pb aproximadamente.

Figura 3.12.- Membrana de Western Blot utilizando anti-his. M: marcador de peso molecular. Carril 1: Control proteína his; carril 2: Células Sf9 sin infección; carril 3: Células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante rRh2b. La flecha indica la banda de proteína reactiva con anticuerpos anti-his.

Figura 3.13.- Panel de análisis de la expresión de rRh2b mediante anti-his – FITC. A.- Identificación de células viables en un cultivo Sf9 sin infección viral; B.- Población de células Sf9 marcadas con anti-his – FITC en células sin infección viral; C: Identificación de células viables en un cultivo Sf9 infectadas con baculovirus rRh2b; D: Población de células sf9 marcadas con anti-his – FITC en células infectadas con baculovirus rRh2b. El recuadro con líneas punteadas en rojo muestra la población de células Sf9 marcadas.

Figura 3.14.- A. Cromatograma de elución de purificación de rRh2b. Data obtenida de LP biological Systems. La flecha negra indica la concentración de imidazol (45-60%) a la cual se dio la elución de rRh2b. El eje “y” indica la absorbancia a 280nm (trazos azules) y el eje x indica tiempo en minutos. B. SDS-PAGE de los eluidos obtenidos de la purificación empleando columnas de IMAC. Carril M: marcador de proteínas. Carril 1-6: eluidos; carril 7: lavado; carril 8: lisado original.

Figura 3.15.- Secuencia de Rh2b presentando las modificaciones pos-traduccionales. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina. “G” indica una modificación de azúcar.

Capítulo 4:

Figura 4.1.- Esquema de selección de péptidos seguido en el presente estudio.

Figura 4.2.- Alineamiento de secuencias de Fibra -1 de 2 especies de fowl adenovirus aviar (8 y 11) y la Fibra -2 de FAdV-4. Flecha con relleno punteado presenta el motivo “VYPY” involucrado en la interacción con la proteína penton viral de los adenovirus. Flecha con líneas verticales indican la región “linker” (Gs) entre la cola y el tallo de la proteína fibra. Flecha con cuadrícula indica el motivo de inicio del tallo de la proteína. Flecha con líneas horizontales indican el final del tallo. Las letras en cursiva y subrayadas son los péptidos seleccionados.

Figura 4.3.- Se muestra las regiones de las secuencias de PFMS10 en base a la información tomada de Black *et al* 2003 y Pacheco *et al* 2012. En los recuadros se encuentran el péptido señal, la secuencia repetitiva, dominios EGF -like y GPI. En letras subrayadas y cursivas se encuentran los péptidos seleccionados. En negrita, la zona predicha por Black *et al* 2003 para la clivación de la proteína P_fPFMS10.

Figura 4.4.- Resultados de servidor TMHMM v. 2.0. Izquierda: Fibra -2; Derecha: PFMS10.

Figura 4.5.- Predicción de estructuras secundarias para la Fibra-2 (Arriba) y para la MSP10 (Abajo). Ambas secuencias proteicas fueron analizadas en el servidor CFSSP, en donde se muestra la potencial estructura secundaria.

Figura 4.6.- Resultados de grado de desorden de Fibra-2. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de fibra-2 y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.

Figura 4.7.- Resultados de grado de desorden de PFMSp10. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de PFMSp10 y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.

Figura 4.8.- Secuencia de fibra-2 presentando las modificaciones. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina y “G” indica un modificación de azúcar.

Figura 4.9.- Secuencia de PFMSp10 presentando las modificaciones. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina; “G” indica un modificación de azúcar y I indica el sitio de modificación para GPI.

Figura 4.10.- Ensayos de Western blot. Izquierdo: Reactividad de los anticuerpos (Fib2-1; Fib2-2 y Fib2-3 preparados 1:600) frente a la proteína recombinante de fibra 2 (donada por el Dr. Vikram Vakaria); carril 1: Proteína recombinante; 2: IgG de conejo; carril 3 células LMH de pollo. L: Marcador molecular de proteínas. Derecho: Reactividad de los anticuerpos frente a virus de hepatitis purificado. Carril A: Anticuerpos 1: 50; carril B: Anticuerpos 1: 500; carril C anticuerpos 1: 5000.

Figura 4.11.- Se muestra la reactividad de los anticuerpos producidos contra PFMSp10, utilizando los péptidos seleccionados. Se lisaron glóbulos rojos infectados con *P.falciparum* (cepa 3D7) en el estadio conocido como esquizonte. PFMSp10-1 (NMNNEKNDNKDNKD); PFMSp10-2 (ERKNQKAPPGEHKP) y PFMSp10 – 3 (RRTLLKESRDIKNT). NEG: Lisado de glóbulos rojos de donante. POS: Suero policlonal de conejo contra proteína recombinante para PFMSp10 (Brindada por Dr. Joseph Vinetz).

Figura 4.12.- Ensayos de IFI utilizando smears de cultivos de *P.falciparum* 3D7 en estadio esquizonte. A. Suero Policlonal anti-PfMSp10 (Donado por el Dr. Joseph Vinetz); B. PFMSp10-1 (NMNNEKNDNKDNKD); C. PFMSp10-2 (ERKNQKAPPGEHKP) y D. PFMSp10 – 3 (RRTLLKESRDIKNT). Control Negativo: Glóbulos rojos humanos de donante. DAPI: Marcador de núcleo.

Figura 4.13.- Alineamiento del péptido KRRHSENGKPEEA con los otros péptidos considerados como mejor *rankeados* (1-6) según el programa AbDesigner. Cuadros amarillos representan los aminoácidos alineados; cuadros plomos representan los aminoácidos diferentes. Cuadros blancos indican los aminoácidos implicados en este alineamiento.

Capítulo 5:

Figura 5.1.- Niveles de IgG Total de los grupos Sintomáticos (Pfal Sym) y Asintomáticos (Pfal Asy) para *P.falciparum* y el grupo de *P.vivax* frente a los péptidos PfMSp10-1 (A), PfMSp10-2 (B) y 1+2 (C). La línea horizontal punteada indica el cut-off calculado. La barra horizontal al centro de cada grupo indica la mediana del mismo.

Figura 5.2.- Niveles de IgG Total de los grupos Sintomáticos (Pfal Sym) y Asintomáticos (Pfal Asy) para *P.falciparum* y el grupo de *P.vivax* frente a la rMSp10 (A) y PvMSp1 (B). La línea horizontal punteada indica el cut-off calculado. La barra horizontal al centro de cada grupo indica la mediana del mismo.

Figura 5.3.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PfMSp10 y PvMSp10. Se muestran las regiones de las secuencias de PfMSp10 en base a la información tomada de Black *et al* y Pacheco *et al*. En

cuadros se encuentran el péptido señal, la secuencia repetitiva, dominios EGF –like y GPI. En letras subrayadas y cursivas se encuentran los péptidos seleccionados. En negrita al zona predicha por Black *et al* para el clivaje de la proteína PfMSP10 que da origen a un proteína de 36kDa.

Figura 5.4.- Ensayos de reacción cruzada de rMSP10 frente a sueros de individuos infectados con patógenos no-Plasmodium spp y suero de individuos endémicos. Niveles totales de IgG de individuos sintomáticos (Pfal Sym) y asintomáticos (Pfal Asym) infectados con *P.falciparum*. HDend: Suero de individuo sano endémico para Malaria; Tx: Toxoplasmosis; Ls: Leishmaniasis; Lp: Leptospirosis; Nc: Neurocisticercocys and Dn: Dengue. La línea horizontal punteada indica el cut-off. La línea horizontal ubicada en cada grupo representa la mediana.

Figura 5.5.- Reactividad de los péptidos PfMSP10-1, PFMSP10-2 y PfMSP10-3 frente a sueros de pacientes infectados con otros patógenos. Tx:Toxoplasmosis; Ls:Leishmaniasis; Lp:Letospirosis; Nc: Neurocisticercosis and Dn: Dengue. Las líneas punteadas horizontales representan el cut-off del ensayo. Las líneas horizontales de cada grupo representan la media de los datos.

Figura 5.6.- Reactividad de los péptidos PfMSP10-1, PFMSP10-2 y PfMSP10-3 frente a sueros de pacientes de zona endémica (HDend) y no endémica para malaria (HDn). La línea punteada horizontal representa el cut-off del ensayo. Las líneas horizontales de cada grupo representan la media de los datos.

Figura 5.7. Resultados de análisis de BLASTp empleando la secuencias de aminoácidos de PfMSP10 contra las secuencias proteicas de *Leishmania* (taxid:5658) y *Leptospira* (taxid:37387). Evaluado en Marzo del año 2019.

Capítulo 6:

Figura 6.1.- Modelo teórico para la búsqueda y evaluación de marcadores serológicos contra las proteínas de los parásitos *P.falciparum* en la amazonia peruana. Las líneas continuas unen los conceptos obtenidos en base a las evidencias presentadas en esta tesis y las líneas discontinuas en base a otros estudios realizados en la región amazónica. En negrita se encuentran los conceptos manejados sobre *P.falciparum* en la amazonia peruana de esta tesis.

Lista de Tablas

Capítulo 1:

Ninguna.

Capítulo 2:

Tabla 2.1.- Antígenos seroreactivos reportados e identificados para malaria *falciparum* en el Perú.

Capítulo 3:

Tabla 3.1.- Cuantificación de rMSP10 utilizando un kit de ELISA para la detección de proteínas marcadas con histidinas.

Tabla 3.2.- Purificación de rMSP10 utilizando la columna de iMAC.

Tabla 3.3.- Se presenta los resultados de ELISA a diferentes concentraciones de rMSP10 utilizado como antígeno frente a sueros de pacientes con malaria y donantes sanos.

Tabla 3.4.- *Codon usage* en donde se presentan los diez codones de *P.falciparum* más raros relativos a Sf9.

Tabla 3.5.- Cuantificación de rRh2b recombinante.

Tabla 3.6.- Purificación de rRh2b usando columnas IMAC.

Tabla 3.7.- Resultados de la reactividad (Ratio) de los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y rRh2b.

Capítulo 4:

Tabla 4.1.- Valores *ig-score* para las zonas NH2, COOH y región media de las proteínas fibra-2 y PFMSp10.

Tabla 4.2.- Resultados de análisis Optimum Antigen™ y AbDesigner™ para Fibra-2 y PFMSp10

Tabla 4.3.- Porcentajes de residuos en estructuras hélix, strand, turn y coil según el servidor CFSSP. Además se presenta los aminoácidos en zonas de desorden según el servidor GlobPlot 2. Los valores son relaciones entre el número de aminoácidos con la característica entre la cantidad de aminoácidos de cada péptido.

Tabla 4.4.- Resultados de alineamientos de los péptidos de Fibra-2 y proteínas de la familia adenoviridae, de *Gallus gallus* y *Oryctolagus cuniculus*.

Tabla 4.5.- Resultados de alineamientos de los péptidos de PFMSp10 y proteínas de *Plasmodium falciparum*, de *Homo sapiens* y *Oryctolagus cuniculus*.

Tabla 4.6.- Características químicas de los péptidos seleccionados.

Capítulo 5:

Tabla 5.1.- Sero-reactividad en individuos sintomáticos y asintomáticos con malaria en a los antígenos y péptidos recombinantes.

Tabla 5.2.- Número de sueros positivos a los diferentes antígenos, agrupados según su sero-reactividad y su relación con la infección a *P.falciparum* y *P.vivax*.

Capítulo 6:

Ninguna.

CAPITULO 1

GENERALIDADES Y DISEÑO DE LA TESIS

1.1.- INTRODUCCIÓN

1.1.1.-Generalidades:

La enfermedad de la malaria es causada por el parásito del género *Plasmodium spp* y es transmitida a los humanos por cerca de 30 diferentes especies de mosquitos del género *Anopheles spp*. Se encuentran referencias de esta enfermedad a partir del año 2,700 A.C en regiones de China y ha sido reconocida como una verdadera plaga para la humanidad que persiste como un serio problema de salud pública a nivel mundial (1). La infección por malaria ocurre en más de 96 países en todo el mundo y cerca de 3.2 mil millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla (Figura 1.1). La infección por el parásito del género *Plasmodium* ocasiona que en África muera un niño cada 2 minutos. De las cinco especies de *Plasmodium spp* que afectan al hombre, dos son las de mayor mortalidad y morbilidad: *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* respectivamente. Estas dos especies tienen una transmisión activa en 21 países de América Latina y el caribe (2).

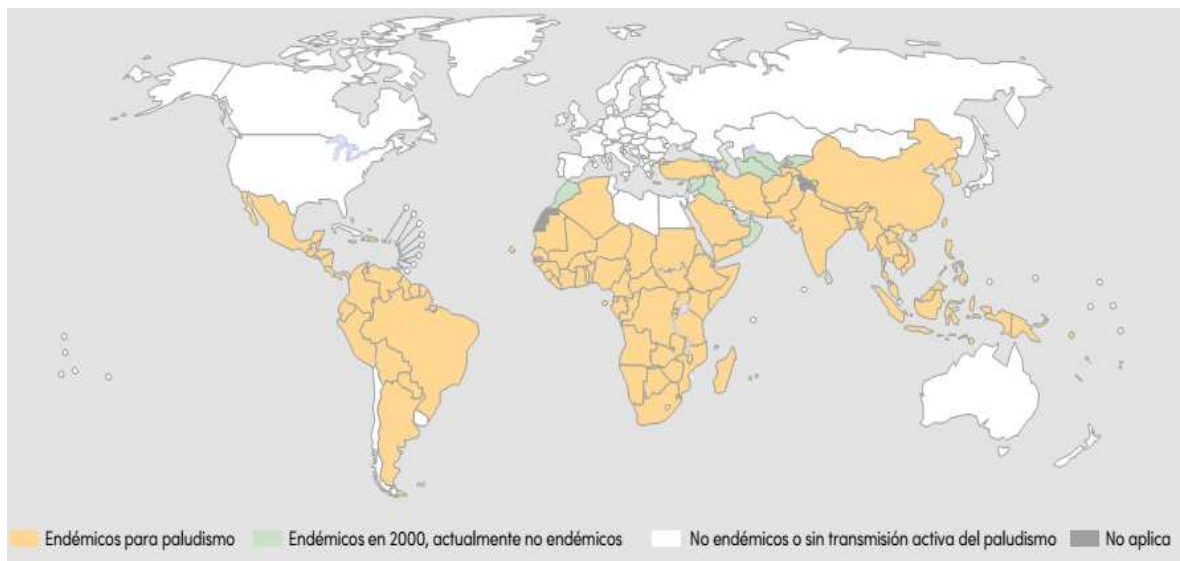


Figura 1.1- Países con transmisión activa de malaria entre los años 2000 y 2015.

Tomado de Reporte mundial de malaria - OMS(2).

1. 1.2.- Malaria en el Perú

El Perú reporta casos de *P.falciparum* y *P.vivax*; además nuestra región es considerada como zona de baja transmisión para la malaria. Después del fenómeno de EL NIÑO durante los años 1997-98, donde se reportaron hasta 120,000 casos, en los años siguientes los programas de control se intensificaron logrando reducir el número hasta los 45,000 casos para el año 2002 permaneciendo estable hasta el año 2005. Ese mismo año el Perú logró obtener un importante apoyo económico exterior del Fondo Global para la Lucha contra HIV, Tuberculosis y Malaria, a través del Organismo Andino de la Salud (ORAS), Convenio Hipólito Unanue, que financió el proyecto “Control de Malaria en zonas de frontera de la Región Andina (PAMAFRO)”. Este proyecto incluía el uso de diferentes estrategias para controlar la malaria, entre las cuales tenemos, búsquedas activas de pacientes febriles, implementación de nuevos puestos de salud con microscopios, capacitación a microscopistas, movilización de promotores de salud, vigilancia epidemiológica, entomológica, participación comunitaria y el empleo de pruebas de diagnóstico rápido (PDR); logrando así que para el año 2010 se redujeran el número de casos hasta los 11,604 casos. Este proyecto terminó en el año 2011 y luego el Ministerio de Salud del Perú asumió el programa de control de malaria (técnica y financieramente); sin embargo desde el 2011 sólo se ha priorizado el tratamiento de casos positivos detectados por microscopia (3), esto sumado al costo actual del tratamiento que es dos veces más caro (21,10 dólares/paciente) que el anterior tratamiento para *P.falciparum* (4), han sido factores que contribuyeron que para el año 2015 se reportaran 62,220 casos de malaria, de los cuales el 20% de los casos fueron producidos por *P.falciparum*, (Figura 1.2). Finalmente, la región de Loreto es la que contribuye con cerca del 90% de casos de malaria en el Perú, para el año 2015 se presentaron 32 distritos que fueron clasificados como de alto riesgo y todos ubicados en la región amazónica de Loreto por lo que es de principal interés llevar a cabo programas de control contra la malaria (5).

A



B

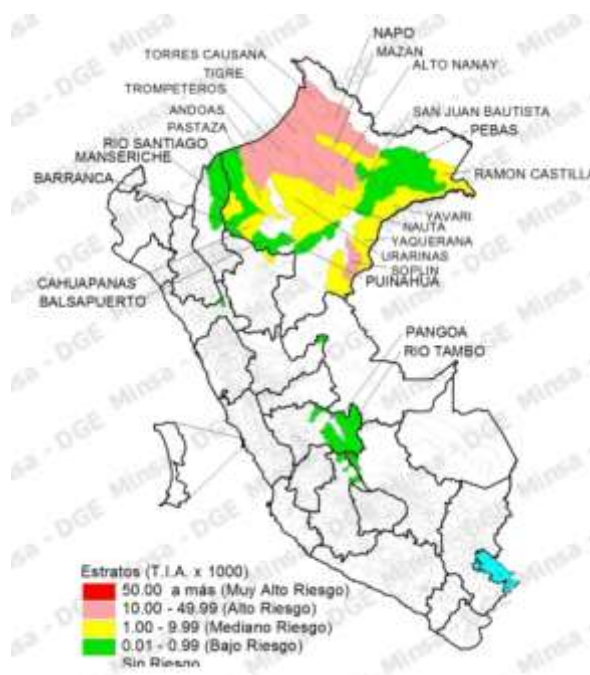


Figura 1.2.- Mapa de incidencia de malaria por distritos en el Perú para el año 2015. (A) Casos de infecciones con *P. vivax*. (B) Casos de infecciones con *P. falciparum*. Tomado del Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología - MINSA (5).

1.1.3.- Ciclo biológico del parásito *Plasmodium spp*

La fase asexual se inicia cuando un mosquito infectado inyecta esporozoitos a través de una picadura en la piel de un individuo, los cuales viajan a través de la circulación para llegar a las células del parénquima hepático, donde en un lapso de 6 a 13 días se diferencian en dos formas distintas, esquizontes tisulares (exo-eritrocíticos) (b) e hipnozoitos (c); estos últimos son los responsables de las recaídas en la infección por malaria causada por *P. vivax* y *P. ovale*. Los nuevos esquizontes hepáticos se forman entre 1 y 18 meses después de la infección a partir de los hipnozoitos, terminan con la ruptura del hepatocito que los contiene, liberando así entre 8 a 16 merozoitos (d), los cuales invaden a los glóbulos rojos y originan un ciclo intra glóbulos rojos, el cual consiste en la división asexual del parásito (esquizogónico) pasando sucesivamente de trofozoito joven (e) a trofozoito adulto (f), luego a esquizonte maduro (forma de mora) (g), para finalmente lisar el glóbulo rojo liberando nuevos merozoitos que van a invadir nuevos glóbulos rojos, este ciclo dura 48 horas (*P.falciparum*). Algunos trofozoitos darán lugar a gametocitos (h), masculinos y femeninos, los cuales al ser ingeridos por los mosquitos en el momento de alimentarse con sangre humana iniciarán el ciclo esporogónico (reproducción sexual) dentro del mosquito. El gametocito masculino se ex-flagela y fecunda al gametocito femenino formando un

ookinete o cigote (i), que se moviliza por la pared estomacal del mosquito y se enquistas en su exterior, madura durante 8 a 15 días y libera los esporozoitos, los cuales se diseminan por la hemolinfa del mosquito concentrándose en sus glándulas salivales, quedando listos para reiniciar el ciclo asexual (Figura 1.3).

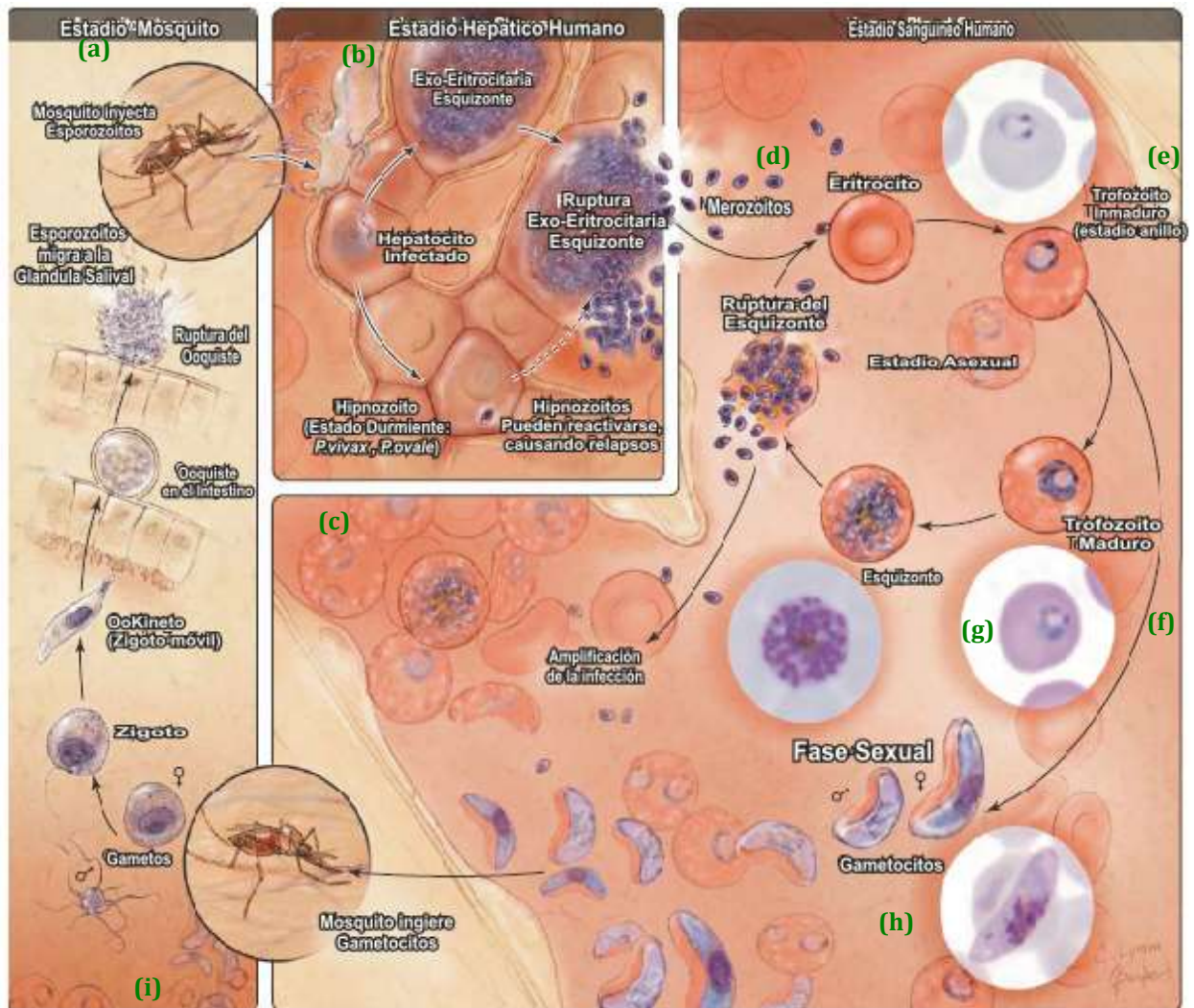


Figura 1.3.-Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Figura tomada y modificada de Griffith *et al* (6).

1.1.4.- Taxonomía del parásito

La malaria es causada por un protozoo del género *Plasmodium*. Este género es parte de un subfilum de organismos protistas unicelulares denominados Apicomplexa. Los Apicomplexa poseen el apicoplasto, que es una organela diseñada para ayudar al ingreso a la célula huésped. El filum Apicomplexa se divide en dos clases, el género *Plasmodium* pertenece a la clase Aconoidasida (carentes de una estructura llamada conoide y se distingue como un conjunto de microtúbulos), y luego a la orden Haemosporida, que contiene a los parásitos que invaden los

glóbulos rojos. Dentro de este suborden, *Plasmodium* pertenece a la familia Plasmodiidae, donde todos comparten numerosas características, incluyendo la reproducción asexual en un huésped vertebrado y la reproducción sexual en un hospedero definitivo (un mosquito, en el caso de las especies del género *Plasmodium* que infectan a todos los mamíferos, incluidos los seres humanos). En la malaria humana, el huésped definitivo se refiere a menudo al vector. La familia Plasmodiidae contiene unos doce géneros, siendo uno de ellos *Plasmodium*, que a su vez se encuentra dividida en numerosos sub-géneros (7).

1.1.4.1.-Clasificación del género *Plasmodium* (Sistema Nature, Linneo 1758)

Phylum: Protozoa

Subphylum: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Subclase: Coccidia

Orden: Eucoccidiida

Suborden: Haemosporina

Familia: Plasmodiidae

Género: Plasmodium

1.1.4.2.-*Plasmodium falciparum*

Es el agente causal de los casos graves de malaria y es el principal responsable de muertes por la enfermedad de la malaria en el Perú y en el mundo.

1.1.5.-Genoma de *P. falciparum*

El genoma de *P. falciparum* consta de 23 Mpb distribuidos en 14 cromosomas, los cuales codifican cerca de 5,300 genes. Cerca del 80% de su genoma está formado por los nucleótidos adenina y timina. La mayoría de sus genes codifican proteínas involucradas en la evasión inmune, en las interacciones hospedero – parásito y están ubicados en las regiones sub-teloméricas de los cromosomas (8, 9). Cerca del 8% de su genoma codifica 455 proteínas que presentan un péptido señal de exportación que las dirige hacia el exterior de la vacuola parasitófora, en donde cumplen una función de interacción con las proteínas del glóbulo rojo infectado, 256 de estas proteínas están relacionadas con la evasión inmune, entre estas PfEMP1 con 59 copias, stevor (32 copias) y rifins (165 copias). El resto de genes, 199 en total, son secuencias únicas que codifican proteínas

con dominios DnaJ o PHIST (chaperonas) y otras proteínas de exportación. La razón por la cual este parásito tiene este gran repertorio de genes se desconoce; pero cabe resaltar que de todas las especies de *Plasmodium spp*, *P. falciparum* es el único que expresa PfEMP1 (Proteína de membrana del eritrocito 1 de *P.falciparum*), la cual es su principal proteína de evasión inmune en el estadio trofozoito y cuyas variedades están relacionadas con casos complicados de malaria (9-11).

1.1.6.-Transcriptoma de *P. falciparum* (cepa 3D7)

Cerca del 75% de los genes de *P. falciparum* son activados durante las primeras 48 horas del ciclo intraeritrocitario, de estos cerca del 80% corresponde a genes del estadio trofozoito (estadio que presenta la proteína PfEMP1). La regulación genética a nivel transcripcional es importante en *P.falciparum* ya que produce una cascada de expresión de genes empezando con aquellos involucrados con funciones generales de la célula y finalizando con aquellos genes que sintetizan proteínas con funciones propias del parásito como las proteínas de exportación y las que están involucradas con la virulencia (interacción con proteínas del glóbulo rojo infectado y la deformación de este) (8, 12, 13)

1.2.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1.-La malaria ocasionada por *P.falciparum*

La malaria exhibe un amplio espectro de manifestaciones no clínicas (infecciones asintomáticas) y clínicas (malaria complicada y no complicada). Este espectro de manifestaciones depende de múltiples factores relacionados al parásito, al hospedero, al vector y al medio ambiente.

1.2.2.-Cuadros clínicos asociados a las características parasitarias de *P.falciparum*

La malaria cerebral es la complicación más frecuente de la malaria causada por *P. falciparum* y no se conoce con claridad su patogénesis; sin embargo, se han postulado cuatro mecanismos posibles: 1) citoadherencia y secuestro de glóbulos rojos infectados en la micro-vasculatura cerebral; 2) formación de rosetas y aglutinación de glóbulos rojos infectados; 3) producción de citoquinas y activación de segundos mensajeros y, 4) apertura de la barrera hemato-encefálica ocasionado por daño celular producto de la inflamación local (Figura 1.4).

1.2.2.1.- El *secuestro* es el resultado de la citoadherencia de los glóbulos rojos infectados en el endotelio microvenular. La citoadherencia está mediada principalmente por receptores afines a PfEMP1 (Figura 1.5) que se encuentran en el endotelio micro-venular. Esto ocurre en capilares y vénulas. El secuestro de glóbulos rojos infectados contribuye a la obstrucción vascular y ha dado origen a la hipótesis de la obstrucción mecánica vascular por glóbulos rojos infectados. (14-16)

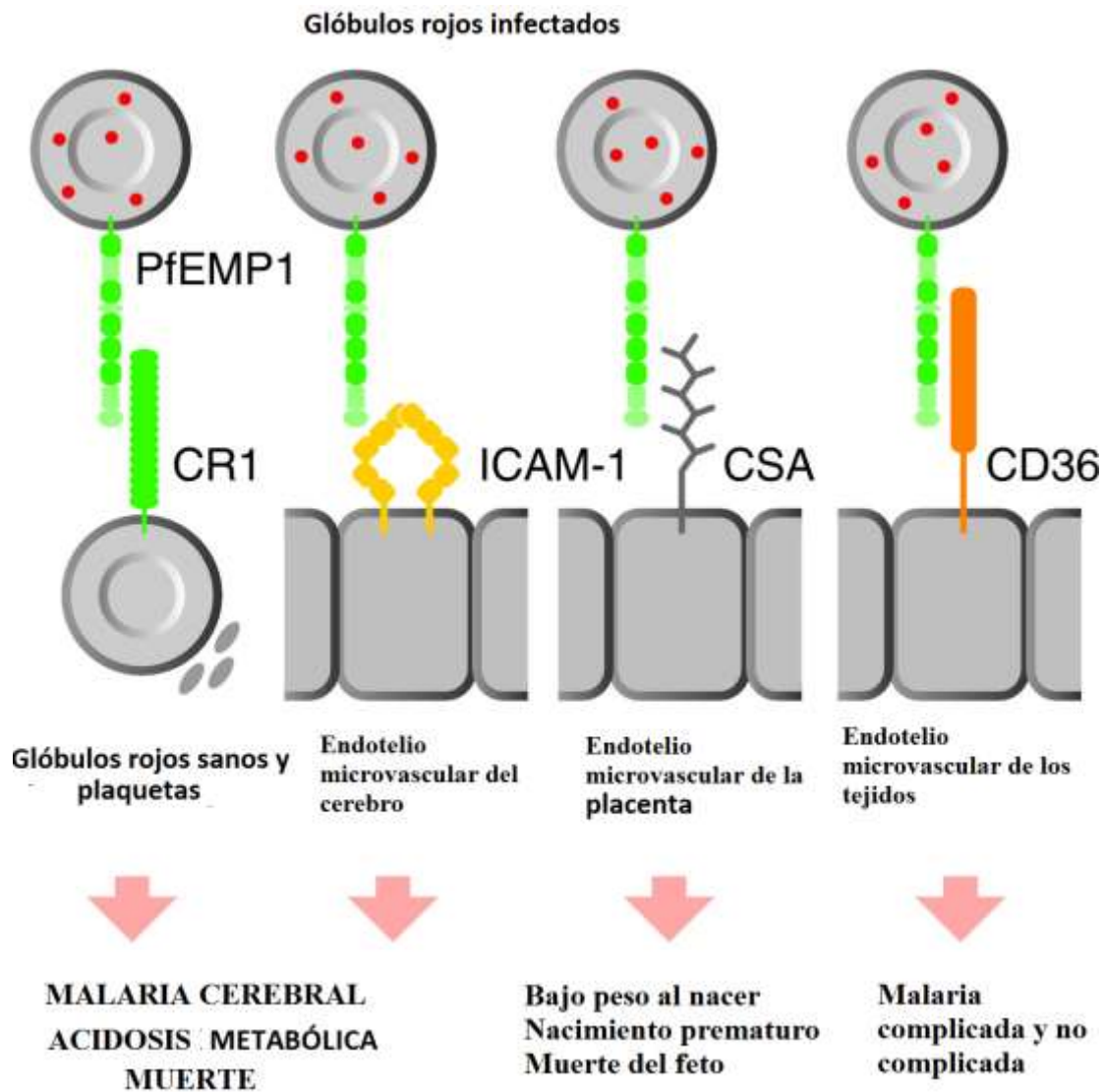


Figura 1.4. Moléculas del hospedero que interactúan con la proteína PfEMP1 del glóbulo rojo infectado. Figura tomada de Penman *et al* (15).

1.2.2.2.- Las *rosetas* se forman mediante la unión de varios glóbulos rojos sanos alrededor de los glóbulos rojos infectados. Estas rosetas se pueden deshacer por un cambio fuerte del flujo sanguíneo; sin embargo, se vuelven a formar en una zona más distal, agravando la obstrucción venosa y complicando la enfermedad.

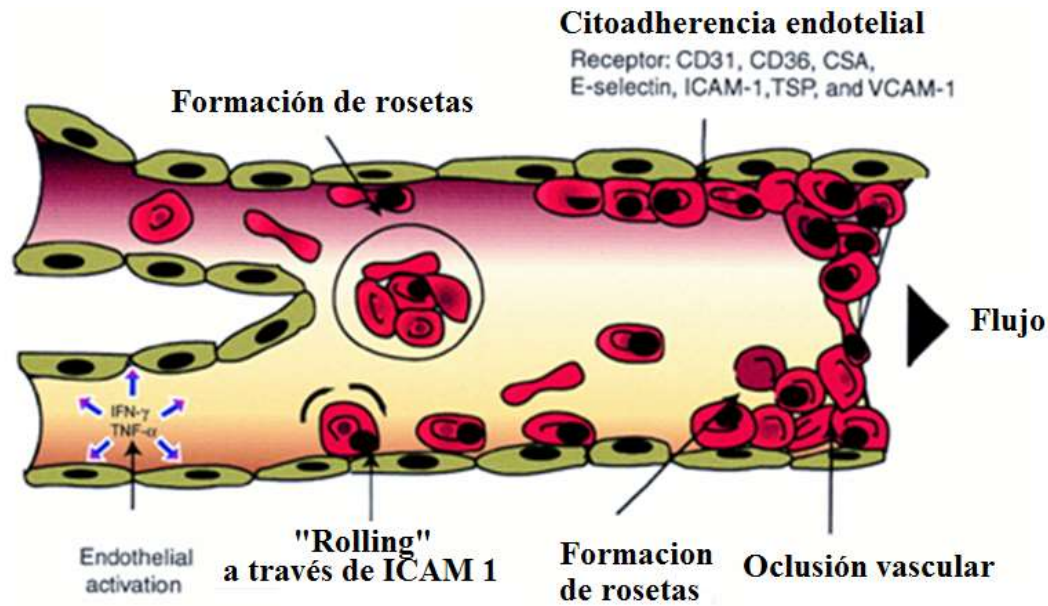


Figura 1.5.- Formación de roseta y cito adherencia en los capilares sanguíneos. Tomado y modificado de Chen *et al* (17).

1.2.3.-Infecciones asintomáticas

Los cuadros clínicos que presenta la enfermedad pueden cambiar con la edad, inmunidad e intensidad de transmisión de la región (Figura 1.6). En áreas de alta transmisión de malaria, los individuos están constantemente expuestos al parásito y desarrollan una protección parcial para los síntomas severos, denominándose infecciones asintomáticas (18) producto de la inmunidad clínica adquirida (19).

Se han establecido dos características fundamentales en la malaria asintomática: la duración de la infección y la densidad de gametocitos en sangre. Las infecciones que persisten por largos períodos de tiempo significan más oportunidades para que una persona con malaria pueda convertirse en un reservorio humano para que pueda ser picado por los mosquitos, esto también permite que los gametocitos de *P. falciparum* puedan producirse ya que les toma alrededor de 7 a 15 días después de la primera aparición de los parásitos en la sangre (20). Se ha observado entre las personas con malaria asintomática provenientes de zonas de moderada hasta de alta transmisión como en África, que las infecciones con densidades más altas de gametocitos son generalmente más infecciosas. Sin embargo, las densidades de gametocitos de los individuos asintomáticos de zonas de baja transmisión son más heterogéneas y no necesariamente comparten los mismos características de lo que ocurre en zonas de alta transmisión (Figura 1.7) (7).

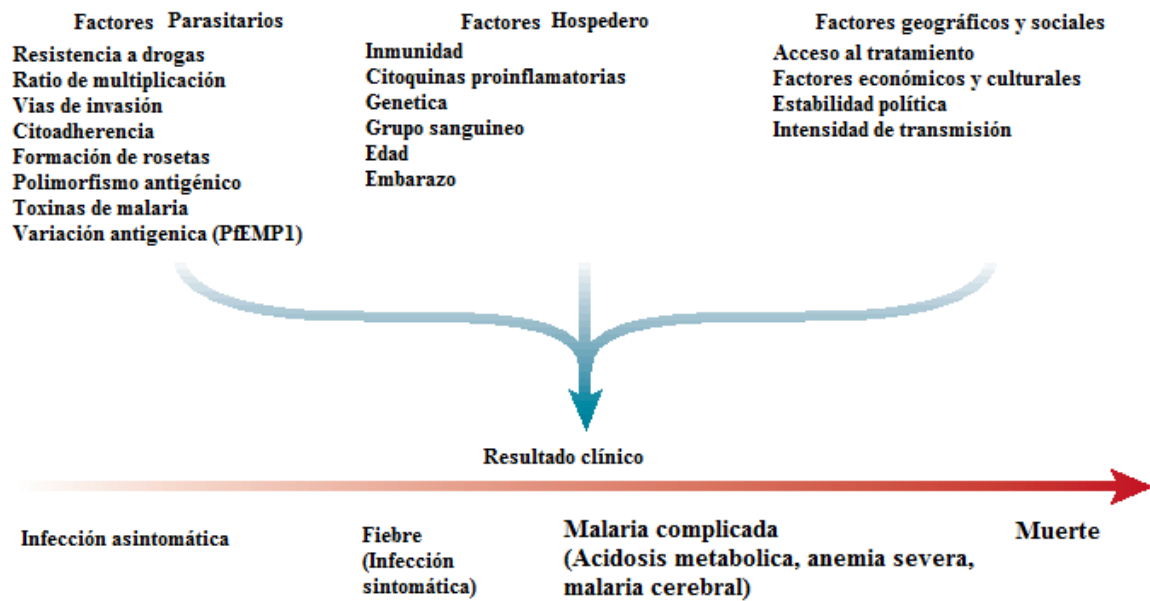


Figura 1.6.- El resultado clínico de las infecciones con *P.falciparum* en África depende de múltiples factores, los cuales incluyen al parásito, el hospedero, aspectos geográficos y sociales. La convergencia de estos factores permite resultados clínicos que van desde la infección asintomática hasta la complicación de la enfermedad y/o la muerte. Tomado y adaptado de Miller *et al* (19).

La situación de las infecciones asintomáticas en las zonas de baja transmisión (distintas a regiones en África) como la Amazonía y el sudeste asiático es mucho más complicada dado que en estas regiones un alto porcentaje de las infecciones asintomáticas de malaria son del tipo submicroscópicas y que además tenemos la presencia de dos especies de *Plasmodium* circulantes (*falciparum* y *vivax*). Los individuos expuestos a malaria en una zona de baja transmisión con el paso del tiempo y la continua exposición se incrementarían sus probabilidades de ser asintomático, ya que estarían en proceso de adquisición de la inmunidad clínica (eliminación de la parasitemia) o podrían estar en el proceso de desarrollar una infección sintomática (Figura 1.7) (7).

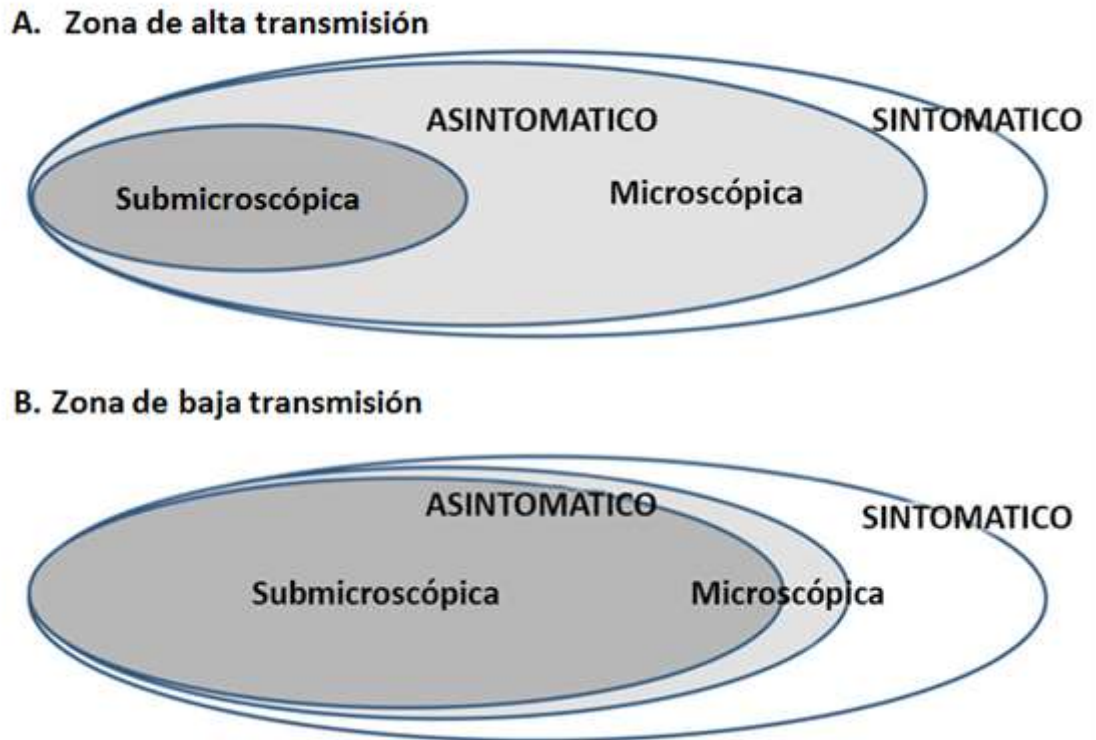


Figura 1.7. Heterogeneidad de los reservorios asintomáticos en zonas de alta y baja transmisión. Figura tomada de Torres K. 2015 (7).

1.2.4.-Marcadores serológicos

Las herramientas convencionales para medir la transmisión de *P.falciparum* en una región son: las mediciones entomológicas las cuales proveen información del vector (mosquito) y la forma de transmisión al humano del parásito en una comunidad; sin embargo, esto requiere de personal entrenado y procedimientos estandarizados aceptados lo cual reduce la precisión de los indicadores de transmisión lo cual hace difícil su interpretación. La prevalencia de las infecciones por *P.falciparum*, es valor importante pero dado la falta de estrategias para asegurar la exactitud de estos datos obtenidos que se basan en el enrolamiento de pacientes sintomáticos, censo de comunidades, inicio del tratamiento con resultados de microscopía, uso de mosquiteros, implementación de redes de microscopistas, hacen que estas herramientas convencionales sean de aplicación dificultosa en zonas con geografía compleja y que a su vez son consideradas como de baja transmisión para la malaria. De forma alterna se puede obtener información precisa y cuantitativa sobre la exposición de determinadas poblaciones, en los estudios de cohortes de pacientes (seguimientos), midiendo la incidencia de pacientes sintomáticos y asintomáticos a *P.falciparum*. Desafortunadamente, estos estudios aumentan sus gastos de aplicación mientras

más comunidades se deseen evaluar y por tanto solo están limitados a nivel de investigación, dejando de lado su aplicación en los programas de control regionales y nacionales (21).

Los marcadores serológicos surgen como una alternativa atractiva para estimar la incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas en las infecciones con *P.falciparum* al costo de estudios tipos *cross-sectional* (corte en un punto de tiempo). Aunque las infecciones de *P.falciparum* puedan resolverse con el tiempo, una evidencia biológica queda marcada en el perfil de anticuerpos de un individuo expuesto, el cual puede ser medido por ensayos de ELISA (Siglas en inglés de “ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas”). A este proceso de monitorear el nivel de anticuerpos generados hacia un determinado marcador (antígeno) en una región, se le denomina “Serovigilancia” y brinda información importante sobre el impacto del programa de control en la región. Se puede determinar el mejor “marcador serológico” en base a estudios de validación del mismo en una población de interés. Un ejemplo del comportamiento esperado de estos marcadores serológicos se muestra en la figura 1.8, en donde se observa el título de anticuerpos en relación al tiempo, los cuales pueden servir para medir infección, exposición y protección.

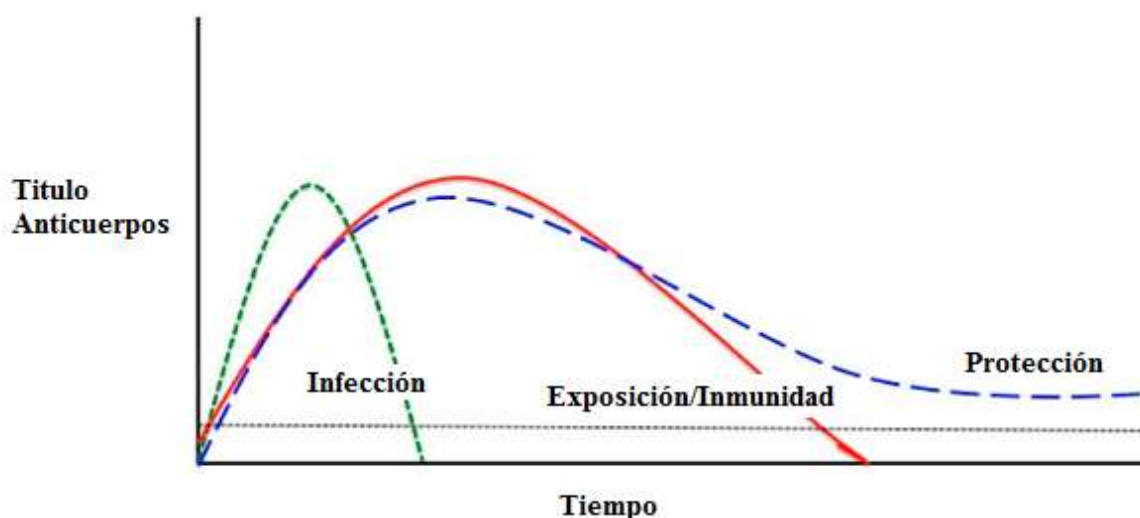


Figura 1.8.- Variación de los títulos de anticuerpos generados contra los marcadores serológicos según estos sean utilizados (infección, exposición y protección) en el tiempo. Figura tomada y modificada de King *et al* (22).

Luego un escenario ideal para estos marcadores serológicos o sero-marcadores es sin duda su empleo en programas de control de malaria para poder estimar el nivel de transmisión, monitorear tendencias en periodos de tiempo desde meses hasta años, evaluar el impacto de los programas de control, identificar individuos y poblaciones con reciente exposición, identificar áreas geográficas (“hot-spots”) o poblaciones (“hot-pops”) con inicios de transmisión, confirmar la eliminación de la malaria, monitorear la re-emergencia y detectar pacientes asintomáticos (22,

23). El empleo de antígenos parasitarios para estos propósitos no es reciente y fue planteado hace 10 años atrás para los programas de control; sin embargo, la falta de metodologías de obtención de antígenos estandarizados dejó esta idea en el tintero. Recientemente esto ha tomado fuerza con la popularización de las tecnologías de obtención de proteínas recombinantes, lo que permitiría su producción más controlada y métodos óptimos de tamizaje (Protein-arrays) por lo cual su interés se viene renovando (22, 23).

1.2.5.- Baculovirus como sistema de producción de antígenos recombinantes.

La producción de proteínas recombinantes se ve limitada por la capacidad de los sistemas de expresión de obtener proteínas con todas sus propiedades, tal cual se encuentran en su forma nativa, como lo son las modificaciones postraduccionales (modificaciones con azúcares, lípidos, etc.) y el correcto plegamiento de estas, los cuales son muy importantes en el correcto reconocimiento por parte de sueros de pacientes infectados (24). Otra limitante es la escalabilidad de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Un sistema ideal de producción de proteínas emplearía un sistema de expresión de células mamíferas pero las condiciones de producción de estas son muy demandantes. Recientemente, se ha retomado la técnica de expresión de proteínas en células de insecto utilizando virus recombinantes (baculovirus), la cual hasta el momento ha puesto en el mercado 2 productos (vacunas) aprobados por la FDA (Food and drug Administration U.S, <http://www.know-vaccines.org>), y recientemente se encuentran en lista de espera 2 productos más para su aplicación en las enfermedades provocadas por los virus de Ebola (25) y Chikungunya (26).

Esta tecnología consiste en insertar genes de interés en un virus de insecto (baculovirus), bajo el promotor de la polihedrina (promotor que confiere una expresión proteica elevada en insectos) y utilizarlos para infectar células de insecto en cultivos, de los cuales se pueden producir las proteínas recombinantes de interés (figura 1.9). La versatilidad de este sistema se encuentra en los tiempos de respuesta frente a una demanda real, como lo fueron las epidemias de Ébola y Chikungunya durante los años 2013 y 2014. La producción de proteínas basadas en este sistema depende de obtener un baculovirus recombinante en condiciones de laboratorio (clonación de vectores y aislamiento de bácmidos), que puede tomar cerca de 2 a 4 semanas hasta obtener el baculovirus recombinante. Luego con el baculovirus se llevan a cabo procesos de producción de proteína infectando células de insecto que no requieren una gran demanda técnica a diferencia de los sistemas de expresión en células de mamífero. Las condiciones para el cultivo de células de insecto son atractivos para un laboratorio básico de investigación como porcentaje de CO₂ nulas, temperaturas entre 25 y 28°C, crecimiento en ausencia de suero fetal bovino (SFB), crecimiento

en suspensión celular pudiendo llegar a densidades entre 3-5 millones de células por cada mililitro, tiempo de producción de proteínas entre el día 2 y 5 post infección, tamizaje de variables en la expresión, facilidad de crío preservación de stock virales, procesos de lisados sencillos sin el uso de complejos detergentes para el caso de proteínas intracelulares y lo más importante, que son inocuos al ser humano (27). Estas condiciones de cultivos hacen que este sistema sea el idóneo para la producción de proteínas recombinantes y prueba de ello varios grupos lo vienen empleando en la producción de formas recombinantes de proteínas parasitarias de interés para las investigaciones en malaria (28-32), y fuera del contexto de malaria su uso se refleja en cerca de 400 artículos al año que son publicados empleando esta tecnología (Figura 1.9).

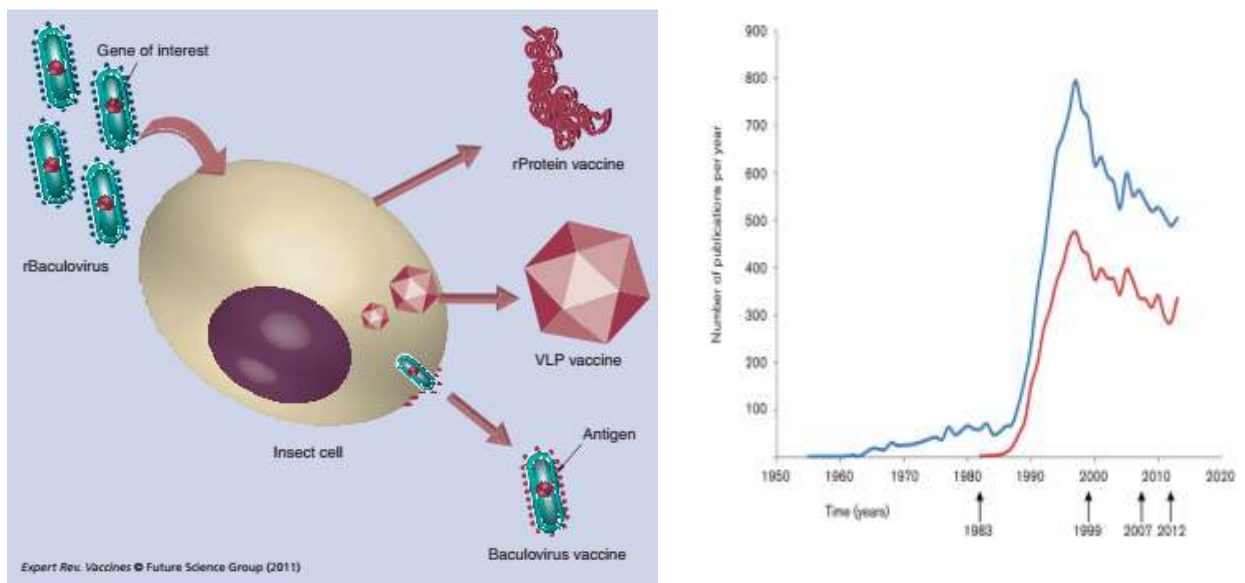


Figura 1.9.- Izquierda. Descripción esquemática de la producción de vacunas utilizando el sistema de expresión en células de insecto. Figura tomado de Mena *et al* (33). Derecha. Literatura buscada en base de datos científicas en donde se empleó el sistema de expresión de células de insecto. Los años de invención de la tecnología (1983), el inicio de la comercialización de la primera vacuna animal con esta tecnología (1999), la primera vacuna humana (2007) y su primer uso como vector de terapia génica (2007) son indicadas por las flechas. Figura tomada de Van oers *et al* (34).

1.3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.3.1.-Parásitos *Plasmodium falciparum* de la Amazonia Peruana

Los parásitos *P.falciparum* en la Amazonia Peruana representan un grupo de especial interés para la investigación debido a que se vienen identificando características notables sobre estos. El primer estudio que involucró conocer características del parásito fue realizado en el año 2003, donde se reportaron los genotipos para el gen GLURP (glutamate-rich protein) en aislados de pacientes de la Región Amazónica (35). Posteriormente se reportaron la existencia de alelos relacionados con la respuesta a drogas antimaláricas (36-40), y ensayos de susceptibilidad *in vitro* a drogas (41), también existieron reportes de asociación entre un marcador molecular y la resistencia a un

antimalárico en cepas nativas (8, 42). En el año 2006 se reportó una asociación positiva entre gametocitos en sangre y la ausencia de síntomas clínicos en pacientes de la Amazonia (43). En el año 2007 se concluyó que las mujeres gestantes eran más susceptibles a la infección por *P.falciparum* que las mujeres no gestantes (44) y además que la variabilidad genética era menor en el gen asociado a malaria en gestantes (VAR2CSA, miembro de la familia PfEMP1), (45). En el año 2008 se reportan los alelos para los antígenos candidatos a vacunas (circumsporozoite protein (CSP), merozoite surface protein 1 (MSP-1), apical membrane antigen 1 (AMA-1), liver stage antigen (LSA-1) y thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)) (46). Estudios de diversidad genética con el marcador PfMSP1, indicaron la presencia de infecciones monoclonales empleando la tecnología del microarray, de marcadores de resistencia y micro satélites (8, 47). En un estudio de 5 años de seguimiento de poblaciones parasitarias se estableció una alta diversidad genética, utilizando marcadores moleculares de superficie del merozoito y microsátélites; sin embargo es baja la diversidad genética comparada a las regiones de alta transmisión de la malaria como el África (48, 49) y en contraste, mediante marcadores de resistencia se ha determinado una población clonal parasitaria que son un producto del proceso de selección ejercida por las distintas políticas de antimaláricos adoptadas en el Perú. (50).

En el año 2010 empezaron los reportes sobre la existencia de parásitos con inestabilidad genómica total (genes *pfhrp2* y *pfhrp3*) (51) y parcial (gen *pfhr2b*) (52) e inestabilidad sub-telomérica de los cromosomas de los parásitos (8). También se buscó establecer el origen genético de la pérdida de genes *pfhrp2* y *pfhrp3*, que se asoció como un producto de una serie de eventos ocurridos entre el periodo de años desde 1998 hasta el año 2005 (53). Un ensayo reportó con cepas nativas y modelos de co-infección de genotipos *in vitro* que las cepas pueden crecer de forma independiente; pero estas ven la necesidad de reducir su densidad por factores no propios (producción de merozoitos y gametocitos) de los genotipos, sino propios de *P.falciparum* que todavía no están esclarecidos (54). Ensayos de invasión de merozoitos a glóbulos rojos fueron realizados en aislados de la Amazonia reportándose únicas y nuevas vías de invasión, además de reportar variantes de las proteínas involucradas en el proceso de invasión (52).

Información genética muy importante se ha rescatado en los últimos 13 años en relación a los parásitos *P.falciparum* de la Amazonia Peruana. Los ensayos de diversidad genética dan indicio de una población clonal a nivel de marcadores neutrales como los microsátélites y poblaciones diversas a nivel de proteínas de superficie del merozoito (PfMSP1, PfMSP3, PfMSP6, PfMSP2 y PfGLURP), proteínas de invasión del merozoito (PfRh1, PfRh2a, PfRh2b, PfRh4, PfRH5 y PfEBA175), proteínas del esporozoito (CSP, TRAP), relacionados con estadio hepático (LSA-1) y asociados con malaria en gestantes (PfEMP1) lo que nos indica que a nivel de proteínas de contacto, *P.falciparum* presentó una limitada variabilidad. Esta limitación podría explicar en parte

las pérdidas genómicas reportadas en estas cepas, ya que al no existir una forma óptima de recombinarse sexualmente (de allí que la Amazonia es considerada de baja transmisión), esta genera que los parásitos busquen formas alternativas para lograr diversidad y se pueden dar eventos de recombinación mitótica que se dan con facilidad en la región sub telomérica en los cromosomas (55). Por lo mencionado, podríamos inferir que tenemos parásitos clonales circulantes en esta región; pero que a su vez presentan diversidad a nivel de proteínas de superficie e invasión, con pérdidas de segmentos genómicos totales y parciales, lo cual puede ser contradictorio; sin embargo se estaría reflejando la falta de selección en estas poblaciones permitiendo que nuevas variantes a nivel de proteínas de superficie aparezcan y se mantengan dada la estructura genética del tipo clonal para *P.falciparum* en nuestra región.

Estudios de caracterización fenotípica se desarrollaron con cepas de la Amazonia Peruana, estudios relacionados con susceptibilidad a drogas, asociación del nivel de gametocitos en sangre de pacientes no febriles, cultivos *in vitro* de co-infección y ensayos de invasión. Es poca la información que se tiene a nivel de fenotipo, salvo que se cuentan con parásitos resistentes a antimaláricos de primera línea (sulfadoxina-piremetamina, cloroquina y quinina), además del antibiótico clindamicina, parásitos que tienden a producir gametocitos con facilidad y cuyos merozoitos presentan una nueva ruta de invasión de glóbulos rojos (35-50).

1.3.2.- Eliminación de la malaria.

Los datos sobre los casos de malaria presentados por la Dirección General de Epidemiología del Perú, obedecen a datos de pacientes con síntomas y que se acercan a la posta de salud respectiva (5); sin embargo, dada la geografía de la región amazónica, la forma más popular de movilización es por vía fluvial que involucra un costo para el paciente, además de tiempo, por lo que este sería un factor que estaría también influenciando en el diagnóstico y tratamiento oportuno de la malaria (56, 57) Una forma de manejar este inconveniente sería a través del uso de pruebas de diagnóstico rápido (PDR) en zonas alejadas, sin acceso al diagnóstico por microscopia. En el Perú se habla de parásitos resistentes a las PDR (58) y es una preocupación de varios grupos de estudios especializados en el mundo (59). La primera mención de estos parásitos como un posible factor de la baja sensibilidad de las PDR en la Amazonia Peruana fue brindada tras los resultados obtenidos para una nueva PDR basada en la detección de la proteína PfHRP2 la cual llevaba por nombre ICT MALARIA P. f/P.v (AMRAD®) y para la cual se obtuvo una sensibilidad de 60% (60). En un segundo estudio utilizando otra PDR (Parascreen®) se obtuvo una sensibilidad de 54%, en donde se menciona por primera vez que la presencia de parásitos sin el gen *pfhrp2* podría ser la causa de esta baja sensibilidad (61). Esto llevó a los investigadores a indagar sobre la posible

presencia de estos parásitos especiales y en el año 2010 se dio el primer reporte de parásitos que no poseían el gen *pfhrp2* (51) y finalmente en el 2012 se reporta que las PDRs basadas en la detección de PfHRP2 no son útiles para la región Amazónica (62); cabe indicar que este tipo de PDR son las más utilizadas en el mundo (59). Se tiene información consistente sobre la presencia de estos parásitos *P.falciparum* en nuestra región, que estarían presentes además en otras regiones de la Amazonia como Colombia y Brasil (63) y también estarían siendo reportados en regiones del África (Malawi, Zambia, Ghana y Senegal) (59).

Las búsquedas activas de pacientes son una herramienta útil para la identificación de pacientes asintomáticos en una región, esta medida consiste en tomar no solamente muestras de sangre de individuos febriles sino también a los individuos que rodean al paciente febril. Una búsqueda activa realizada en la región amazónica durante el año 2003 demostró la presencia de individuos asintomáticos (5% de casos) empleando una combinación de herramientas moleculares con la microscopía.(64). Después de este reporte, otros estudios han encontrado entre 5 – 14% de individuos asintomáticos (3, 44, 65, 66). Este tipo de malaria no tiene aún un concepto definido, sin embargo ya existe mucho interés en cómo están controlando estos individuos a los parásitos en la sangre sin llegar a presentar síntomas o sin llegar a eliminarlos completamente (7, 67). Estos individuos asintomáticos se han convertido en un tema crítico en términos de la asignación del tratamiento; ya que, de acuerdo con las directrices nacionales del programa de Malaria en el Perú, sólo después de confirmar la presencia del parásito en el frotis o gota gruesa de sangre se puede proporcionar tratamiento al paciente; con esto, los casos asintomáticos submicroscópicos quedarían fuera del esquema. Asimismo, esta condición en zonas endémicas del Perú representa una barrera crítica para la eliminación o erradicación de la malaria, por lo que es crucial seguir diseñando nuevas estrategias o herramienta para la prevención y control (7).

1.4.- MARCO TEÓRICO

Los grupos de investigación del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humboldt” y el laboratorio de Malaria de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía, ambos pertenecientes a la Universidad Peruana Cayetano Heredia, llevan a cabo extensos estudios en la Región Amazónica (Loreto principalmente), en diferentes áreas: estudios epidemiológicos, genéticos, celulares (caracterización de fenotipos de cepas de *P. falciparum* en cultivo), inmunológicos (respuestas sintomática o asintomática en el hospedero relacionadas con las cepas *P.falciparum*) y entre otros.

El reporte de cepas *P.falciparum* sin el gen *pfhrp2* (51) tras los resultados de baja sensibilidad obtenida con la PDR Parascreen® (61) y el estudio que indica que las PDR basadas en la detección de PfHRP2 no son útiles para la Región Amazónica (62), realizados por nuestro grupo de investigación, fueron de gran impacto sobre el desarrollo y uso de PDRs. Para agudizar este problema tenemos un importante hallazgo sobre la presencia de un gran número de individuos asintomáticos y algunos con infecciones sub-microscópicas en la región (65)

Estudios inmunológicos en nuestra región han descrito que los individuos expuestos a *P.falciparum* pueden evocar rápidamente y mantener títulos de anticuerpos anti-PfMSP1 durante 4 meses (68). Esto puede ser una ventaja técnica para la evaluación de marcadores serológicos.

Estudios pensados para el control de la enfermedad proponen la identificación de estos individuos asintomáticos y la detección de zonas de transmisión o “puntos calientes” mediante el uso de marcadores serológicos que indiquen la exposición de los individuos al parásito *P.falciparum* (3), ya que a pesar que la infección se resuelva, estos dejan una huella en el hospedero humano (respuesta de anticuerpos frente proteínas parasitarias) que puede ser medible. Se han llevado a cabo estudios de diferenciación entre sintomáticos y asintomáticos en base a su nivel de respuesta serológica a proteínas relacionados con la invasión, identificando potenciales proteínas (PfRh2b, PfEBA175, PfEBA181 y PfMSP1); sin embargo esta diferenciación se debería en parte a la presión de selección que se lleva en el hospedero humano americano (69) y también a las nuevas rutas de invasión identificados para las cepas peruanas (52). En el año 2015 se realizaron ensayos con el sistema proteínarray empleando sueros de pacientes sintomáticos y asintomáticos, lo cual permitió identificar potenciales marcadores de sero-vigilancia que permitirían identificar ambos tipos de pacientes y contribuir con los programas de control regionales (70).

1.5.- JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Existen muchos espacios por llenar para lograr entender el comportamiento de los parásitos *P.falciparum* de la región Amazónica. Sin embargo, podemos identificar 2 rasgos propios de estos parásitos: 1) No se les puede detectar utilizando PDR basadas en PfHRP2 y 2) A nivel genómico no parecen presentar variantes que indiquen una relación con la complicación de la enfermedad. El punto 1 a su vez, estaría agudizándose por la presencia de individuos asintomáticos que jamás asistirán a un puesto de salud y que por lo tanto se convertirán en reservorios humanos contribuyendo así en la transmisión de *P.falciparum* en la Amazonia Peruana. Estas características tanto parasitarias como del hospedero pueden ser propias de las zonas de baja transmisión de *P.falciparum*, por lo que algunos estudios indican la necesidad de monitorear estas zonas mediante el uso de marcadores serológicos para detectar transmisión, lo cual permitiría el

diseño de nuevas herramientas y estrategias que contribuyan al control de la enfermedad. Partiendo de este punto, la exploración de las características parasitarias de *P.falciparum* en la región Amazónica podría contribuir en la búsqueda de marcadores serológicos (Figura 1.10).

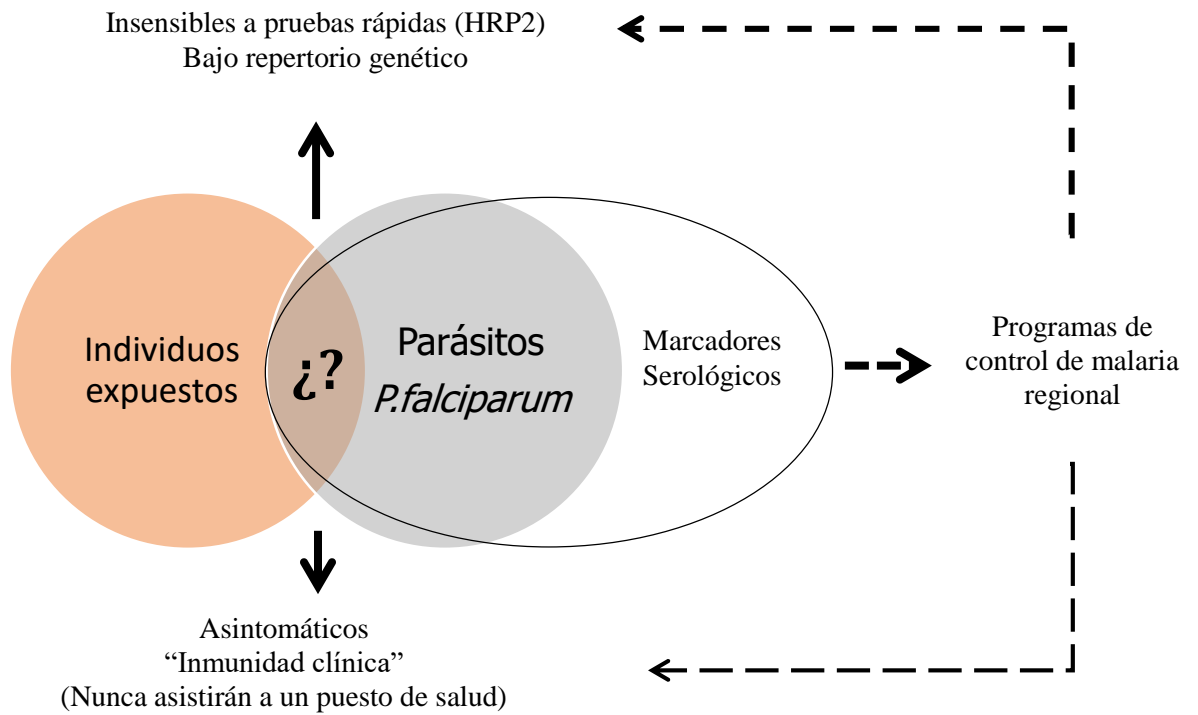


Figura 1.10.- Contribución de factores parasitarios y del hospedero en la problemática existente en la Región Amazónica para los programas de control de malaria.

1.6.- OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis fue explorar la contribución de las proteínas parasitarias de *P.falciparum* de la Amazonia Peruana en la búsqueda de marcadores serológicos, mediante el diseño de péptidos, expresión heteróloga en células de insecto y evaluación serológica.

1.6.1.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.6.1.1.- Búsqueda bibliográfica de potenciales antígenos seroreactivos y su importancia en la baja transmisión de la malaria *falciparum* en el Perú (Capítulo 2).

Para el objetivo del capítulo 2, se tuvo como hipótesis que existen ciertas proteínas involucradas en procesos de invasión del parásito al glóbulo rojo que presentan sero-reactividad y que podrían ser utilizadas como marcadores serológicos, para lo cual realizamos una revisión de la literatura disponible de los ensayos reportados en nuestra región con las proteínas de *P.falciparum* reportadas desde el año 1988 hasta el 2015. Esta revisión nos permitió identificar aquellos antígenos característicos de los parásitos *P.falciparum* que puedan ser considerados como potenciales marcadores para sero-vigilancia teniendo en cuenta valores de sero-reactividad y diversidad genética de estos marcadores. Tras esta revisión se verificó que los antígenos presentes en el merozoito (estadio que se desarrolla fuera del glóbulo rojo), fueron los más reconocidos por sueros de individuos infectados (PfMSP10 y PfRh2b), de la misma forma se considera a PfEBA175 como un marcador de discriminación entre infecciones sintomáticas y asintomáticas.

1.6.1.2.- Clonación y expresión de las proteínas: Merozoite surface protein 10, reticulocyte-binding homologue-2b y Erythrocyte binding antigen 175 de *Plasmodium falciparum* utilizando el sistema de expresión de células de insecto – Sf9 (capítulo 3).

Para lo cual se describe la clonación y expresión de la proteína completa PfMSP10 (identificada en el capítulo 2) en el sistema heterólogo de células de insecto – Sf9, para posteriormente purificarla y evaluarla en un panel reducido de sueros de individuos infectados con *P.falciparum* y *P.vivax*. Se logró obtener la proteína recombinante con una pureza de 86% (rMSP10), tras un paso de optimización de codones del gen *pfmsp10* para *Spododtera frugiperda* (Sf9) y se demostró su sero-reactividad en sueros de individuos infectados con *P.falciparum*. También se presenta la clonación y expresión de la región única de la proteína PfRh2b (identificada en el capítulo 2) utilizando el sistema de expresión de células de insecto, lográndose purificar la proteína con una pureza de 64% (rRh2b), también se demostró su sero-reactividad en sueros de

pacientes infectados con *P.falciparum*. Además, se logró a realizar, de forma paralela, la expresión de la proteína EBA175 en el sistema de baculovirus; sin embargo, al momento de comparar su reactividad con un panel de sueros frente a rRH2b y rMSP10, la versión recombinante, rEBA175 presentó bajos niveles de sero-reactividad por lo que no se siguió con su evaluación (Anexos, capítulo 3). Como una herramienta adicional se presenta la aplicación de la citometría de flujo en la detección de proteínas recombinantes producidas en células de insecto como método de tamizaje de expresión alternativo a western blot.

1.6.1.3.- Selección de péptidos para producción de anticuerpos que permitan la identificación de proteínas noveles de interés local: Ejemplos de aplicaciones en agentes infecciosos (Capítulo 4).

Tras haber obtenido proteínas recombinantes en el capítulo 3 se decide explorar la posibilidad de diseñar anticuerpos en base a las secuencias de péptidos inmunogénicos, este paso se describe en el capítulo 4 en donde se presentan parámetros de selección para el diseño de péptidos como una alternativa costo-efectiva para obtener anticuerpos que permitan identificar a la proteína de interés y que no presenten un anticuerpo disponible de forma comercial. Para evaluar estos parámetros, se utilizaron dos proteínas completamente distintas entre sí, una de ellas fue PfMSP10 (parásito) y la otra fue la proteína fibra-2 de un aviandenovirus (FadV-4). Tras este proceso se obtuvieron 3 péptidos sintéticos por cada proteína, los cuales fueron utilizados para producir anticuerpos policlonales en conejo y luego estos fueron evaluados en ensayos de western blot e inmunofluorescencia. Los anticuerpos obtenidos demostraron ser reactivos a las proteínas de interés en este trabajo.

Se seleccionaron péptidos para las proteínas PfRh2b y PfEBA175, sin embargo, los anticuerpos producidos no pudieron detectar las proteínas de interés y las proteínas recombinantes respectivas (Anexos, capítulo 4).

1.6.1.4.- Alta sero-reactividad de la proteína PfMSP10 de *Plasmodium falciparum* en sueros de individuos infectados con malaria en la amazonia peruana (Capítulo 5).

Con los productos obtenidos para PfMSP10 (un recombinante rMSP10 y 2 péptidos sintéticos), se realizaron ensayos de ELISA utilizando un panel amplio de sueros de pacientes catalogados como sintomáticos y asintomáticos para *P.falciparum* (capítulo 6); además de incluir sueros de pacientes infectados con *P.vivax*. Tanto rMSP10 y un péptido de PfMSP10 presentaron una sero-reactividad significativa diferencial entre los sueros del grupo *P.falciparum* (sintomáticos y asintomáticos) y el grupo *P.vivax*. Se realizaron ensayos de ELISA para los 9 péptidos (tres por

cada una de las 3 proteínas de interés), de los cuales sólo 2 péptidos diseñados para MSP10 reaccionaron, mientras que los 7 péptidos restantes brindaron valores muy cercanos al *cut-off* (punto de corte) o reaccionaban de forma simultánea con sueros de pacientes infectados con *P.vivax*. (Anexos, capítulo 5).

CAPITULO 2

Búsqueda bibliográfica de potenciales antígenos seroreactivos y su importancia en la baja transmisión de la malaria *falciparum* en el Perú.

Resumen

En la Amazonia Peruana, la transmisión de la malaria ocasionado por *Plasmodium falciparum* es considerada hipo-endémica y de baja intensidad, como consecuencia de ello tenemos la presencia de individuos infectados asintomáticos, que a su vez presentan parasitemias bajas, los cuales contribuyen a mantener la transmisión activa de la malaria. La detección de casos de malaria se da mediante el uso de la microscopía, cuyo uso se ve limitado en comunidades alejadas, donde no existen microscopios ni mucho menos microscopistas entrenados. Por otro lado, el uso de pruebas de diagnóstico rápido como alternativa de diagnóstico en regiones alejadas no tuvo mucho éxito en nuestra región debido a los costos y por la ausencia del gen *pfhrp2* que codifica la *proteína rica en histina II* de *P.falciparum*. Ante este escenario, se plantea la búsqueda de nuevas estrategias que contribuyan al control de la malaria como es la identificación de estos individuos asintomáticos o zonas de transmisión de la malaria para optimizar las intervenciones del Ministerio de Salud (MINSA). Para esto se plantea el uso de anticuerpos, presentes en sueros de individuos expuestos, como una herramienta para monitorear la transmisión en la región. Sin embargo, para la selección de estos nuevos antígenos parasitarios se debe tener en cuenta su perfil de sero-reactividad y la diversidad genética de estos marcadores en la Amazonia Peruana. Desde 1988 hasta el 2015 se han identificado 10 estudios en los cuales han empleado antígenos crudos o recombinantes en formato western blot, ELISAs y *proteinarrays* (arreglos de proteínas) con sueros de pacientes con malaria. Una descripción de cada resultado y su asociación con estudios de diversidad genética para cada antígeno es presentada en esta búsqueda bibliográfica con el objetivo de identificar sus potencialidades como proteínas antigénicas sero-reactivos de *P.falciparum* para nuestra región y su uso en el desarrollo de marcadores serológicos de transmisión.

2.1.- Introducción

La erradicación de la malaria en una región se alcanza cuando ocurre una reducción de la transmisión. Para lograr esto, la estrategia clave es contar con un sistema de diagnóstico rápido y tratamiento oportuno de la malaria (1). En el Perú, el diagnóstico de malaria se lleva a cabo principalmente mediante la detección microscópica de los estadios sanguíneos (trofozoitos, esquizontes y gametocitos), esta técnica es considerada como la prueba de oro o “*gold standard*”. Este método de diagnóstico tiene varias limitaciones, entre ellas tenemos el alto nivel de

entrenamiento del personal de laboratorio encargado de leer las láminas en el microscopio (microscopista), la necesidad de mantener un sistema de entrenamiento constante, control de calidad de las lecturas y mantenimiento de los microscopios. El uso de herramientas de diagnóstico molecular, tiene otras limitaciones, como el uso de equipos sofisticados, reactivos o material costoso y personal mucho más capacitado. Estas limitaciones provocan los fracasos de los programas de vigilancia y control implementados por los sistemas de salud, especialmente en las comunidades rurales, alejadas de los puestos o centros de salud, en donde el diagnóstico por microscopia no existe y por tanto deben enviar las láminas a los puestos de salud más cercanos, lo que puede tomar días o semanas, debido a que el acceso a las comunidades se da principalmente a través de vías fluviales (2, 3). Para solucionar estos inconvenientes, se han venido utilizando las Pruebas de Diagnóstico Rápido para malaria (PDRM) basados en la detección de antígenos parasitarios, que son de fácil uso por el personal de salud o el líder comunitario, para su implementación como herramienta de diagnóstico en las comunidades que carecen de un microscopio y/o microscopista. Sin embargo, estas pruebas presentan una serie de dificultades relacionadas a la genética del parásito (3), presencia de bajas parasitemias en los individuos infectados y condiciones ambientales difíciles para su transporte y almacenamiento (2, 4). El problema es mayor tras la aparición de los llamados “pacientes asintomáticos” o “reservorios humanos”, que presentan infecciones sub-microscópicas (5, 6) y que jamás asistirán a un puesto de salud por falta de síntomas y por tanto no serán detectados por la microscopia y por tanto no tratados, contribuyendo de esta forma a mantener la transmisión de la enfermedad en esta región. Por lo que los esfuerzos actuales para la erradicación de la malaria se enfocan en el diseño de nuevas estrategias de control con el uso de herramientas que puedan buscar, detectar y tratar a estos individuos infectados, sintomáticos y/o asintomáticos, con parasitemias muy bajas, para después medir y monitorear el impacto de estos programas o estrategias de control sobre la transmisión de la malaria en la región. Los actuales métodos de medición de la transmisión solo se basan en la detección de individuos infectados con síntomas, que se acercan a un puesto de salud en busca de diagnóstico, el cual se hace principalmente por microscopia (7).

En zonas donde se logre una disminución significativa de los casos clínicos y por lo tanto sólo queden individuos asintomáticos, se necesitarán otro tipo de aproximaciones o herramientas para medir o monitorear los cambios en la transmisión, y una de ellas es la serología. Una muestra de sangre puede contener información importante sobre el nivel de exposición a una determinada enfermedad, así como de niveles de Inmunidad Adquirida (INA) (7). Esta información la proporciona la concentración de anticuerpos en suero, la cual es estable cuando la transmisión es estacional y estos pueden ser medidos por métodos de fácil implementación como ensayos de ELISA (Por sus siglas en inglés “ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas”) (8), que se facilita más por la tecnología de antígenos recombinantes, que permitirá hacer mediciones no solo a nivel individual, sino también a nivel poblacional.

La selección de nuevos antígenos debe considerar factores propios de la región geográfica de interés, es decir determinar el comportamiento de los antígenos candidatos frente a sueros de pacientes locales, enfocándose en la detección de los individuos asintomáticos y teniendo en cuenta las características genéticas propias de los parásitos circulantes en la región (3, 9, 10), por lo que una búsqueda de antígenos candidatos se hace necesario en base a la evidencia reportada. Esta búsqueda bibliográfica tiene como objetivo resumir los hallazgos de los diferentes estudios reportados hasta el momento, que incluyeron el uso de antígenos recombinantes de *P.falciparum* ensayados en el Perú y presentaremos evidencia sobre los antígenos más relevantes para diseño de herramientas para sero-vigilancia.

2.2.- Criterios de inclusión de estudios

La búsqueda de los estudios fue realizada utilizando los términos: “*Plasmodium falciparum*”, “Peru” en el buscador de la base de datos del NCBI (Siglas en inglés para Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology). Se incluyeron todos aquellos estudios que presentaron resultados de ELISA y otros formatos similares (Proteinarray o western blot) empleando sueros de pacientes.

2.2.1.- Estudios identificados

De 125 estudios que aparecieron con los términos señalados, se seleccionaron 10 estudios (5, 11-18). Dentro de estos se identificaron aquellos realizados en el departamento de Cuzco y comunidades o distritos del departamento de Loreto (Amazonia Peruana), los cuales se realizaron entre los años 1988 y el 2015. Los estudios utilizaron desde antígenos crudos (lisados parasitarios) hasta proteínas recombinantes expresadas en sistemas procariotas, eucariotas y en sistemas libres de células. De la misma forma se identificó que un estudio (19), brindo muestras para su evaluación en 5 estudios (11-13, 17, 20). En un estudio se evaluaron 8 antígenos en formato ELISA (18), 3126 antígenos en formato Proteinarray (5) y en el resto de estudios se evaluaron en promedio entre 1 a 4 antígenos.

En esta revisión se puede identificar diferentes proteínas expresadas, las cuales están relacionadas con diferentes estadios del parásito y que han sido exitosamente evaluados en muestras de sueros de pacientes de provenientes de la región Amazónica. Tenemos la proteína CSP que está presente en la superficie del estadio esporozoito y que infecta los hepatocitos. También las proteínas RESA, PfMSP1, PfMSP3, PfMSP6, PfMSP10, EBA-140, EBA-175, EBA-181, PfRh1, PfRh2a/b, PfRh4, PfRh5, AMA-1 y GLURP; todas estas forman parte de estadio conocido como merozoito, así como MESA y Pf332 presentes en el estadio trofozoito del parásito. Los sistemas de expresión fueron la *Escherichia coli* (MSP1-19, PfMSP3, PfMSP6, PfMSP10, EBA-181, PfRh1, PfRh2a/b,

PfRh4, PfRh5, AMA-1 y GLURP); y el sistema eucariota como *Sacharomyces cerevisiae* (MSP1-19), *Pichia pastoris* (EBA-140, EBA-175, AMA-1) y baculovirus (EBA175), los cuales fueron utilizados en el formato de western blot, ELISA y sistemas similares (Proteinarray) frente a los sueros utilizados (Tabla 2.1).

2.3.- Antígenos

2.3.1. - Ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)

La proteína RESA es producida en el estadio esquizonte maduro, la cual es llevada por los merozoitos del parásito *P.falciparum* (21) y participa durante el proceso de restructuración del glóbulo rojo infectado post-invasión. Un estudio se llevó a cabo empleando sueros de pacientes provenientes de la selva - central del Perú (Cutiverini, Saoreni, y Puerto Ocopa en Cuzco) con lisados de cultivos de *P.falciparum* (16). Este estudio presentó resultados de que indicó un 26% (n=298) de los sueros reaccionaron de forma específica a la banda de la proteína RESA.

2.3.2.- Merozoite Surface Protein-1 (MSP1-19kD)

Esta proteína es expresada en el estadio merozoito del parásito y está involucrada en el proceso de adhesión del parásito al glóbulo rojo previo a la invasión (22). Torres *et al* (20), realizó ensayos de ELISA en suero de pobladores (no infectados, estudio de detección de casos activos) de diferentes edades cuya zona de origen fue la Amazonia Peruana, específicamente la Comunidad Zungarococha en Iquitos, Departamento de Loreto. En base a los resultados de ELISA se obtuvo una respuesta en niños entre 27–30% y en adultos entre 53–65%, en este estudio participaron un total de 600 personas. También se señala que la seroprevalencia a esta proteína fue estable durante un periodo de 18 meses. Sutton *et al* (17) con muestras del mismo estudio pero captados como casos activos, evaluó sueros en formato ELISA y estimó que de 105 individuos adultos provenientes de la misma comunidad el 59% fueron seropositivos. Clark *et al* (11), dentro del mismo estudio, demostró en pobladores no infectados (n=150) que existió un porcentaje de 47,7% que eran sero-reactivos y luego de realizarles un seguimiento por 30 días se encontró que después de tener una infección con *P.falciparum*, este porcentaje de sero-reactivos había aumentado a 71,8%.

Villasis *et al* (18) empleando sueros de individuos infectados con malaria sintomáticos (presencia de parásitos en sangre con síntomas) y asintomáticos (presencia de parásitos en sangre sin síntomas) provenientes de 14 comunidades de la Región Loreto – Amazonia Peruana; encontró que el 100% de los individuos asintomáticos eran sero-reactivos (8/8) mientras que solo el 54% (20/37) en el grupo de sintomáticos eran sero-reactivos.

Cabe resaltar que estos 4 estudios utilizaron la región de la proteína MSP1 conocida como 19kDa expresada *Sacharomyces cerevisiae* y cuya secuencia de origen fue la cepa *P. falciparum* Ugandan-PA (23).

2.3.3.- *P. falciparum* merozoite surface protein 3 (PfMSP3)

Al igual que MSP1 esta proteína pertenece a la misma familia de proteínas MSPs y es expresada en el estadio merozoito. Jordan *et al* (12) realizó ensayos de clonación con la región amino terminal y expresó la proteína en un sistema bacteriano demostrando luego su conformación mediante ensayos de difracción circular y utilizó este antígeno en un formato ELISA frente a suero de 362 pacientes infectados con malaria provenientes de la región Amazónica (Zungarococha). Este estudio reportó hasta un 91,2% de pacientes sero-reactivos.

2.3.4.- *P. falciparum* merozoite surface protein 6 (PfMSP6)

Esta proteína está relacionada con PfMSP3 y forma parte de un complejo proteico con MSP1 que en su conjunto llevan a cabo el proceso de invasión del glóbulo rojo (24). Jordan *et al* (13), expresó el dominio amino terminal de esta proteína en un sistema bacteriano y la evaluó en un formato de ELISA frente a sueros de 309 pacientes de la región Amazónica (Zungarococha) infectados con el alelo HB3 de *P. falciparum*, reportando hasta un 40,1% de sero-reactividad.

2.3.5.- Erythrocyte binding antigen 140 (EBA-140).

Esta proteína se enlaza a través de la Glicoforina C al glóbulo rojo, permitiendo la invasión (25). Villasis *et al* (18) utilizó como antígeno la región de EBA-140 comprendida entre los aminoácidos (aa) 141 al 756 el cual fue expresada utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Los sueros de individuos asintomáticos fueron sero-reactivos en 25,0% (2/8) y frente a los sueros de individuos sintomáticos estos sólo fueron reactivos en un 5,4% (2/37).

2.3.6.- Erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175).

Esta proteína cumple un rol importante durante la invasión al glóbulo rojo mediante su interacción con los ácidos siálicos de la glicoforina A, presente en los glóbulos rojos (26). Clark *et al* (11) utilizó la región II de la proteína EBA-175 que fue expresada en el sistema de baculovirus (26) y esta presentó sero-reactividad en el 56,9% de los individuos no infectados y luego de la infección presentaron la sero-reactividad subió a 66,2%. Villasis *et al* (18) empleó la proteína EBA-175 región II expresada en *Pichia pastoris* y según su estudio detectó que 100% (8/8) de individuos asintomáticos fueron sero-reactivos, mientras que solo el 32,4% (12/37) de los individuos sintomáticos presentaron reactividad.

2.3.7.-Erythrocyte binding antigen 181 (EBA-181).

Esta proteína se enlaza a la proteína 4.1R (Banda 4.1) del glóbulo rojo contribuyendo al proceso de invasión al glóbulo rojo (27). Villasis *et al* (18) expresó el dominio carboxilo terminal (1235–1345 aa) en un sistema bacteriano y evaluó su inmunogenicidad en sueros de individuos infectados generando los siguientes resultados: 88,0% (7/8) de los asintomáticos reaccionaron y 21,6% (8/37) dieron respuesta en los sintomáticos.

2.3.8.-Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homologue (PFRh)

Al igual que los EBAs estas proteínas están involucradas con el proceso de invasión al glóbulo rojo, permitiendo identificar vías de invasión al glóbulo (28).

2.3.8.1.-PFRh1

Esta proteína permite enlazarse al receptor Y (receptor resistente a quimiotripsina, neuramidasa y tripsina) en el glóbulo rojo (29). Villasis *et al* (18) expresó la región carboxilo terminal (1318–1574 aa) en sistema bacteriano y lo evaluó en sueros de individuos infectados con malaria. Reportando sero-reactividad en individuos asintomáticos (100%, 8/8) y sintomáticos (82,5%; 32/37).

2.3.8.2.-PFRh2 a/b

Esta proteína permite enlazarse al receptor Z (receptor resistente a tripsina, neuramidasa y sensible a quimiotripsina) en el glóbulo rojo. Villasis *et al* (18) expresó la región carboxilo terminal de PFRh2a (2813-2933 aa) y PFRh2b (2735–3133 aa) en sistema bacteriano. Para PFRh2a, en individuos asintomáticos se reportó 75,0% (6/8) de reactividad y en sintomáticos 75,7% (28/37); mientras que para PFRh2b en asintomáticos se reportó 75,0% (6/8) de reactividad y en sintomáticos 21,6% (8/37) fueron sero-reactivos a esta proteína.

2.3.8.3.-PFRh4

Esta proteína se enlaza a un receptor no caracterizado (receptor resistente a quimiotripsina y neuramidasa) en el glóbulo rojo. Villasis *et al* (18), empleó la proteína de un estudio previo que expresó la región 1160–1370 aa en *E.coli* (30). Se reportó que este antígeno reacciono en el 71% de sueros de individuos asintomáticos (5/7) y en 47% (17/36) de los sueros de individuos sintomáticos.

2.3.8.4.-PFRh5

Contribuye a la invasión mediante la unión a la proteína “Basignina humana” y se ha demostrado que es de vital importancia para el parásito (31). Una región de PFRh5 (31–174aa) fue expresada en *E.coli*, para luego ser evaluada con sueros de individuos asintomáticos generando reactividad

en el 25% (2/8) de las muestras; y en sueros de individuos sintomáticos se presentó reactividad con el 8.1% (3/37) (18).

2.3.9.- Apical membrane antigen 1 (AMA-1)

Esta proteína tiene un rol importante durante el proceso de invasión al glóbulo rojo de los merozoitos ya que anticuerpos dirigidos a esta proteína, son capaces de bloquear la invasión del parásito al glóbulo rojo (32). Clark *et al* (11) utilizó este antígeno expresado en bacterias y cuya región es conocida como la zona de ecto-dominio (32). Evaluó los títulos de anticuerpos para dicha proteína en suero de individuos no infectados (50,8%) y luego de su infección (45,9%) en un grupo de 150 individuos provenientes de la comunidad de Zungarococha. Rosas *et al* (15), utilizó la misma región del ecto-dominio de AMA-1 pero expresada en *Pichia pastoris* (33) y reportó los siguientes resultados: un 7% (n=42) de sero-reativos que presentaban un resultado de PCR negativo a *P.falciparum* y un 20,6% (n=7) de sero-reativos que contaban con un resultado de PCR positivo o presencia de parásito en sangre.

2.3.10.- Circumsporozoite protein (CSP)

Esta proteína tiene una función crítica durante la invasión del estadio esporozoito a los hepatocitos luego de una infección por mosquito. Clark *et al* (11) empleó este antígeno (no se menciona el sistema de expresión de la proteína salvo que fue donado por el Dr. David Lanar - Walter Reed Army Institute of Research) en ensayos de ELISA para evaluarlo en 150 pacientes post - infección de la comunidad de zungarococha encontrando un 45,9% de sero-reactividad.

2.3.11.- Glutamate-rich protein (GLURP)

Esta proteína se encuentra presente en el estadio merozoito y anticuerpos contra esta proteína han permitido bloquear la invasión del parásito al glóbulo rojo (34). Rosas *et al* (15) empleó la región R2 de esta proteína expresada en sistema bacteriano (34) y muestra la asociación entre los resultados de PCR a *P.falciparum* y su relación con su sero-reactividad a GLURP-R2 en individuos expuestos de la región Loreto (distrito de San Juan al sur de Iquitos). Se reportó que 13,9% (n=83) de los individuos con PCR negativo presentaron sero-reactividad y que un 38,2% (n=13) de los individuos con PCR positivo presentaron sero-reactividad. En un segundo estudio llevado por Rosas *et al* (35) utilizando la misma proteína en una región distinta a la Amazonia (Provincia de Sullana en la Costa Norte Peruana) reportó una sero-reactividad de 9,8% (n =2653) en un estudio poblacional de seroprevalencia.

2.4.- Pf824 microarray

Torres *et al* (5), realizó este ensayo mediante la tecnología conocida como protein-array utilizando 3126 proteínas expresadas en un sistema libre de células para *E.coli*. Se emplearon 24 sueros de individuos infectados sintomáticos y 14 asintomáticos para *P.falciparum* provenientes de 17 comunidades y 1 distrito en Loreto. En este ensayo se identificaron a las proteínas más reactivas, entre las cuales destacan MSP1, PfRh2b, RESA, MESA y PfMSP10, para ambos grupos de individuos. También se detectaron a las proteínas MSP1, EBA-175, RESA y PfRh2b como proteínas que reaccionaron de forma más frecuente a los sueros de individuos asintomáticos frente los sintomáticos. Es importante mencionar, que aún queda por analizar proteínas de interés como la *liver stage antigen 3* (LSA3) dentro de la lista presentada por Torres *et al*, los cuales deben marcar el inicio de futuros estudios.

2.5.- Antígenos y diversidad genética

La proteína RESA fue evaluada para la región de la selva central peruana utilizando lisado parasitario, encontrándose una reactividad del 26%. Posteriormente, utilizando protein-array esta misma proteína fue detectada en individuos infectados con malaria (sintomática y asintomática) de la Amazonia peruana, como una de las más reactivas dentro del panel de detección. Sin embargo, un factor a tener en cuenta es la diversidad genética reportada para esta proteína en otras partes del mundo (21), la cual tendría un impacto en el desarrollo de la inmunidad (36), por lo que un estudio sobre la diversidad genética de esta proteína en cepas de *P. falciparum* locales se haría necesario antes de poder considerarlo como un potencial marcador serológico.

MSP1-19kDa ha sido ampliamente evaluado en nuestra región en 5 diferentes estudios (5, 11, 17, 18, 20), y se han presentado resultados de seroprevalencia variables, que puede ser por las diferentes zonas de estudio, las cuales pueden presentar condiciones epidemiológicas diferentes (15). De esta forma se presentan resultados de sero-reactividad en la comunidad de Zungarococha en adultos expuestos de hasta un 65% (20), adultos infectados de 59,1% (17), antes de la infección 47,7% y luego de la infección aumenta hasta un 71,8% (11). Posteriormente, Villasis *et al* (18) evaluó en sueros de individuos infectados con malaria de 14 comunidades obteniendo hasta un 100% de reactividad en asintomáticos y 54% en sintomáticos. Adicionalmente, esta fue una de las proteínas que fue más reactiva en los ensayos de protein-array (5), donde se utilizaron muestras de 17 comunidades de la Amazonia peruana. Sin embargo a pesar de que este antígeno es inmunodominante y se ha demostrado que el título de anticuerpos frente a esta proteína permanece por más de 4 meses en los pacientes (20), se han realizado estudios de diversidad genética en esta misma región y se han reportado hasta 7 haplotipos para MSP1 y 1 haplotipo para la región 19kDa de MSP1(37), estos haplotipos pueden restringir la respuesta inmune, como una prueba de ello es la falta de éxito de la vacuna basada en MSP1 (36).

La proteína PfMSP3 presentó una alta sero-reactividad (91,2%) para individuos infectados con la variedad HB3 o 3D7 y de 88,7% de sero-reactividad cruzada con la variedad K1 cuando se emplea la región amino terminal de PfMSP3, variedad HB3. Estudios de diversidad genética con esta proteína han indicado la presencia de estos dos alelos HB3 o 3D7 y K1 circulantes en la región de las comunidades de Zungarococha y alrededores (38). PfMSP6 no presentó un mayor reactividad comparado con PfMSP3 a pesar de ser utilizada con el mismo panel de sueros provenientes de un estudio realizado por Branch *et al* (19), esto sumada a la diversidad reportada para esta proteína en nuestra región (39), limitaría su uso como candidato como sero-marcador. EBA-140 no parece formar parte de los antígenos que evocan la inmunidad natural adquirida contra *P.falciparum* ya que probablemente no esté siendo expuesta. Esto explicaría los bajos porcentajes de sero-reactividad reportados (18). No existen estudios de diversidad para esta proteína con muestras de Perú; sin embargo se han reportado para cepas de laboratorio y otros aislados a nivel mundial (25).

EBA-175 fue detectado en el 100% de individuos asintomáticos tanto por ELISA en Villasis *et al* (18) y protein-array en Torres *et al* (5). Esta proteína es de especial interés para la comprensión de estos grupos de individuos infectados con malaria (con y sin síntomas) que predominan últimamente en la región Amazónica. Estudios de diversidad genética en esta proteína han sido reportados, en los cuales se indica la presencia de 3 variantes (14), estudios sobre el impacto de estas variantes en la respuesta serológica de individuos infectados con malaria deben ser realizados.

EBA-181 fue detectado en el 88% de individuos asintomáticos y en el 21,6% de sintomáticos (18); por lo que también sería un buen candidato, al igual que EBA-175, para discriminar entre infecciones sintomáticas y asintomáticas, sin embargo estudios son necesarios para confirmar estos reportes. En relación a la diversidad genética para el Perú, se han reportado hasta 4 variantes de esta proteína (14).

Para PfRh1 se obtuvieron resultados de sero-reactividad entre 82,5% y 100% en individuos sintomáticos y asintomáticos (18), lo que nos indicaría que este sería un buen candidato para marcador serológico; pero presenta una limitante con respecto a la variabilidad genética, ya que se han reportado 3 variantes de esta proteína (14). Con PfRh2a, en ambos tipos de individuos infectados con malaria (sintomáticos y asintomáticos), se obtuvo un 75% de sero-reactividad, habiéndose reportado 3 variedades de esta proteína (14, 18).

PfRh2b presentó un 75% y 21,6% de sero-reactividad en sintomáticos y asintomáticos (18) y fue una de las proteínas más reactivas en el panel de antígenos analizados por protein-array (5). Es importante mencionar que se debe considerar las dos variedades reportadas para esta proteína, así como las deleciones de 52 aa en su estructura, lo cual también ha sido reportado (14).

PfRh4 presentó reactividad en 71% de los sueros de individuos asintomáticos con respecto a los sintomáticos (47%) y presenta hasta 4 variantes proteicas reportadas para el Perú (14, 18).

Para PfRh5 una baja reactividad fue observada en casos clínicos con síntomas (8-25%) (18), una explicación puede ser que este antígeno haya sido expuesto por un periodo corto; pero también cabe la posibilidad de que los antígenos no estén correctamente conformados y sin las modificaciones postraduccionales necesarias ya que se empleó el sistema de expresión en *E.coli*, lo que puede haber influido en la falta de reactividad (40). No se han reportado variedades de esta proteína en nuestra región (14). Adicionalmente es importante mencionar que EBA-140, EBA-175, EBA-181 y los PFRHs, cuya diversidad ha sido reportada y estarían relacionados con los 6 nuevos perfiles de invasión al glóbulo rojo que presentan los parásitos de *P.falciparum* reportadas para la región Amazónica peruana (14).

Para AMA-1 se obtuvieron valores de 50,8% (11) y 20,6% (15) de sero-reactividad en casos clínicos infectados con *P.falciparum* y además presenta hasta 3 variantes reportados en nuestra región (37). La proteína CSP presentó cerca de 45,9% de sero-reactividad (11) y presenta 4 variantes genéticas (37).

GLURP presento valores de sero-reactividad de 38,2% en pacientes infectados con el parásito (15) en la Amazonia, además en la Costa norte peruana, reporto cerca de 9,8% (35) y presenta una alta variabilidad genética, hasta 6 genotipos diferentes del gen *pfglurp* (3, 41).

PfMSP10 tiene un peso de 57 kDa aproximadamente, la función de esta proteína sigue siendo desconocida. Se sabe que contiene 2 copias de los dominios conservados EGF en su extremo C-terminal que se anclan a la membrana del eritrocito y presenta niveles bajos de polimorfismos genéticos y a la fecha no se le han identificado alelos (42). MESA - “mature parasite-infected erythrocyte surface antigen” es una proteína de aproximadamente 300 kDa, y es una de las dos mega proteínas identificadas en *P. falciparum* que es exportada hacia el glóbulo rojo y que recientemente se ha demostrado su presencia en los sueros de pacientes (43) y no posee reportes de diversidad genética. La proteína Pf332 con un peso molecular de 332 kDa (considerada también una mega proteína) está involucrada en la cito-adherencia y deformación del glóbulo rojo, mediante interacción con la proteína actina del glóbulo rojo y la diversidad genética ha sido reportada para esta proteína en Honduras con la presencia de 2 alelos (44). Torres *et al* (5), identificó a PfMSP10, PfRh2b, MESA y Pf332 dentro de las proteínas más reactivas del panel de 824 proteínas evaluadas y reconocidas por suero de individuos infectados con malaria de diferentes comunidades de la región Amazónica.

Tanto para MESA como Pf332, sería necesario hacer estudios sobre diversidad genética en nuestra región, así como también identificar las regiones más inmunogénicas de estas dos proteínas que pueden ser un reto al momento de su expresión en sistemas eucariotas dado su gran tamaño.

2.6.-Perspectivas para antígenos de *P.falciparum* en nuestra región.

Una respuesta ideal de anticuerpos para monitorear la transmisión o una INA ideal debe ser aquella que persista por algunos meses para zonas de baja y moderada transmisión. Ya que una variación hacia el descenso en estos niveles de INA indicarían un incremento en el riesgo de provocar malaria clínica o una re-emergencia de esta enfermedad (7).

De algunos estudios se pueden desprender datos de sero-reactividad en individuos negativos a *P.falciparum* y que presentaron valores de reactividad de hasta un 65% para el caso de MSP1-19kDa (11, 15, 20, 35), sin embargo la presencia de variantes proteicas deben ser consideradas antes de su empleo en sero-vigilancia. Los estudios realizados con individuos infectados y clasificados en sintomáticos o asintomáticos son importantes, ya que nos permiten evaluar el comportamiento del antígeno en este grupo especial de asintomáticos, los cuales nunca asistirán a un puesto de salud en búsqueda de diagnóstico o tratamiento (5, 18) y serían los que mantendrían la transmisión. Sin embargo no se tiene suficiente información sobre la respuesta de este grupo especial de individuos frente a todos los antígenos que se han estudiado como posibles candidatos a sero-marcadores o vacunas, por lo que nuestra selección se ha basado solamente en la información disponible (genética y reporte de sero-reactividad).

Teniendo en cuenta los niveles de seroconversión expuestas, en especial en individuos con malaria *falciparum* asintomática y la diversidad genética de los antígenos parasitarios reportados a la fecha, se podrían considerar para nuestra región a PfMSP10 para futuros ensayos de validación en estudios sero-epidemiológicos para medir la INA, mediante estudios de cohorte longitudinales de pacientes similares a los realizados con MSP1-19 (7, 11-13, 17, 20), para verificar la persistencia la respuesta serológica a estos antígenos (antes durante y después de una infección), así como para monitorear cambios de transmisión en diferentes regiones endémicas a malaria. En un estudio realizado en Kenya (zona de alta transmisión de *P.falciparum*) utilizando proteinarray, se identificó a PfMSP10 y PfRh2b dentro de los antígenos más reactivos (45). En otro estudio realizado en Tailandia (zona de baja transmisión de *P.falciparum* y *P.vivax*), no se detectaron ninguna de las dos proteínas, siempre utilizando sueros de casos clínicos (46). Sin embargo; la proteína liver stage antigen 3 (LSA3) ha sido identificada en los ensayos de Perú, Tailandia y Kenya, y debería llamar la atención su potencial antigénico, así como para estudios de diversidad genética y seroprevalencia. EBA175 puede también ser considerado en base a los resultados ya publicados (5, 18) como un proteína que puede discriminar entre infecciones sintomáticas y asintomáticas; sin embargo hay que considerar las potenciales efectos de la diversidad genética.

Finalmente, otro parámetro a tener en cuenta es la cantidad de antígeno requerido para estas evaluaciones y el sistema de expresión heteróloga, el cual puede ser un sistema eucariota con el

objetivo de tener una mayor aproximación de la medición de la seroconversión. Debido a la facilidad para expresar proteínas en el sistema bacteriano, este es ampliamente utilizado por los estudios descritos previamente; sin embargo existen reportes de que fuentes diferentes de proteína (diferentes lotes de producción) pueden afectar la respuesta celular en ensayos *in vitro* (47), puede afectar el correcto plegamiento de la proteína (48), presencia de proteínas co-purificadas y producción de anticuerpos (49), cuando se compara el sistema procariota con el eucariota. Sin embargo, se requieren de estudios comparativos para asegurar que existen diferencias en el reconocimiento de los anticuerpos en relación a si el sistema de expresión utilizado es procariota u eucariota.

En los estudios analizados en esta revisión no se realizaron comparaciones en función al origen del antígeno, ya que los 10 estudios revisados tenían diferentes diseños (tipo de colección de muestras, temporadas de recolecta, entre otros), lo que hace difícil la comparación; sin embargo, la información presentada nos permite evaluar en forma general “como fue el comportamiento de los antígenos en las diferentes poblaciones”, brindándonos una idea de la sero-reactividad de estos antígenos en poblaciones de individuos expuestos a malaria, principalmente en la región Amazonia, área de interés en esta tesis (Tabla 2.1).

En zonas de baja transmisión de la malaria, como la Región Amazónica peruana, se está presentando la necesidad de implementar estrategias particulares, como la detección de individuos infectados con malaria pero asintomáticos, así como de individuos expuestos a la enfermedad. Para esto se necesita el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas (1), que involucren métodos de detección con alta sensibilidad para la detección de bajas parasitemias (superior al límite de detección de la microscopia y pruebas rápidas) y también el uso de la NIAs que nos permitan identificar focos de exposición para orientar a los programas de control. Por lo que el diseño de pruebas de detección de anticuerpos puede ser de gran utilidad para identificar en nuestra región estos focos de reciente transmisión de la malaria y áreas libres de malaria para vigilar una posible re-introducción, sobre todo en poblaciones o regiones con transmisión muy baja que ya estén entrando en etapa de eliminación. Finalmente, tras la revisión sólo se identificó un estudio para la región de la costa peruana (Piura) y un estudio para la región de selva central (Cuzco), que no es información suficiente para determinar patrones de respuesta serológica en estas áreas geográficas por lo que se sería necesario hacer más estudios sero-epidemiológicos en estas regiones con los antígenos candidatos a *P.falciparum*.

Tabla 2.1.- Antígenos seroreactivos reportados e identificados para malaria *falciparum* en el Perú.

Estudio	Año	Antígenos	Fuente de antígeno	Tipo de formato	Departamento	Comunidades	Descripción de muestras	Sero-reactividad (%) o Detección	Estudios de diversidad (Ref)
Sulzer <i>et al</i>	1988	RESA	Lisado parasitario	Western blot	Cuzco	3	Sueros de pacientes infectados	26	Mundial (21)
Torres <i>et al</i>	2008	MSP1-19kD	Recombinante – <i>S. cerevisiae</i>	ELISA	Loreto	1	Sueros de pacientes infectados y no infectados	30 (Niños expuestos)	Perú (37)
Sutton <i>et al</i>	2010							65 (Adultos expuestos)	
Clark <i>et al</i>	2012							59,1	
Villasis <i>et al</i>	2012				Hasta 71,8				
					Loreto	14	Suero de pacientes infectados catalogados como sintomáticos (Sym) y asintomáticos (Asy)	100 (Sym) 54 (Asy)	
Jordan <i>et al</i>	2011a	PfMSP3	Recombinante – <i>E.coli</i>	ELISA	Loreto	1	Sueros de pacientes infectados	91,2	Perú (38)
Jordan <i>et al</i>	2011b	PfMSP6						40,1	Perú (39)
Villasis <i>et al</i>	2012	EBA-140	Recombinante – <i>P. pastoris</i>	ELISA	Loreto	14	Suero de pacientes infectados catalogados como sintomáticos (Sym) y asintomáticos (Asy)	25 (Sym) 5,4 (Asy)	Mundial (25)
		EBA-175						100 (Sym) 32,4 (Asy)	Perú (14)

		EBA-181	Recombinante – <i>E.coli</i>					88 (Sym) 21,6 (Asy)	
		PfRh1						82,5 (Sym) 100 (Asy)	
		PfRh2a						75,7 (Sym) 75 (Asy)	
		PfRh2b						21,6 (Sym) 75 (Asy)	
		PfRh4						47 (Sym) 71 (Asy)	
		PfRh5						8,1 (Sym) 25 (Asy)	
Clark <i>et al</i>	2012	AMA-1	Recombinante – <i>E.coli</i>	ELISA	Loreto	1	Sueros de pacientes infectados y no infectados	50,8 (Pacientes no infectados) 45,9 (Pacientes luego de infección)	Perú (37)
Rosas <i>et al</i>	2015		Recombinante – <i>P. pastoris</i>	ELISA	Loreto	8	Sueros de pacientes infectados y no infectados	7 (Pacientes no infectados) 20,6 (Pacientes luego de infección)	

Clark <i>et al</i>	2012	CSP	No específica	ELISA	Loreto	1	Sueros de pacientes infectados y no infectados	45,9 (Pacientes luego de infección)	
Rosas <i>et al</i>	2015	GLURP	Recombinante – <i>P. pastoris</i>	ELISA	Loreto	8	Sueros de pacientes infectados y no infectados	13,9 (Pacientes no infectados) 38,2 (Pacientes luego de infección)	Perú (3,40)
Rosas <i>et al</i>	2013				Piura	1 Distrito	Sueros de pacientes infectados y no infectados	9,8	
Torres <i>et al</i>	2015	MSP1, PfRh2b, RESA, MESA, PfMSP10, EBA175	Recombinante – <i>E.coli</i>	Pf824 microarray	Loreto	17, 1 distrito	Suero de pacientes infectados catalogados como sintomáticos (Sym) y asintomáticos (Asy)	Detectados: MSP1, PfRh2b, RESA, MESA, PfMSP10 en Sym y Asy. MSP1, EBA175, RESA y PfMSP10 en Asy.	Perú (14,36) Mundial (41,43)

2.7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Diagnostics mCGoDa. A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. *PLoS medicine*. 2011;8(1):e1000396.
2. Bendezu J, Rosas A, Grande T, Rodriguez H, Llanos-Cuentas A, Escobedo J, et al. Field evaluation of a rapid diagnostic test (Parascreen) for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon. *Malaria journal*. 2010;9:154.
3. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*. 2010;5(1):e8091.
4. 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 *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PloS one*. 2012;7(8):e43094.
5. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(8):1342-51.
6. Torres KJ, Villasis E, Bendezu J, Chauca J, Vinetz JM, Gamboa D. Relationship of regulatory T cells to *Plasmodium falciparum* malaria symptomatology in a hypoendemic region. *Malaria journal*. 2014;13:108.
7. King CL, Davies DH, Felgner P, Baum E, Jain A, Randall A, et al. Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(3 Suppl):16-27.
8. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):13-36, Table of Contents.
9. Dharia NV, Plouffe D, Bopp SE, Gonzalez-Paez GE, Lucas C, Salas C, et al. Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome research*. 2010;20(11):1534-44.
10. Yalcindag E, Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Brisse S, et al. Patterns of selection on *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigens after the colonization of the New World. *Molecular ecology*. 2014;23(8):1979-93.
11. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and immunity*. 2012;80(4):1583-92.
12. Jordan SJ, Oliveira AL, Hernandez JN, Oster RA, Chattopadhyay D, Branch OH, et al. Malaria immunoepidemiology in low transmission: correlation of infecting genotype and immune response to domains of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Infection and immunity*. 2011;79(5):2070-8.
13. Jordan SJ, Oliveira AL, Neal AT, Hernandez JN, Branch OH, Rayner JC. Antibodies directed against merozoite surface protein-6 are induced by natural exposure to *Plasmodium falciparum* in a low transmission environment. *Parasite immunology*. 2011;33(7):401-10.
14. Lopez-Perez M, Villasis E, Machado RL, Pova MM, Vinetz JM, Blair S, et al. *Plasmodium falciparum* field isolates from South America use an atypical red blood cell invasion pathway associated with invasion ligand polymorphisms. *PloS one*. 2012;7(10):e47913.
15. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PloS one*. 2015;10(9):e0137458.
16. Sulzer AJ, Deloron P, Cantella RA, Collins WE, Nguyen-Dinh P. Antibodies to the ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* elicited by infection with *Plasmodium malariae*. *Infection and immunity*. 1988;56(4):729-33.
17. Sutton PL, Clark EH, Silva C, Branch OH. The *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 19 KD antibody response in the Peruvian Amazon predominantly targets the non-allele specific, shared sites of this antigen. *Malaria journal*. 2010;9:3.
18. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malaria journal*. 2012;11:361.
19. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria journal*. 2005;4:27.
20. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH. Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum*

- conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria journal*. 2008;7:173.
21. Moyano EM, Gonzalez LM, Cuevas L, Perez-Pastrana E, Santa-Maria Y, Benito A. Molecular cloning and characterisation of the RESA gene, a marker of genetic diversity of *Plasmodium falciparum*. *Molecular biology reports*. 2010;37(6):2893-902.
 22. Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Petres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Molecular cell*. 1999;3(4):457-64.
 23. Kaslow DC, Hui G, Kumar S. Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein (MSP1(19)) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1994;63(2):283-9.
 24. Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, Mucke N, et al. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(42):31517-27.
 25. Maier AG, Baum J, Smith B, Conway DJ, Cowman AF. Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 2009;77(4):1689-99.
 26. Ockenhouse CF, Barbosa A, Blackall DP, Murphy CI, Kashala O, Dutta S, et al. Sialic acid-dependent binding of baculovirus-expressed recombinant antigens from *Plasmodium falciparum* EBA-175 to Glycophorin A. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001;113(1):9-21.
 27. Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(5):341-54.
 28. Gao X, Yeo KP, Aw SS, Kuss C, Iyer JK, Genesan S, et al. Antibodies targeting the PfrH1 binding domain inhibit invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites. *PLoS pathogens*. 2008;4(7):e1000104.
 29. Lobo CA, de Frazao K, Rodriguez M, Reid M, Zalis M, Lustigman S. Invasion profiles of Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*: phenotypic and genotypic analyses. *Infection and immunity*. 2004;72(10):5886-91.
 30. Gaur D, Singh S, Singh S, Jiang L, Diouf A, Miller LH. Recombinant *Plasmodium falciparum* reticulocyte homology protein 4 binds to erythrocytes and blocks invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(45):17789-94.
 31. 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.
 32. Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Moch JK, Vassell MA, et al. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2002;70(6):3101-10.
 33. Faber BW, Remarque EJ, Kocken CH, Cheront P, Cingolani D, Xhonneux F, et al. Production, quality control, stability and pharmacotoxicity of cGMP-produced *Plasmodium falciparum* AMA1 FVO strain ectodomain expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*. 2008;26(48):6143-50.
 34. Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Høgh B. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1995;2(1):30-4.
 35. Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Speybroeck N, Cook J, Contreras-Mancilla J, Soto V, et al. Assessing malaria transmission in a low endemicity area of north-western Peru. *Malaria journal*. 2013;12:339.
 36. Barry A, Hansen D. Naturally acquired immunity to malaria. *Parasitology*. 2016;143(2):125-8.
 37. Chenet SM, Branch OH, Escalante AA, Lucas CM, Bacon DJ. Genetic diversity of vaccine candidate antigens in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon basin of Peru. *Malaria journal*. 2008;7:93.
 38. Jordan SJ, Branch OH, Castro JC, Oster RA, Rayner JC. Genetic diversity of the malaria vaccine candidate *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 in a hypoendemic transmission environment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(3):479-86.
 39. Neal AT, Jordan SJ, Oliveira AL, Hernandez JN, Branch OH, Rayner JC. Limited variation in vaccine candidate *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-6 over multiple transmission seasons. *Malaria journal*. 2010;9:138.
 40. Ord RL, Rodriguez M, Lobo CA. Malaria invasion ligand RH5 and its prime candidacy in

- blood-stage malaria vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(6):1465-73.
41. Hajar G, Padilla C, Marquino W, Falconi E, Montoya Y. Genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* isolates from Loreto, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96 Suppl 1:S137-40.
 42. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(5):978-86.
 43. Zainudin NS, Othman N, Muhi J, Abdu Sani AA, Noordin R. Mature Erythrocyte Surface Antigen Protein Identified in the Serum of *Plasmodium falciparum*-Infected Patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(6):1268-73.
 44. Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Stahl S, et al. Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60(1):30-4.
 45. Dent AE, Nakajima R, Liang L, Baum E, Moormann AM, Sumba PO, et al. *Plasmodium falciparum* Protein Microarray Antibody Profiles Correlate With Protection From Symptomatic Malaria in Kenya. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(9):1429-38.
 46. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Jain A, Taghavian O, et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: a challenge to malaria elimination. *Malaria journal*. 2016;15:333.
 47. Garraud O, Diouf A, Nguer CM, Dieye A, Longacre S, Kaslow DC, et al. Different *Plasmodium falciparum* recombinant MSP1(19) antigens differ in their capacities to stimulate in vitro peripheral blood T lymphocytes in individuals from various endemic areas. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(4):431-40.
 48. Kumar R, Angov E, Kumar N. Potent malaria transmission-blocking antibody responses elicited by *Plasmodium falciparum* Pfs25 expressed in *Escherichia coli* after successful protein refolding. *Infection and immunity*. 2014;82(4):1453-9.
 49. Victor ME, Bengtsson A, Andersen G, Bengtsson D, Lusingu JP, Vestergaard LS, et al. Insect cells are superior to *Escherichia coli* in producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. *Malaria journal*. 2010;9:325.

CAPITULO 3

Clonación y expresión de las proteínas: Merozoite surface protein 10, reticulocyte-binding homologue-2b y Erythrocyte binding antigen 175 de *Plasmodium falciparum* utilizando el sistema de expresión de células de insecto – Sf9.

Resumen

Las proteínas relacionadas con el proceso de invasión de *Plasmodium falciparum* al glóbulo rojo son las que actualmente concentran la atención de la comunidad científica, como posibles candidatos para combatir la enfermedad de malaria. PfMSP10 es una proteína que presenta, al igual que PfMSP1, dos dominios denominados factor de crecimiento epidermal (o EGF por sus siglas en inglés) convirtiéndolo en un potencial candidato a vacuna. Para las proteínas PfRh2b (*P. falciparum* reticulocyte-binding homologue-2b) y PfEBA175 (Erythrocyte binding antigen 175), existe evidencia que anticuerpos contra estas proteínas bloquean la invasión de *P. falciparum* y además estas proteínas son reconocidas por sueros de pacientes naturalmente infectados. A pesar de su importancia, existen pocos estudios que reporten su expresión de forma recombinante, los cuales se basan en sistemas bacterianos y no contemplarían las modificaciones postraduccionales que de forma reciente se está conociendo en *P. falciparum*. Para determinar el potencial uso de PfMSP10, PfRh2b y PfEBA175 en futuros estudios, se requiere de la obtención de la forma recombinante que guarde similares características a la proteína nativa. En este trabajo describimos la expresión de la proteína PfMSP10 en células de insecto Sf9 utilizando una secuencia del gen *pfmsp10*, en base a la secuencia de la cepa 3D7, previamente codon-optimizada para su expresión en Sf9. El único baculovirus recombinante obtenido fue utilizado para optimizar la expresión de proteína PfMSP10 recombinante al cual denominamos rMSP10. Valores de pureza y recuperación fueron obtenidos a partir de cultivos de 100mL de células Sf9, estos fueron 82.50% y 39.20% respectivamente. También se realizaron ensayos de clonación la región única del gen *prfh2b* (Glu2701-Fenil3188) a partir de un aislado natural de *P. falciparum* de la Amazonia Peruana. Se verificó su expresión mediante ensayos de western blot obteniendo una proteína de 53kDa al cual nombramos rRh2b y se complementaron estos ensayos mediante el empleo de citometría de flujo, la cual indico que un 90.72% de las células Sf9 expresaron rRh2b. De esta forma se obtuvo rRh2b a partir de 100mL de cultivo de células-Sf9 con una pureza de 64.28%, una eficiencia de recuperación en columnas IMAC de 56.84% y un factor de purificación de 4.63. Se logró clonar, expresar, purificar y obtener las proteínas PfMSP10 y PfRh2b de *P. falciparum* de forma recombinante (rMSP10 y rRh2b) que demostraron ser reactivas en sueros de pacientes infectados con *P. falciparum*, estas proteínas puede ser empleadas en estudios sero-epidemiológicos y funcionales. De forma adicional se logró clonar y expresar la proteína PfEBA175 (rEBA175); sin embargo no presentó reactividad frente a los sueros de pacientes y sólo se describe su obtención en los anexos del presente capítulo.

3.1.-Introducción

La invasión de *Plasmodium falciparum* a los glóbulos rojos es llevado a cabo por el estadio denominado merozoito y este utiliza una serie de proteínas que en conjunto se denominan

proteínas de invasión (1). Estas proteínas incluyen la familia de MSPs (merozoite surface proteins), cuya función consiste en iniciar el contacto entre el merozoito y el glóbulo rojo. PfMSP1 es la más estudiada y contiene dominios conocidos como EGF (epidermal growth factor) y el empleo de anticuerpos contra esta región han demostrado la inhibición del proceso de invasión por parte del merozoito (2). Los ensayos de expresión de las diferentes regiones de esta proteína utilizando distintos sistemas han sido reportados; y el uso de subunidades recombinantes que forman parte de la vacuna ha demostrado consistentes resultados en la protección frente a *P. falciparum* (3). Los otros miembros de la familia MSPs han sido estudiadas en función a la presencia de las regiones conservadas en relación a PfMSP1(4). De esta forma Black *et al* (5) reportó una nueva proteína con características similares a PfMSP1, y a la cual la denominó PfMSP10 que se ubicaba en la región apical de los merozoitos y contenía 2 dominios EGF cercanos a la región carboxilo terminal y su función es desconocida. Los dominios EGF, están conformados por 6 residuos de cisteína y la secuencia propia del dominio EGF, la función de este dominio es desconocida, no obstante se cree que está asociada a la promoción del crecimiento y al reconocimiento proteína-proteína en los merozoitos y gametocitos (4). MSP10 al igual que MSP1, también está sujeto a procesos de clivajes (6), por lo que su estudio tiene cada día más interés. El gen que codifica esta proteína se ubica en el cromosoma 6 del genoma y va desde el nucleótido 851,378 hasta el 852,955 el cual abarca 1,577 pares de bases (pb) en longitud (7).

La producción de proteínas recombinantes se ve limitado por la capacidad de los sistemas de no igualar en propiedades a las proteínas nativas, como son las modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones y modificaciones de glicosilfosfatidilinositol) y plegamiento natural de estas, los cuales son muy importantes para el correcto reconocimiento por parte de sueros de pacientes infectados (8). De la misma forma, la escalabilidad de estos sistemas es un factor limitante. Un sistema ideal de producción de proteínas se daría por un sistema de expresión de células mamíferas, pero las condiciones de cultivos de estas son muy demandantes. Recientemente se ha venido adoptando el sistema de producción de proteínas recombinantes en células de insecto (*Spodoptera frugiperda* – Sf9) para producir diferentes proteínas recombinantes. La versatilidad de este sistema se encuentra en los rápidos tiempos de respuesta frente a una demanda real, como lo fueron las epidemias de Ébola (9) y Chingunkunya (10) en donde se registraron grandes cantidades de proteínas. Este sistema de expresión en células de insecto depende de obtener un baculovirus recombinante, el cual se logra bajo condiciones básicas de laboratorio (clonación de vectores y aislamiento de bácmidos) y puede tomar entre 2 a 4 semanas. Con el baculovirus se llevan a cabo procesos de producción de proteínas infectando células de insecto. Estas células no requieren una demanda técnica alta para su mantenimiento, como sí lo requieren las células de mamífero. Siendo sus condiciones para el cultivo: porcentaje de CO₂ mínimas o nulas, temperaturas de crecimiento entre 25 a 28°C, crecimiento en ausencia

de suero fetal bovino, crecimiento en suspensión celular pudiendo llegar a densidades celulares entre 3 a 5 millones de células por cada mililitro, tiempo de producción de proteínas entre el día 2 y 5 posinfección, tamizaje de variables de expresión, facilidad de crio preservación de los stocks virales, procesos de lisados sencillos sin el empleo de complejos detergentes para el caso de proteínas intracelulares y lo más importante, que sean inocuos e inofensivos al ser humano (11). Por estos motivos el sistema de expresión de baculovirus es un sistema idóneo para la producción de proteínas recombinantes y en especial de proteínas del parásito *Plasmodium spp* como lo vienen realizando otros grupos de forma reciente (12-16).

La proteína *P. falciparum* reticulocyte-binding (PfRh), también conocida como *normocyte-binding protein*, está localizada en el robtries del merozoito y es liberada para enlazarse a receptores del glóbulo rojo para iniciar las interacciones con las proteínas MSP (proteínas de superficie del merozoito) (17). En *P.falciparum* existen hasta 6 genes PfRh, de estos PfRh2a y PfRh2b son idénticos hasta el aminoácido 2,776 luego empieza la región conocida como independiente o única y son secuencias específicas para PfRh2a y PfRh2b (18). La presencia de anticuerpos contra PfRh2b han demostrado ser protectivos en pacientes infectados con *P.falciparum* (19), de la misma forma anticuerpos producidos en ratones han demostrado ser efectivos en bloquear la invasión *in vitro* (20) y la proteína es reconocida de igual forma por individuos infectados con *P.falciparum* catalogados como sintomáticos y asintomáticos en regiones de baja transmisión como la Amazonia Peruana, utilizando el formato de protein-array (21). El importante rol de PfRh2b en la invasión, así como la habilidad de ser reconocido por anticuerpos específicos para bloquear la invasión y su posible relación con la protección frente a malaria en individuos expuestos, le otorgan un rol potencial como marcador serológico a corto plazo (21, 22). Son pocos los estudios que han reportado la obtención de la proteína PfRh2b de forma recombinante (17, 19, 21, 23) y todos se basan en el sistema bacteriano. Teniendo en cuenta que esta proteína forma parte de un complejo sistema de interacción con el glóbulo rojo, previa a la invasión, por lo que no se debe descartar la presencia de modificaciones postraduccionales en las proteínas, las cuales no serían otorgadas por los sistemas bacterianos de expresión. Recientemente, Swearingen *et al* (24) ha demostrado la presencia de glicosilaciones en la superficie de proteínas de invasión del estadio esporozoito de *P.falciparum*. Este hallazgo nos indica la necesidad de un sistema de expresión de proteínas heterólogas diferente al sistema bacteriano para expresar proteínas de *P.falciparum* que presenten un potencial uso para vacunas o como biomarcadores.

En el presente estudio se utilizó el sistema de expresión de células de insecto –Sf9 para la producción de rMSP10 (Proteína recombinante PfMSP10) empleando una secuencia original del gen *pfmsp10* y una secuencia *pfmsp10* previamente codon-optimizada para células de insecto-

Sf9. De la misma forma dada la importancia de la proteína PfRh2b, en esta tesis también realizamos la clonación, expresión y purificación de la proteína PfRh2b de *P.falciparum* en células de insecto Sf9. Luego se evaluó la antigenicidad de ambas proteínas rMSP10 y rRh2b frente a sueros de pacientes infectados por *P.falciparum* provenientes de la Amazonia peruana.

3.2.-METODOLOGIA

Se siguió el diagrama de flujo presentado en la figura 3.1, en donde se presenta todo el proceso de obtención de proteínas recombinantes hasta su evaluación por ELISA para las proteínas estudiadas.

3.2.1.-rMSP10

3.2.1.1.-Extracción de ADN a partir de cultivos *P.falciparum*.

La cepa 3D7 de *P.falciparum* (obtenida del Centers for Disease Control and Prevention, USA) fue cultivada siguiendo condiciones reportadas previamente (25). Cuando los cultivos alcanzaron parasitemias mayores al 5%, se procedió a extraer el ADN genómico por el método de fenol-cloroformo (26) para iniciar de esta forma con la construcción de los vectores recombinantes.

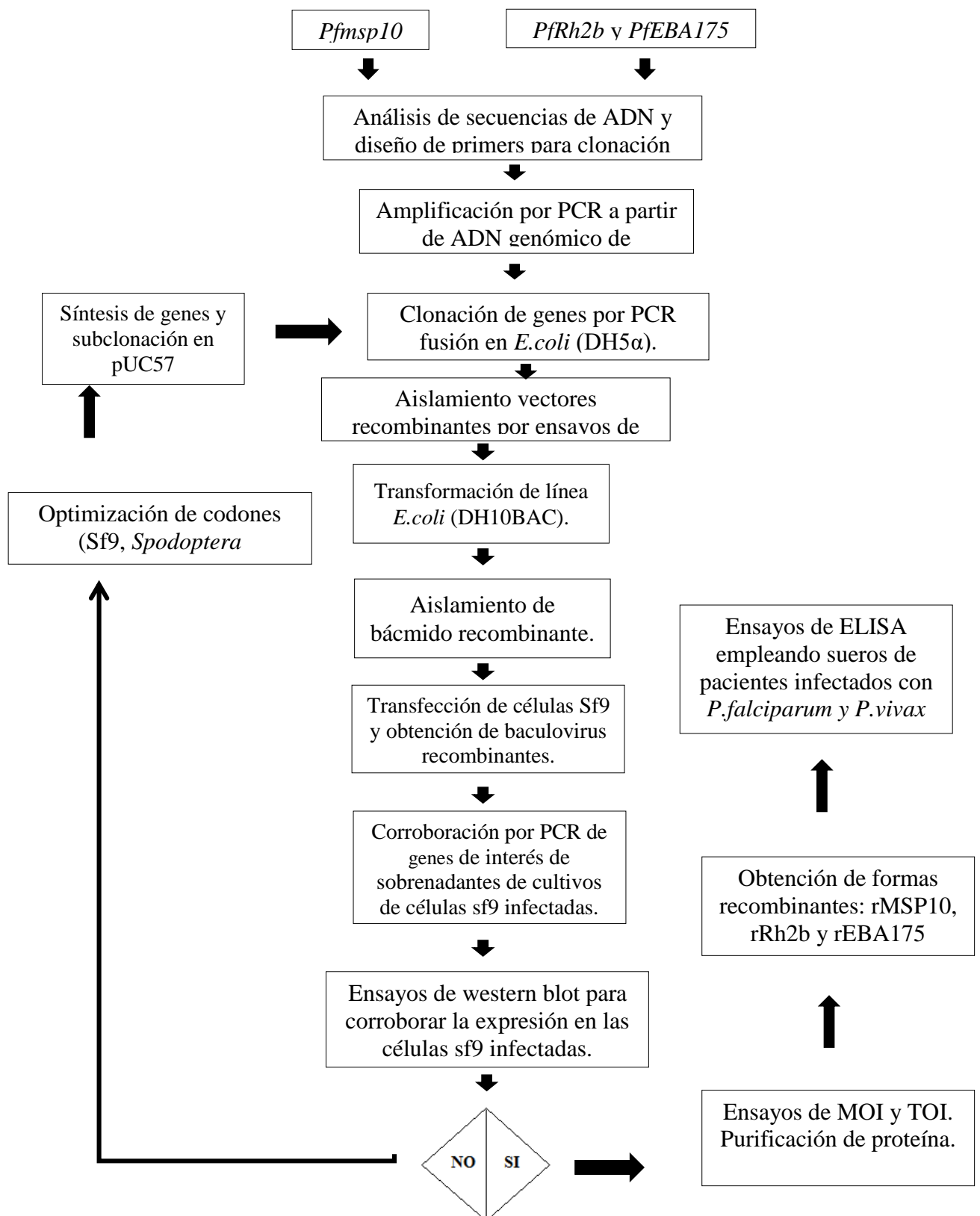


Figura 3.1.- Diagrama de flujo para el proceso de clonación y expresión de las proteínas PfMSP10, PfRh2b y PfEBA175 de *P.falciparum* empleando el sistema de baculovirus.

3.2.1.2.-Suero de pacientes.

Para los ensayos de sero-reactividad se emplearon suero de individuos infectados con *P.falciparum* (PE01F05 y PE01F19) y sueros de individuos infectados con *P.vivax* (PV22 y PV23) obtenidos de un estudio previo realizado en la región Amazónica peruana (Loreto-Perú) (27). Además, se incluyó suero de donadores sanos de una región no – endémica para Malaria (Lima-Perú). El presente estudio formo parte de un protocolo previamente aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú (Código SIDISI: 61540).

3.2.1.3.-Construcción de vector recombinante a partir de ADN parasitario.

Se utilizó el kit Gibson Assembly™ (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) que permite unir un producto de PCR con un vector digerido. Para lograr esto, los primers deben tener secuencias específicas al gen de interés, secuencias espaciadoras (linker) y una secuencia complementaria a la zona del vector previamente digerido con enzimas de restricción. Para el diseño de los primers se ingresaron las secuencias del vector pFastBac™ Dual indicando los puntos de restricción (EcoRI y HindIII), la secuencia del gen *pfmsp10* (1,440 pb), excluyendo las regiones entre 1-78pb y 1,519-1,578 bp. Además se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones: un mínimo de overlapping de 15 pb y una longitud mínima de fragmento de 150 pb en el servidor NEB builder (<http://nebuilder.neb.com/>).

Tabla 3.1.- Primers empleados para amplificar el gen *pfmsp10* a partir de ADN parasitario.

Primer	Secuencia (5'→3')
<i>pfmsp10</i>	gtccgaagcgcgcg atgcatcaccatcaccatcac
F	ATGATGTTTTTTAAGTGTAATCAGG
<i>pfmsp10</i>	tctagtactctcgaca TTAATGAAAAATTTGAAAACTAACAATATTAC
R	

En letras minúsculas se encuentran las regiones complementarias al vector pFastBac™ Dual; en mayúsculas se encuentra las secuencias específicas para el gen *pfmsp10*, subrayado está la secuencia codante para la cola de 6-histidinas y en negrita el codón de inicio

Luego se realizó una PCR utilizando el sistema Q5™ High Fidelity 2X Master Mix (1X) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA); Primers *pfmsp10* – F/R (0.5 uM) descritos en la Tabla 3.1, con 600 ng de ADN (extraído previamente de la cepa 3D7 de *P.falciparum*) y en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de ciclaje fueron 98°C x 1 min seguido de 40 ciclos a 94°C x 30s;

53°C x 30s y 72°C x 2 min, con una extensión final de 72°C x 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con una solución de Sybr Safe 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Luego se purificaron las bandas de aproximadamente 1,500 pb utilizando el kit de extracción de Qiaquick (Qiagen, Hilden, Mettmann, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante, los eluidos finales fueron almacenados a 4°C hasta su posterior uso. Se tomó 200ng del vector pFastBac™ Dual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) previamente digerido con las enzimas de restricción EcorI y HindIII (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), el cual fue mezclado con 5 µL de las bandas de PCR purificados previamente y se incubaron con 10 µL de Gibson Assembly master mix (2X) y agua en un volumen final de 20 µL. Se llevó a incubar a 50°C durante 60 minutos, luego se siguió con las instrucciones del fabricante Gibson Assembly para la obtención de colonias bacterianas recombinantes utilizando como medio de selección LB-agar con el antibiótico ampicilina (100 ug/ml) se incubaron las placas toda a la noche a 37°C. Se aislaron los vectores de las colonias seleccionadas y se verificó el marco de lectura mediante reacciones de secuenciamiento (Macrogen, Beotkkot-ro Geumcheon-qu, Seol, Rep. of Korea). Los vectores recombinantes aislados se utilizaron para iniciar los ensayos de obtención de baculovirus recombinante.

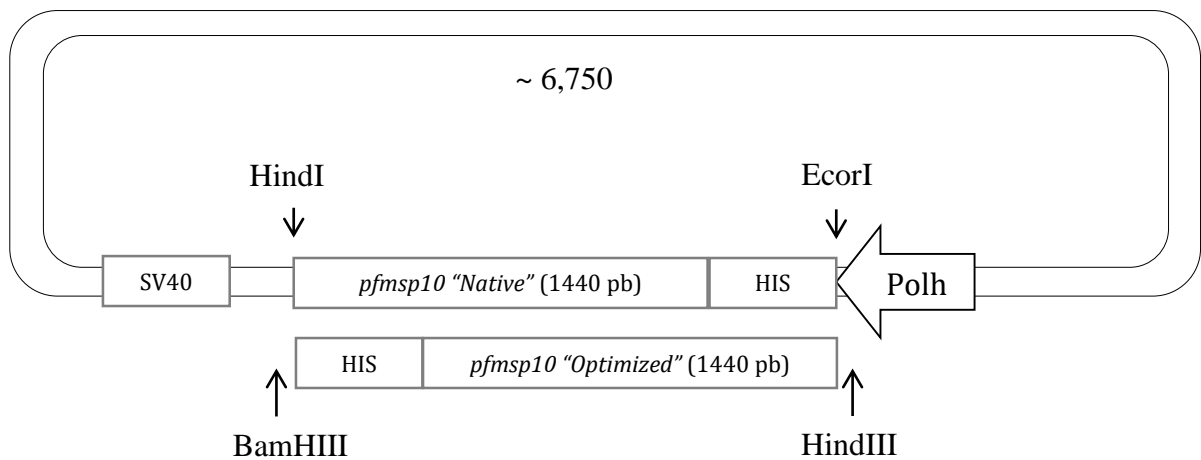


Figura 3.2.- Esquema del vector pFastBac™ Dual modificado con las inserciones de los genes *pfmsp10* nativo y codon optimizado. His: Cola de histidina; SV40: terminador SV40 de poliadenilización. HindIII, BamHI y EcorI: Son los sitios de restricción en donde se insertaron los genes.

3.2.1.4.-Construcción de vector recombinante a partir del gen *pfmsp10* codon - optimizado.

El gen *pfmsp10* fue codón-optimizado para la expresión en células de insecto utilizando la secuencia depositada en PlasmDB (PF3D7_0620400) (7), se excluyeron las secuencias con potencial dominio trans-membrana (Figura 3.3).

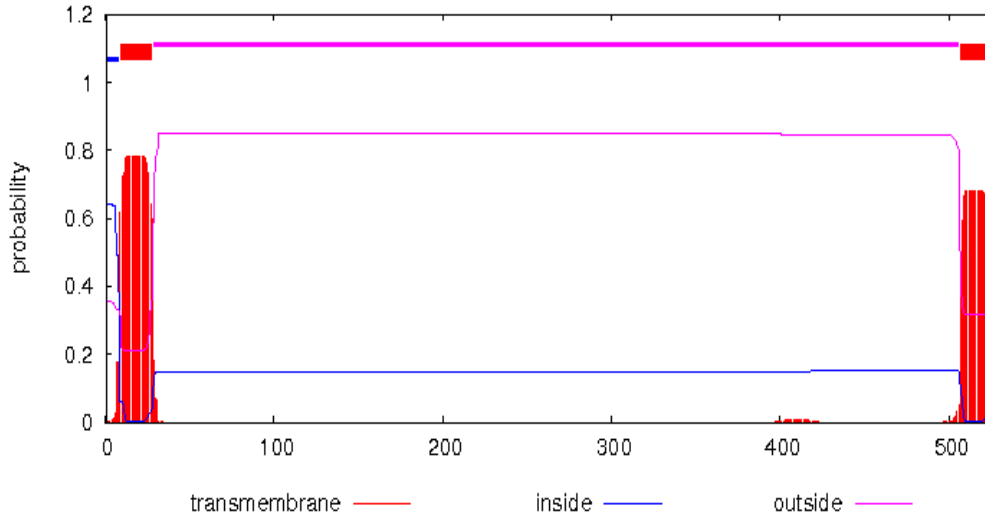


Figura 3.3.- Análisis de la proteína PfMSP10 utilizando TMHMM v. 2.0 server para identificar las regiones trans-membrana y péptido señal en los 525 aa de la proteína. Las predicción están en líneas rojas: 1 – 26 aa (1 – 78 nt) y 507-525 aa (1,519-1,575bp). El servidor está disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

Se colocó la cola de histidinas en el lado carboxilo de la proteína (figura 3.2) y se sintetizó el gen *pfmsp10* en el vector pUC57 (OptimunGene™, Genscript, Piscataway, NJ, USA). Seguidamente se clonó en el vector de expresión pFastBac™ Dual utilizando los primers F1 (5'ATTGGATCCATTATGCACGTGGATGACATCAAG 3') con sitio BamHI (letras subrayadas) y R1 (5'TTAAAGCTTTTATTAATGATGATGATGATGATGATGCTTG 3') con el sitio de restricción HindIII (letras subrayadas); el codón de inicio y stop se encuentran en negritas. Se verificó el marco de lectura con secuenciación obteniendo la nueva secuencia para *pfmsp10* (Figura 3.4).

```

1   CACGTGGATG ACATCAAGAA CACCAGCCAA AAGAAAATTA CTTACGACAA GTACAACAAA
61  AACAAAGGAGA ACATGAACAA CGAAAAGAAC GACAACAAAG ATAACAAGGA CAACATCTAC
121 AACGATAACA TTAACAACGA CAACATCAAC AACGACAACA TTAACAACGA GGACGAATAC
181 AAGTTCCTCT CAATGAAACA CTACAAGGAC TCCCTCTCTA ACAAGTTGAA CAACGAGAAC
241 GATCATATGA ACTACTTGAT CAGGAAAAGA AAGGACAACA CCCAGGGCAG TCAACACTTC
301 AACGAGAACA TCGAAAACAA CGAGAACGTC GAAAACAACG AGAACATTGA AAACAACGAG
361 AACAAACGAAA ACATTGAAAA CATCGAGAAC AACGAAAACA ATGAGAACAA CGAGAACATC
421 GAGAACAACG AGAATAATGA GAATAATGAG AACTCCAGCA TCATGAACTC TGAGTCATAC
481 AACAAACATCA TTAACTCCAA CGAACACAAC GAGGAACAAA TCAAGAAAAA GGAGGAAGAC
541 CTCATCGAGG CCTTCTTCCC ATTCATTTTG AAAAAGCTGG ACAACGAAAG TCTGTCGCTC

```

601 GATAACAAGT ACGACGATTA CTACAACCTG CCTAACGATC ACAACGACAC CCATAAGGAG
 661 AACTCTTCAG ATCATAACCT GCTCGGATAC AAGCTGGGTA ACAACCTCAA ATCATACTTG
 721 ATCGAGGAAA ACGACGTCAG TCAGAAAAAG ACTGACGATA TTAACGAGTC GGCTAGTTCC
 781 GATTCCGAGA ACATCCAAGA AATTTTGTCC ACAGACAGCA ACACGTCTCA CCTGAAAGAA
 841 AGGAAGAACC AGAAAGCTCC TCCCGGAGAG CATAAGCCTG AAGTCAAAAA CGCATTGCTG
 901 AACTCACAGG TTGCGAGTCC CAAGGGAGAG GACGAGAAGA AGTCCCAGCC ACAACACCCG
 961 CTGGTGA ACT CCGGCGACCA GCTCCAACAT CCCAAGGAAA TCGATGAGAA CGCAGAAAAG
 1021 ATTCGCCGTA CACTCTTGAA GGAGTCCCGC GACATCAAAA ACACCACTGC CATCATTGAT
 1081 GAGACAGTCT ACAAGTTCGA ACAACTGATC ATGAAAGGAA GGTACTACGC TACGGCCGTTG
 1141 AGAAACTTCG TCATCTTCAA GGTAACTAC ATTTGCGAGT ACAGCAAGTG TGGTCCAAAC
 1201 TCTCGTTGCT ACATCGTTGA GAAAGATAAG GAACAGTGCC GCTGTGCTCC AA ACTACATC
 1261 GTGGACATGA GCGTCAACTA CTTCAAGTGC ATTCGATGA AAGATATGAA CTGTTCTAAG
 1321 AACAAACGGTG GCTGCGACGT GAACGCTGAG TGTACGATCG TTGAAGGCGC CGTGAAGTGC
 1381 CAGTGTCCC ACCTGTACTT CGGAGACGGT GTCTTCTGTG TCAAAA ACTC TCAAACCAAG
 1441 CATCATCATC ATCATCATCA TCAC

Figura 3.4.- Gen *pfmsp10* codón optimizado (79 – 1518 nucleótidos). Letras subrayadas representan los nucleótidos que codificarán la cola de histidinas.

3.2.1.5.-Obtención del baculovirus recombinante.

Se descongelaron los viales conteniendo células competentes de bacterias MAX EfficiencyTMDH10Bac™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conservadas a -80 C y los vectores recombinantes en hielo por 10 min. Para cada transformación se mezcló suavemente y se transfirieron 100µL de las células DH10Bac™ en un vial de 2 mL de base redonda previamente enfriado. Se añadió 200 ng del vector y se mezcló suavemente. Se incubó la mezcla en hielo por 30 minutos. Se realizó un “shock térmico” a la mezcla durante 45 segundos a 42°C. Se dejó reposar la mezcla en hielo por 2 min. Se añadió 900µL de medio SOC temperado (SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA). Se incubó a 37°C, 250 rpm durante 4 horas. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10min, se retiró 800uL de sobrenadante y se resuspendió suavemente el pellet bacteriano con el sobrenadante. Se sembró en placas temperadas de agar LB conteniendo kanamicina (50µg/ml), gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml), Bluo-gal 100 µg/ml e IPTG (40 µg/ml) (SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA) y se incubó a 37°C por 48 horas. Una vez obtenidas las colonias con los bácmidos recombinantes (colonias blancas), se realizó un segundo paso de aislamiento de las colonias por sembrado en estrías y se incubó bajo las mismas condiciones. Para su amplificación se picaron colonias blancas y se cultivaron en matraces con 100mL de medio líquido LB conteniendo kanamicina (50µg/ml), gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml) y se incubo a 37°C, 250 rpm por 24 horas.

Luego se realizó la extracción de bacmidos recombinantes con el QIAprep spin Midiprep Kit (Qiagen, Hilden, Mettmann, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se definió el rendimiento e integridad del bacmido mediante la cuantificación en Qubit V1.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y electroforesis en gel de agarosa 1% preparadas con Sybr safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los bacmidos se conservaron a -20°C hasta su uso en la transfección.

Una vez obtenidos los bacmidos recombinantes se procedió a construir los baculovirus recombinantes transfectando células de la línea celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ensayo se ejecutó en placas de 6 pozos (6-well). Un día antes de la transfección se prepararon las placas conteniendo 10^6 células (con una viabilidad mayor al 90%) por cada pozo e incubando a 27°C. Para cada muestra a transfectar se preparó el complejo Cellfectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) – ADN siguiendo las indicaciones del fabricante con la variación en el tiempo de incubación a 27°C que se realizó durante 7 días. Luego se cosecharon las células a 3000 rpm a 20°C por 10 min y se transfirió el sobrenadante a tubos de color caramelo de 2mL de volumen y se almacenó a 4°C hasta su uso, a esta generación de virus se le nombró P0. Se amplificó la cosecha inicial de baculovirus recombinantes mediante 3 pasajes sucesivos, los dos primeros en flasks de 75cm² y el último en flasks de 225cm² a una multiplicidad de infección de (MOI) entre 0.1 y 5. Los sobrenadantes fueron llamados “P1 y P2” se procedió a realizar una extracción de ADN, utilizando el kit DNAeasy (Qiagen, Hilden, Mettmann, Germany) para luego realizar una PCR para la detección del gen *pfmsp10* utilizando los primers:

Ext-*pfmsp10F* (5`ATGATGTTTTTTAAGTGTAATCAGG`3)

Ext-*pfmsp10R* (5`TTAAATGAAAAATTTTGAAAACTAAC`3)

Las condiciones de amplificación fueron Q5 High Fidelity 2X Master Mix (1X) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA); Primers *pfmsp10* – F/R (0.5 uM) con 100 ng de ADN extraído y en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de ciclaje fueron 98°C x 1 min seguido de 40 ciclos a 94°C x 30s; 60°C x 30s y 72°C x 2 min, con una extensión final de 72°C x 7 min.

3.2.1.6.-Expresión de la proteína pfMSP10 (rMSP10).

Utilizando la P2 se procedió a evaluar el MOI y TOI de los baculovirus recombinantes. Para esto se prepararon matraces de 250 mL y se sembraron 0.8×10^6 células de insecto

en un volumen de 100 mL, se dejó en agitación (300 rpm / 27°C) durante toda la noche. Al día siguiente se realizó la infección de los matraces con MOI (relación de baculovirus infectantes con respecto a las células por infectar) de 0.1; 0.5; 1; 5; 20. Se agregó una cantidad en mL de baculovirus para cada MOI. Para los ensayos de TOI (tiempo de infección) cada día se fue retirando 1 mL (10^6 células aprox.) de cada matraz durante 6 días.

Las células cosechadas de los diferentes días fueron lisadas con un tampón de lisis conteniendo Tris -HCL 50 mM; EDTA 5 mM; NaCl 300 mM; Dimetil sulfoxido 10% V/V SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA); CHAPS 0.6% P/V SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA). Se tomó en cuenta la relación de 1 mL de buffer por cada 20×10^6 células. Luego se dejó en rotación a 4°C durante toda una noche. Al día siguiente se tomaron los tubos y centrifugaron a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante para los ensayos de detección de las proteínas. Para la detección de las proteínas utilizando sus colas de histidina, los lisados fueron evaluados mediante el His Tag ELISA Detection Kit (Genscript, Piscataway, NJ, USA). Se llevó a cabo siguiendo los pasos recomendados por el fabricante del kit. Para esto se utilizaron 50 μ L del lisado celular; las absorbancias (OD) fueron medidas a la longitud de 450 nm en un lector de microplacas (Biotek, Winooski, VT, USA). Con el resto del lisado se procedió a realizar ensayos de SDS-PAGE y Western blot para esto se adicionó una tercera parte del buffer de corrida 4X (Glycerol 40%; Tris/HCl a pH (6.8) 240 mM; SDS 8%; azul de bromophenol 0.04%; beta-mercaptoethanol 5%). La muestra se colocó en baño maría a 100°C por 5 min, se centrifugó a 10 000g por 5min y se cargó 10 μ L del sobrenadante por carril. Las muestras se corrieron durante 120 min a razón de 0.01 amperio por gel. Luego de eso se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema e- blot (Genscript, Piscataway, NJ, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Con la membrana ya preparada se procedió a realizar el ensayo de western blot. Para esto se sumergieron las membranas en buffer de bloqueo TTBS – BSA (Tris 50mM; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0.05%; pH 7.6; con 1% de BSA P/V) durante una hora en agitación. Luego se colocó la membrana en el sistema SNAP i.d 2.0 protein detection system (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), las condiciones a utilizarse fueron de anticuerpo anti - his (0.001 mg/mL) (Genscript, Piscataway, NJ, USA) y utilizando TTBS como buffer de lavado, y se siguió las indicaciones del fabricante hasta obtener las membranas listas para revelar. Luego se revelaron las membranas utilizando las pastillas SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer (SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA) se diluyeron las pastillas en 10 mL de buffer TTBS y se agregó 5 mL a cada gel, se agitaron durante 15 minutos hasta el revelado de las bandas y se detuvo la reacción agregando agua destilada.

3.2.1.7.-Purificación de rMSP10.

Para ensayos de expresión en 100 mL, se sembraron matraces con las condiciones de crecimiento ya descritas y se infectaron al MOI identificado y se cosecharon a un TOI establecido previamente. Las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (iMAC). Para esto se lisaron 20 millones de células infectadas por cada 1 ml de buffer de lisis (DMSO 10%, Tris – HCL 100 mM y NaCl 250mM) más la presencia de inhibidor de proteasas (PMSF) (SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA) y fueron incubadas en agitación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos a 4°C para luego retirar el sobrenadante (10mL) y filtrarlo a través de una membrana de 0.22 µm, los cuales fueron cargados en la columna de afinidad iMAC (BioRad, Hercules, CA, USA) utilizando el sistema colector de fracciones LP system collection (BioRad, Hercules, CA, USA) siguiendo las condiciones estándares de purificación de proteínas solubles utilizando una gradiente de imidazol (0 – 500 mM) y en fracciones de 4 ml cada uno. Luego se procedió a concentrar las fracciones utilizando membranas para ultrafiltración de 100 MWCo (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

3.2.1.8.-Cuantificación de proteínas recombinantes.

Las fracciones concentradas fueron cuantificadas por el método de Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. De la misma forma se colectaron proteínas totales en cada paso de purificación para la estimación de la pureza de la proteína. La pureza fue calculada utilizando las ecuaciones previamente reportadas (28).

3.2.1.9.-Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos humanos (igG total).

Un total de 100 µl de proteína a una concentración de 0.5 o 5 ug/mL en solución pH 7.4, fueron fijados en una placa de ELISA-High Binding plates (Costar™, BioRad, Hercules, CA, USA), luego las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas fueron lavadas una vez con PBS-T (NaH₂PO₄ (bibásico) 0.15 M; Na₂HPO₄ (monobásico) 0.15 M; NaCl 0.5 M; Tween 20 al 0.05%) y se agregó la solución de bloqueo (PBS + 0.1% BSA). Las placas fueron incubadas durante 1 hora y luego lavadas tres veces con PBS-T. Un total de 100 µl de suero diluido 1:100 en PBS-T + 1.5% de leche descremada, fue agregado al pocillo, las placas fueron incubadas por 1 hora y lavadas 4 veces con PBS-T. Seguidamente, anti-IgG human antibody (HRP-anti-IgG) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) diluido 1:2,000 en PBS-T fue

añadido en la placa y esta fue incubada por una hora para luego ser lavada 3 veces con PBS-T. Se agregó 100 µl de una solución reveladora de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) y se permitió que reaccionara durante 7 minutos, luego la reacción fue detenida agregando 50 µl de HCl 0.25 M. Finalmente la placa fue lavada con PBS-T y leída en un lector de ELISA iMARK™ microplate-reader (BioRad, Hercules, CA, USA) a 450nm para obtener los valores de OD (unidades de densidades ópticas). Un control negativo se elaboró con sueros de donantes sanos. Los resultados fueron expresados como una razón entre los OD de la muestra y el OD del *pool* de donantes. Los sueros de individuos con una razón mayor a 2 y que excedía la señal del pool de donantes fueron catalogados como sero-reactivos (29).

3.2.2.-rRH2b.

3.2.2.1.-Clonación de la región independiente de Rh2b (rRH2b).

El gen *PfRh2b* consiste de 9762 pares de bases (pb) que codifican 3255 aminoácidos (RH2B), del cual se excluyó la secuencia común con su gen homólogo *PfRh2a* (Met1-Glu2700) y la región transmembrana (Asp3190-Fen3254). Luego fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico (200ng) de la cepa F32 (*P.falciparum* aislado de paciente de la amazonia peruana y adaptado a cultivo), utilizando los siguientes primers: Rh2bF (5`gtccgaagegcgcgg**ATG**catcaccatcaccatcacGAAAAACAAGAGAAAGAAAGACTG`3) y Rh2bR (5`tctagtacttctcgaca**TTAGAAATCATCCATTTTGT**TATGGT`3). En minúsculas están las secuencias complementarias al vector pFastBacdual™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), en negritas secuencias que codifican codón de inicio (ATG) y codón *Stop*, en letras subrayadas esta la cola 6-His y en mayúsculas la secuencia del gen *pfhr2b*. Luego los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Qiaquick (Qiagen, Hilden, Mettmann, Germany) y utilizados para realizar la reacción de fusión con el vector pFastBacdual™ previamente digerido con las enzimas EcorI y HindIII (New England BioLabs, Beverly, MA) utilizando el Gibson Assembly Cloning™ Kit (New England BioLabs, Beverly, MA) siguiendo las condiciones del fabricante.

3.2.2.2.-Secuenciamiento de rRh2b.

Ensayos de secuenciamiento (Macrogen, Beotkkot-ro Geumcheon-qu, Seol, Rep. of Korea) se realizaron en los vectores recombinantes obtenidos para verificar el marco de lectura. Las secuencias para verificar el correcto marco de lectura se analizaron utilizando

los programas SnapgeneViewver v1.1.3 (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA) y Sequencher v5.4.5 (Gene codes corporation, Pittsfield, MI, USA).

3.2.2.3.-Expresión de rRh2b.

Se realizaron según lo descrito para rMSP10.

3.2.2.4.-Ensayos de citometría de flujo.

Para estos ensayos, 10 mL de cultivos Sf9 previamente infectados con rRh2b fueron centrifugados a 1,000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 10 mL de PBS para luego ser centrifugado a 1,000g durante 10 minutos. El pellet celular fue fijado con 10 mL de formaldehído al 2% (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) preparado en PBS durante 20 minutos, para luego ser lavado tres veces con PBS. Las células fueron permeabilizadas durante 15 minutos con deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en PBS con 2% de Suero fetal bovino (SFB) (SigmaAldrich, St, Louis, MO, USA), y lavadas con PBS dos veces. Para la inmuno-detección de His-tag, 1 mL de pellet celular fue resuspendido en 1 mL de PBS (0.2%SFB) con un anticuerpo anti-6X His tagTM antibody (FITC) (Abcam, Cambridge, MA, USA), diluido 1:200 durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 1 mL de solución buferada salina (PBS). El análisis se realizó en un cítopmetro de flujo (GalliusTM, Beckman Coulter, Brea, Ca, USA). Las células expresando la cola - his fueron identificadas por fluorescencia de GFP (Siglas en ingles de Proteína verde fluorescente) (λ excitation: 488 nm, λ emission: 510, FL1 channel). Se analizaron 10,000 eventos.

3.2.2.5.-Verificación de la secuencia de rRh2b en los baculovirus recombinantes.

Se extrajo el ADN viral a partir de la P1 utilizando el kit de extracción DNeasy Blood (Qiagen, Hilden, Mettmann, Germany). Luego se utilizaron los primers Rh2bF1 ((5`GAAAAACAAGAGAAAGAAAGACTG`3) y Rh2bR1 (5`GAAATCATCCATTTTGTATGGT`3) para amplificar la secuencia de rRh2b. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 2% y teñidos con Sybr SafeTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

3.2.2.6.-Purificación de rRh2b.

Luego de establecido el MOI y TOI, se infectaron 100 mL de células Sf9 a 1millon/ml con P1. Luego se cosecharon las células por centrifugación a 1,000g durante 15 minutos y se resuspendió el pellet celular en buffer de lisis (10%v/v DMSO, 100 mM Tris-HCl y 250 mM NaCl en presencia de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Sigma, USA), se incubo en agitación durante 1 hora a 4°C. Al día siguiente los lisados fueron sonicados en el equipo Q700 Sonicator (Qsonica LLC, Newtown, CT, USA) a una amplitud de 40 u con un time -on de 10s y un time - off de 10 s (en hielo) durante 3 minutos. Luego el lisado fue centrifugado a 10,000g por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.22 µm para luego ser cargada en el equipo colector de fracciones (BioRad, Hercules, CA, USA) y ser purificada en columnas IMAC (BioRad, Hercules, CA, USA). Se utilizó una gradiente de Imidazol (0-500mM) y las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 4 ml. Las fracciones colectadas fueron corridas en SDS-PAGE para verificar su pureza y utilizadas en ensayos de western blot (anti-his) para verificar la reactividad.

3.2.2.7.-Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes infectados: Ensayos de ELISA fueron similares a los descritos para rMSP10.

3.3.-RESULTADOS

3.3.1.-rMSP10

3.3.1.1.-Vectores recombinantes.

El gen *pfmsp10* de la cepa 3D7 de *P.falciparum* fue clonado en el vector pFastBac™ Dual entre los sitios de restricción EcorI y HindIII (Figura 3.2), de igual forma el gen *pfmsp10* fue codón optimizado y clonado en pFastBac™ Dual en los sitios BamHI y HindIII; ambos vectores fueron verificados mediante ensayos de restricción (Figura 3.5), verificando la liberación del inserto de unos 1,440pb aproximadamente.

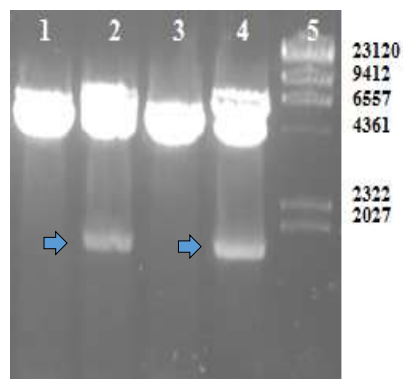


Figura 3.5.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa la liberación del inserto de ~1,440 pb (flechas azules). En el carril 1: vector pFastBac™ Dual con el gen nativo *pfmsp10* sin digerir y el carril 2: el mismo vector digerido con EcorI y HindIII. Carril 3: vector

pFastBacTMDual con el gen optimizado *pfmsp10* sin digerir y en el carril 4: el mismo vector digerido con BamHI y HindIII. Carril 5: marcador DNA fago lambda/HindIII (pb).

Ambos vectores fueron utilizados para obtener baculovirus recombinante, mediante su transposición en bacterias DH10Bac (contienen el b́acmido con el genoma de baculovirus) y la transfecci3n de la ĺnea celular de insectos (*Spodoptera frugiperda*-Sf9). El sobrenadante de las transfecciones con los baculovirus recombinantes fueron utilizados para realizar ensayos de PCR para detectar el gen *pfmsp10* en el genoma de los baculovirus recombinantes, ambos baculovirus presentaron una banda espećfica para *pfmsp10* indicando la correcta inserci3n (Figura 3.6).

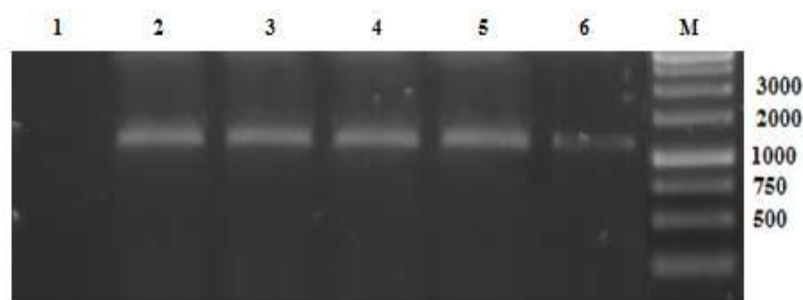


Figura 3.6.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa los productos de PCR utilizando primers para *pfmsp10* y el ADN extraído de los sobrenadantes de cultivos Sf9 (baculovirus recombinantes). Carril 1: Control negativo PCR; carril 2: ADN gen3mico *Plasmodium falciparum*; carril 3 y 4: baculovirus obtenido con el vector que contiene el gen nativo de *pfmsp10*; carril 5 y 6: baculovirus obtenido con el vector que contiene el gen nativo de *pfmsp10* optimizado. Marcador de 1Kb.

3.3.1.2.-Expresi3n de rMSP10 detectada en el baculovirus con el gen codon - optimizado

La expresi3n de rMSP10 fue evaluada a MOI de 5 (valor arbitrario) en placas de 6 pozos a 1×10^6 c3lulas por pozo. Los ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti cola de histidina, revelaron la presencia de una banda de proténa de 56 kDa que correspondía al peso molecular calculado para PfMSP10 en las infecciones realizadas con los baculovirus obtenidos con el gen *pfmsp10* cod3n optimizado (Figura 3.7). Sin embargo, no se pudo detectar una banda reactiva con el anticuerpo anti cola de histidina en el producto del baculovirus que se origin3 a partir del gen *pfmsp10* clonado directamente del genoma de la cepa 3D7. A partir de este resultado para los siguientes ensayos s3lo se decidi3 trabajar con el baculovirus con el gen *pfmsp10* cod3n optimizado.

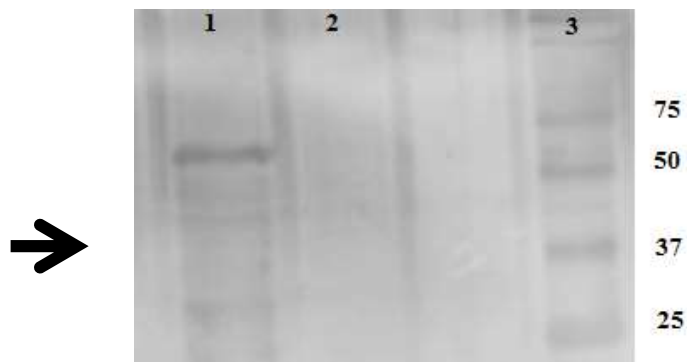


Figura 3.7.- Membrana de nitrocelulosa de WB utilizando anti-6his. Carril 1: Lisado celular Sf9 a partir de baculovirus con el gen *pfmsp10* optimizado; carril 2: Lisado celular Sf9 con el gen *pfmsp10* nativo; carril 3: Marcador de peso molecular para proteínas (kDa). La flecha negra indica rMSP10 (~56kDa).

3.3.1.3.-Optimización de la expresión de rMSP10.

La optimización de la expresión de rMSP10 a partir del baculovirus con el gen *pfmsp10* codón optimizado, se realizó utilizando los parámetros de MOI y TOI. Para esto se infectaron matraces conteniendo 100 mL de medio con células Sf9 y se infectaron a diferentes MOI 1; 5; 20. Se utilizaron los lisados en ensayos de ELISA, lo que permitió detectar las proteínas con colas histidina, en este caso la rMSP10. Según la tabla 3.2, la mayor cantidad de proteína en ng/10⁶ células se obtuvo con parámetros de MOI 20 y un TOI de 48 horas posinfección con 276 ng totales detectados por cada 10⁶ células Sf9. De la misma forma se puede observar que la producción de rMSP10 tiende a decrecer con el tiempo luego de obtener un pico proporcional al MOI utilizada.

Tabla 3.2.- Cuantificación de rMSP10 utilizando un kit de ELISA para la detección de proteínas marcadas con histidinas.

rMSP10 – 6-HIS (ng/10 ⁶ Sf9 células)			
Horas posinfección	MOI		
	1	5	20
48	0	50,3	276,6
72	50,7	120,6	220,5
96	190,4	104,4	60,0
120	142,8	40,4	20,6
144	100,2	60,6	0

3.3.1.4.-Purificación de rMSP10.

La purificación de rMSP10 se realizó a partir de 100mL de cultivo. Las fracciones colectadas fueron cargadas en geles de SDS-PAGE y reveladas por western blot utilizando anticuerpos anti cola de histidina. Una banda reactiva entre los 50 y 75kDa del marcador nos indica la presencia de rMSP10 sugiriendo la correcta unión de la proteína a la columna (figura 3.8).

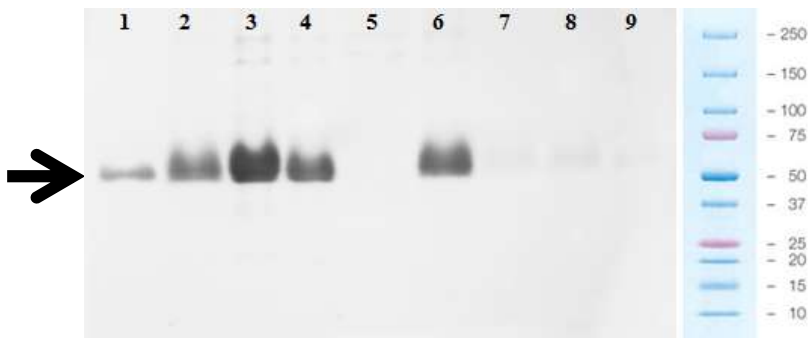


Figura 3.8.- Membrana de nitrocelulosa de WB utilizando anti-6his. Eluídos obtenidos del proceso de purificación con Imidazol: Carril 1: 50 mM; carril 2: 150 mM; carril 3: 200 mM; carril 4: 250 mM; carril 5: Lisado células Sf9 sin infectar, carril 6: Lisado celular Sf9 a partir de baculovirus con el gen *pfmsp10* optimizado; carril 7-9: Lavados de la columna. La flecha negra indica la banda reactiva esperada para cada eluido (~56kDa).

La pureza y eficiencia de recuperación de la rMSP10 fue de 80% y 39,2% respectivamente como se muestran en la tabla 3.3 y corroborado por SDS –PAGE (Figura 3.9).

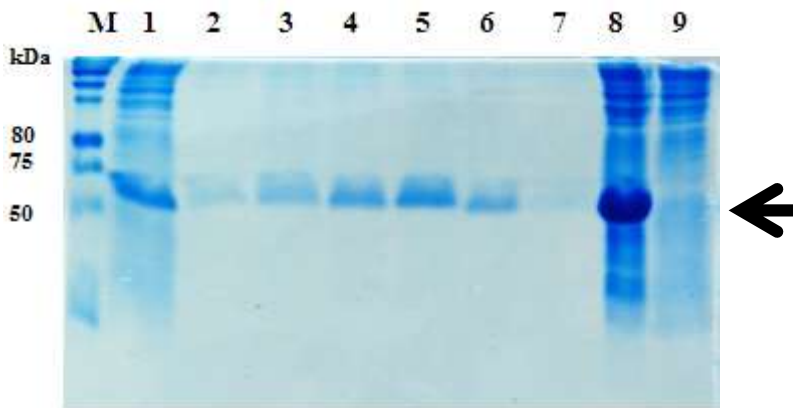


Figura 3.9.- SDS-PAGE de las colecciones obtenidas de la purificación empleando columnas de IMAC. Carril M: marcador de proteínas; carril 1: Flow trough; carril 2 – 6: eluidos; carril 7: lavado; carril 8: lisado original; carril 9: lisado de células sanas Sf9. La flecha negra indica la altura de la banda esperada para cada eluido (~56kDa).

Tabla 3.3.- Purificación de rMSP10 utilizando la columna de IMAC.

Paso de purificación	Volumen Total (mL)	Proteína Total (mg)	rMSP10 (mg)	Pureza (%)	Eficiencia de recuperación (%)	Factor de purificación
Carga inicial	10	4,50	0,84	18,6	100	
Flujo no retenido	10	3,80	0,15	3,94	17,8	
Lavado	20	0,90	0,10	11,1	11,9	
Eluido	4	0,40	0,33	80,0	39,2	4,30

3.3.1.5.-Antigenicidad de rMSP10

Para evaluar la antigenicidad se realizaron ensayos de ELISA, los resultados muestran reactividad de la proteína rMSP10 purificada con anticuerpos presentes en sueros de individuos infectados con *P.falciparum*, los cuales fueron más altos que los donantes sanos negativos y los sueros de individuos infectados con *P.vivax*. En la tabla 3.4 se presenta que un valor menor a 2 (OD/ODpool-) se obtiene en sueros de pacientes con *P.vivax* al utilizar una menor concentración de antígeno (0.25 ug/mL) en la placa de ELISA, lo que nos indicaría una mejor sero-reactividad en sueros de pacientes infectados con *P.falciparum*. Este resultado indica que la proteína rMSP10 reacciona con sueros de pacientes naturalmente infectados presentando valores por encima de 2 (OD/OD pool -).

Tabla 3.4- Se presenta los resultados de ELISA a diferentes concentraciones de rMSP10 utilizado como antígeno frente a sueros de pacientes con malaria y donantes sanos.

	MUESTRA	PROM	Menos Blanco	OD / OD pool -		MUESTRA	PROM	Menos blanco	OD / OD pool -
0.5 ug/ml	PE01F05	2,322	2,277	17,18	0.06 ug/ml	PE01F05	1,574	1,533	19,52
	PE01F19	1,806	1,760	13,28		PE01F19	0,693	0,652	8,30
	PV22	0,166	0,120	0,91		PV22	0,090	0,049	0,62
	PV23	0,424	0,379	2,86		PV23	0,131	0,090	1,14
	Pool (-)	0,178	0,133	1,00		Pool (-)	0,120	0,079	1,00
	BLANK	0,046	0,046			BLANK	0,042	0,042	
0.25 ug/ml	PE01F05	2,199	2,157	20,54	0.03 ug/ml	PE01F05	1,021	0,980	11,46
	PE01F19	1,399	1,358	12,93		PE01F19	0,428	0,387	4,52
	PV22	0,118	0,076	0,72		PV22	0,093	0,052	0,60
	PV23	0,249	0,208	1,98		PV23	0,148	0,106	1,24
	Pool (-)	0,147	0,105	1,00		Pool (-)	0,127	0,086	1,00
	BLANK	0,042	0,042			BLANK	0,042	0,042	
0.12 ug/ml	PE01F05	2,021	1,979	22,62	0.01 ug/ml	PE01F05	0,754	0,706	6,53
	PE01F19	1,079	1,037	11,85		PE01F19	0,347	0,298	2,76
	PV22	0,099	0,057	0,65		PV22	0,084	0,035	0,32
	PV23	0,187	0,145	1,65		PV23	0,148	0,099	0,92
	Pool (-)	0,130	0,088	1,00		Pool (-)	0,157	0,108	1,00
	BLANK	0,042	0,042			BLANK	0,049	0,049	

PE01F05, PE01F19: Sueros de pacientes positivos a *P.falciparum*; PV22, PV23: suero de pacientes positivos a *P.vivax*. Pool (-): Suero de donantes sanos; BLANK: blanco de placa

3.3.1.6.-Codon usage entre *P.falciparum* y *Spodoptera frugiperda* (Sf9)

Un análisis de *codon usage* se realizó para determinar la causa de la falta de expresión del vector con el gen *pfmsp10* nativo. Para esto se tomó la información disponible de los codones de *P.falciparum* y *S.frugiperda* disponibles en la base de datos de codones <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Se encontraron los 10 codones más raros de *P.falciparum* en relación a *S.frugiperda*. Tras la determinación de la composición de aminoácidos de la proteína PfMSP10 utilizando la herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/protpar-ref.html>) se identificó que un 17,7% (93/525) de la proteína estaba conformado por el aminoácido Asparagina, que es codificada por el codón más raro de *P.falciparum* (AAT) en Sf9, de forma similar para otros aminoácidos (Tabla 3.5). Un 66% (349/525 aa) de los aminoácidos de PfMSP10 son codificados por codones raros para Sf9 y esto explicaría, de forma parcial, la falta de expresión del vector pFastBacTM Dual con el gen *pfmsp10* clonado directamente de la cepa 3D7 en nuestro estudio.

Tabla 3.5.- *Codon usage* en donde se presentan los diez codones de *P.falciparum* más raros relativos a Sf9.

Codon	Aminoácido	Frecuencia de uso cada 1000 codones			% en MSP10 (n/525 aa)
		<i>P.falciparum</i>	Sf9	Ratio	
AAT	Asparagina	93,9	13,4	7,0	17,7 (93)
TAA	Stop	50,5	7,7	6,6	-
ATA	Isoleucina	40,3	8,3	4,9	7,4 (39)
TAT	Tirosina	38,9	10	3,9	4,6 (24)
AAA	Lisina	86,4	26,8	3,2	9,7 (51)
TTT	Fenilalanina	31,6	10,1	3,1	3,8 (20)
GAA	Glutamina	73,2	27,6	2,7	9,9 (52)
AGT	Serina	21,9	8,4	2,6	6,5 (34)
GAT	Ácido aspártico	55,0	21,9	2,5	6,9 (36)

3.3.2.-rRh2b

3.3.2.1.-Clonamiento de rRh2b

Se logró clonar la región independiente de PfRh2b (Glu2701-Fenil3188) en el vector pFastBacdualTM y se verificó su inserción en el vector mediante un análisis con enzimas de restricción BamHI y MefI (Figura 3.10). Se obtuvo un producto de 1,400 pb aproximadamente tras la digestión del vector.



Figura 3.10.- Liberación del inserto rRh2b del vector pFastBacdual. Digestión realizada con las enzimas BamHI y MefI. Carril M: Marcador de peso molecular lambda/HindIII; carril 1: vector digerido (indicado por la flecha azul) y que presenta el inserto liberado de ~1,400 pb (flecha roja); carril 2: vector recombinante sin digerir.

Se verificó el correcto marco de lectura de PfRh2b en la secuencia del vector (Figura 3.11), se constató la ubicación después del promotor de polihedrina, seguido del codón de inicio (ATG), luego la cola de histidina y el inicio de la secuencia de rRh2b (Glu2701). Con estos resultados se procedió a producir el baculovirus recombinante.

3.3.2.2.-Secuencia genética de rRh2b en los baculovirus recombinantes.

Para verificar la presencia de la secuencia rRh2b en los baculovirus obtenidos, se procedió a tomar el sobrenadante de los cultivos de células infectadas denominadas P0 y P1 para extraer el ADN y realizar una PCR. Se logró obtener un amplificado esperado de 1400 pb aproximadamente, tanto para P0 y P1 (Figura 3.12), indicando la presencia de rRh2b en los baculovirus.

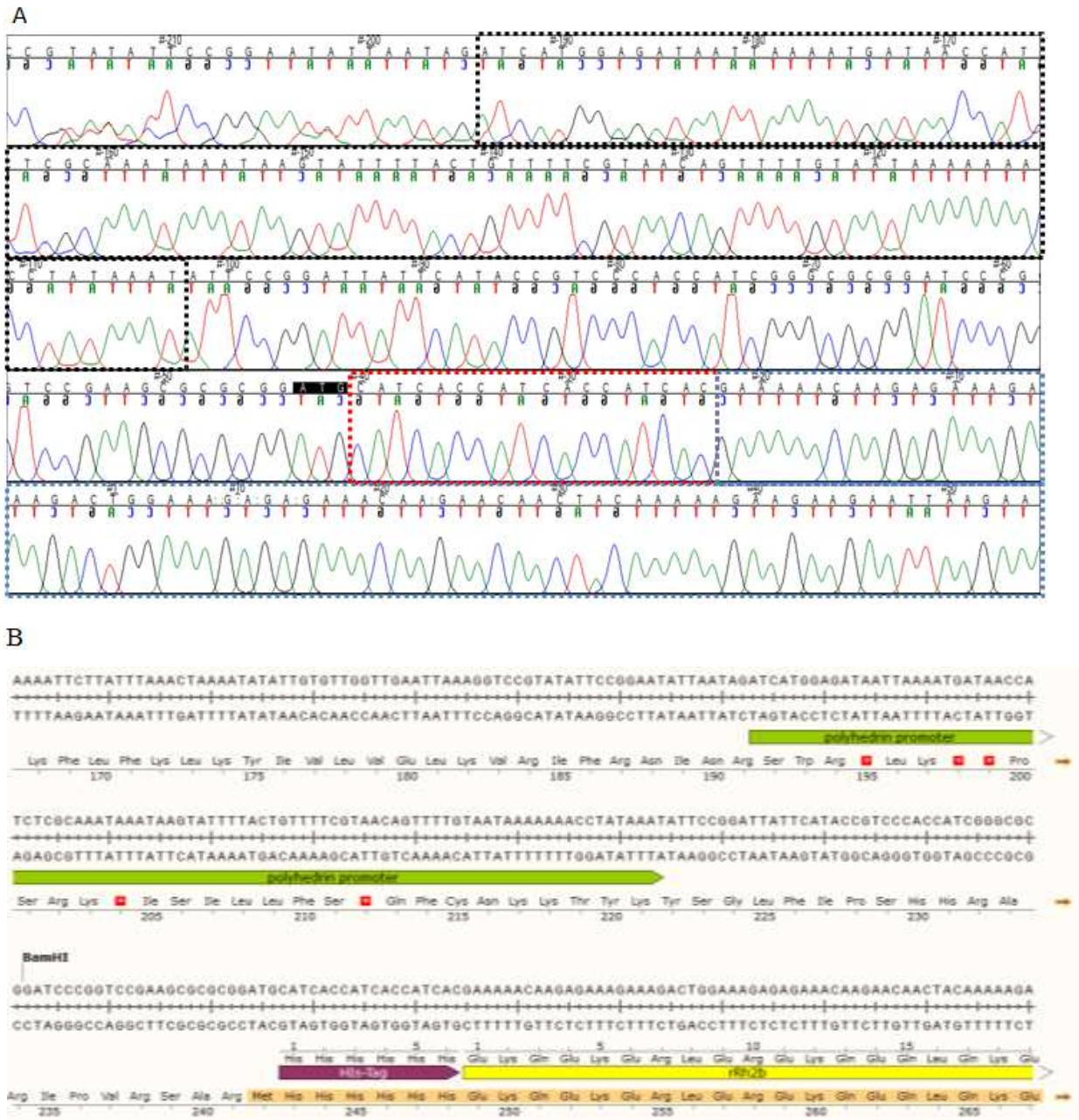


Figura 3.11.- A. Cromatogramas obtenidos de la reacción de secuenciación del vector pFastBacdual que contiene rRh2b. Los marcos negros indican la secuencia del promotor de polihedrina del vector de expresión pFastBacdual; marcos rojos indican la secuencia correspondiente a la cola 6-his; marcos azules indican el inicio de la secuencia del gen rh2b (Glu2701), las secuencias en fondo negro indican ATG o codón de inicio (vistas del programa Sequencher). B. Secuencias colocadas en el programa Snapgene para verificar el marco de lectura después del codón de inicio ATG.

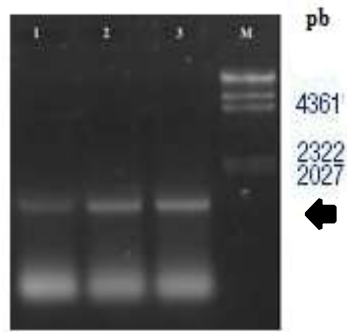


Figura 3.12.- Ensayo de PCR realizado a P0 y P1 obtenidos tras la transfección de células Sf9 con el vector conteniendo rRh2b. Carril 1: PCR con ADN genómico extraído de P0; carril 2: PCR con ADN genómico extraído de P1; carril 3: pFastBacTM con el gen *pfrh2b*. M: Marcador de peso molecular lambda/HindIII. La flecha indica el peso molecular de 1,400 pb aproximadamente.

3.3.2.3.-Expresión de rRh2b

Se realizó ensayos de western blot a los lisados de insecto infectados con P1 de baculovirus con la secuencia de rRh2b y se detectó una banda de ~53kDa utilizando anticuerpos anti cola - his (figura 3.13).

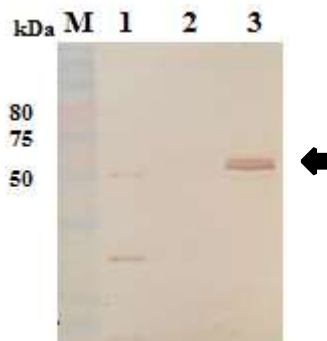


Figura 3.13.- Membrana de western blot utilizando anti-histidinas. M: marcador de peso molecular. Carril 1: Control proteína histidinas; carril 2: Células Sf9 sin infección; carril 3: Células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante rRh2b. La flecha negra indica la banda de proteína reactiva con anticuerpos anti-histidina (~53kDa)

3.3.2.4.-Determinación de la expresión rRh2b

Para esto se cultivaron células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante a MOI de 1, 5 y 20 durante 144 horas (6 días). Con el objetivo de determinar la cantidad de virus (MOI) y días necesario de infección (TOI) para producir rRh2b. Luego se tomó 1x10⁶ células Sf9 y se procedió a lisarlas para obtener la cantidad de proteína rRh2b producida, a través de la cuantificación de la cola de histidina. La tabla 3.6 muestra un pico máximo de expresión a las 96 horas posinfección con una cantidad de 206,9ng de proteína His (MOI 5; TOI: 96 horas) expresada por cada 10⁶ células sf9.

Tabla 3.6.- Cuantificación de rRh2b recombinante.

Horas pos infección	rRh2b-6-HIS (ng/10⁶ Sf9 cells)		
	MOI		
	1	5	20
48	60,4	121,3	124,9
72	110,1	129,4	105,3
96	120,4	206,9	114,4
120	100,4	60,4	67,3
144	21,6	10,8	10,7

3.3.2.5.-Análisis de citometría de flujo para rRh2b.

Para verificar la expresión de la proteína en base al MOI y TOI identificados, se utilizó un anticuerpo anti-his –FITC para identificar proteínas intracelulares en Sf9 que presenten colas de histidina. Para validar este ensayo se utilizaron como control células Sf9 sanas. Según la figura 3.14, se identificó que cerca del 98.26% de células viables (43.67% total células infectadas con rRh2b) expresaban la proteína rRh2b evidenciando un pico en los paneles de los datos del citómetro de flujo; mientras que un 0.15% de las células sanas presentó reacción cruzada al anticuerpo. Esto nos indica que las células Sf9 en suspensión al MOI de 5 y al tercer día de infección; presentan cerca del 90.72% en su interior la proteína rRh2b.

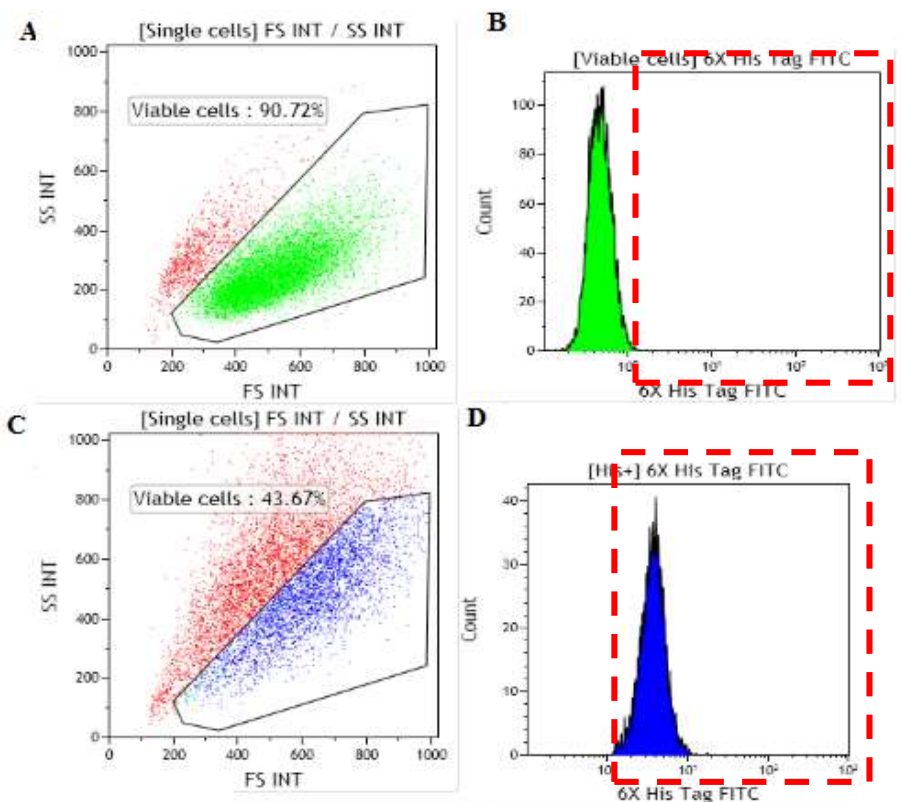


Figura 3.14.- Panel de análisis de la expresión de rRh2b mediante anti-his – FITC. A.- Identificación de células viables en un cultivo Sf9 sin infección viral; B.- Población de células Sf9 marcadas con anti-histidina – FITC en células sin infección viral; C: Identificación de células viables en un cultivo Sf9 infectadas con baculovirus rRh2b; D: Población de células sf9 marcadas con anti-histidina – FITC en células infectadas con baculovirus rRh2b. El recuadro con líneas punteadas en rojo muestra la población de células sf9 marcadas.

3.3.2.6.-Purificación de rRh2b.

Se realizó la purificación de rRh2b a partir de 100 ml de cultivos de células de insecto Sf9, para obtener valores de pureza y eficiencia de recuperación utilizando una columna de cromatografía (IMAC) y una gradiente de imidazol (Figura 3.15). Se logró purificar la proteína rRh2b a una pureza de 64.28% y con una eficiencia de recuperación de 56.84% con un factor de purificación de 4.63 (Tabla 3.6).

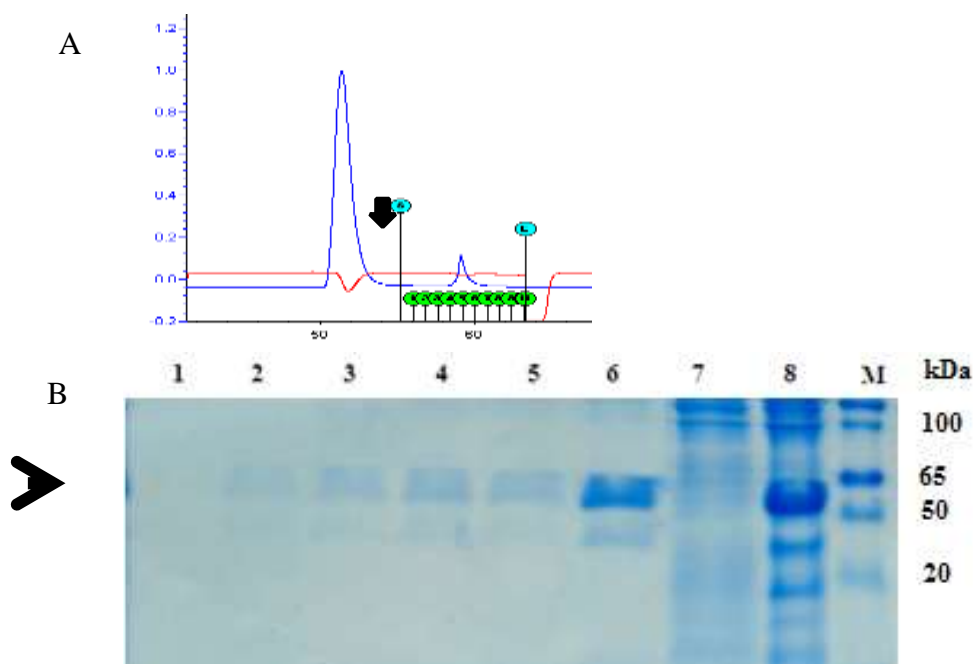


Figura 3.15.- A. Cromatograma de elución de purificación de rRh2b. Data obtenida de LP biological Systems. La flecha negra indica la concentración de imidazol (45-60%) a la cual se dio la elución de rRh2b. El eje “y” indica la absorbancia a 280nm (trazos azules) y el eje x indica tiempo en minutos. B. SDS-PAGE de los eluidos obtenidos de la purificación empleando columnas de IMAC. Carril M: marcador de proteínas. Carril 1-6: eluidos; carril 7: lavado; carril 8: lisado original. La flecha negra indica el nivel de la banda de proteína esperada (~53kDa).

Tabla 3.7.- Purificación de rRh2b empleando columnas IMAC.

Paso de purificación	Volumen Total (mL)	Proteína Total (mg)	rMSP10 (mg)	Pureza (%)	Eficiencia de recuperación (%)	Factor de purificación
Carga inicial	10	6.85	0.95	13.86	100.00	
Flujo no retenido	10	3.58	0.13	3.63	13.68	
Lavado	20	0.15	0.01	6.66	1.05	
Eluído	4	0.84	0.54	64.28	56.84	4.63

3.3.2.7.-Antigenicidad de rRh2b.

Para evaluar la antigenicidad de rRh2b se realizaron ensayos de ELISA indirecto utilizando rRh2b como antígeno frente a 11 sueros de pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* (Tabla 3.8). Se determinó la sero-reactividad ($OD / OD_{pool} \rightarrow \geq 2$) para los sueros evaluados y el antígeno recombinante, indicando que el rRh2b está siendo reconocido por sueros de pacientes infectados de forma natural.

Tabla 3.8.- Resultados de la reactividad (Ratio) de los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y rRh2b.

Sueros	OD	Ratio (OD / OD pool -)
PE01F01	1,69	6,17
PE01F02	1,66	6,05
PE01F03	1,76	6,41
PE01F04	1,66	6,04
PE01F05	2,07	7,54
PE01F06	1,83	6,68
PE01F08	1,62	5,92
PE01F09	1,59	5,79
PE01F13	0,87	3,19
PE01F15	1,27	4,65
PE01F16	1,59	5,80
PE01F18	1,86	6,80
PE01F19	1,94	7,09
Pool (-)	0,27	1,00

3.4.- DISCUSION

Proteínas enteras de *P.falciparum* han sido expresados de forma recombinante utilizando el sistema de células de insecto (Sf9), tales como Proteína del circumsporozito (CSP) (30), Proteína específica de membrana del gametocito/gameto (pfs48/45) (31), Antígeno de la membrana apical (PF83/AMA-1) (32), Cistein proteinasa del trofozoito (13), Sintetasa 1 ácido graso –Coenzima A (33), Subtilasas (34, 35), Proteína relacionada al dominio A del factor de von Willebrand (36), Antígeno con repetición de serina (37) y 9 proteínas más reportadas en un trabajo bastante complejo (38). De la misma forma que otras proteínas relacionadas con el sistema de invasión al glóbulo rojo, PfMSP1 ha sido expresada utilizando el sistema de células de insecto empezando por los segmentos relacionados con el péptido señal y el extremo C- terminal (39) permitiendo inclusive su cristalización (40).

3.4.1.- Obtención de rMSP10, sus limitaciones y su empleo en los ensayos de sero-actividad frente a sueros naturalmente infectados con *P.falciparum* y *P.vivax*.

En la primera parte de este estudio se elaboraron dos vectores, uno basándose en el gen original *pfmsp10* obtenido a partir de ADN de la cepa 3D7 y el otro vector utilizando un paso previo

denominado optimización de codón para células de insecto. Solo en el baculovirus obtenido a partir de la optimización de codón se logró detectar la proteína rMSP10. Tras un breve análisis de *codon usage* entre *P.falciparum* y las células Sf9, se identificó que un 66% de la proteína MSP10 era codificado por codones raros para Sf9, lo que podría explicar la falta de expresión utilizando el gen *pfmsp10* clonado directamente del ADN de la cepa 3D7. En otros estudios la expresión del gen total, como el caso de PfMSP1 (4,971 pb), se logró la expresión tras su optimización de codones para *E.coli* (41). Esto demostraría que se debe considerar una etapa de optimización previa a los ensayos de expresión de un gen de *P.falciparum* para evitar los problemas estructurales por lo menos para el caso de sistemas eucariotas (38).

Pocos son los estudios reportados de expresión de PfMSP10. Black *et al* (5), logró expresar la proteína PfMSP10 en 4 segmentos (A, B, C y D) utilizando el sistema bacteriano (*E.coli*), los cuales se ubicaban entre los aminoácidos 216 al 500, lo cual contenía a su vez a los dominios conservados EGF (Segmento D). Un reciente estudio logró expresar segmentos de la proteína MSP10 utilizando el sistema *Nicotiana benthamiana*; estos segmentos fueron: EGF1_MSP10 y EGF2_MSP10 y contenían los dominios conservados EGF, por lo que el segmento total expresado comprendían desde el aminoácido 414 al 501 de la proteína original (6). En este estudio presentamos la obtención de la proteína completa PfMSP10 (27 al 454aa, excluyendo el péptido señal y el dominio transmembrana) de *P.falciparum* de forma recombinante utilizando el sistema de expresión de baculovirus.

Blackman *et al* (39) reportó la obtención de 0.85 mg/5.5 Litros y 1mg/L de células de insecto expresando el extremo carboxilo terminal de PfMSP1. En otro estudio Mehlin *et al* (38) reportó haber obtenido cerca de 0.9 mg /500 ml de cultivo de células de insecto (Sf21). En nuestro estudio no realizamos el escalamiento hacia sistemas mayores a 1 litro, por lo que no podemos indicar si se obtendrán cantidades similares; sin embargo se puede deducir, tras los resultados obtenidos, que se podría llegar hasta 4 mg (0.4 mg/100mL) de la proteína recombinante a partir de un litro de cultivo. Estos valores pueden variar de acuerdo a la línea celular empleada (Sf9 y Sf21), por ejemplo Sf9, crece en suspensión con mejor producción de biomasa (cantidad de células por litro) a diferencia de la línea Sf21 que crece en adherencia y su producción de biomasa es menor (42); sin embargo, para demostrar la verdadera capacidad de producción de la proteína rMSP10 en 1 litro de cultivo de Sf9, se requieren realizar nuevos estudios.

En relación a los ensayos de sero-reactividad, rMSP10 llegó a ser detectada por sueros de individuos infectados con *P.falciparum*, a diferencia de los sueros de pacientes con *P.vivax*. La

posible reacción se estaría dando gracias al reconocimiento de la región asociada con los dominios EGF y los puentes disulfuro. Black *et al* (5), logró esclarecer que buena parte de la reacción de los sueros de los pacientes infectados con *P.falciparum* sero-reactivos al segmento D (carboxilo terminal) de la proteína MSP10 se debió a la presencia de epítopes en cuya conformación participarían los puentes di-sulfuro. En otro estudio, segmentos expresados en *N.benthamiana* de la proteína MSP10 (segmentos con los dominios EGF) lograron ser reconocidos por sueros de pacientes naturalmente infectados indicando el correcto plegamiento de la proteína (6). La principal diferencia de este sistema frente al sistema bacteriano es sin duda la capacidad de producir proteínas con las modificaciones postraduccionales y la cercana conformación secundaria y terciaria como se observa en la proteína nativa. En el caso de antígenos recombinantes bacterianos, puede provocar incorrectos reconocimientos utilizando sueros de pacientes ya que el suero contiene anticuerpos frente a los antígenos bacterianos (39). El rol de la conformación de la proteína y las modificaciones postraduccionales cambian la inmunogenicidad de una proteína cuando es expresada entre diferentes sistemas de expresión (14). En este estudio y tras una optimización de la secuencia codante del gen la proteína PfMSP10 se expresó (rMSP10) y se purificó su forma recombinante a partir de cultivos de células de insecto-Sf9 (Pureza; 85%).

3.4.2.- Expresión, purificación y niveles de la seroreactividad de rRh2b frente a sueros pacientes infectados con *P.falciparum* y *P.vivax*.

La región única de la proteína PfRh2b ha sido recientemente anotada como un antígeno que confiere protección frente a Malaria clínica (19) y está involucrada en el proceso de invasión del merozoito de *P.falciparum* al glóbulo rojo. Sin embargo, pocos son los estudios que reportan la obtención de esta proteína y que emplean el sistema bacteriano o sistemas cell-free *E. coli* para su obtención (17, 19, 21, 23, 43). Estos estudios solo se enfocan a describir los resultados de inmunogenicidad por formatos de ELISA o protein-array de la proteína en sueros de pacientes y describen de forma resumida su método de obtención de la forma recombinante. Dada la escasa información sobre la obtención de este antígeno de forma recombinante, se presenta el siguiente estudio donde se logró clonar, expresar y purificar la región independiente de la proteína rRh2b (Glu2701-Fenil3188) empleando células de insecto Sf9. La región de expresión fue de aproximadamente de 53kDa y fue clonado a partir de la cepa PF032 (cepa *P.falciparum*). Reilling *et al* (17), logró expresar una región que consistía desde la Glu2792 a Gli3,193

de 44kDa; Villasis *et al* (23) una región desde Glu2735- Tir3133 de 45kDa y Richard *et al* (19) una región de Glu2792-Met3185 de 43kDa. La selección de esta región corresponde a la ubicación del aminoácido conocido como “Break Point” de Rh2 (Lis2776) que indica el inicio de la región independiente para Rh2b (18) hasta la región de inicio del dominio trans-membrana (Val3189).

Estudios en el campo de la malaria indican que dependiendo del sistema de expresión utilizado (bacteriano o insecto) (14, 38), estos influyen en los ensayos inmunológicos (ensayos de proliferación y ELISA) y por lo tanto el sistema de expresión a utilizar debe ser capaz de realizar las modificaciones postraduccionales y la posibilidad de formación de estructuras terciarias y cuaternarias en las proteínas recombinantes. Por lo que las futuras herramientas serodiagnósticas deben contemplar estos aspectos (14). Para predecir estas potenciales modificaciones se utilizaron dos predictores: NetOGlyc 4.0 Server (glicosilaciones) (44) y NetPhos 2.0 (fosforilaciones) (45); según estos servidores se detectaron hasta 51 modificaciones (46 fosforilaciones y 5 glicosilaciones) entre Glu2701-Fenil3188 (Figura 3.16), por lo que 10% de los aminoácidos de esta región (51/487 aa) presentarían modificaciones los cuales podrían contribuir al correcto plegamiento de una proteína (46).



Figura 3.16.- Secuencia de Rh2b presentando las modificaciones pos-traduccionales. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina. “G” indica una modificación de azúcar.

La proteína rRh2b expresada y purificada a partir de Sf9 fue evaluada mediante ensayos de ELISA para determinar su antigenicidad, permitiéndonos obtener valores de OD que

iban desde 0.87 – 2.07 en 12 sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* provenientes de la Amazonia Peruana, siendo todos sero-reactivos a la proteína expresada. En un estudio realizado en Papua Nueva Guinea que utilizó sueros de 175 niños se realizaron ensayos de ELISA con rRh2b (origen bacteriano) y se obtuvo un resultado de sero-reactividad en el 85% de niños, cuya media fue de 0.610 (17). Un segundo estudio realizado en Perú con sueros de 45 pacientes, entre niños y adultos, se realizó el ensayo con rRh2b (bacteriano) obteniendo un 31% de sero-reactivos y una OD media de 0.360 (23). De ambos estudios; llama la atención el valor de la media de OD obtenidos; ya que en nuestro caso se obtiene el valor OD media para nuestros 12 sueros fue de 1.660 con un 100% de sero-reactividad. Para confirmar esto, se necesitaría aumentar el número de muestras de sueros y poder afirmar que la proteína rRh2b obtenida por nuestro sistema permite un mejor reconocimiento de los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* dado que la proteína nativa requeriría de hasta 51 modificaciones pos-traduccionales.

Aplicaciones de rMSP10 y rRh2b

Es bien sabido que las proteínas de *P.falciparum* expresadas en células de insecto permiten un mayor reconocimiento de los sueros de pacientes a diferencia de la producida en bacterias (8), por lo que este sistema sería el más recomendable para su uso. La proteína rMSP10 presentó reactividad con sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* excluyendo sueros de pacientes con *P.vivax*, aunque un número mayor de sueros se debe evaluar en estudios posteriores para validar rMSP10 como un potencial marcador para sero-vigilancia, como se ha descrito en el capítulo 2. De esta manera se logró obtener rMSP10 para futuros ensayos funcionales, epidemiológicos y biotecnológicos como el desarrollo de pruebas de diagnóstico y vacunas. La obtención de rRh2b utilizando células de insecto-Sf9 permitirá su uso como un marcador de seroprevalencia en estudios epidemiológicos y además de ser el primer reporte de expresión de esta región de la proteína parasitaria.

Esta información es relevante ya que permitirá determinar si las poblaciones de individuos expuestos presentan anticuerpos naturales contra estas proteínas de invasión al glóbulo rojo y de forma adicional estudiar la relación de estos anticuerpos en relación con la protección frente a las infecciones de *P.falciparum* en nuestra región.

3.5.- REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS:

1. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006;124(4):755-66.
2. Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;60(2):303-11.
3. Chang SP. Expression systems that best mimic native structure: which ones to try first and why. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1994;50(4 Suppl):11-9.
4. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(5):978-86.
5. Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003;127(1):59-68.
6. Maskus DJ, Bethke S, Seidel M, Kapelski S, Addai-Mensah O, Boes A, et al. Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to *Plasmodium falciparum* MSP10. *Malaria journal*. 2015;14:276.
7. Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database issue):D539-43.
8. Victor ME, Bengtsson A, Andersen G, Bengtsson D, Lusingu JP, Vestergaard LS, et al. Insect cells are superior to *Escherichia coli* in producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. *Malaria journal*. 2010;9:325.
9. Bengtsson KL, Song H, Stertman L, Liu Y, Flyer DC, Massare MJ, et al. Matrix-M adjuvant enhances antibody, cellular and protective immune responses of a Zaire Ebola/Makona virus glycoprotein (GP) nanoparticle vaccine in mice. *Vaccine*. 2016;34(16):1927-35.
10. Wagner JM, Pajerowski JD, Daniels CL, McHugh PM, Flynn JA, Balliet JW, et al. Enhanced production of Chikungunya virus-like particles using a high-pH adapted *spodoptera frugiperda* insect cell line. *PloS one*. 2014;9(4):e94401.
11. Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C, Tanaka T, et al. Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*. 2003;316(1):161-70.
12. Mizutani M, Iyori M, Blagborough AM, Fukumoto S, Funatsu T, Sinden RE, et al. Baculovirus-vectored multistage *Plasmodium vivax* vaccine induces both protective and transmission-blocking immunities against transgenic rodent malaria parasites. *Infection and immunity*. 2014;82(10):4348-57.
13. Salas F, Fichmann J, Lee GK, Scott MD, Rosenthal PJ. Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase. *Infection and immunity*. 1995;63(6):2120-5.
14. Garraud O, Diouf A, Nguer CM, Dieye A, Longacre S, Kaslow DC, et al. Different *Plasmodium falciparum* recombinant MSP1(19) antigens differ in their capacities to stimulate in vitro peripheral blood T lymphocytes in individuals from various endemic areas. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(4):431-40.
15. Nielsen MA, Resende M, de Jongh WA, Ditlev SB, Mordmuller B, Houard S, et al. The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine. *PloS one*. 2015;10(9):e0135406.
16. Zerka A, Rydzak J, Lass A, Szostakowska B, Nahorski W, Wroczynska A, et al. Studies on Immunogenicity and Antigenicity of Baculovirus-Expressed Binding Region of *Plasmodium falciparum* EBA-140 Merozoite Ligand. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2016;64(2):149-56.
17. Reiling L, Richards JS, Fowkes FJ, Barry AE, Triglia T, Chokejindachai W, et al. Evidence that the erythrocyte invasion ligand PfRh2 is a target of protective immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of immunology*. 2010;185(10):6157-67.
18. Triglia T, Thompson J, Caruana SR, Delorenzi M, Speed T, Cowman AF. Identification of proteins from *Plasmodium falciparum* that are homologous to

- reticulocyte binding proteins in *Plasmodium vivax*. *Infection and immunity*. 2001;69(2):1084-92.
19. Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Healer J, Hodder AN, Fowkes FJ, et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. *Journal of immunology*. 2013;191(2):795-809.
 20. Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, et al. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *The EMBO journal*. 2003;22(5):1047-57.
 21. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(8):1342-51.
 22. Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000prime reports*. 2014;6:100.
 23. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malaria journal*. 2012;11:361.
 24. Swearingen KE, Lindner SE, Shi L, Shears MJ, Harupa A, Hopp CS, et al. Interrogating the *Plasmodium* Sporozoite Surface: Identification of Surface-Exposed Proteins and Demonstration of Glycosylation on CSP and TRAP by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *PLoS pathogens*. 2016;12(4):e1005606.
 25. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Alban-Castillo J, Estevez Y, Lores FA, et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2009;123(3):413-22.
 26. Lopez-Perez M, Villasis E, Machado RL, Pova MM, Vinetz JM, Blair S, et al. *Plasmodium falciparum* field isolates from South America use an atypical red blood cell invasion pathway associated with invasion ligand polymorphisms. *PloS one*. 2012;7(10):e47913.
 27. Torres KJ, Villasis E, Bendezu J, Chauca J, Vinetz JM, Gamboa D. Relationship of regulatory T cells to *Plasmodium falciparum* malaria symptomatology in a hypoendemic region. *Malaria journal*. 2014;13:108.
 28. Yap WB, Tey BT, Alitheen NB, Tan WS. Purification of His-tagged hepatitis B core antigen from unclarified bacterial homogenate using immobilized metal affinity-expanded bed adsorption chromatography. *Journal of chromatography A*. 2010;1217(21):3473-80.
 29. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(2):264-71.
 30. Jacobs P, Massaer M, Heinderyckx M, Milican F, Gilles P, van Opstal O, et al. *Plasmodium falciparum*: recombinant baculoviruses direct the expression of circumsporozoite proteins in *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *Molecular biology reports*. 1991;15(2):73-9.
 31. Kocken CH, Jansen J, Kaan AM, Beckers PJ, Ponnudurai T, Kaslow DC, et al. Cloning and expression of the gene coding for the transmission blocking target antigen Pfs48/45 of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;61(1):59-68.
 32. Narum DL, Welling GW, Thomas AW. Ion-exchange-immunoaffinity purification of a recombinant baculovirus *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen, PF83/AMA-1. *Journal of chromatography A*. 1993;657(2):357-63.
 33. Matesanz F, Duran-Chica I, Alcina A. The cloning and expression of Pfacs1, a *Plasmodium falciparum* fatty acyl coenzyme A synthetase-1 targeted to the host erythrocyte cytoplasm. *Journal of molecular biology*. 1999;291(1):59-70.
 34. Sajid M, Withers-Martinez C, Blackman MJ. Maturation and specificity of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1, a malaria merozoite subtilisin-like serine protease. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(1):631-41.
 35. Jean L, Hackett F, Martin SR, Blackman MJ. Functional characterization of the propeptide of *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease-1. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):28572-9.

36. Yuda M, Yano K, Tsuboi T, Torii M, Chinzei Y. von Willebrand Factor A domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout Plasmodium parasites. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001;116(1):65-72.
37. Li J, Matsuoka H, Mitamura T, Horii T. Characterization of proteases involved in the processing of Plasmodium falciparum serine repeat antigen (SERA). *Molecular and biochemical parasitology*. 2002;120(2):177-86.
38. Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, Gelb MH, et al. Heterologous expression of proteins from Plasmodium falciparum: results from 1000 genes. *Molecular and biochemical parasitology*. 2006;148(2):144-60.
39. MJ B, AA H. Use of a recombinant baculovirus product to measure naturally-acquired human antibodies to disulphide-constrained epitopes on the P. falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6(4):307-15.
40. Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Petres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Molecular cell*. 1999;3(4):457-64.
41. Pan W, Ravot E, Tolle R, Frank R, Mosbach R, Turbachova I, et al. Vaccine candidate MSP-1 from Plasmodium falciparum: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from Escherichia coli and mammalian cells. *Nucleic acids research*. 1999;27(4):1094-103.
42. Murhammer DW. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*. Second ed: Humana Press; 2007 7/6/2007.
43. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews*. 2016;40(3):343-72.
44. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO journal*. 2013;32(10):1478-88.
45. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*. 1999;294(5):1351-62.
46. Pisitkun T, Dummer P, Somparn P, Hirankarn N, Kopp JB, Knepper MA. Integrated Design of Antibodies for Systems Biology Using Ab Designer. *Journal of proteomics & bioinformatics*. 2014;7(4):088-94.

CAPITULO 4

Selección de péptidos para producción de anticuerpos que permitan la identificación de proteínas novedales de interés local: Ejemplos de aplicaciones en agentes infecciosos.

Resumen

Existen múltiples servidores o programas bioinformáticos libres para la predicción de péptidos antigénicos para la posterior producción de anticuerpos. El más popular de estos servidores es el AbDesignerTM; sin embargo su utilidad se ve limitada cuando sólo se dispone de la secuencia FASTA (Fichero informático basado en texto, utilizado para representar secuencias biológicas) de proteínas y más aún si son sólo de interés de una red limitada de laboratorios (proteínas virales, bacterianas y eucariotas de importancia global). Este servidor brinda todas las regiones antigénicas en la secuencia, por lo que en estos casos, la decisión de selección de la región recae sobre el investigador, quien en algunos casos cuenta con recursos limitados. Para esto el uso de servidores libres, uso de software (programas bioinformáticos) de acceso limitado brindado por laboratorios externos, recopilación de información sobre la proteína de interés y el uso de programas bioinformáticos - predictores de estructuras y modificaciones pos-traduccionales pueden contribuir en el proceso de selección de péptidos para una correcta producción de anticuerpos. En este estudio se contempló el uso de las herramientas mencionadas anteriormente, más el uso de parámetros prácticos de selección que nos permitirá obtener péptidos candidatos para ser utilizados en la inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales. Para esto se presenta el proceso de selección de péptidos de las secuencias de proteínas de interés cuya secuencia de aminoácidos se encuentran en formato FASTA (Proteína de un virus aviar (Fibra-2 de Fowl aviadenovirus 4) y una proteína del parásito de la malaria (PfMSP10-*Plasmodium falciparum*)), para luego producir anticuerpos policlonales en conejos que fueron evaluados mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia en la identificación de proteínas de interés como un paso inicial a la caracterización de estas.

4.1.- Introducción

Para realizar ensayos de caracterización de proteínas a nivel molecular y celular se requiere del uso de anticuerpos tanto de origen monoclonales y/o policlonales producidos en cualquier sistema biológico que nos permitan identificar las proteínas de interés.

Según Pisitkun *et al* (1, 2), en el “Best of All Possible Worlds” (Mejor de los escenarios posibles) se debe tener anticuerpos para cada uno de los productos proteicos de todos los genes de forma “*a priori*”. Sin embargo; el mercado actual está limitado a un determinado grupo de proteínas que son ampliamente estudiadas. Sin embargo, cuando se realizan ensayos de interés local o de un área relacionada a la clínica humana a nivel regional, el grupo de anticuerpos disponibles comercialmente se reduce. Para citar un ejemplo de un anticuerpo ampliamente utilizado se buscó el anticuerpo “p53 humano” entre tres compañías de ventas de anticuerpos que presentaron desde 99 hasta 797 anticuerpos disponibles (Biosource (797 anticuerpos) (<http://www.mybiosource.com>), Lsbio (499 anticuerpos) (<https://www.lsbio.com>) y abcam (99 anticuerpos) (<http://www.abcam.com>).

La disponibilidad de bases de datos primarias ha facilitado el diseño de anticuerpos basándose en el uso de las secuencias FASTA disponible de la proteína de interés. Como evidencia de ello tenemos disponibles distintas webs gratuitas de diseño de péptidos para anticuerpos (NHLBI AbDesigner (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/AbDesigner/>), EpiC (<http://bioware.ucd.ie/epic/>) y IEDB (https://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input) y servicios en laboratorios internacionales que incluyen desde el uso de software especializados (OptimunAntigenTM (Antígeno óptimo)), pasando por la selección (a cargo del solicitante), inmunización, purificación y control de calidad (Genscript laboratorios, EE.UU con más de 13 000 anticuerpos producidos desde el 2004 y cerca de 626 publicaciones que citan los servicios de producción de anticuerpos según su web (www.genscript.com, (3)). Un servidor altamente utilizado es NHLBI AbDesigner que apareció el año 2012 con una gran experiencia (25 publicaciones previas del grupo de Pisitkun *et al* 2012 utilizando este algoritmo), el año 2014 (1) valida y se compara frente a servidores libres mediante el diseño de péptidos para 3 anticuerpos y recientemente presenta publicaciones de su aplicación (4-6); lo que hace de este servidor un buen predictor de péptidos antigénicos y únicos. Este servidor presenta sus resultados como un valor de *score* de antigenicidad,

especificidad, conservación, potenciales modificaciones traduccionales, dominios, variación de secuencias y otras características relevantes que se encuentren disponibles en la base de datos Swiss-Prot. Sin embargo, su limitante está en solo utilizar cualquiera de los 7 organismos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*) para aprovechar las opciones de conservación y especificidad que son determinantes para tomar decisiones en la selección de péptidos para la inmunización. Tras el uso de software libres o especializados se contempla una lista de péptidos que no es sólo un péptido, sino más de 3 péptidos, pero en este caso se puede considerar que un servicio de obtención de anticuerpos policlonales a partir de un péptido equivale alrededor de 500 dólares por péptido, esto sin contar los gastos de importación que en algunos casos puede exceder incluso el costo del péptido. En algunos laboratorios, con facilidades de bioterio, se puede contemplar el uso de animales pero los cuidados de estos implican nuevos gastos. Por lo que el proceso de selección es crucial en laboratorios locales ya que involucran decisiones logísticas importantes.

Teniendo en cuenta la falta de anticuerpos en el mercado internacional para intereses específicos, se justifica el uso de servidores libres y de software de relativo acceso; sin embargo, debido a los recursos limitados de algunos laboratorios la toma de decisión para diseñar los péptidos ideales, tienen un fuerte impacto en el curso de las investigaciones realizadas, ya sea en virus u organismos no tan conocidos; sin embargo esto se complica cuando no se cuenta con información completa de las proteínas de interés particular. Para el caso de proteínas de virus u organismos diferentes a los 7 organismos de NHLBI AbDesigner™, este servidor reporta una lista de potenciales péptidos sin criterios de conservación y especificidad frente a otros organismos y es el investigador el que debe tomar la decisión en base a criterios empíricos u reportes previos realizados. Como parte de los criterios tenemos: cual es la zona de interés de la proteína? en caso se requiera caracterizar una proteína de interés local, la selección de péptidos en función a su ubicación es importante dependiendo si está en la zona -NH₂, medio o -COOH; tanto la zona -NH₂ o -COOH son zonas con probabilidad de exposición a los solventes (7), evitar las dominios transmembrana y péptidos señales (8), ubicar los péptidos fuera de regiones conservadas cuando se busca especificidad, zonas de baja complejidad, zonas de modificaciones postraduccionales (fosforilación y glicosilaciones) (1) y su presencia en zonas ordenadas (Hélices y *strand*) y desordenadas (*loop* y *coil*) de la proteína (7, 9).

El objetivo de este trabajo fue presentar parámetros de selección generales que nos permitan diseñar péptidos para inmunización y obtención de anticuerpos policlonales que logren reconocer proteínas de interés local. Para validar estos parámetros se realizó el diseño de péptidos en proteínas de agentes infecciosos del campo humano y veterinario. Un virus aviar (Fibra-2 de Avian adenovirus C) y de un parásito intracelular humano (PFMSP10 - *Plasmodium falciparum*); para esto se evaluó un servidor de obtención de péptidos candidatos (AbDesigner™), un software de acceso limitado (OptimunAntigen™ (Antígeno óptimo)) y se utilizaron herramientas bioinformáticas: TMHMM v. 2.0 (10) , NetOGlyc 4.0 (11), The GPI Prediction (12) , CFSSP Server (13), Globplot 2 (14), NetPhos 2.0 (15) y PepDraw(16). Todas estas herramientas nos permitirán seleccionar los péptidos que puedan ser empleados en los procesos de inmunización de conejo y posterior identificación de las proteínas de interés local. Cabe indicar que a nuestro conocimiento no se tiene de forma comercial anticuerpos para estas dos proteínas, una de interés clínico-humano (PFMSP10) y el otro de interés veterinario (Fibra-2).

4.2.- Materiales y Métodos

4.2.1.- Selección de proteínas de interés

Para la producción de anticuerpos policlonales se seleccionaron proteínas de un virus aviar y un parásito intracelular que afecta humanos. Para el caso del virus se trabajó con la proteína Fibra -2 del *Aviadenovirus C* de la familia adenoviridae, esta selección se basó en la disponibilidad del material viral y proteína recombinante rFib2 donado por el Dr. Vikram Vakaria (University of Maryland, Baltimore, USA). Para el parásito la proteína PfPFMSP10 (merozoite surface protein 10) de *Plasmodium falciparum* se eligió dado que se contó con material biológico como cultivos de *P.falciparum*, proteína recombinante (rMSP10) y anticuerpos policlonales contra esta proteína brindada por el Dr. Joseph Vinetz (University of California, San Diego, USA). Las secuencias de aminoácidos fueron descargadas del NCBI en formato FASTA, para Fibra-2 (AIS19803.1) y PFMSP10 (XP_966190) respectivamente. Para determinar el peso molecular teórico de las proteínas, se utilizó el servidor Compute pI/Mw tool de ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/), según este servidor para Fibra - 2 se obtuvo un peso teórico de 49,92kDa y para PFMSP10 se obtuvo 61,38 kDa.

4.2.2.- Obtención de péptidos candidatos PfPFMSP10

4.2.2.1.- AbDesignerTM

Las secuencias FASTA fueron llevadas al servidor AbDesigner (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/AbDesigner/>) y ajustados a los siguientes parámetros: Peptide Length = 14 y Epitope Length= 5. Los resultados de ig-Score Rank fueron analizados en formatos de Excel para establecer el ranking de epitopes potenciales. Este servidor nos permitió identificar los péptidos con sus respectivos ig-score, este valor obedece a un valor de antigenicidad que sus algoritmos predicen en función a la naturaleza de aminoácidos (2). Se brindó caracteres cualitativos a los resultados de *ig-score* considerados como Bajo, Moderado y Alto, esto en función a la apreciación de Pisitkun *et al* 2014(1) el cual nombró al *ig-score* de sus anticuerpos de Podocina humana con un “Moderado” *ig-score*: 6,53 y Nephhrin human con un “Alto” *ig-score*: 11,1.

4.2.2.2.- OptimunAntigenTM (Antígeno óptimo).

Se enviaron las secuencias FASTA de las proteínas de interés a Genscript laboratorios (NY, EE.UU); quienes remitieron un reporte de antigenicidad tras el uso de su software OptimunAntigenTM (Antígeno óptimo). Este reporte contenía un ranking de péptidos que son seleccionados en base a un *cut-off* de su índice de antigenicidad. Para Fibra-2 se obtuvieron 12 péptidos de forma original y se tuvo un *cut-off* de 0,76 que redujo el grupo a 9 péptidos y para PfPFMSP10 se obtuvieron 18 péptidos que se redujeron a 10 péptidos en base a un *cut-off* de 1,54. La lista de péptidos final se presenta en la tabla 4.2. La estrategia para la selección de epitopes con este software involucró longitud de secuencia, hidrofobicidad, hidrofiliidad, superficie, flexibilidad, presencia de epítopes lineales, estructuras secundarias, evitando motivos conservados de proteínas (tripeptide Arg-Gly-Asp motif (RGD), secuencia helix-loop-helix, GTP *binding site*, dominios SH2) y una combinación de diferentes paquetes de software MacVectorTM, DNASTarTM y PC-GeneTM (Genscript Laboratorios, (3)).

4.2.3.- Selección de péptidos candidatos

4.2.3.1.- Identificación de regiones

Para la identificación de regiones de las proteínas las cuales no cuentan con un cristal disponible, se procedió a revisar la literatura científica (Fuentes NCBI – Pubmed)

disponible para identificar regiones más relevantes de las proteínas. Estas regiones pueden ser: regiones repetitivas, dominios transmembrana, péptidos señales, dominios conservados y motivos de aminoácidos. Se buscaron proteínas similares cuyas regiones ya habían sido identificadas y se procedió a realizar un análisis por Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

4.2.3.2.- Estructurales

Se predijo la estructura secundaria con el servidor CFSSP Server (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>), dominios transmembrana con TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y regiones desordenadas de las proteínas utilizando el servidor Globplot 2 (<http://globplot.embl.de/>) respectivamente.

4.2.3.3.- Especificidad

Con las secuencias de los péptidos se procedió a realizar una búsqueda en la base de proteínas del NCBI mediante la herramienta BLASTp. En la herramienta BLASTp y en la sección “choose search data set” en la opción “organism” se seleccionó el organismo a comparar. Para la búsqueda de antígenos homólogos dentro del mismo organismo se eligió “Adenoviridae (taxid:10508)” para Fibra-2 y “Plasmodium falciparum (isolate 3D7) (taxid:36329)” para PFMSP10.

Al ser un virus (adenoviridae) que afecta aves, también se buscaron antígenos conservados dentro del organismo hospedero y se eligió “*Gallus gallus* (taxid:903)” y para el caso de PFMSP10 dentro de “*Homo sapiens* (taxid:9606)”, por ser un parásito que afecta humanos. También se identificó su conservación frente a organismos como “*Mus musculus* (taxid:10090)” y “*Oryctolagus cuniculus* (taxid:9986)” para ambas proteínas. En la opción “database” se eligió la “non-redundant protein sequences (nr)” y las demás secciones del BLASTp se dejaron con sus valores por defecto. Los resultados de los alineamientos fueron elegidos según si existía un alineamiento continuo igual o en más de 5 aminoácidos de forma independiente de la cobertura, esto bajo un criterio mínimo de longitud de epitopes lineales para células B (17, 18), para los resultados se tomó como mínimo 5 aminoácidos alineados de forma continua para ser considerado como alineamiento parcial y 14 aminoácidos como alineamiento total. Las secuencias que

presentaron al inicio de sus nombres “PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN” fueron excluidas del análisis.

4.2.3.4.- *Modificaciones postraduccionales (MPT)*

Para la predicción de las modificaciones como glicosilaciones, incorporación de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y fosforilaciones se utilizaron los siguientes servidores: NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), The GPI Prediction Server(http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) y NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) respectivamente, mediante el uso de la secuencia FASTA de las proteínas.

4.2.3.5.- *Factibilidad Técnica*

Con los péptidos se procedió a evaluar sus valores como carga neta (evitando la carga nula), hidrofobicidad (según escala Wimley-White evitando valores menores o por debajo de 0 Kcal*mol⁻¹) y punto isoeléctrico (evitando valores cercanos a 7) mediante el servidor PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>).

4.2.4.- Ensayos de inmunización

Los péptidos seleccionados fueron sintetizados y conjugados a KLH (“Keyhole limpet hemocyanine” o Hemocianina extraída de *'lapa californiana'*) para su inmunización en conejos (*Oryctolagus cuniculus*), lo cual fue realizado por los laboratorios Genscript (GenScript, NJ, USA). Los anticuerpos purificados fueron derivados a nuestros laboratorios para los ensayos respectivos.

4.2.5.- Ensayos de Western blot para Fibra-2

Para determinar la afinidad de los anticuerpos policlonales obtenidos, se realizó un ensayo de western blot, en el cual el FAdV-4 fue separado por SDS-PAGE y transferido a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo a las condiciones descritas por Sambrook & Russell, 2001. Brevemente, para la separación de proteínas por SDS-PAGE, se utilizó un gel discontinuo de 5-10% empleando el sistema de electroforesis. Las proteínas fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa y utilizadas para la inmunodetección con los anticuerpos específicos a una concentración de 0.2 µg/ml. Se utilizó un anticuerpo

de cabra anti-IgG de conejo marcado con HRP (GenScript, NJ, USA), como anticuerpo secundario.

4.2.6.- Ensayos de Western Blot e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para PFMSP10

Las condiciones técnicas de los ensayos de western blot e IFI para los anticuerpos PFMSP10 son descritos por Villasis Elizabeth 2016 (Tesis para optar el grado de Magister en Microbiología en Universidad Peruana Cayetano Heredia - Perú). Para el western blot, se realizó el ensayo frente a lisados de parásitos obtenidos de cultivos parasitarios de *P.falciparum*, cepa 3D7. Mientras que para los ensayos de IFI, se realizaron a partir de *smears* (extendidos de muestras en láminas portaobjetos) obtenidos de los cultivos sincronizados en el estadio esquizonte. Los permisos éticos para el trabajo con glóbulos rojos fueron previamente aprobados por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú (SIDISI: 61540)

El flujo del presente trabajo y la integración de los ensayos se encuentran descritos en la figura 4.1.

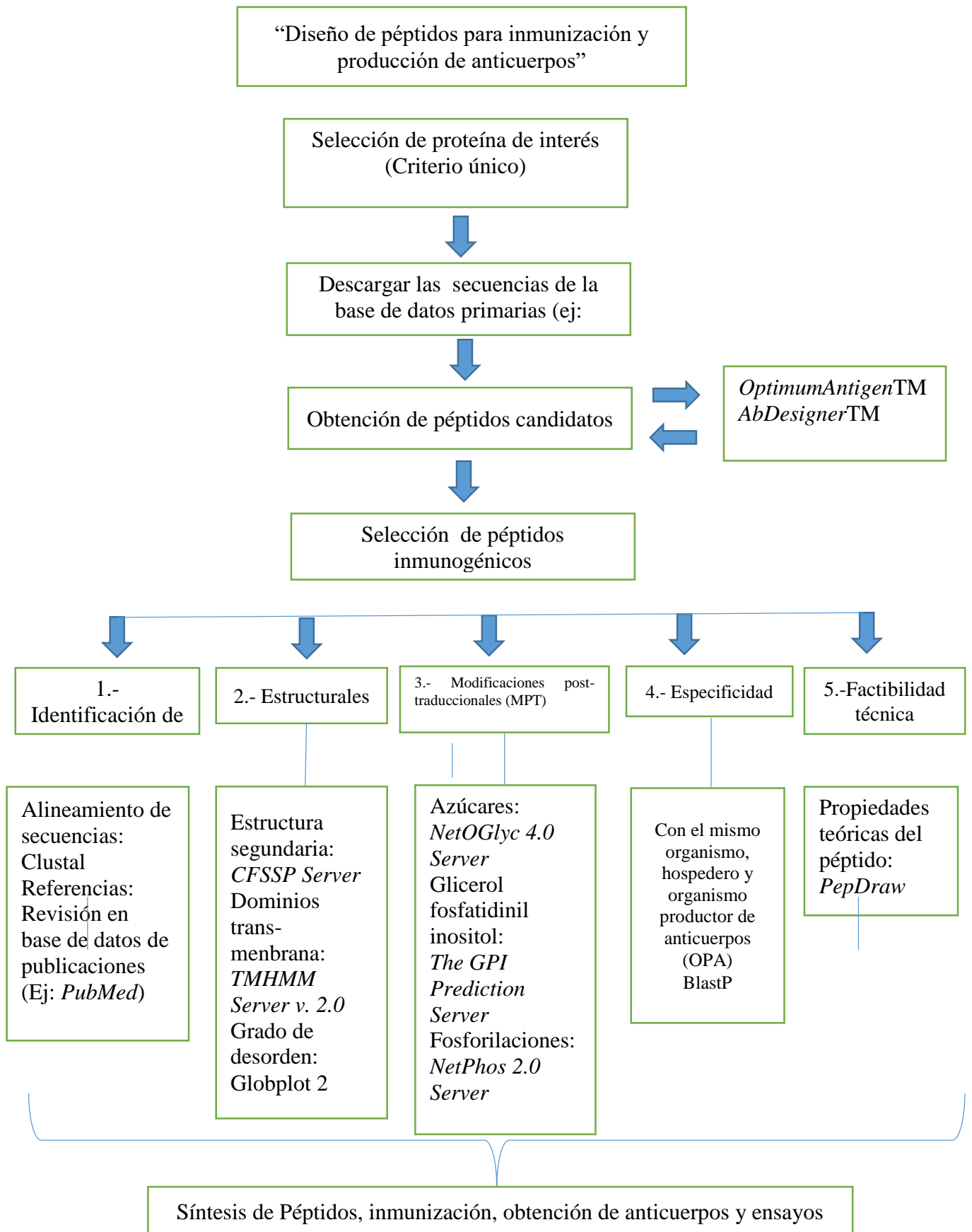


Figura 4.1.- Esquema de selección de péptidos seguido en el presente estudio.

4.3.-Resultados

4.3.1.- Análisis AbDesigner™

La Fibra-2 de FAdV-4 presenta 478 aa (anexos, 4S1), de los cuales según este software presentaría 466 péptidos candidatos con *ig-score* desde 2,54 hasta 8,14. El lado NH2-terminal (1-159 aa) presentó entre los aminoácidos 1 y 21 la región con mayor *ig-score* (8,14). La proteína PFMSP10 de *P.falciparum* presenta 525 aa (anexos, 4S1) y presentó 512 posibles péptidos. Los rangos del *ig-score* fueron desde 1,18 hasta 9,96. El lado NH2-terminal (1-175aa) ubicó el mayor *score* con 9,96. Según la tabla 4.1 el péptido para fibra-2 deberá ser elegido en la región NH2 debido a sus altos *scores*; para el caso de PFMSP10 los péptidos deben ser de la región NH2 y media de la proteína. Los péptidos que presentaron valores altos (≥ 8) de *ig-score* para fibra-2 fue de 0.2% (1/466) y para PFMSP10 un 14.4% (74/512).

Tabla 4.1.- Valores *ig-score* para las zonas NH2, COOH y región media de las proteínas fibra-2 y PFMSP10.

Región Posición de aa	Ig-Score Min-Max	Péptidos Totales	N° péptidos		
			≥ 4.5 (Bajo)	≥ 6.5 (Moderado)	≥ 8 (Alto)
fibra-2					
-NH2 (1-159)	3,16 - 8,14	147	86	12	1
Media (160-318)	2,54 - 6,38	166	105	0	0
-COOH (319-478)	3,00 - 7,13	153	88	5	0
		466	279	17	1
PFMSP10					
-NH2 (1-175)	1,90 - 9,96	173	155	130	56
Media (176-350)	2,71 - 9,36	179	162	82	19
-COOH (351-525)	1,18 - 7,34	160	86	10	0
		512	403	222	75

4.3.2.- Análisis Optimum Antigen™

Este análisis se realizó para filtrar los resultados de AbDesigner, un reporte de antigenicidad fue emitido por los laboratorios Genscript. Este reporte contempla valores de antigenicidad, superficie, hidrofiliidad y un *score* de desorden los cuales en conjunto generan un ranking. Se identificaron 9 péptidos para la fibra -2 y 10 péptidos para PFMSP10 los cuales se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Resultados de análisis Optimum Antigen™ y AbDesigner™ para Fibra-2 y PFMSP10

Optimum Antigen™				Región	AbDesigner™	
No	Antigenic Determinant	Antigenicity/Surface/Hydrophilicity	Disordered Score		Ig-Score	
	Fibra-2					
					Rank (Score)	Carácter
1	KRRHSENGKPETEA	3,40/1,00/1,23	0,3236	-NH2	7 (7,44)	Moderado
2	DSATMGNRPGDLNS	2,16/0,79/0,31	NONE	-COOH	14 (6,94)	Moderado
3	VDPSGGLDSTAGGL	1,98/0,71/0,11	NONE	-NH2	114 (5,31)	Bajo
4	PEGALDITPDGLDV	1,97/0,50/0,39	NONE	-NH2	185 (4,88)	Bajo
5	LKAQGGIQADSSGV	1,93/0,71/0,08	NONE	Medio	191 (4,85)	Bajo
6	VSVDDTLLVDQGEL	1,40/0,50/0,13	NONE	-NH2	379 (3,96)	Sin carácter
7	QQGPITADSSGIDL	1,39/0,71/0,07	NONE	Medio	115 (5,31)	Bajo
8	VDGVTVMVNDWEL	0,81/0,29/0,04	NONE	-NH2	356 (4,09)	Sin carácter
9	SPAPIKRAKRMVRA	0,78/0,64/0,61	0,0956	-NH2	209 (4,75)	Bajo
	PFMSP10					
					Rank (Score)	Carácter
1	NMNNEKNDNKDNKD	3,27/1,00/1,46	0,1597	-NH2	1 (9,96)	Alto
2	ERKNQKAPPGEHKP	3,16/0,93/1,14	0,1376	Medio	74 (8,01)	Alto
3	INNDNINNDNINNE	2,85/0,86/0,52	0,1126	-NH2	81 (7,88)	Moderado
4	VASPKGEDEKKSQP	2,75/0,93/1,26	0,0930	Medio	180 (6,98)	Moderado
5	IRKRKDNTQGSQHF	2,38/0,86/0,78	NONE	-NH2	184 (6,64)	Moderado
6	SGDQLQHPKEIDEN	2,00/0,79/0,74	0,1314	-COOH	177 (7,01)	Moderado
7	NNLKSYLEENDVS	1,84/0,71/0,38	NONE	Medio	326 (5,61)	Bajo
8	IINSNEHNEEQIKK	1,65/0,79/0,85	NONE	Medio	278 (5,99)	Bajo
9	SLSNKLNNENDHMN	1,65/0,79/0,43	NONE	-NH2	125 (7,33)	Moderado
10	RRTLLKESRDIKNT	1,55/0,79/0,92	0,1538	-COOH	284 (5,90)	Moderado

De los posibles candidatos para la región NH2- (86/147 péptidos detectados para esta región, tabla 4.1), región media (105/166 péptidos detectados para esta región) y COOH- (88/153 péptidos detectados para esta región, tabla 1) presentados por AbDesigner™ para Fibra-2, el uso de OptimumAntigen™ permitió seleccionar 1 péptido (KRRHSENGKPETEA) en la región NH2- que presentó carácter de “Moderado”, en la región media de Fibra-2 se identificaron 2 péptidos con carácter “Bajo” (LKAQGGIQADSSGV - QQGPITADSSGIDL) y un único péptido en la región COOH- con carácter “Moderado” (DSATMGNRPGDLNS). Para PFMSP10 el número de candidatos por AbDesigner™ para la región –NH2 (155/173), para la región media (162/179) y para –COOH (86/160) presentó una mayor cantidad de candidatos a comparación de fibra-2, tras el uso de OptimumAntigen™, esto permitió identificar un péptido con carácter “Alto” en cada una de las regiones NH2- (NMNNEKNDNKDNKD) y media (ERKNQKAPPGEHKP); mientras para la región COOH- se identificó 2 péptidos con carácter “Moderado” (SGDQLQHPKEIDEN – RRTLLKESRDIKNT).

4.3.3.- Selección de péptidos candidatos:

Para afinar el proceso de selección de péptidos se procedió a: identificar las regiones propias de la proteína, dominios transmembrana, estructuras secundarias, grado de

desorden y modificaciones postraduccionales; también a analizar la especificidad y las características químicas de los péptidos (Figura 4.1).

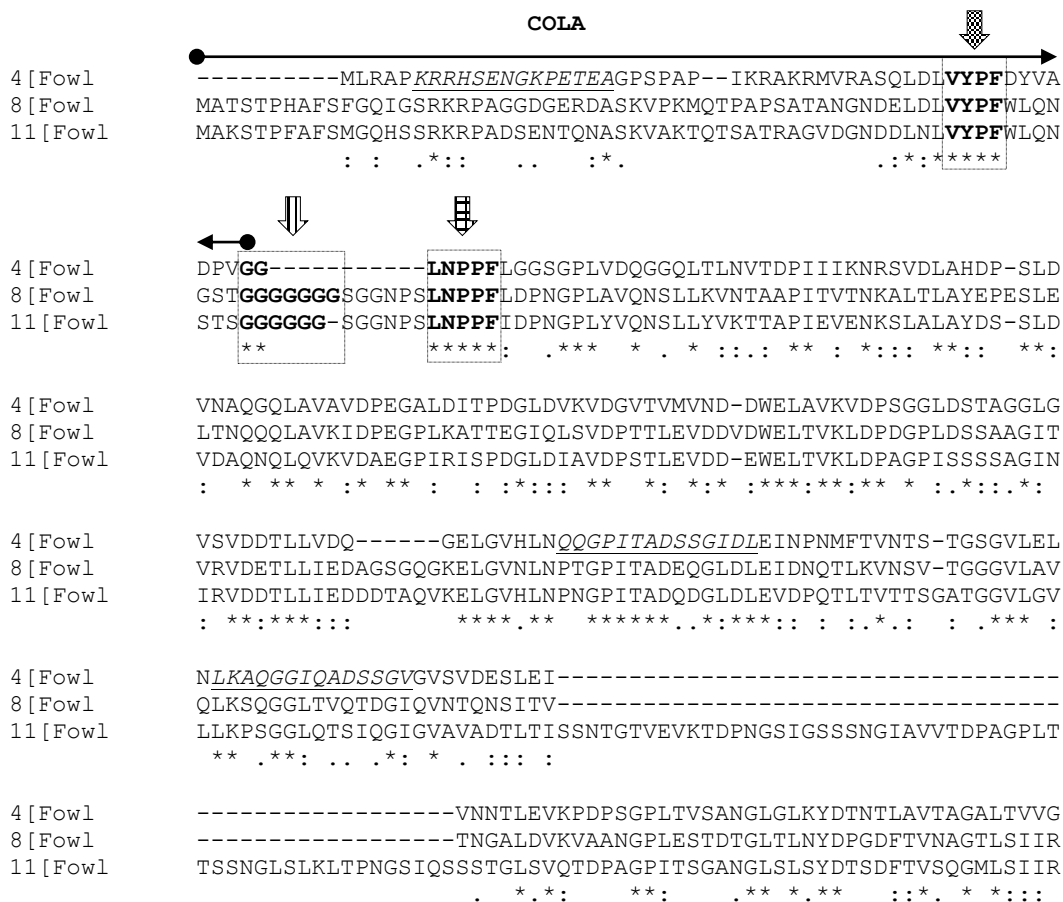
4.3.3.1. Identificación de regiones:

Con las secuencias de aminoácidos se logró identificar regiones de la proteína según reportes previos. 1) Las regiones estructurales de la proteína; 2) Dominios conservados en las proteínas; ya que si nuestros péptidos pudieron haber sido ubicados en algunas de estas regiones se puede comprometer la especificidad del anticuerpo diseñado, de la misma forma ocurre con las repeticiones en *tandem*, las cuales pueden ser variables entre cepas de una misma especie de virus o parásito.

4.3.3.1.1.- Fibra-2

Para determinar las regiones de la proteína fibra-2 se procedió a realizar un alineamiento de aminoácidos de esta secuencia con la fibra-1 de Fowl aviadenovirus 8 y 11, los cuales presentan un registro previo de sus regiones (19), en este caso la identificación de las regiones de la cabeza, tallo y cola de la proteína fibra-1 sirvieron como referencia para el alineamiento de la fibra-2 (Figura 4.2).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment



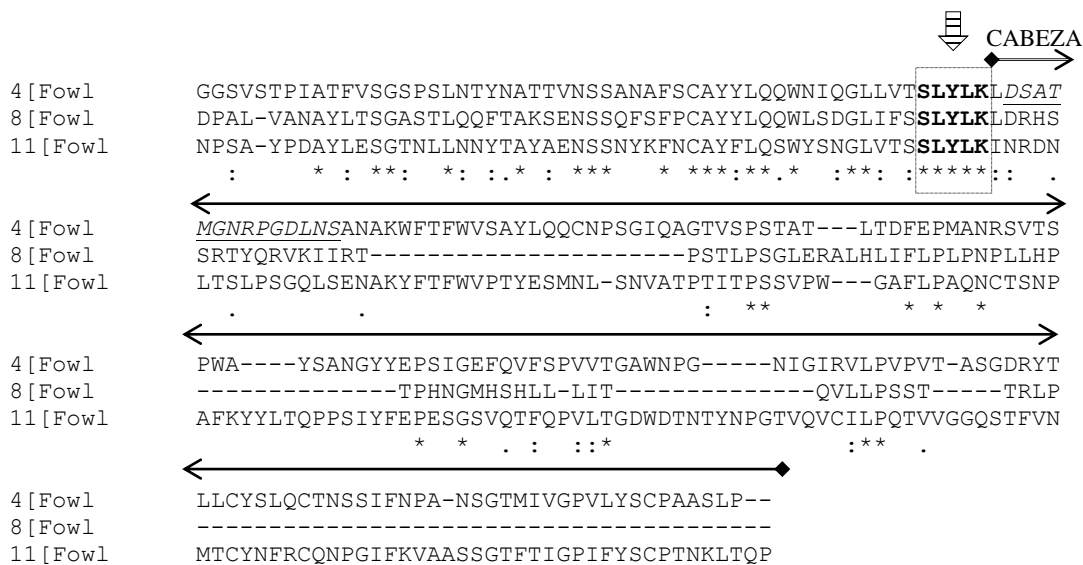


Figura 4.2.- Alineamiento de secuencias de Fibra -1 de 2 especies de fowl adenovirus aviar (8 y 11) y la Fibra -2 de FAdV-4. Flecha con relleno punteado presenta el motivo “VYPY” involucrado en la interacción con la proteína penton viral de los adenovirus. Flecha con líneas verticales indican la región “linker” (Gs) entre la cola y el tallo de la proteína fibra. Flecha con cuadrícula indica el motivo de inicio del tallo de la proteína. Flecha con líneas horizontales indican el final del tallo. Las letras en cursiva y subrayadas son los péptidos seleccionados.

Luego de identificar las regiones de Fibra -2 se procedió a determinar la ubicación de los péptidos predichos en la zona NH₂- (Cola), medio (Tallo) y COOH- (Cola) (Figura 4.2).

4.3.3.1.2.- PFMSP10

Según los reportes de Black *et al* 2003 y Pacheco *et al* 2012 (20, 21) se esquematizó la secuencia de PFMSP10 y se ubicaron los péptidos (Figura 4.3). El péptido NMNNEKNDNKNKD se encuentra a una distancia de 23 aa *downstream* del péptido señal y 40 aa *upstream* de la secuencia repetitiva. Mientras que los péptidos de la región COOH- se encuentran alejados a 54 aa y 36 aa *upstream* de los dominios conservados *Epidermal growth factor-like domain* (EGF-like). El péptido ERKNQKAPPGEHKP se encuentra en la zona de potencial clivaje predicha por Black *et al* 2003 (20), sin embargo a la fecha no se ha identificado específicamente que región es reconocido por las proteasas.

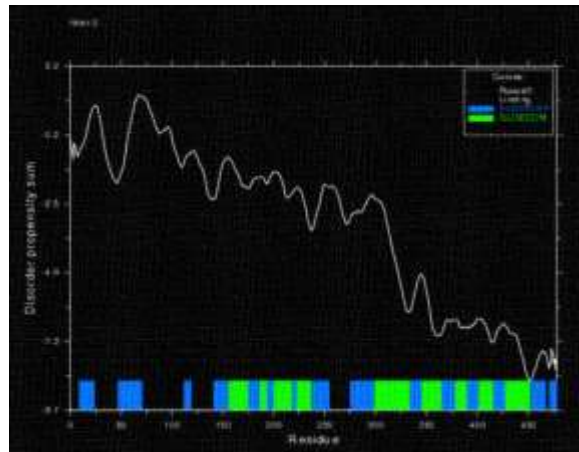
Tabla 4.3.- Porcentajes de residuos en estructuras hélix, strand, turn y coil según el servidor CFSSP. Además se presenta los aminoácidos en zonas de desorden según el servidor GlobPlot 2. Los valores son relaciones entre el número de aminoácidos con la característica entre la cantidad de aminoácidos de cada péptido (14).

	Helix	Strand	Turn	Coil	Disorder
Fibra-2					
KRRHSENGKPETEA	3 (0,21)	0 (0)	2 (0,14)	9 (0,65)	11 (0,78)
LKAQGGIQADSSGV	6 (0,42)	3 (0,21)	3 (0,21)	2 (0,14)	5 (0,35)
QQGPITADSSGIDL	5 (0,35)	3 (0,21)	4 (0,28)	2 (0,14)	12 (0,85)
DSATMGNRPGDLNS	3 (0,21)	0 (0)	2 (0,14)	9 (0,65)	12 (0,85)
PFMSP10					
NMNNEKNDNKDNKD	4 (0,28)	0 (0)	2 (0,14)	8 (0,58)	14 (1,0)
ERKNQKAPPGEHKP	10 (0,71)	0 (0)	2 (0,14)	2 (0,14)	14 (1,0)
SGDQLQHPKEIDEN	13 (0,92)	0 (0)	1 (0,08)	0 (0)	4 (0,28)
RRTLLKESRDIKNT	8 (0,58)	4 (0,28)	2 (0,14)	0 (0)	0 (0)

En la figura 4.5 y la tabla 4.3 se muestran que los péptidos seleccionados presentan para fibra 2 un porcentaje de aminoácidos en estructura turn + coil de 79% para los péptidos de la región –NH₂ y COOH; mientras que para la zona media presentó para LKAQGGIQADSSGV y QQGPITADSSGID un 35% y 42% respectivamente. PFMSP10 presentó para NMNNEKNDNKDNKD un 72% (entre turn + coil), para ERKNQKAPPGEHKP un 28%, SGDQLQHPKEIDEN un 8% y para RRTLLKESRDIKNT un 14%, este último además tiene menos residuos estructurales con un 86% (Helix + Strand) frente a 92% del péptido SGDQLQHPKEIDEN.

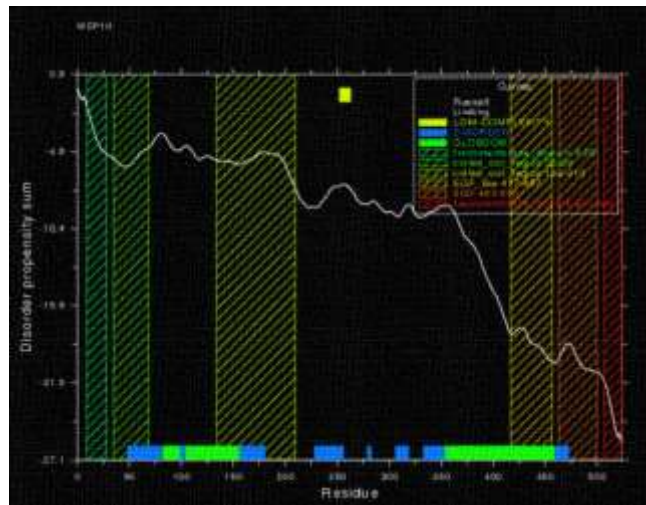
4.3.3.4.- Grado de desorden

Las estructuras desordenadas son un buen blanco para la elección de péptidos ya que al no tener una estructura definida estas pueden ser reconocidas por los anticuerpos, ya sea que la proteína se encuentre en su forma nativa o desnaturalizada. Para esto se utilizó el servidor GlobPlot 2 para identificar si nuestros péptidos se encuentran en estas regiones.



mlrapkrr**HS** **ENGKPE**TEAG **PSP**Apikrak rmvrasqldl vvpfdy**VADP** **VGGLNPPFLG** **GSGPLVDQGG**
 Qltlnvtdpi iiknrsvdla hdpsldvnaq gglavavdpe **gALDITPDG**l dvkvdgvtvm vnddwelavk
VDPSGGLD**ST** **AGGLG**vsvdd tllvdqgelg vhl**nQQGPIT** **ADSSGI**dlei npn**MFTVNTS** tgsgvlelnl
 kagggig**ADS** **SG**vgvsvdes lqivnnt**LEV** **KPDP**SGPL**TV** **SANGL**glkyd tntlavtaga ltv**vGGGSVS**
TPIATFVSGS **PSLNTYNA**tt vnssanafsc ayylqgwniq gllvtslylk lds**ATMG**NR**P** **GDLNS**anakw
 ftfwvsaylq qcn**PSGIQAG** **TVSP**STATlt dfepmanrs**V** **TSPWTYSANG** **Y**epsigefq vfspv**VTGAW**
NPGNIGIrvl pvpvsasger ytlcyslqc t**ASIFNPNN** **SGTMIVG**pvl **YSCPAASLP**

Figura 4.6.- Resultados de grado de desorden de Fibrin-2. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de fibrin-2 y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.



mmffkcnqvf tlvfllllyf nnivythvdd ikntsqqkit ydkynkn**KEN** **MNNEKNDNKD** **NKDNIYNDNI**
NNDNINNDNI Nnedeyskfls mkhykds**SN** **KLNN**endhmn yllrkrkdnt qgsqhfne*ni* ennenvenne
 niennennen ienie**NNENN** **ENNENIENNE** **NNENNENS****SI** Mnsesynnii nsnehneeqi kkkeedliea
 ffpfilkkld neslsld**NKY** **DDYYNL**PNDH **NDTHKENS**SD **HNLLGY**klgn nlksylieen dvsqktd**DI**
NESassdsen iqeilstdsn tshlk**ERKNQ** **KAPPGEH**KPe vknallnsqv as**PKGEDEK**K **SQPQHPLVNS**
GDQlqhpkei denaekirrt llkesrdikn ttaiidetvy kfeqlimkgr yyatavrnfv ifkvnicey
 skcgpnsr*cy* ivekdkeqcr crpnyivdms vnyfkci**pmK** **DMNCSK**NNGG **CDV**naectiv egavkqcqsh
 lyfgdgvfcv knsqtkqtly ilfivillvf qnffi

Figura 4.7.- Resultados de grado de desorden de PFMSP10. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de PFMSP10 y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.

Los resultados nos indican para fibra-2 un alto porcentaje de aminoácidos (más 75%) en los péptidos que se encuentran en zonas de desorden de la proteína (KRRHSENGKPETEA, QQGPITADSSGIDL, DSATMGNRPGDLNS) (Figura 4.6). Para PFMSP10 dos de ellos (NMNNEKNDNKDNKD, ERKNQKAPPGEHKP) presentaron 100% de sus aminoácidos en zonas desordenadas y un péptido no presentó aminoácidos en zonas desordenadas (RRTLLKESRDIKNT) (Figura 4.7).

4.3.3.5.- Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones que puedan sufrir las secuencias de aminoácidos por adición de azúcares, fosfatos o unidades de fosfatidil inositol glicosilados (GPI) son un factor a considerar, ya que si se eligen péptidos que sean potenciales puntos de modificación, estas pueden impedir el reconocimiento del anticuerpo diseñado hacia la proteína nativa. Para identificar las adiciones de azucares se utilizó el servidor NetOGlyc 4.0 Server, para las fosforilaciones NetPhos 2.0 y para la predicción de GPI el servidor The GPI Prediction Server.

Fibra-2 presentó en su secuencia 19 puntos de potenciales fosforilaciones (Serinas: 11; Treoninas: 4 y Tirosinas: 4); 14 puntos de adición de azucares y ningún punto de adición de GPI. El péptido KRRHSENGKPETEA presentó 2 modificaciones (serina y azúcar en un mismo aminoácido), QQGPITADSSGIDL una modificación de serina, LKAQGGIQADSSGV dos modificaciones de serina, mientras que DSATMGNRPGDLNS no presentó modificaciones en su secuencia (Figura 4.8).

MLRAPKRRHSENGKPETEAGPSPAPIKRAKRMVRSQDLVYPFDYVADPVGGLNPPFLGGSGPLVDQGGQLTLNVTDP	80
I IKNRSVDLAHDPSLDVNAQQQLAVAVDPEGALDITPDGLDVKVDGVTVMVNDWELAVKVDPSGGLDSTAGGLGVSVD	160
TLVDQGEELGVHLNQGPITADSSGIDLEINPNMFTVNTSTGSGVLELNLKAQGGIQADSSGVGVSVDESLEIVNNTLEV	240
KPDPSPGLTVSANGLGKLYDTNLTAVTAGALTVVGGGSVSTPIATFVSGSPSLNTYNATTVNSSANAFSCAYLQQWNIQ	320
GLLVTSLYLKLDSATMGNRPGDLNSANAKWFTFWVSAYLQQCNPSGIQAGTVSPSTATLTDPEPMANRSVTSFWAYSANG	400
YYEPSIGEFQVFSVVVTGAWNPGNIGIRVLPVPTASGDRYTLCCYSLQCTNSSIFNPANSGTMIVGPVLYSCPAAASLP	480
.....S/G.....S.....S.....Y.....T.....	80
.....S.....S.....SS.....S.....	160
.....G.....T...G.....G.GT.....G.S/G.G.G...G.....	240
.....G.....G.....G.G.G...T/G.....Y.....	320
Y.....Y.....S.....	400
.....Y.....S.....	480

Figura 4.8.- Secuencia de fibra-2 presentando las modificaciones. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina y “G” indica un modificación de azúcar.

PFMSP10 presentó 48 potenciales puntos de modificaciones postraduccionales, de las cuales 16 fueron fosforilaciones en serinas, 2 en treonina, 2 en tirosina, se identificó 17 puntos para azúcares y 1 punto para GPI. Los péptidos NMNNEKNDNKDNKD y ERKNQKAPPGEHKP no presentaron aminoácidos con modificaciones, mientras que los péptidos SGDQLQHPKEIDEN y RRTLLKESRDIKNT presentaron modificaciones de azúcares una respectivamente (Figura 4.9).

MFFKCNQVFTLVFLLLLYFNNIVYTHVDDIKNTSQKKITYDKYNKNKENMNEKNDNKDNDNIYNDNINNDNINNDNIN	80
NEDEYKFLSMKHYKDSLNSKLNNDHMNYLIRKRKDNTQGSQHFNENIENNENVENNENIENNENENIENIENNENNE	160
NNENIENNENNNENNENSIMNSESYNNIINSNEHNEEQIKKKEEDLIEAFFPFI LKKLDNESLSLDNKYDDYYNLPNDHN	240
DTHKENS SDHNLG YKLGNNLKS YLIEENDVSQKKTDDINESASSDSENIQEILSTDSNTSHLKERKNQKAPPGEHKPEV	320
KNALLNSQVASPKGEDEKKSQPQHPLVNSGDQLQHPKEIDENAEKIRRTLLKESRDIKNTTAI IDETVYKFEQLIMKGRY	400
YATAVRNFVIFKVN YICEYSKCGPNSRCYIVEKDKQCRCRPNYIVDMSVNYFKCIPMKDMNCSKNNGGCDVNAEACTIVE	480
GAVKCQC SHLYFGDGVFCVKN SQTKQTLYILFIVILLVFNFFI	560
.....Y.....GS/G....GY..Y.....Y.....	80
...Y...S...Y..G.....G..S/G.....	160
.....S.....GY.....S.....Y..YY.....	240
.T....SG.....S.....S/G.S/GS.....GS/G..SGG.S.....	320
.....G...S/G.....S/G.....G.....Y.....	400
.....Y.....T...	480
.....I.....	560

Figura 4.9.- Secuencia de PFMSP10 presentando las modificaciones. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina; “G” indica un modificación de azúcar y I indica el sitio de modificación para GPI.

4.3.3.6.- Especificidad

Con las secuencias de péptidos se procedió a realizar la búsqueda de posibles secuencias que compartan en común hasta en una serie de 5 aminoácidos continuos, que puedan reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos diseñados.

4.3.3.6.1.- Ensayos de BlastP para fibra-2: Identificación de secuencias conservadas

Los resultados de alineamientos se presentan en la tabla 4.4. Para el péptido KRRHSENGKPETEA, esta se alinea a la “fibra-2 de FAdV-4” y aviadenovirus A; parcialmente (8/14 aminoácidos) con Fowl adenovirus 10. Su presencia en su hospedero *Gallus gallus*, las secuencias formadas entre de 5-6 aminoácidos se encuentran presentes en 9 proteínas del hospedero natural del virus. Su presencia en el organismo productor de anticuerpos (OPA) (*O.cuniculus*), 16 proteínas presentaron similar secuencia de aminoácidos, esto es importante ya que mientras un antígeno sea más extraño al organismo, mejor es el antígeno para evocar una respuesta inmune, favoreciendo la producción de anticuerpos. De este grupo la secuencia KRRHS estaba presente en una proteína de función inmune (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B). Al comparar los resultados del hospedero y el organismo se puede observar 3 proteínas que comparten secuencias de péptidos en común (ATP-dependent RNA helicase, B-cadherin y spectrin beta chain, non-erythrocytic) indicando que estas secuencias “KRRHS”, “HSENG” y “KPETEA” puedan estar conservadas entre especies.

Para el péptido DSATMGNRPGLNS se alinea a la “fiber-2 short fiber de fowl adenovirus 4” y Fowl adenovirus A; mientras que parcialmente 11/14 aminoácidos con “short fiber de fowl adenovirus 10”. Con respecto al alineamiento con el hospedero 17 proteínas fueron identificadas. El alineamiento con *O. cuniculus* identificó 20 proteínas, de las cuales 11 de ellas presentaban “RPGDL” como secuencia común y la secuencia “RPGDL” está asociado con proteínas de respuesta inmune (T-cell activation Rho GTPase-activating protein). Al comparar ambos resultados de *Gallus gallus* con *Oryctolagus cuniculus*, se identificaron 3 nombres de proteínas (AT-rich interactive domain-containing protein 1A, Fumarylacetoacetase y zinc finger E-box-binding

homeobox 1), las cuales tienen en común secuencias como “MGNRP”, “RPGDL” y “PGDLN”.

El péptido LKAQQGIQADSSGV se alineó con la fibra 2 de “fowl adenovirus C”, la proteína “fibra de fowl adenovirus 4”, la “short fiber de fowl adenovirus A”, un alineamiento parcial (11/14) con “short fiber protein de Fowl adenovirus 10” y con “fiber-1 de Fowl aviadenovirus A” (5/14). Al momento de alinear con el hospedero natural 16 proteínas fueron identificadas. El alineamiento con *O.cuniculus* mostró 14 proteínas con al menos 5 aminoácidos en común con nuestro péptido de interés. Entre las cuales una secuencia de aminoácidos “ADSSG” está presente en proteínas de función inmune (IgG heavy chain VDJ región). Los nombres de las proteínas en común para el hospedero y el organismo fueron 2 (semaphorin-5A (“GGIQA” y fermitin family homolog 2 (“GIQAD”)).

El péptido QQGPITADSSGIDL se alineó con “fiber-2 protein de Fowl aviadenovirus C”, “fiber protein 2 de Fowl adenovirus 4”, “short fiber de Fowl aviadenovirus A”, “short fiber protein de Fowl adenovirus 10”; parcialmente con “fiber de Turkey aviadenovirus 4”, “fiber-2 de Pigeon adenovirus 1”, “fiber protein de Fowl adenovirus 8”, “Fowl aviadenovirus D y E”. El alineamiento con *Gallus gallus* presentó 8 proteínas y para *O.cuniculus* presentó 17 de las cuales 5 estaban implicadas en la respuesta inmune (interleukin enhancer-binding factor 3 (“QQGPI”), IgG heavy chain VDJ region (“ADSSG”) además de antibody variable domain, immunoglobulin heavy chain variable región, IgM heavy chain VDJ región todas presentando la secuencia “SGIDL”).

4.3.3.6.2.- Ensayos de BlastP para PFMS10: Identificación de secuencias conservadas

Los resultados de alineamiento entre los péptidos de PFMS10 (Tabla 4.5) y las proteínas de *Plasmodium falciparum* 3D7 fueron para el péptido NMNNEKNDNKD con “Merozoite surface protein 10” y otras 10 proteínas alineadas parcialmente entre 5 – 7 aminoácidos en común. Cuando se alineó a las proteínas del hospedero (*Homo sapiens*) se identificaron 9 proteínas de las cuales 7 compartían en común la secuencia “NNEKND”. Para el alineamiento con *O.cuniculus* sólo se identificó 1 proteína (IaC-like protein 1) alineada parcialmente. No se identificaron proteínas en común entre el hospedero y el OPA a diferencia de fibra-2. El péptido ERKNQKAPPGEHKP se alineó con “Merozoite surface protein 10” y de forma parcial con otras 9 proteínas con *Plasmodium falciparum* 3D7. La sección “ERKNQK” se alineó con 7 proteínas de las 9. En el alineamiento con *Homo sapiens* se identificaron 4 proteínas alineadas parcialmente, con *O.cuniculus* 13 proteínas (5-6 aminoácidos) y ninguna proteína en común con las halladas con el hospedero. El péptido SGDQLQHPKEIDEN se alineó con “Merozoite surface protein 10” y parcialmente con otras 22 proteínas en *Plasmodium falciparum* 3D7, de las cuales 20 tenían la secuencia “KEIDEN” en común. Cuando se alineó con el hospedero se obtuvieron 6 proteínas y con *O.cuniculus* 16 proteínas. Una proteína en común (chloride intracellular channel protein 4) la cual tenía la secuencia “EIDEN” alineada al péptido SGDQLQHPKEIDEN. El alineamiento del péptido

RRTLLKESRDIKNT con *Plasmodium falciparum* 3D7 nos permitió identificar a “Merozoite surface protein 10” y otras 13 proteínas alienadas parcialmente (5-7 aminoácidos). Con el hospedero se detectaron 7 proteínas y 12 con *O.cuniculus*. La proteína E3 ubiquitin-protein ligase ARIH2 fue común entre los dos grupos de proteínas y la secuencia que presentó fue “RRTLLK”.

4.3.3.7.- Características de los péptidos

Para el cálculo de estas características se consideró una cisteína en el extremo amino o carboxilo del péptido y se utilizó el servidor PepDraw. Los resultados se encuentran en la tabla 4.6. El péptido CLKAQGGIQADSSGV de fibra -2 presenta carga neta 0 y esto podría comprometer la solubilidad en agua del péptido. Mientras que los otros péptidos para fibra-2 y PFMSP10 presentaron carga y puntos isoeléctricos alejados del pH del agua lo que facilitaría su uso en solución acuosa

Tabla 4.6.- Características químicas de los péptidos seleccionados.

	Hidrofobicidad (Kcal /mol)	Carga neta	Punto isoeléctrico
Fibra-2			
KRRHSENGKPETEAC	+33,67	+1	9.19
CLKAQGGIQADSSGV	+18,40	0	6.08
CQQGPITADSSGIDL	+17,32	-2	2.75
CDSATMGNRPGDLNS	+20,86	-1	3,91
PFMSP10			
NMNNEKNDNKDNKDC	+35,26	-1	4,43
CERKNQKAPPGEHKP	+31,37	+2	10,10
CSGDQLQHPKEIDEN	+29,39	-3	3,99
CRRTLLKESRDIKNT	+24,37	+3	10,55

4.4.- Análisis de los pasos de selección

4.4.1.- Fibra -2

El análisis con AbDesignerTM nos permitió identificar 466 péptidos potenciales, de los cuales 279 se encontraban dentro de los criterios bajo, medio y alto (*ig -score* ≥ 4.5); con Optimun AntigenTM se identificaron 9 péptidos y cuando se cruzó la información de ambos análisis se identificaron 7 péptidos. De estos péptidos, 4 se ubicaron en la región -NH₂, 2 en la región media y 1 en la región -COOH. En la región -NH₂ se eligió el péptido que presentó un carácter moderado (KRRHSENGKPETEA), para la región media se tomaron los dos péptidos con carácter “bajo” (CQQGPITADSSGIDL y LKAQGGIQADSSGV) al no haber ninguno con carácter “moderado” o “alto” y para -COOH se tomó el único candidato con carácter “moderado” (DSATMGNRPGDLNS), de esta forma se redujo a 4 los péptidos candidatos.

Los péptidos fueron ubicados en un mapa de la proteína elaborado en base a reportes publicados previamente (Figura 4.2), de esta forma KRRHSENGKPETEA se ubicó en la

cola citoplasmática de la proteína, QQGPITADSSGIDL y LKAQGGIQADSSGV en el tallo de la proteína y DSATMGNRPGDLNS en la cabeza extracelular (*knob*) de la proteína. Fibra-2 no posee una zona trans-membrana ni péptidos señales que puedan clivarse.

La estructura secundaria nos presenta el grado de desorden de los aminoácidos, es decir mientras menos estructuras posean más posibilidades hay que el anticuerpo detecte la proteína en cualquier estado (7). KRRHSENGKPETEA, QQGPITADSSGIDL y DSATMGNRPGDLNS presentan aminoácidos que participan en estados de desorden y que participan a su vez en formar giros o *coils*. Tanto QQGPITADSSGIDL y LKAQGGIQADSSGV poseen más estructuras (*Helix + Strand*) al ubicarse en la zona del tallo de la proteína.

Las modificaciones postraduccionales pueden evitar que la proteína sea reconocida por anticuerpos basados en péptidos (7). KRRHSENGKPETEA, QQGPITADSSGIDL y LKAQGGIQADSSGV presentaron al menos una modificación ya sea del tipo glicosilación o fosforilación, mientras que DSATMGNRPGDLNS no presentó modificaciones.

Para determinar la conservación de regiones de los péptidos se realizaron análisis por Blastp en donde se comparó las secuencias con las proteínas anotadas del hospedero natural (*Gallus gallus*) y el organismo en donde se producirán los anticuerpos (OPA), luego se identificaron los nombres de las proteínas comunes en cada resultado para verificar la conservación del péptido o parte de este. Se identificaron para KRRHSENGKPETEA unas 3 proteínas, para QQGPITADSSGIDL 2 proteínas, para LKAQGGIQADSSGV unas 2 proteínas y DSATMGNRPGDLNS unas 3 proteínas. Sin embargo; llamo la atención para QQGPITADSSGIDL que 5 de las proteínas alineadas con *O.cuniculus* estuvieran relacionadas con dominios variables de anticuerpos, el mismo péptido presentó alineamientos parciales con adenovirus aviares tipo B, D y E además de los alineamientos totales esperados frente a los tipos A y C.

Nuestro criterio de selección fue la especificidad para los tipos aviares A, C y la ausencia de secuencias conservadas con proteínas inmunes como las inmunoglobulinas en *O.cuniculus* el cual puede comprometer la antigenicidad del péptido y por ende la obtención de anticuerpos.

Con respecto al carácter técnico sólo el péptido LKAQGGIQADSSGV no presentó carga (0) esto pudo traer un problema de solubilidad. A pesar de esto se tomaron como péptidos elegidos para síntesis KRRHSENGKPETEA (-NH₂ o Cola), LKAQGGIQADSSGV (Media o tallo) y DSATMGNRPGDLNS (-COOH o Cabeza) (Figura 4.2).

4.4.2.- PFMSP10

AbDesignerTM identificó 512 péptidos para PFMSP10 de estos 403 tenían valores *ig-score* por encima de 4,5. OptimunAntigenTM identificó 9 péptidos; al cruzar ambos resultados se obtuvo para la zona -NH₂ unos 3 péptidos con caracteres (01) alto y (02) moderados, para la zona media 4 péptidos con caracteres (01) alto, (01) moderado y (02)

bajo; mientras que para la zona –COOH se obtuvo (02) con carácter moderado. Se seleccionaron los péptidos con carácter “Alto”: para las regiones –NH₂ (NMNNEKNDNKDNKD) y región media (ERKNQKAPPGEHKP); mientras que para la región –COOH se seleccionaron los dos únicos péptidos identificados (SGDQLQHPKEIDEN y RRTLLKESRDIKNT); seleccionando 4 péptidos para los siguientes análisis.

Los péptidos se ubicaron en mapas elaborados para la proteína PFMSP10 (Figura 4.3). NMNNEKNDNKDNKD se ubicó entre el péptido señal de la proteína y la zona repetitiva de la proteína; mientras que el péptido ERKNQKAPPGEHKP se ubica en una región no caracterizada de la proteína; los péptidos GDQLQHPKEIDEN y RRTLLKESRDIKNT se ubican próximos a los dominios EGF y GPI. Ningún péptido se ubicó en el péptido señal u dominio transmembrana.

Los péptidos que presentaron regiones más desordenadas fueron NMNNEKNDNKDNKD y ERKNQKAPPGEHKP; mientras que en la región -COOH presentaron valores entre 86 y 92% correspondiente al porcentaje de sus residuos que participan en estructuras *Helix* o *strand*.

En las modificaciones postraduccionales los péptidos de las regiones –NH₂ y región media no presentaron modificaciones, mientras que los péptidos de la región –COOH presentaron modificaciones de azúcares.

Los resultados de Blastp para NMNNEKNDNKDNKD muestran un alineamiento con la proteína PFMSP10 y 10 proteínas de *Plasmodium falciparum* 3D7 que alineaban entre 5 – 7 aminoácidos. Para ERKNQKAPPGEHKP se identificó una región conservada de 6 aminoácidos de PFMSP10 con otras 7 proteínas. Para el caso de SGDQLQHPKEIDEN se identificaron 20 proteínas que tenían en común la secuencia “KEIDEN” y de forma conservada dentro del repertorio de proteínas de *P.falciparum* 3D7. Finalmente con RRTLLKESRDIKNT se identificaron 13 proteínas de *P.falciparum* pero no se observó secuencias conservadas. Todos los péptidos seleccionados presentaron carga neta y un punto isoeléctrico adecuado (carga positiva o negativamente y un punto isoeléctrico diferente a 7). El criterio que determinó la selección fue la conservación de “KEIDEN” presente en el péptido SGDQLQHPKEIDEN y otras 20 proteínas del parásito. De esta forma sólo se eligieron para la síntesis los péptidos NMNNEKNDNKDNKD (NH₂-), ERKNQKAPPGEHKP (Media) y RRTLLKESRDIKNT (COOH-) (Figura 4.3).

4.5.- Ensayos de western blot para fibra-2

La proteína recombinante de Fibra -2 fue utilizada como un control de reacción en los ensayos de western blot, de la misma forma se utilizó el FAdV-4 purificado para determinar su correcta reactividad, también se evaluó un lisado de una línea celular de carcinoma hepato-celular de pollo (LMH) e IgG de conejo para evaluar su reactividad. Frente a la proteína recombinante los anticuerpos diseñados presentaron reactividad en una banda de aproximadamente ~60kDa. El anticuerpo contra el péptido LKAQGGIQADSSGV (Fib2-3) fue el que reaccionó con mayor intensidad, como puede ser apreciado en la figura 4.10

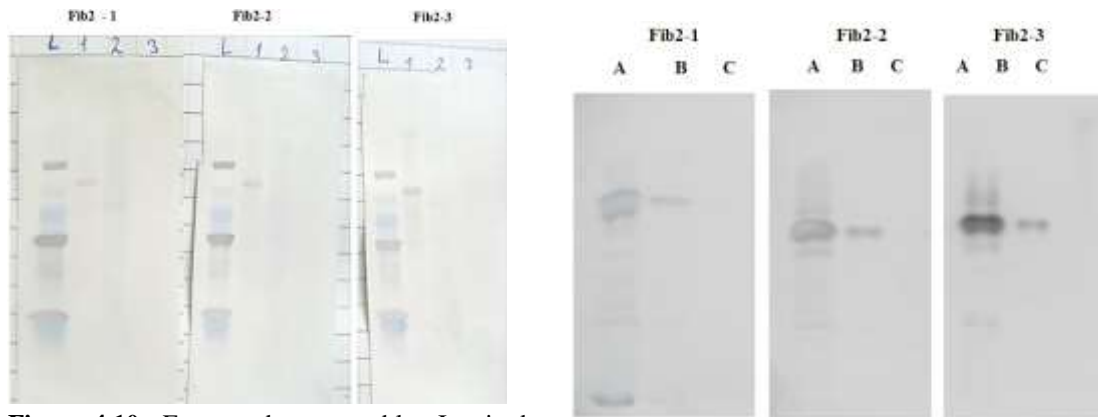


Figura 4.10.- Ensayos de western blot. Izquierda: Reactividad de los anticuerpos (Fib2-1; Fib2-2 y Fib2-3 preparados 1:600) frente a la proteína recombinante de fibra 2 (donada por el Dr. Vikram Vakaria); carril 1: Proteína recombinante; 2: igG de conejo; carril 3 células LMH de pollo. L: Marcador molecular de proteínas. Derecha: Reactividad de los anticuerpos frente a virus de hepatitis purificado. Carril A: Anticuerpos 1: 50; carril B: Anticuerpos 1: 500; carril C anticuerpos 1: 5000.

4.6.- Ensayos de western blot e IFI para PFMSP10

La proteína recombinante rMSP10, lisado parasitario proveniente de cultivos y glóbulos rojos de donante sano, fueron utilizados para evaluar la reactividad de los anticuerpos obtenidos. Los 3 anticuerpos reaccionaron tanto a la proteína como al lisado de parásitos en el estadio esquizonte (estadio en donde se reporta una mayor expresión de la proteína) (22). La proteína identificada tuvo un peso molecular de ~68kDa (Figura 4.11). Los ensayos de IFI (Inmunofluorescencia indirecta) muestran reactividad de los anticuerpos frente al estadio esquizonte (Figura 4.12).

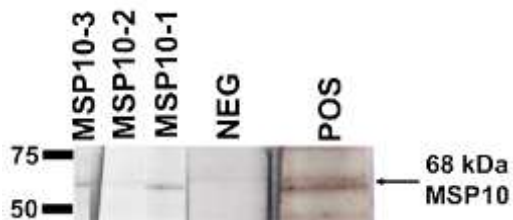


Figura 4.11.- Se muestra la reactividad de los anticuerpos producidos contra PFMSP10, utilizando los péptidos seleccionados. Se lisaron glóbulos rojos infectados con *P.falciparum* (cepa 3D7) en el estadio conocido como esquizonte. PFMSP10-1 (NMNNEKNDNKDNKD); PFMSP10-2 (ERKNQKAPPGEHKP) y PFMSP10 – 3 (RRTLLKESRDIKNT). NEG: Lisado de glóbulos rojos de donante. POS: Suero policlonal de conejo contra proteína recombinante para PFMSP10 (Brindada por Dr. Joseph Vinetz).

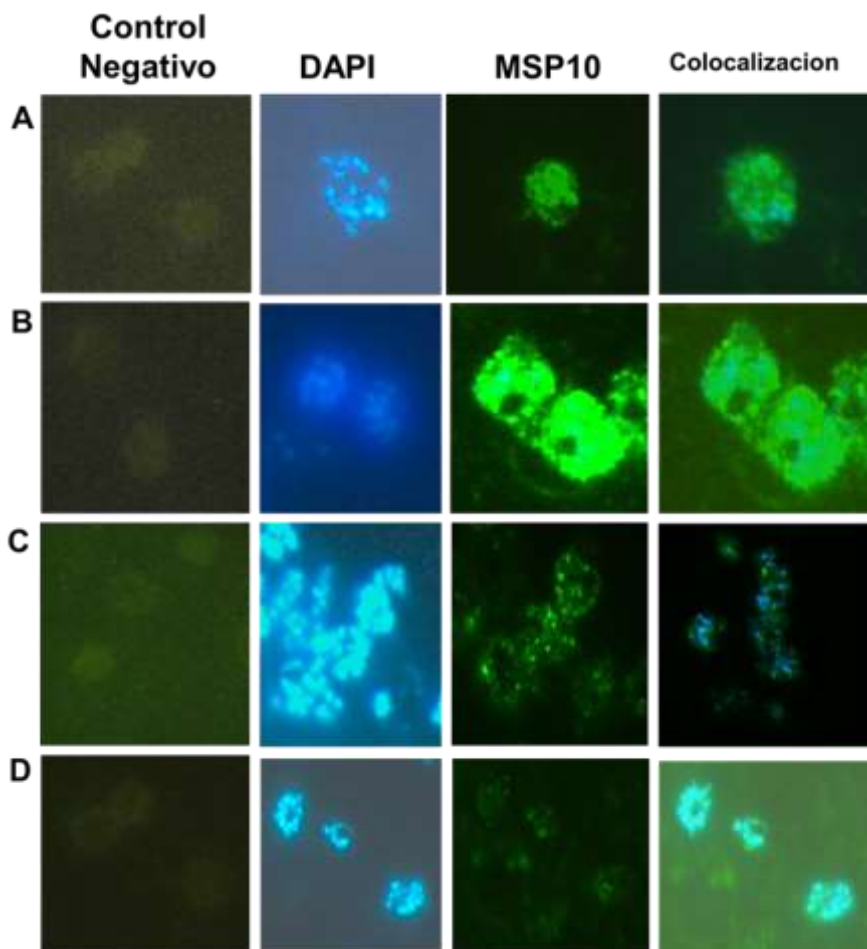


Figura 4.12.- Ensayos de IFI utilizando smears de cultivos de *P.falciparum* 3D7 en estadio esquizonte. A. Suero Policlonal anti-PfMSP10 (Donado por el Dr. Joseph Vinetz); B. PFMSP10-1 (NMNNEKNDNKNKD); C. PFMSP10-2 (ERKNQKAPPGEHKP) y D. PFMSP10 – 3 (RRTLLKESRDIKNT). Control Negativo: Glóbulos rojos humanos de donante. DAPI: Marcador de núcleo.

4.7.- Discusión

La disponibilidad de anticuerpos en el mercado puede limitar los estudios de proteínas de interés local como el caso de la fibra-2 y PFMSP10, los cuales no tienen formas comerciales disponibles a la fecha por lo menos en 3 compañías que fueron consultadas (Biosource (0), Abcam (0) y lsbio (0), lo que nos lleva a la producción propia de los anticuerpos.

La selección de péptidos es una etapa importante, previa a la inmunización, para la posterior obtención de anticuerpos, ya sea del tipo monoclonal o policlonal. También se debe resaltar que los anticuerpos policlonales de epítopes lineales tienen ventajas frente a los policlonales clásicos (brindando mayor especificidad) y también frente a los monoclonales (velocidad de producción y costos), por lo que son una alternativa intermedia.

Como un apoyo a esta etapa de selección tenemos desde plataformas libres en la Internet (AbDesigner, EpiC), así como softwares especializados en la predicción de epítopes en 3D (23). Pisitkin *et al* 2014 (1), menciona la necesidad de seleccionar los péptidos en función a su identidad como un fuerte criterio para este proceso. Según sus reportes con un alineamiento parcial de 8 aminoácidos no existió reacción cruzada con proteínas del mismo organismo (Human nephrin); mientras que en un alineamiento parcial de 9 aminoácidos, si existió una reacción cruzada a nivel de especies (*Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*) para un anticuerpo de Human podocin. AbDesigner™ es un software ampliamente utilizado por los grupos de investigación y ha tenido éxito en la identificación de péptidos para 7 organismos *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*; basado en la identidad única del péptido elegido; sin embargo si el interés es diferente al de estos organismos el criterio de selección recaería sobre el investigador. Ante esto se buscó establecer una metodología basada en criterios como resultados de dos programas predictores, mapas elaborados de las proteínas, análisis de modificaciones postraduccionales y alineamientos de los péptidos en base de proteínas de todos los organismos implicados en la obtención de anticuerpos.

En el presente estudio se brinda ejemplos de selección de péptidos en proteínas de un virus aviar y un parásito intracelular humano cuya información de alineamientos, dominios conservados, epítopes inmunogénicos, entre otros, no se encuentran disponibles en un solo lugar que esté conectado a su vez a las *webs* con software de predicción de epítopes de acceso libre. Los criterios descritos se basan en el análisis previo de inmunogenicidad realizada por un software libre (AbDesigner™) y uno comercial (OptimunAntigen™ (Antígeno óptimo)), este último disponible a través de los laboratorios Genscript (3). Una lista previa de péptidos obtenidos a partir de la secuencia FASTA de las proteínas de interés, son luego seleccionadas según su ubicación en mapas de proteínas que fueron armadas en base a alineamientos en publicaciones previas, modificaciones postraduccionales evidenciada mediante predictores, alineamientos con proteínas virales y eucariotas utilizando la herramienta Blastp y características técnicas de los péptidos a sintetizarse. Luego los péptidos seleccionados son utilizados para inmunizar conejos y obtener anticuerpos que fueron purificados y utilizados en ensayos de western blot e inmunofluorescencia.

4.7.1.- Ejemplos de aplicaciones en fibra -2 de FAdV-4 y PFMSP10 de *Plasmodium falciparum*.

4.7.1.1.-Reconocimiento de Fibra-2 (FAdV-4)

La selección de péptidos para fibra-2 identificó con el software AbDesigner™ unos 466 péptidos y sólo 279 péptidos cumplieron con un criterio de *ig-score* ≥ 4.5 (valor establecido en este estudio). Luego de cruzar los candidatos con los péptidos

seleccionados por OptimunAntigen™ se establecieron 7 péptidos, que por su ubicación (-NH₂, Medio y -COOH) y carácter (alto, moderado y bajo) se redujeron a 4 únicamente, por un criterio de selección de péptidos óptimos según los parámetros de los programas utilizados.

Para el caso de la fibra -2 de FAvD-4, el péptido elegido se ubicó en la posición 7 (Figura 4.13) y no entre las posiciones 1 o 6. Para definir esto, se alineo el péptido KRRHSENGKPE TEA con los péptidos con una mejor posición y se observó que el péptido elegido contiene entre un 71% (10/14) y un 93% (14/15) de los aminoácidos considerados como *rankeados*, estos péptidos poseen características técnicas similares (datos no mostrados). En este tipo de definiciones se consideró el uso de un segundo programa que nos permitió delimitar mejor los péptidos candidatos.

Rank	Secuencia																				
1			P	K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E					
2	R	A	P	K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E							
3		A	P	K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T						
4								S	E	N	G	K	P	E	T	E	A	G	P	S	P
5						R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E	A	G	P		
6				K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E	A	G			
7				K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E	A				
	R	A	P	K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E	A	G	P	S	P

Figura 4.13.- Alineamiento del peptido KRRHSENGKPE TEA con los otros péptidos considerados como mejor *rankeados* (1-6) según el programa AbDesigner. Cuadros amarillos representan los aminoácidos alineados; cuadros plomos representan los aminoácidos diferentes. Cuadros blancos indican los aminoácidos implicados en este alineamiento.

El mapa de proteínas permitió ubicar los péptidos en zonas previamente identificadas (Knob, tallo o cola de la proteína), identificar las regiones con mayor desorden y las modificaciones postraduccionales. Los alineamientos por BLASTp nos permitieron identificar la identidad única de los péptidos tanto entre los miembros del grupo aviadenovirus, el hospedero natural (*Gallus gallus*) y el OPA en busca de proteínas conservadas (3). Para el caso de Fibra - 2 la identidad única de los péptidos para discriminar entre las serovariedades de aviadenovirus fue el criterio más relevante. Para la fibra-2 se obtuvieron 3 péptidos y sólo dos de sus anticuerpos reconocieron de forma óptima la proteína, la falta de reacción del anticuerpo frente al péptido KRRHSENGKPE TEA estaría asociado a la modificación postraducciona que fue predicha (fosforilación de serina y/o glicosilación), explicación que escaparía al objetivo de este estudio. Por lo que podemos establecer el éxito en 2 de 3 péptidos predichos por los programas bioinformáticas. De esta forma se logró obtener con éxito dos anticuerpos policlonales (Fibra-2-1 y Fibra -2-3) que reconocieron con una correcta intensidad la proteína fibra-2 en FAdV-4 mediante ensayos de wester blot.

4.7.1.2.-Reconocimiento de PfMSP10 en *P.falciparum*

Para PFMSP10, de 512 péptidos obtenidos por AbDesigner estos se redujeron a 8 péptidos tras realizar la comparación con el software OptimunAntigen™ (Antígeno óptimo) y luego sólo 4 péptidos cuyos caracteres fueron entre alto y moderado, de la misma forma que Fibra-2 se ubicaron los péptidos en el mapa de la proteína y se identificaron las modificaciones postraduccionales y a los alineamientos por BLASTp que identificó un péptido que presentó una secuencia de 5 aminoácidos conservados con otras 20 proteínas de *P.falciparum* lo que permitió descartar este péptido por falta de identidad. Finalmente el proceso de selección se centra en los alineamientos parciales utilizando la herramienta BLASTp que nos indica los péptidos únicos dentro del organismo a evaluar, respaldando lo mencionado por Pisitkun *et al* 2014 (1) en relación a la identidad única de los péptidos. Según este autor los anticuerpos producidos teniendo en cuenta este solapamiento (de hasta 8 aminoácidos) no presentaron reacción cruzada entre tejidos (ejemplo: human nephrin), nuestros ensayos de alineamientos fueron basadas en ese criterio y según nuestros resultados se obtuvo un alineamiento parcial de hasta 7 aminoácidos con NMNNEKNDNKDNKD (seleccionada) para la proteína PFMSP10 con 2 proteínas de *P.falciparum*; mientras para el péptido SGDQLQHPKEIDEN (fue excluida) se obtuvo un alineamiento parcial de 5-6 aminoácidos en 20 proteínas de *P.falciparum* que pueden contener epitopes solapantes que puede evocar una reacción cruzada (17), ante esto se decidió elegir en base a su ubicación en el mapa, identidad dentro del proteoma de *P. falciparum* y al *ig-score* obtenido para cada péptido. De esta forma se logró obtener con éxito 3 anticuerpos policlonales (Msp10-1, Msp10-2 y Msp10-3) que reconocieron la proteína en ensayos de wester blot e IFI.

La selección de péptidos para proteínas pobremente caracterizadas como el caso de patógenos de interés veterinario o proteínas noveles de parásitos humanos puede llevarse a cabo cuando se combinan herramientas disponibles de forma gratuita en la web (AbDesigner™) o de fácil solicitud de acceso (OptimunAntigen™ (Antígeno óptimo)), que sumado a las herramientas bioinformáticas disponibles en la web ayudan a la selección de péptidos y posterior producción de anticuerpos. El presente trabajo pretende brindar lineamientos básicos para ser seguidos en el desarrollo de anticuerpos o péptidos mediante el uso de estas herramientas disponibles para otras proteínas interés en un modelo viral no infeccioso para humanos (FAdV-4) y otro parasitario (*P.falciparum*) (Figura 4.14). A la luz de nuestros resultados se pueden obtener anticuerpos que puedan contribuir a realizar estudios de caracterización de proteínas de interés local (como las evaluadas en el presente trabajo) que contribuyendo a los estudios de ciencia básica que se vienen realizando en laboratorios locales y regionales.

Figura 4.14.- Selección de péptidos de las proteínas Fibra -2 y PfPFMSP10 para la producción de anticuerpos policlonales en conejo.

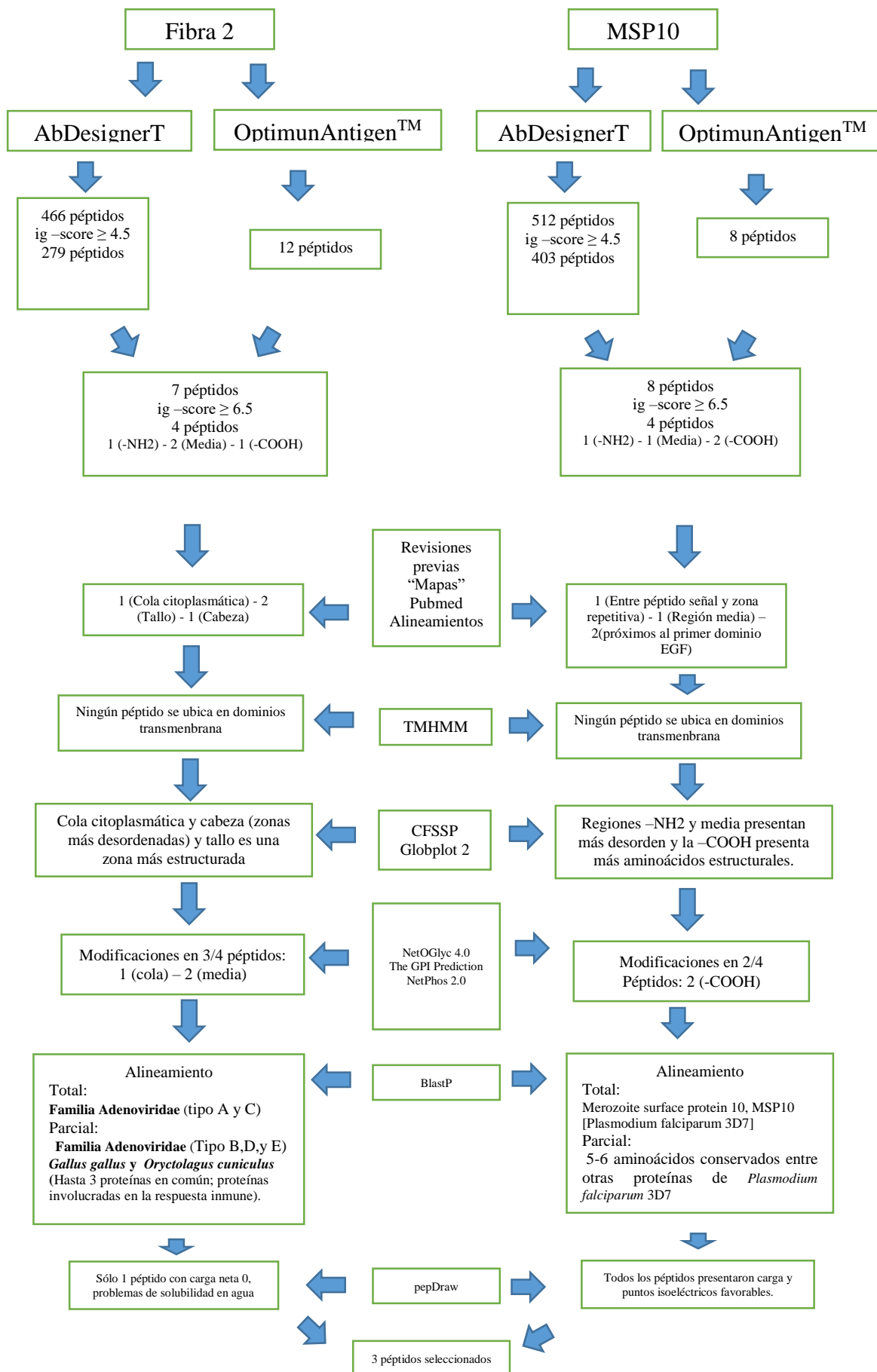


Tabla 4.4.- Resultados de alineamientos de los péptidos de Fibra-2 y proteínas de la familia adenoviridae, de *Gallus gallus* y *Oryctolagus cuniculus*.

Adenoviridae

K	R	R	H	S	E	N	G	K	P	E	T	E	A	Nombre	Acceso
														fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]	gb AHW98792.1
														fiber protein 2 [Fowl adenovirus 4]	gb ANG08832.1
														short fiber [Fowl adenovirus 4]	gb AAQ17079.1
														short fiber [Fowl aviadenovirus A]	emb CCF55050.1
														fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]	gb AIS19803.1
														short fiber protein [Fowl adenovirus 10]	gb AAB88670.1
														hexon capsid protein, partial [Human adenovirus 49]	emb CAH25395.1
														hexon [Human mastadenovirus D]	gb AHV83729.1

Gallus gallus

														PREDICTED: probable ATP-dependent RNA helicase DHX37 [Gallus gallus]	ref XP_415104.3
														PREDICTED: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma isoform X12 [Gallus gallus]	ref XP_015143803.1
														PREDICTED: serine/threonine kinase-like domain-containing protein STKLD1 isoform X6 [Gallus gallus]	ref XP_015135264.1
														neuroigin 3, partial [Gallus gallus]	gb ADB12632.1
														PREDICTED: protein Shroom2 [Gallus gallus]	ref XP_004938467.2
														B-cadherin, partial [Gallus gallus]	emb CAA41408.1
														PREDICTED: succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial [Gallus gallus]	ref XP_418909.3
														PREDICTED: spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 isoform X3 [Gallus gallus]	ref XP_015138839.1
														PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 13C isoform X3 [Gallus gallus]	ref XP_015134497.1

Oryctolagus cuniculus

														PREDICTED: serine/arginine-rich splicing factor 11 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008263295.1
														osteoprotegerin [Oryctolagus cuniculus]	gb ADM64618.1
														PREDICTED: tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002710649.1
														PREDICTED: chromodomain Y-like protein isoform X3 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008272488.1
														PREDICTED: contactin-associated protein-like 3 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008259197.1
														PREDICTED: cadherin-9 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008260311.1
														PREDICTED: disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23 isoform X3 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008257263.1
														PREDICTED: motile sperm domain-containing protein 2 isoform X7 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008270584.1
														PREDICTED: zinc finger protein 516 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008251052.1
														PREDICTED: beta-2-microglobulin [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008267300.1
														annexin A13 [Oryctolagus cuniculus]	ref NP_001075588.1
														PREDICTED: SAM domain-containing protein SAMSIN-1 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008265356.1
														PREDICTED: testican-2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008268210.1
														PREDICTED: spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008252621.1
														PREDICTED: probable ATP-dependent RNA helicase DDX59 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008266900.1
														PREDICTED: collagen alpha-3(V) chain [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002722890.1

Adenoviridae

L	K	A	Q	G	G	I	Q	A	D	S	S	G	V	Nombre	Acceso
														fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]	gb AHW98792.1
														fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]	gb AIS19803.1

Adenoviridae

D	S	A	T	M	G	N	R	P	G	D	L	N	S	Nombre	Acceso
														fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]	gb AIS19803.1
														short fiber [Fowl adenovirus 4]	gb AAQ17079.1
														fiber protein [Fowl adenovirus 4]	gb ACR54094.1
														short fiber [Fowl aviadenovirus A]	emb CCF55050.1
														fiber protein 2 [Fowl adenovirus 4]	gb ANG08832.1
														short fiber protein [Fowl adenovirus 10]	gb AAB88670.1

Gallus gallus

															PREDICTED: phospholipase A2 inhibitor and Ly6/PLAUR domain-containing protein [Gallus gallus]	ref XP_424499.3
															PREDICTED: ras GTPase-activating protein nGAP isoform X13 [Gallus gallus]	ref XP_015146006.1
															PREDICTED: complement decay-accelerating factor isoform X1 [Gallus gallus]	ref XP_417981.4
															PREDICTED: von Willebrand factor A domain-containing protein 5A-like isoform X1 [Gallus gallus]	ref XP_015153799.1
															poly [ADP-ribose] polymerase 4 [Gallus gallus]	ref NP_001164635.1
															fructose-bisphosphate aldolase B [Gallus gallus]	ref NP_001007978.1
															PREDICTED: AT-rich interactive domain-containing protein 1A isoform X3 [Gallus gallus]	ref XP_417693.5
															PREDICTED: adhesion G-protein coupled receptor D1 [Gallus gallus]	ref XP_415094.4
															transcription factor CP2 [Gallus gallus]	ref NP_989715.1
															cation-independent mannose-6-phosphate receptor precursor [Gallus gallus]	ref NP_990301.1
															PREDICTED: eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 isoform X1 [Gallus gallus]	ref XP_004943440.1
															fumarylacetoacetase [Gallus gallus]	ref NP_001264402.1
															PREDICTED: dnaJ homolog subfamily A member 1-like [Gallus gallus]	ref XP_015153907.1
															PREDICTED: maestro heat-like repeat-containing protein family member 2B [Gallus gallus]	ref XP_015156248.1
															PREDICTED: motile sperm domain-containing protein 2 isoform X2 [Gallus gallus]	ref XP_015128728.1
															PREDICTED: zinc finger E-box-binding homeobox 1 isoform X2 [Gallus gallus]	ref XP_015136791.1
															PREDICTED: gamma-butyrobetaine dioxygenase isoform X1 [Gallus gallus]	ref XP_004941389.1

Oryctolagus cuniculus

															PREDICTED: prostaglandin D2 receptor [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002718292.1
															PREDICTED: RING finger and SPRY domain-containing protein 1 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002711584.1
															fructose-bisphosphate aldolase B [Oryctolagus cuniculus]	ref NP_001164585.1
															PREDICTED: AT-rich interactive domain-containing protein 1A [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008264121.1
															cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008262601.1
															PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008264106.1
															PREDICTED: pre-mRNA 3' end processing protein WDR33 isoform X6 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008256661.1
															PREDICTED: uncharacterized protein LOC103346168 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008250050.1

Plasmodium falciparum 3D7

E	R	K	N	Q	K	A	P	F	G	E	H	K	P	Nombre	Acceso
														Merozoite surface protein 10, PF MSP10 [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_966190.1
														conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_002808655.1
														dynein heavy chain, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001351927.1
														conserved Plasmodium protein [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001350602.1
														conserved Plasmodium protein [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001350893.1
														conserved protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001351400.1
														DNA helicase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_966036.1
														branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001349853.1
														DNA repair protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001351613.1
														serine/threonine protein kinase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]	ref XP_001348566.1

Homo sapiens

														MED25 protein, partial [Homo sapiens]	gb AAH24312.2
														Chain A, Pry-Spry Domain Of Human Trim72	pdb 3KB5 A
														DNA-binding protein [Homo sapiens]	gb AAA61326.1
														PREDICTED: probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF217 isoform X6 [Homo sapiens]	ref XP_011533801.1

Oryctolagus cuniculus

														PREDICTED: UBX domain-containing protein 10 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002716048.1
														PREDICTED: serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008259157.1
														PREDICTED: tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008261688.1
														PREDICTED: zinc finger protein 345-like [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008250406.1
														PREDICTED: SAM and SH3 domain-containing protein 1 isoform X3 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008261849.1
														PREDICTED: separin isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008254732.1
														PREDICTED: palmitoyltransferase ZDHHC5 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_002709212.1
														PREDICTED: ATPase family AAA domain-containing protein 5 isoform X2 [Oryctolagus cuniculus]	ref XP_008269281.1

eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*. 1999;294(5):1351-62.

16. White SH, Wimley WC. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1376(3):339-52.

17. Geysen HM, Mason TJ, Rodda SJ. Cognitive features of continuous antigenic determinants. *Journal of molecular recognition : JMR*. 1988;1(1):32-41.

18. Singh H, Ansari HR, Raghava GP. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PloS one*. 2013;8(5):e62216.

19. Grgic H, Krell PJ, Nagy E. Comparison of fiber gene sequences of inclusion body hepatitis (IBH) and non-IBH strains of serotype 8 and 11 fowl adenoviruses. *Virus genes*. 2014;48(1):74-80.

20. Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003;127(1):59-68.

21. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(5):978-86.

22. Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Dommer J, Fischer S, Gajria B, et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database issue):D539-43.

23. Kuroda D, Shirai H, Jacobson MP, Nakamura H. Computer-aided antibody design. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2012;25(10):507-21.

CAPITULO 5

Alta sero-reactividad de la proteína PfMSP10 de *Plasmodium falciparum* en sueros de individuos infectados con malaria en la amazonia peruana.

Resumen

La serovigilancia permitirá en un futuro, evaluar el impacto de un programa de control de la malaria en una región determinada. Por lo que la selección del antígeno para esta vigilancia debe permitirnos identificar regiones “hotspots” (“puntos calientes” de transmisión) y poblaciones expuestas “hotpops” (“poblaciones calientes”). En la actualidad se están evaluando distintos antígenos candidatos a nivel mundial, sin embargo se debe tener en cuenta las características epidemiológicas locales y regionales para su elección. Teniendo en cuenta esto, la proteína de superficie del merozoito 10 (PfMSP10) ha demostrado ser un candidato idóneo para nuestra región. En este estudio evaluamos la sero-reactividad a la proteína recombinante y péptidos de PfMSP10 con sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y *P.vivax*. Se realizaron ensayos de ELISA con proteína recombinante (rMSP10) y 2 péptidos de PfMSP10 con sueros de pacientes catalogados como sintomáticos (Sym; n=30) y asintomáticos (Asy; n=27), agrupados *P.falciparum* (Sym+Asy; n=54) y sueros de pacientes infectados con *P.vivax* (grupo *P.vivax*; n=30). No existieron diferencias entre pacientes sintomáticos y asintomáticos ni con el antígeno rMSP10 y ni los péptidos. Un péptido ubicado en la posición Glu306-Pro319 presentó diferencias entre el grupo de *P.falciparum* y el grupo de *P.vivax*. Se evidenció una relación de alta sero-reactividad de IgG total a rMSP10 en el grupo *P.falciparum*. 12/26 sueros reactivos del grupo *P.vivax* presentaron una alta sero-reactividad a rMSP10, esto se explicaría por la alta identidad reportada entre PfMSP10 y PvMSP10 en la región carboxilo terminal en donde se encuentran los 2 dominios denominados Factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés). Este es el primer reporte de sero-reactividad para PfMSP10 recombinante utilizando un panel de sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y *P.vivax* provenientes de la Amazonia peruana. Se puede considerar a rMSP10 y los péptidos de PfMSP10 en futuros estudios de validación como potenciales marcadores serológicos en la detección de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P.falciparum* y para planes de serovigilancia de la malaria *falciparum* en regiones endémicas como la Amazonia Peruana.

5.1.- Introducción

Monitorear los cambios de la intensidad de transmisión y la prevalencia de la malaria a través de la vigilancia, permite a los programas nacionales de control de la malaria, tener información sobre el impacto de las estrategias adoptadas para controlar la enfermedad (1, 2). Cuando la transmisión de la malaria decae o es inestable como el caso de *Plasmodium falciparum* en la región Amazónica, la vigilancia ayuda a identificar las áreas focales “hotspots” (puntos calientes) o poblaciones expuestas “hotpops”; así como portadores del parásito de la malaria que no desarrollan síntomas, quienes pueden continuar con la transmisión silenciosa a manera de “reservorios humanos” (2, 3). Para llevar a cabo esta vigilancia se pueden utilizar herramientas serológicas, las cuales detectan anticuerpos en suero de individuos expuestos como un bio-marcador para determinar si existe una transmisión activa o no de la enfermedad. Con la llegada de las proteínas recombinantes esta “serovigilancia” puede llevarse a cabo a nivel costo – efectivo para ser incluidos en los programas de control. Los actuales candidatos a nivel mundial como biomarcadores, son la apical membrane antigen 1 (AMA-1), *circumsporozoite protein* (CSP), *merozoite surface protein 1* fragmento de 19kDa (MSP1-19) y *merozoite surface protein 3* (MSP3). Estas proteínas, a su vez forman parte de vacunas en prueba, las cuales serían excluidas de los monitoreos futuros, por lo menos el antígeno CSP (2, 4, 5). Factores como diversidad genética y reactividad cruzada con proteínas homólogas entre especies de *Plasmodium*, aún son desconocidos para algunos de estos candidatos, por lo que la elección del antígeno debe tener en cuenta características propias de los parásitos y la epidemiología de la región geográfica donde se aplicaran estas herramientas (Capítulo 2), para no repetir la experiencia con las pruebas de diagnóstico rápido para detección de *P.falciparum* en nuestra región (6-8), donde los parásitos de *P. falciparum* han perdido el gen que produce la proteína empleada en la detección del parásito.

La proteína *merozoite surface protein 10* (PfMSP10) de *P.falciparum* ha presentado resultados prometedores dado su alta reactividad en sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* en la Amazonia peruana, además de ser reconocida de igual forma por individuos sintomáticos y asintomáticos (9) y su bajo nivel de polimorfismo (10). Sin embargo, el estudio de Torres *et al* fue realizado en un sistema de protein-array, y aún se debe tener reportes de evaluación de esta proteína en formato de fácil estandarización e

implementación como el ELISA, previo a su caracterización y validación como sero-marcador (2).

Dado la escasa información existente sobre respuesta de anticuerpos a PfMSP10 en individuos naturalmente expuestos a *P.falciparum* en la región Amazónica, se decidió investigar la sero-reactividad de los sueros de un panel de individuos calificados como sintomáticos y asintomáticos para *P.falciparum* y sueros de individuos infectados con *P.vivax* frente a la forma recombinante de PfMSP10 y sus péptidos derivados. En este estudio describimos la sero-reactividad y los niveles de IgG total frente a rMSP10 (Proteína recombinante de PfMSP10) y péptidos obtenidos de la secuencia de PfMSP10, así como la respuesta cruzada en sueros de individuos infectados con *P.vivax*.

5.2.- Materiales y Métodos

5.2.1.- Suero de individuos naturalmente infectados con *Plasmodium spp.*

Los sueros incluidos en este análisis provienen de un estudio realizado por Torres K *et al* 2015 (11). En este estudio se catalogaron a los individuos enrolados como sintomáticos, aquellos que asistían a un centro de salud con síntomas característicos de la malaria y que presentaron parásitos ya sea de *P.falciparum* o *P.vivax* en sangre por técnicas de microscopia y/o PCR. Mientras que los individuos asintomáticos, fueron aquellos que eran identificados en búsquedas activas en comunidades de la región de Iquitos (Loreto – Perú) donde se reportaban brotes de malaria, estos individuos no presentaron síntomas pero si tenían parásitos en sangre detectados por microscopia y/o PCR. De este estudio se utilizó el suero de 30 individuos infectados con *P.falciparum* que fueron caracterizados como sintomáticos (Syn), 24 sueros de individuos infectados con *P.falciparum* y catalogados como asintomáticos (Asy), 30 muestras de sueros de individuos sintomáticos y con presencia de parásitos *P.vivax* en sangre y finalmente se incluyeron en este estudio suero de donadores sanos sin exposición previa a malaria. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité de ética institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, Perú (SIDISI: 61540).

Además de los sueros descritos se incluyeron muestras de sueros correspondientes a dos individuos que viven en una región endémica para malaria y que fueron negativos a la presencia del parásito por técnicas de microscopia y/o PCR (HDend; n=2); además se

incluyeron sueros de pacientes diagnosticados con Toxoplasmosis (Tx; n=1), Leishmaniasis (Ls; n=1), Leptospirosis (Lp; n=1), Dengue (Dn; n=3) y Neurocysticercocys (Nc; n=1). Los sueros fueron gentilmente donados por los Laboratorios de Malaria (Dra. Dionicia Gamboa y Dra. Katherine Torres).

5.2.2.- Antígenos

La proteína recombinante PfMSP10 (rMSP10) obtenida en el capítulo 3 de esta tesis abarca desde los 27 hasta 506 aa, los péptidos PfMSP10-1: NMNNEKNDNKDNKDC, PfMSP10-2: CERKNQKAPPGEHKP correspondientes a la región NH₂- y región media de la proteína PfMSP10 y descritas en el capítulo 4 fueron utilizados. Adicionalmente se utilizó, para los ensayos de ELISA, la proteína recombinante PvMSP1 de 25kDa expresada en *E.coli* purificada y renaturada (MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA).

5.2.3.- Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos (IgG total) en sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y *P.vivax*

Un total de 100 µL de proteína o péptido a una concentración de 0.5 o 4µg/mL en solución pH 7.4, fueron fijados en una placa de ELISA-High Binding plates (CostarTM, BioRad, Hercules, CA, USA), luego las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas fueron lavadas una vez con PBS-T (NaH₂PO₄ 0.15 M; Na₂HPO₄ 0.15 M, NaCl 0.5 M; Tween 20 al 0.05%) y se agregó la solución de bloqueo (PBS + 0.1% BSA). Las placas fueron incubadas durante una hora y luego lavadas tres veces con PBS-T. Un total de 100 µL de suero diluido 1:100 en PBS-T + 1.5% de leche descremada fue agregado al pocillo, las placas fueron incubadas por una hora y lavadas 4 veces con PBS-T. Seguidamente, anti-IgG human antibody (HRP-anti-IgG) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) diluido 1:2,000 en PBS-T fue añadido en la placa y esta fue incubada por una hora, para luego ser lavada 3 veces con PBS-T. Se agregó 100 µL de una solución reveladora de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) y se permitió que reaccionara durante 7 minutos, luego la reacción fue detenida agregando 50 µL de HCl 0.25 M. Finalmente la placa fue lavada con PBS-T y leída en un lector de ELISA iMARKTM microplate-reader (BioRad, Hercules, CA, USA) a 450nm para obtener valores de OD.

5.2.4.- Análisis estadístico

Cada suero de paciente fue leído por triplicado. Los sueros sero-reactivos fueron aquellos que generaron un OD mayor que el promedio más 3 desviaciones estándares (DE) de la

reactividad obtenida en los sueros de donadores sanos, este valor fue denominado *cut-off* (punto de corte). Los sero-reactivos fueron divididos en 2 grupos en donde un valor de OD, 3 veces mayor al *cut-off* se consideró como “Alta sero-reactividad” y el grupo de “Baja sero-reactividad” con ODs mayores al *cut-off* pero menores a los de alta reactividad. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar las diferencias entre los OD de los grupos. Prueba de Fisher exacta (Tablas de 2 x 2) fue utilizada para comparar diferencias entre las proporciones de sero-reactividad de los grupos. Un valor $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. El análisis estadístico y el OD de las diferentes muestras fueron graficadas utilizando el programa (GraphPad Prism, Version 3.0, San Diego, CA, USA).

5.3.- Resultados

Se evaluó la reactividad de los sueros de individuos infectados con *P.falciparum* y *P.vivax* a 2 péptidos de la proteína PfMSP10 (PfMSP10-1, -2 y 1+2 (mezcla de péptidos)), una proteína recombinante total de PfMSP10 (rMSP10) y se utilizó la proteína PvMSP1 como un control de comparación en los sueros de individuos infectados con *P.vivax*. El grupo de individuos infectados con *P.falciparum* se clasificaron como pacientes sintomáticos (Sym) y asintomáticos (Asy).

5.3.1.- Sero-reactividad a los antígenos

La proporción de sueros reactivos fue similar entre Sym vs Asy para todos los antígenos evaluados (Tabla 5.1), se obtuvo una escala de reactividad para los antígenos relacionados con PfMSP10 de *P.falciparum*: PfMSP10-1 < 1+2 < PfMSP10-2 < rMSP10. Para el antígeno de *P.vivax* (PvMSP1) con los sueros de Sym vs Asy de *P.falciparum* se obtuvieron valores entre 83.3 y 95.8% de sueros reactivos respectivamente. Al considerar al grupo de Sym y Asy como un nuevo grupo (*P.falciparum*) se comparó a los sueros reactivos de *P.vivax* frente a los antígenos, se obtuvo una diferencia de proporción para PfMSP10-2 y PfMSP10-1+ PfMSP10-2 ($p < 0,0001$). La proporción de sero-reactivos fue similar en pacientes infectados con *P.falciparum* y *P.vivax* y de en baja proporción frente a PfMSP10-1 (11.1 y 8.3 % respectivamente). Mientras tanto esta fue en alta proporción para rMSP10 con 96.3% para el grupo *P.falciparum* y 86.7% para el grupo

P.vivax; y para PvMSP1 fue de 88.8% para *P.falciparum* y 100% para el grupo de *P.vivax*.

5.3.2.- Niveles de IgG a los antígenos

Tras establecer el número de sero-reactivos, se determinaron los niveles de IgG totales de los grupos frente a los péptidos (figura 5.1). Para PfMSP10-1 no se encontraron diferencias entre los grupos de *P.falciparum* y *P.vivax*, mientras que para PfMSP10-2 y PfMSP10-1+ PfMSP10-2 sus niveles de IgG (Grupos *P.falciparum*) fueron mayores al grupo de sueros de pacientes infectados con *P.vivax* ($P < 0,0001$).

Tabla 5.1.- Sero-reactividad de individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con *P.falciparum* y con *P.vivax* frente a los antígenos recombinantes y péptidos obtenidos en este trabajo.

Grupos	Antígeno				
	PfMSP10-1	PfMSP10-2	1+2	rMSP10	PvMSP1
Sym	4/30 (13.3%)	13/30 (43.3%)	15/30 (50.0%)	28/30 (93.3%)	25/30 (83.3%)
Asy	2/24 (4.2%)	14/24 (58.3%)	11/24 (45.8%)	24/24 (100%)	23/24 (95.8%)
<i>p</i> (Fisher test)	ns	ns	ns	ns	ns
<i>P.falciparum</i> (Sym + Asy)	6/54 (11.1%)	27/54 (50%)	26/54 (48.1%)	52/54 (96.3%)	48/54 (88.8%)
<i>P.vivax</i>	4/30 (8.3%)	2/30 (6.7%)	1/30 (3.3%)	26/30 (86.7%)	30/30 (100%)
Cut-off	0.60	0.53	0.40	0.23	0.11
<i>p</i> (Fisher test)	ns	0.0001*	0.0001*	ns	ns

*se muestran las relaciones significativas.

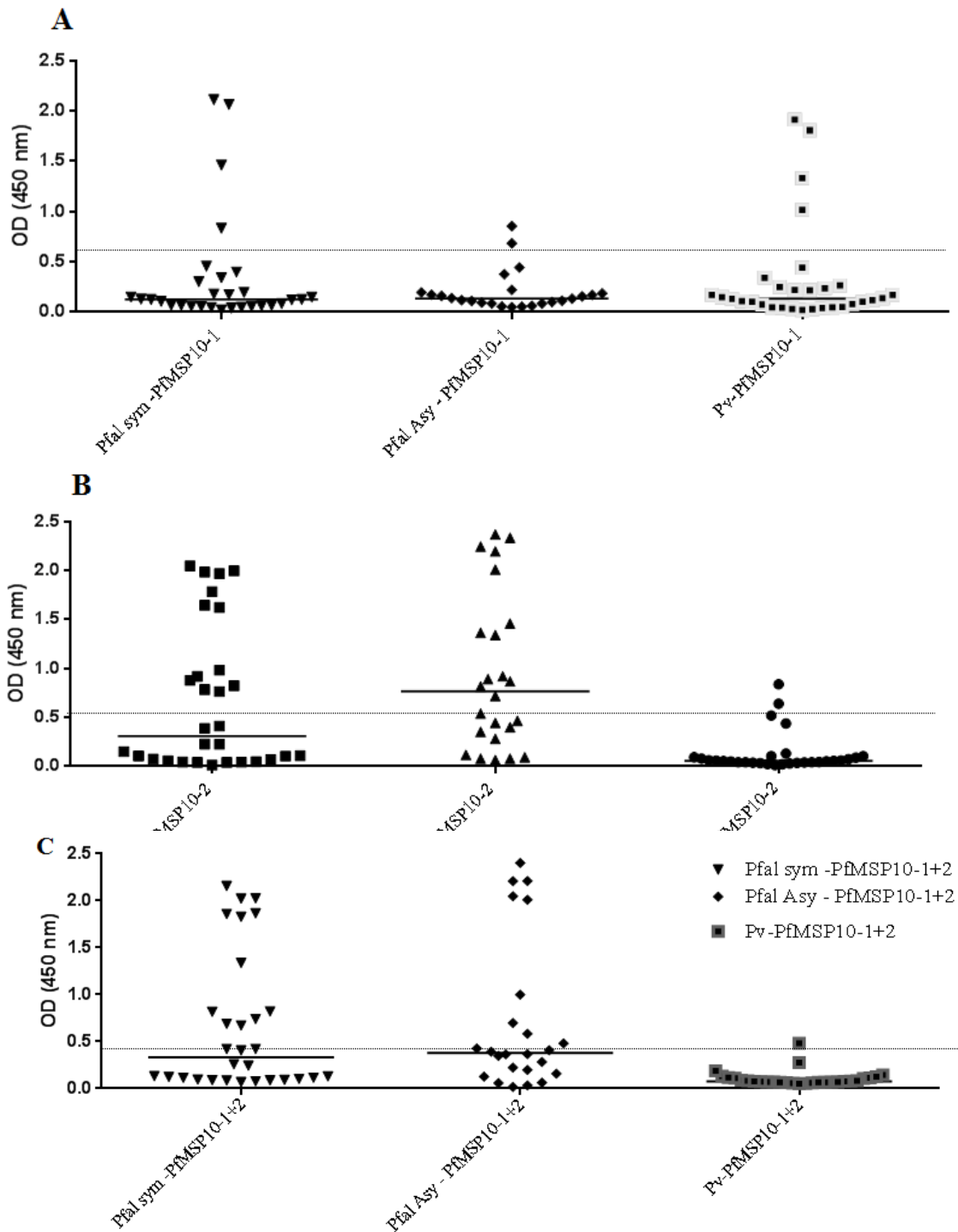


Figura 5.1.- Niveles de IgG Total de los grupos Sintomáticos (Pfal Sym) y Asintomáticos (Pfal Asy) para *P.falciparum* y el grupo de *P.vivax* frente a los péptidos PfMSP10-1 (A), PfMSP10-2 (B) y 1+2 (C). La línea horizontal punteada indica el cut-off calculado. La barra horizontal al centro de cada grupo indica la mediana del mismo.

Los niveles de IgG frente a los antígenos se presentan en la figura 5.2, al igual que PfMSP10-2, se encontraron diferencias entre los títulos de anticuerpos entre los grupos. Niveles elevados fue presentado para el grupo de *P.falciparum* frente a rMSP10 ($P < 0,0001$) vs el grupo de *P.vivax*. Utilizando el antígeno PvMSP10 se obtuvo niveles elevados de IgG ($P < 0,0001$) con los sueros del grupo de *P.vivax* frente a los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum*.

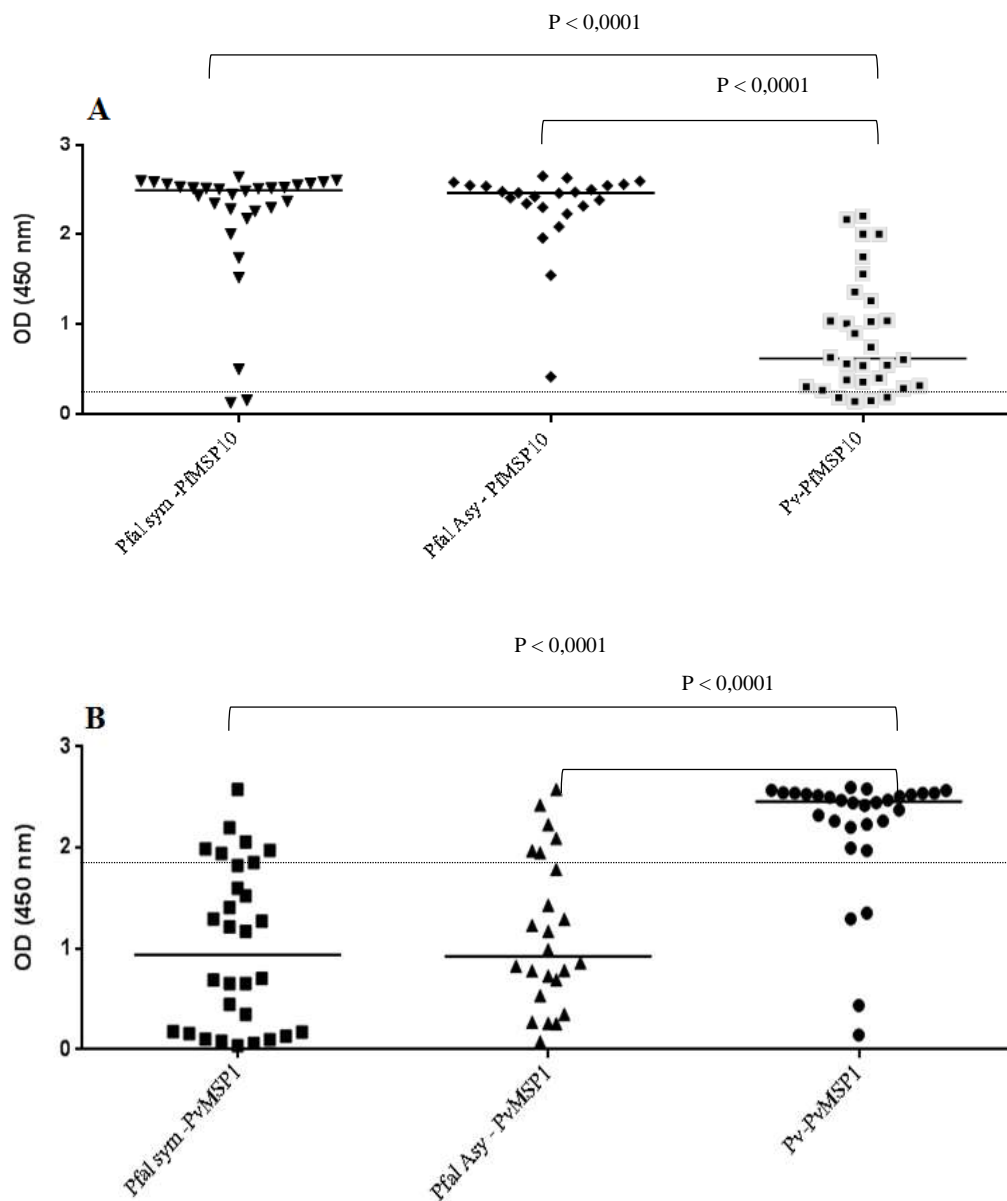


Figura 5.2.- Niveles de IgG Total de los grupos Sintomáticos (Pfal Sym) y Asintomáticos (Pfal Asy) para *P.falciparum* y el grupo de *P.vivax* frente a la rMSP10 (A) y PvMSP1 (B). La línea horizontal punteada indica el cut-off calculado. La barra horizontal al centro de cada grupo indica la mediana del mismo.

5.3.3.-Niveles de sero-reactividad

Del total de sueros sero-reactivos, estos se clasificaron en función a sus niveles de sero-reactividad como “Bajo” y “Alto” frente a cada antígeno para determinar una asociación estadística entre el nivel de reactividad y el grupo (Tabla 5.2). Luego de realizar esta clasificación se determinó una baja sero-reactividad para 23 de 27 sueros reactivos frente a PfMSP10-2 en el grupo *P.falciparum*, sin embargo esto no fue significativo frente al número de sueros sero-reactivos a este antígeno en el grupo *P.vivax*. Se identificó una asociación entre alta sero-reactividad (50/52) y el grupo *P.falciparum* ($p = 0.0001$). No se detectó una asociación entre los niveles de sero-reactividad de PvMSP1 y el grupo de *P.vivax*.

Tabla 5.2.- Número de sueros positivos a los diferentes antígenos, agrupados según su sero-reactividad y su relación con la infección a *P.falciparum* y *P.vivax*.

Antígeno	Sero-reactividad	<i>P.falciparum</i> m (Sym + Asy)	<i>P.vivax</i>	p(Fisher test)
PfMSP10-1	Alta	0	0	
	Baja	6	4	ns
PfMSP10-2	Alta	4	0	
	Baja	23	2	ns
1+2	Alta	11	0	
	Baja	15	1	ns
rMSP10	Alta	50	12	
	Baja	2	14	0.0001
PvMSP1	Alta	39	29	
	Baja	9	1	ns

5.3.4.-Alineamiento de PfMSP10 y PvMSP10

La reactividad de PfMSP10 presentó niveles altos de IgG en individuos infectados con *P.falciparum*; mientras que existieron 12 sueros del grupo de *P.vivax* que reaccionaron con niveles altos a rMSP10. Esto nos indicaría la existencia de una posible reacción cruzada, por lo que se decidió analizar las secuencias de aminoácidos de las proteínas PfMSP10 del capítulo 3 y PvMSP10 (Genbank: XP_001616217.1) de *P.vivax* para determinar secuencias de aminoácidos en común (Figura 5.3).

Luego del alineamiento de las proteínas se identificaron dos regiones de aminoácidos con una alta identidad entre ambas proteínas. En la región NH₂- terminal, el péptido señal y luego en la región COOH terminal para PfMSP10, la región desde Ala364 hasta la Iso525 (161 aa) y para PvMSP10 desde Ala317 hasta Fen479 (162 aa). Estas regiones abarcan los 2 dominios EGF y la zona de inserción de GPI. En la Figura 5.3 también se ubicaron la secuencia de los péptidos de PfMSP10 (PfMSP10-1 y -2) y estos no presentaron identidad con PvMSP10.

5.3.5.- Ensayos de reactividad cruzada frente a sueros de individuos infectados con otros virus y bacterias.

La reactividad cruzada de rMSP10 frente a sueros de individuos infectados con otros patógenos distintos al género *Plasmodium spp* fue realizada. Ninguna reacción fue observada frente a sueros de Toxoplasma, Neurocisticercosis y Dengue (sólo uno de los tres sueros presento reacción); sin embargo, una señal fue detectada para los sueros de pacientes infectados con Leishmaniasis y Leptospirosis (Figura 5.4). Cuando se evaluaron los péptidos sólo PfMSP10-3 presentó reactividad cruzada a todos los sueros empleados (Figura 5.5). Ninguna reacción fue observada cuando se evaluaron rMSP10, PfMSP10-1 y PfMSP10-2 frente a sueros de individuos sanos endémicos y no endémicos (Figuras 5.6).

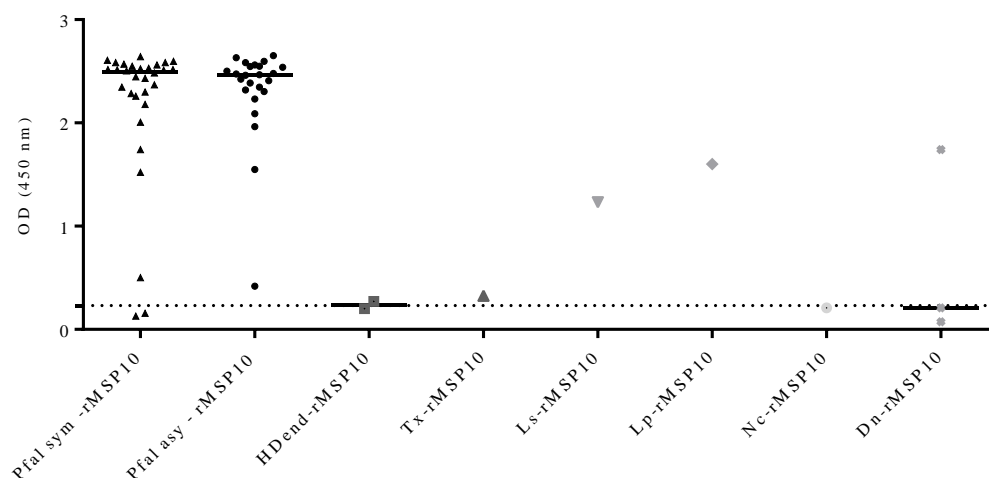


Figura 5.4.- Ensayos de reacción cruzada de rMSP10 frente a sueros de individuos infectados con patógenos no-*Plasmodium spp* y suero de individuos endémicos. Niveles totales de IgG de individuos sintomáticos (Pfal Sym) y asintomáticos (Pfal Asym) infectados con *P.falciparum*. HDend: Suero de individuo sano endémico para Malaria; Tx: Toxoplasmosis; Ls: Leishmaniasis; Lp: Leptospirosis; Nc: Neurocisticercocys and Dn: Dengue. La línea horizontal punteada indica el cut-off. La línea horizontal ubicada en cada grupo representa la mediana.

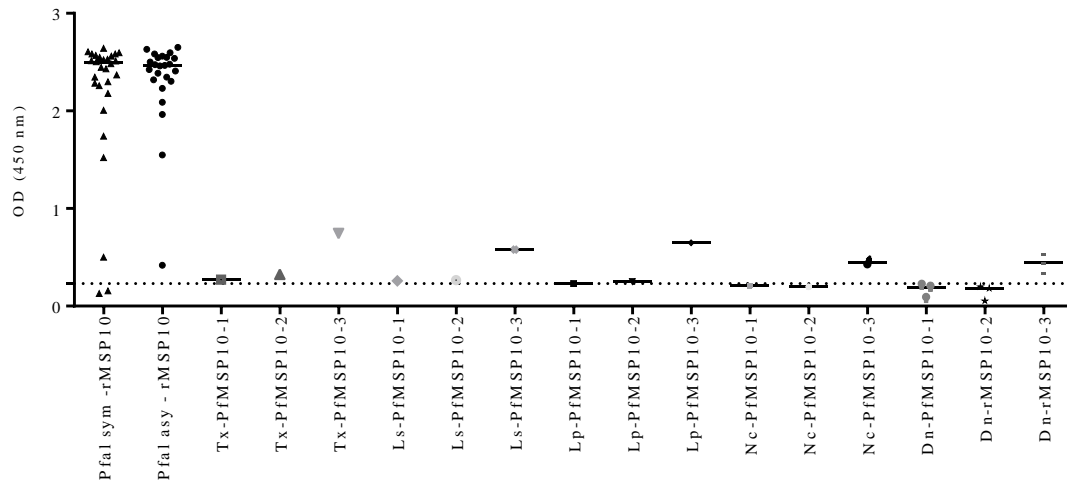


Figura 5.5.- Reactividad de los péptidos PFMSP10-1, PFMSP10-2 y PFMSP10-3 frente a sueros de pacientes infectados con otros patógenos. Tx:Toxoplasmosis; Ls:Leishmaniasis; Lp:Letospirosis; Nc: Neurocisticercosis and Dn: Dengue. Las líneas punteadas horizontales representan el cut-off del ensayo. Las líneas horizontales de cada grupo representan la media de los datos.

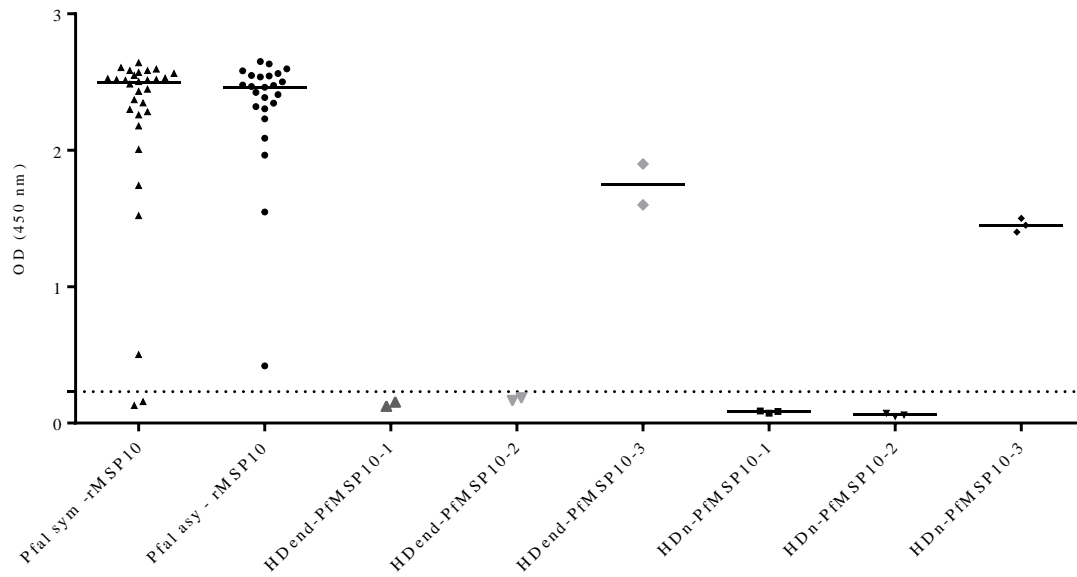


Figura 5.6.- Reactividad de los péptidos PFMSP10-1, PFMSP10-2 y PFMSP10-3 frente a sueros de pacientes de zona endémica (HDend) y no endémica para malaria (HDn). La línea punteada horizontal representa el cut-off del ensayo. Las líneas horizontales de cada grupo representan la media de los datos.

5.4.- Discusión

Este estudio presentó la sero-reactividad de 54 sueros de individuos infectados con *P.falciparum* (agrupados como sintomáticos (Sym) y asintomáticos (Asy)) hacia péptidos (PfMSP10-1 y -2) y la proteína recombinante de PfMSP10 (rMSP10). No se observó una reactividad preferencial entre sueros de individuos Sym vs Asy hacia PfMSP10, corroborando lo encontrado por Torres *et al* en sueros de individuos de la misma región (9). Dos estudios llevados a cabo en la región Amazónica, reportaron una respuesta diferencial utilizando la proteína PfMSP1 (una proteína con regiones similares a PfMSP10) y cuyos niveles altos de sero-reactividad se asociaba a los individuos asintomáticos (9, 13), esto indicaría que PfMSP10 estaría jugando un rol diferencial en la inmunidad frente a *P.falciparum*, tal y como se ha demostrado para PfMSP1 (14, 15).

PfMSP10 -1 (Asn57-Asp70) es un péptido que se encuentra ubicado cerca del lado amino terminal, próximo al péptido señal y presentó una sero-reactividad similar estadísticamente, entre los grupos de *P.falciparum* y *P.vivax* con valores de 11.1% y de 8.3% respectivamente.. Sin embargo no se encontró identidad cuando se alinearon PvMSP10 y PfMSP10. Lyon *et al* (16), reportó que anticuerpos aislados de pacientes curados de *P.falciparum* no reaccionaron frente a un fragmento de PfMSP1 que abarcaba desde el aminoácido 35 hasta el 141, estas regiones era una zona intermedia entre el final del péptido señal y el inicio de las secuencias repetitivas características de PfMSP1, por lo que la función de la zona amino terminal tendría un tiempo de exposición corto y tampoco estaría relacionada con la unión al glóbulo rojo (17) . El péptido PfMSP10 -2 (Glu306-Pro319) se ubica dentro de la región central e indicada como la potencial zona de clivaje de la proteína PfMSP10 y su sero-reactividad fue similar entre Sym vs Asy (43.3% y 58.3%); sin embargo al compararse el grupo *P.falciparum* frente a los sueros de *P.vivax* se presentó diferencias (50% vs 6.7%), esto se debería a que es secuencia única y estaría expuesta formando parte de la forma clivada de PfMSP10 (PfMSP10-36kDa), la cual es expuesta y reconocida por sueros de pacientes infectados (12), de forma similar al fragmento de 19kDa asociado a PfMSP1 (PfMSP1-19kDa) el cual es ampliamente utilizado como marcador serológico. De forma adicional PfMSP10-2 se encuentra en la región central de la proteína PfMSP10 que fue una de las más reactivas ante

sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* (12, 17) y estaría implicada en la adherencia al glóbulo rojo (17).

Los niveles de anticuerpos presentados para rMSP10 y PfMSP10-2 fueron elevados en sueros de individuos infectados con *P.falciparum* (Sym y Asy) a diferencia de los infectados con *P.vivax*. Los valores de medianas obtenidas con rMSP10 para el grupo Sym fueron de 2.49 y para Asym fue de 2.46 a diferencia de los sueros de *P.vivax* que fueron menores con una mediana de 0.62. Esto nos indica los altos niveles de reactividad que evocan, por lo menos para rMSP10, el cual puede deberse a la región con los dominios EGF propios de los PfMSPs y al posible plegamiento adecuado que esta posee (12), ya que el sistema para la expresión de rMSP10 fueron las células Sf9, en las cuales se expresó de forma integral la proteína PfMSP10 (Capítulo 3). Las medianas obtenidas para PfMSP10-2 fueron altas (Sym (0.31); Asym (0.77)) comparados con la mediana del grupo *P.vivax* (0.06). Estudios con péptidos de proteínas de *P.falciparum* se han reportado previamente y el más utilizado para determinar infección previa de *P.falciparum* es el relacionado con la proteína CSP (Proteína del circumesporozoito), la cual utiliza un péptido (NANP)⁹ (18), esto nos indica que existen epitopes lineales que forman parte del repertorio antigénico de *P.falciparum*.

Se encontró una asociación entre los altos niveles de seroreactividad a rMSP10 y los sueros de *P.falciparum* ($p= 0.0001$, tabla 5.2) sobre los sueros de *P.vivax*, estos niveles pueden deberse a una mayor cantidad de anticuerpos en los sueros que reconocen epitopes conformacionales más que los lineales (12), estos epitopes conformacionales se darían por la presencia de los dominios EGF y los enlaces di-sulfuro que forman parte de estos dominios; así como también a las modificaciones postraduccionales generadas durante la producción en células Sf9.

Existieron 26/30 sueros de individuos infectados con parásitos *P.vivax* que reaccionaron a rMSP10 y de los cuales 12 presentaron alta sero-reactividad. Para verificar esto, se alinearon las proteínas PfMSP10 de *P.falciparum* y PvMSP10 de *P.vivax*, y se encontró la región homóloga entre ambas secuencias de proteínas, la región correspondiente a los dominios EGF y la zona de inserción de GPI, estas presentaron hasta un 58% de identidad. Se sabe los dominios EGF son conservados entre las especies de *Plasmodium* (12) y en especial entre los genes MSP10s de *P.falciparum* y *P.vivax* (10). Una aparente reacción cruzada por parte

de la proteína rMSP10 a sueros de individuos infectados con *P.vivax* puede explicarse en parte por la presencia de anticuerpos circulantes producto de una exposición a *P.falciparum*, esto si tomamos en cuenta el tiempo de permanencia de anticuerpos circulantes en nuestra región (18 meses) para *P.falciparum* (22) y de infecciones sub-microscópicas (presentándose como coinfecciones) (11) que explicaría los 12/26 sueros reactivos de *P.vivax* tuvieran reactividad “Alta”; sin embargo, también posibles epitopes de *P.vivax* puede estar evocando una protección cruzada frente a *P.falciparum* (23) lo que explicaría que 14/26 sueros *P.vivax* tuvieran reactividad “Baja” (Tabla 5.2), ante esto se debe considerar la evaluación de estas herramientas serológicas en individuos jóvenes, viajeros y pacientes experimentalmente expuestos (19) con el fin de descartar posibles factores de reactividad relacionados al contexto natural antes de continuar con su validación en campo y considerar o no su reactividad cruzada como criterio de inclusión dentro de los monitoreos.

Se daría un reconocimiento tanto de epitopes lineales (PfMSP10-2) y conformacionales (rMSP10) tal y como sería enunciado para los antígenos basados en MSPs (12, 15, 19), para los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum*; sin embargo dicho reconocimiento de epitopes conformacionales permitiría la posibilidad de reconocer proteínas similares como PvMSP10 en pacientes infectados con *P.vivax* y más en una región geográfica en donde ambos parásitos circulan. Hallazgos de reacción cruzada se han dado en regiones similares a la Amazonia Peruana con las proteínas MSP1 en China-Myanmar (20) y MSP5 en Indonesia (21). También está la posibilidad de que exista una reacción cruzada entre familias de MSPs propias de *P.falciparum* como el caso de PfMSP8 (10), además existen estudios en la Amazonia peruana en donde indican que los títulos contra MSP1-19kDa puede mantenerse durante 4 meses (22). Esto explicaría la presencia de niveles de IgG total en el grupo de *P.falciparum* (88.8% de seroreactivos) frente al antígeno PvMSP1.

Nagao *et al* (23), reportó resultados de inhibición de crecimiento de cultivos de *P.falciparum* frente a sueros de pacientes infectados con *P.vivax* experimentalmente forma experimental, indicando que esto puede darse en regiones en donde ambas especies coexisten, por lo que títulos de anticuerpos para proteínas de ambos parásitos podría existir de forma frecuente; sin embargo, más estudios son requeridos.

Nuevos estudios con la proteína PvMSP10 permitirá evaluarlos con estos sueros en ensayos de ELISAs competitivos para determinar si realmente existen anticuerpos de reacción cruzada entre ambas proteínas, además de ser validados a nivel poblacional, tal como se propone para los actuales candidatos mundiales a bio-marcadores para serovigilancia de *P.falciparum* como PfCSP, PfMSP1-19kDa, PfMSP3 y PfAMA-1; también cabe señalar que estas proteínas poseen valores de homología con proteínas de *P.vivax* que son de 25%, 45%, 51% y 21% respectivamente.

Llamó la atención que la mediana de los ODs registrada en nuestros ensayos para rMSP10 fue de 2.5 con diluciones de suero de 1:100; cuando se compararon estos resultados con los de Black *et al* este obtiene un OD máximo de 0.6 con sueros diluidos 1:500. Este puede ser una simple diferencia técnica; sin embargo se ha reportado que el uso de diferentes fuentes antigénicas (procariotas u eucariotas) puede tener un impacto en la presentación de epitopes conformacionales u modificaciones postraduccionales que influyan en este reconocimiento en *P.falciparum* (24-26). Para esta comparación, es importante recordar que rMSP10 es una proteína obtenida a partir de una expresión heteróloga en células de insecto –Sf9, mientras que Black *et al* expreso la región carboxilo terminal de PfMSP10 en *Escherichia coli*, esto puede haber tenido un impacto en los altos niveles de respuesta reportados en este estudio. Por otro lado, un estudio de comparación se llevó a cabo para PvMSP1 con sueros de pacientes de Brasil y la fuente de antígeno (procariota y eucariota); sin encontrar diferencias entre los OD obtenidos de los sueros frente a los antígenos (27). Es importante también tener en cuenta la factibilidad de la producción a gran escala, que ofrecen los sistemas eucariotas (células de insecto, *Pichia pastoris*, células mamíferas, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras).

Nuestros resultados revelaron que la proteína rMSP10 presentó reactividad cruzada cuando fue evaluada frente a sueros de pacientes infectados con Leishmaniasis y Leptospirosis. Estos hallazgos son inciertos ya que no se encontraron secuencias en común entre rMSP10 y otras proteínas del genoma de los patógenos empleando herramientas bioinformáticas como el BLASTp (Figura 5.7); sin embargo, no se podría descartar la posibilidad de epitopes conformacionales en común, por lo que la aplicación de rMSP10 en el desarrollo de futuras herramientas de serovigilancia debe considerar la prevalencia de casos de Leishmaniasis y

Leptospirosis en la región. Para el caso de los péptidos PfMSP10-1 y -2 demostraron ser específicos para los sueros de pacientes infectados con *P.falciparum*.

Leishmania (taxid:5658)



Leptosira (taxid:37387)



Figura 5.7. Resultados de análisis de BLASTp empleando la secuencias de aminoácidos de PfMSP10 contra las secuencias proteicas de Leishmania (taxid:5658) y Leptosira (taxid:37387). Evaluado en Marzo del año 2019.

La proteína rMSP10 presentó una alta sero-reactividad con los sueros de individuos infectados con *P.falciparum* (sintomáticos y asintomáticos en igual reactividad) provenientes de la Amazonia peruana; sin embargo se debe tener en cuenta la existencia de una reactividad cruzada entre proteínas de *P.vivax* (PvMSP10) o de *P.falciparum* (PfMSP8), para esto se puede considerar el uso de péptidos o fragmentos de la proteína comprendidas a partir de la Glutamina en la posición 306 de PfMSP10 para el desarrollo de herramientas sero-epidemiológicas. Futuros ensayos de reactividad cruzada deben ser realizados, definir el impacto de los polimorfismos muy poco reportados para PfMSP10, estudios de seguimiento para determinar la cinética y duración de estos títulos de anticuerpos frente a rMSP10 en pacientes naturalmente infectados con *P.falciparum* en el Perú.

5.5.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Diagnostics mCGoDa. A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. *PLoS medicine*. 2011;8(1):e1000396.
2. Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000prime reports*. 2014;6:100.
3. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PloS one*. 2015;10(9):e0137458.
4. Faber BW, Remarque EJ, Kocken CH, Cheront P, Cingolani D, Xhonneux F, et al. Production, quality control, stability and pharmacotoxicity of cGMP-produced *Plasmodium falciparum* AMA1 FVO strain ectodomain expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*. 2008;26(48):6143-50.
5. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003(1):CD000129.
6. Bendezu J, Rosas A, Grande T, Rodriguez H, Llanos-Cuentas A, Escobedo J, et al. Field evaluation of a rapid diagnostic test (Parascreen) for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon. *Malaria journal*. 2010;9:154.
7. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*. 2010;5(1):e8091.
8. 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 *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PloS one*. 2012;7(8):e43094.
9. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(8):1342-51.
10. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, genetics and evolution* : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2012;12(5):978-86.
11. Torres K. Evaluación de la respuesta inmune a Malaria Sintomática y Asintomática por *Plasmodium falciparum* en la Amazonía Peruana: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2015.
12. Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003;127(1):59-68.
13. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malaria journal*. 2012;11:361.
14. Lucchi NW, Tongren JE, Jain V, Nagpal AC, Kauth CW, Woehlbier U, et al. Antibody responses to the merozoite surface protein-1 complex in cerebral malaria patients in India. *Malaria journal*. 2008;7:121.
15. Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Petres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Molecular cell*. 1999;3(4):457-64.
16. Lyon JA, Carter JM, Thomas AW, Chulay JD. Merozoite surface protein-1 epitopes recognized by antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* merozoite dispersal. *Molecular and biochemical parasitology*. 1997;90(1):223-34.
17. Puentes A, Ocampo M, Rodriguez LE, Vera R, Valbuena J, Curtidor H, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. *Biochimie*. 2005;87(5):461-72.
18. Koffi D, Toure AO, Varela ML, Vigan-Womas I, Beourou S, Brou S, et al. Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX). *Malaria journal*. 2015;14:509.
19. Egan AF, Chappel JA, Burghaus PA, Morris JS, McBride JS, Holder AA, et al. Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infection and immunity*. 1995;63(2):456-66.
20. Wang Q, Zhao Z, Zhang X, Li X, Zhu M, Li P, et al. Naturally Acquired Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*

Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. *PloS one*. 2016;11(3):e0151900.

21. Woodberry T, Minigo G, Piera KA, Hanley JC, de Silva HD, Salwati E, et al. Antibodies to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax merozoite surface protein 5 in Indonesia: species-specific and cross-reactive responses. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(1):134-42.

22. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH. Antibody response dynamics to the Plasmodium falciparum conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria journal*. 2008;7:173.

23. Nagao Y, Kimura-Sato M, Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Thongrungrat S, Wilairatana P, Ishida T, et al. Suppression of Plasmodium falciparum by serum collected from a case of Plasmodium vivax infection. *Malaria journal*. 2008;7:113.

24. Garraud O, Diouf A, Nguer CM, Dieye A, Longacre S, Kaslow DC, et al. Different Plasmodium falciparum recombinant MSP1(19) antigens differ in their capacities to stimulate in vitro peripheral blood T lymphocytes in individuals from various endemic areas. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(4):431-40.

25. Ord RL, Rodriguez M, Lobo CA. Malaria invasion ligand RH5 and its prime candidacy in blood-stage malaria vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(6):1465-73.

26. Victor ME, Bengtsson A, Andersen G, Bengtsson D, Lusingu JP, Vestergaard LS, et al. Insect cells are superior to Escherichia coli in producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. *Malaria journal*. 2010;9:325.

27. Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC, Jr., Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of Plasmodium vivax malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malaria journal*. 2003;2(1):39.

CAPITULO 6

6.1.- DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En esta tesis se estudiaron 3 proteínas del parásito *P.falciparum* y sus contribuciones en la búsqueda de marcadores serológicos, mediante el diseño de péptidos y expresión heteróloga en células de insecto.

El presente trabajo empezó por identificar a estas potenciales proteínas, para lo cual se realizó una revisión bibliográfica (capítulo 2) sobre la sero-reactividad de antígenos de *P.falciparum* ensayados en sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* en el Perú y se identificó a PfMSP10, Pfrh2b y EBA175 como principales antígenos reactivos. Es importante mencionar que se tuvo en cuenta el factor de la diversidad genética de estas proteínas, la cual influye en la inmunidad, principal motivo por el cual hasta ahora no ha funcionado correctamente una vacuna contra la malaria, ya que una misma población no puede generar respuesta de anticuerpos de forma homogénea ante un antígeno que presente variedades genéticas (71). La conservación genética de PfMSP10 de aproximadamente 60kDa (72) y la baja diversidad de Pfrh2b (52), son las principales características que se tomaron en cuenta para seleccionar ambas proteínas. Se tuvo en cuenta que la proteína Pfrh2b pasa por un proceso de maduración que termina con un segmento de 56kDa denominado “Región única” el cual fue considerada para su expresión (52). Las proteínas identificadas deberían ser consideradas para el desarrollo de potenciales herramientas de diagnóstico, como el caso de PfMSP10 y Pfrh2b ya que al ser proteínas expuestas de *P.falciparum* pueden permanecer un tiempo en la sangre del paciente y ser detectadas de forma oportuna.

En el capítulo 3 se logró expresar la proteína completa de PfMSP10 (excluyendo el péptido señal y la región transmembrana y se denominó rMSP10), luego de un paso previo de optimización de codones se logró su expresión en células de insecto Sf9, obteniendo así rMSP10 la cual únicamente había sido clonada y expresada por partes en sistemas de expresión bacterianas (73). También se presenta la clonación y expresión en células de insecto de la región única de Pfrh2b, cuya secuencia genética correspondía a un aislado nativo de *P.falciparum* y se demostró también su sero-reactividad en sueros de pacientes infectados el cual únicamente había sido clonado y expresado en bacterias como la *Escherichia coli* (67). La importancia del correcto plegamiento de las proteínas es discutido

como una ventaja cuando se emplea el sistema de expresión en células de insecto sobre los sistemas de expresión bacterianos (24, 71, 74, 75).

La baja reactividad de la forma recombinante de EBA175 (rEBA175) ante el panel de sueros de pacientes puede deberse a regiones de la proteína que no necesariamente son inmunogénicas en los pacientes, a pesar de haber logrado su correcta expresión en células Sf9 (Anexos en el capítulo 3). Otro factor de esta falta de reactividad de rEBA175 estaría dado por el tiempo de vida corto que tendrían los anticuerpos frente esta proteína, los cuales podrían estar involucrados probablemente en los procesos de protección frente al parásito, ya que altos títulos de anticuerpos han sido relacionados a la protección ante *P.falciparum* (67, 70, 76). Son necesarios más estudios para comprobar esta relación en nuestra región.

En el capítulo 4 se presentaron los parámetros para el diseño de péptidos como una alternativa para producir anticuerpos costo-efectivos para los estudios de caracterización los cuales son una demanda existente para proteínas nuevas (77). De esta forma, mediante la combinación del uso de software libres y de relativo acceso, así como la estandarización de diferentes parámetros, se tomó la secuencia de la proteína PfMSP10 y se diseñaron 3 péptidos para producir sueros hiper-inmunes en conejos. Estos anticuerpos policlonales posteriormente demostraron reactividad ante la proteína recombinante (rMSP10) y lisados de cultivos parasitarios de *P.falciparum*. En los experimentos suplementarios del capítulo 5, de los 9 péptidos (3 por cada proteína PfMSP10, PfRH2B y PfEBA175) producidos sólo 2 péptidos diseñados (MSP10-1 y MSP10-2) presentaron reactividad frente a sueros de pacientes. Para el caso de RH2B y EBA175, los péptidos no reaccionaron debido a riesgos del diseño como zonas de modificaciones postraduccionales, sin embargo estos péptidos fueron inmunogénicos ya que produjeron anticuerpos en conejo y esta falta de reactividad a sueros de pacientes podría deberse a la baja cantidad de anticuerpos presentes en el suero de los individuos infectados con *P.falciparum* específicos para estas proteínas (67, 70, 76).

Finalmente, en el capítulo 5 se realizaron ensayos de ELISA con la rMSP10 descrita en el capítulo 3; y 2 de los péptidos descritos en el capítulo 4. Se demostró una alta sero-reactividad de los sueros de individuos infectados con *P.falciparum* (en presencia y ausencia de síntomas), utilizando la proteína rMSP10, la alta sero-reactividad se debería a la región conocida como los dominios EGF presentes en la proteína (72, 73). De forma adicional rMSP10 puede ser utilizado para discriminar sueros de individuos infectados con *P.falciparum* sobre los sueros de individuos infectados con *P.vivax*,

teniendo en cuenta los niveles de respuesta; sin embargo esto debe ser profundizado mediante ensayos posteriores

El hospedero humano en la región Amazónica ha desarrollado una inmunidad clínica y por esto se observa un gran porcentaje de individuos infectados con *Plasmodium* spp pero asintomáticos, los cuales desarrollaron anticuerpos (7, 67) de forma rápida (un periodo corto de tiempo) (68) frente a proteínas parasitarias, lo cual les ayuda a controlar por si mismos la infección y no desarrollar los síntomas característicos de la malaria. Sin embargo, el problema que se genera con esto, es que estos individuos asintomáticos no asistirán a un puesto de salud, por lo tanto no serán tratados y se convertirán en reservorios silenciosos de la enfermedad, complicándose en mujeres gestantes (población de alto riesgo) tal como reportan algunos estudios (44). Mediante la información recabada de los diferentes estudios realizadas en la región Amazónica, en base a la sero-reactividad de antígenos parasitarios sumados a criterios de diversidad genética y criterios técnicos de producción de proteínas recombinantes, se pudo identificar hasta 3 proteínas candidatas a ser evaluadas como marcadores serológicos. Ya que un seromarcador es aquel antígeno que puede ser utilizado para monitorear, en base a títulos de anticuerpos, si en una región los programas de control están correctamente dirigidos (22) y se obtiene una ventaja si esta es una proteína de superficie parasitaria como el caso de las proteínas de superficie del merozoito (MSPs) ya que estudios recientes indican que pueden ser predictores de la complicación de la malaria en poblaciones con poca experiencia inmune (78).

PfMSP10 fue expresada utilizando el sistema de células de insecto-Sf9, el cual presenta amplias ventajas frente al sistema bacteriano (24, 75). De igual forma se diseñaron péptidos que fueron utilizados para ensayos de ELISA empleando sueros de individuos infectados los cuales mostraron alta sero-reactividad, principal característica de un potencial marcador serológico (22). Con estos hallazgos se puede considerar a rMSP10 como una proteína candidata a marcador serológico al presentar altos niveles de reactividad en sueros de individuos clasificados como sintomáticos y asintomáticos infectados con *P.falciparum*, estableciéndose los primeros pasos hacia el cumplimiento de la demanda por herramientas para sero-vigilancia como parte de los programas de control en la región Amazónica contra la malaria *falciparum* (3). Según las evidencias presentadas en este trabajo, proponemos un modelo teórico para la búsqueda y evaluación de potenciales marcadores serológicos a partir de proteínas de los parásitos *P.falciparum* en la Amazonia Peruana (Figura 6.1).

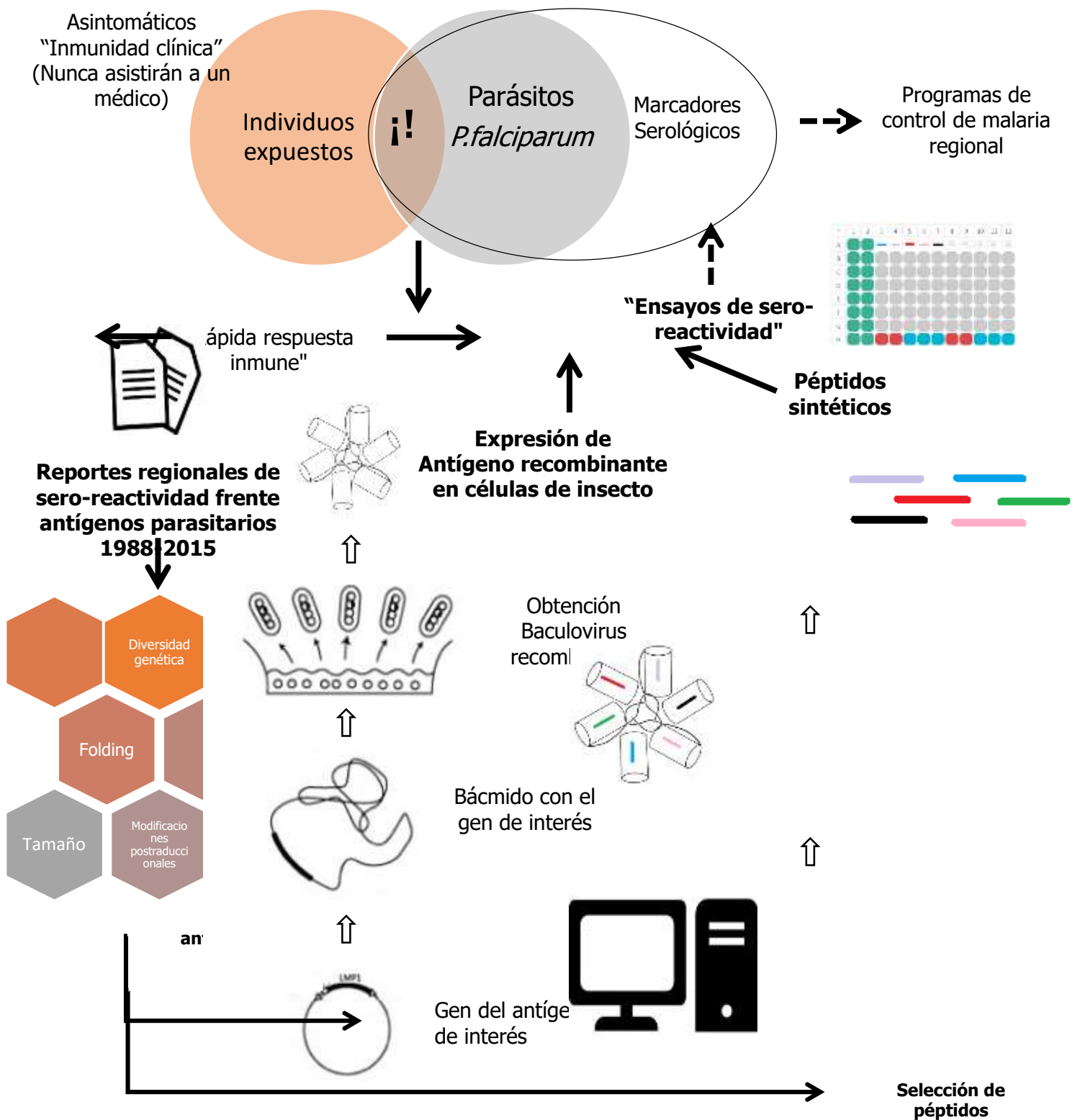


Figura 6.1.- Modelo teórico para la búsqueda y evaluación de marcadores serológicos contra las proteínas de los parásitos *P.falciparum* en la amazonia peruana. Las líneas continuas unen los conceptos obtenidos en base a las evidencias presentadas en esta tesis y las líneas discontinuas en base a otros estudios realizados en la región amazónica. En negrita se encuentran los conceptos manejados sobre *P.falciparum* en la amazonia peruana de esta tesis.

En el presente trabajo de investigación se logró la síntesis de una proteína (rMSP10) y de un péptido (MSP10-2) los cuales presentaron características de fuerte reactividad en sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* y baja reactividad a sueros de pacientes infectados con *P.vivax*. Además cabe resaltar la falta de reactividad del péptido frente a sueros de pacientes infectados con Leishmania, Leptospira, Dengue, Neurocisticercosis y Toxoplasma.

Esto es importante ya que tendríamos dos antígenos candidatos para el futuro desarrollo de una prueba de diagnóstico rápida para infecciones con *P.falciparum*, utilizando el sistema de DIGFA (*dot immunogold filtration assay*). También se logró obtener un lote de anticuerpos policlonales que reconocen la proteína MSP10 a partir de una secuencia de péptido de *P.falciparum* que presentó capacidad de inhibición de la invasión de *P.falciparum* en condiciones *in vitro*, Villasís Elizabeth., Tesis para optar el grado de Maestría en Microbiología UPCH). Esto nos indicaría que anticuerpos frente a este péptido o región de la proteína MSP10 de *P.falciparum* podría ser considerado como una potencial sub-unidad de una futura vacuna contra *P.falciparum*.

Con la proteína recombinante (rMSP10) se puede considerar estudios de respuesta serológica como marcadores de exposición evaluando: la reciente exposición a la enfermedad, la edad del paciente e información de seguimiento (cohorte); similar a un estudio realizado de forma reciente en la amazonia peruana utilizando rMSP10 para *P.vivax* que demostró ser un buen predictor de la exposición de la enfermedad; se describió un ensayo con rMSP10 (expresada en células mamíferos); sin embargo el número limitado de muestras para *P.falciparum* no permitió inferir resultados más que la asociación encontrada entre la exposición en pacientes menores de 15 años (81). Sin embargo, vale la pena indicar que según nuestros resultados rMSP10 presentaría reactividad cruzada frente a sueros de pacientes infectados con el parásito Leishmania y la bacteria Leptospira, por lo que se hacen necesarios más estudios para considerar su uso en regiones en donde se registren casos con estos dos patógenos.

Una respuesta ideal de anticuerpos para monitorear la transmisión debe ser aquella que persista por algunos meses para zonas de baja y moderada transmisión. Ya que una variación hacia el descenso en estos niveles indicaría un incremento en el riesgo de provocar malaria clínica o una re-emergencia de la enfermedad, estudios de este tipo pueden ser considerados para la proteína rMSP10. En zonas de baja transmisión de la malaria, como la región Amazónica peruana, se está presentando la necesidad de implementar estrategias particulares, como la detección de individuos infectados con

malaria pero asintomáticos, así como de individuos expuestos a la enfermedad. Para esto se necesita el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas (1), que involucren métodos de detección con alta sensibilidad para la detección de bajas parasitemias (superior al límite de detección de la microscopia y PDR) y también que permitan identificar focos de exposición para orientar a los programas de control. Futuros diseños de pruebas de detección de anticuerpos empleando rMSP10 pueden ser de gran utilidad para contribuir a la identificación en la región de estos focos de reciente transmisión de la malaria y áreas libres de malaria para vigilar una posible re-introducción, sobre todo en poblaciones o regiones con transmisión muy baja que ya estén entrando en etapa de eliminación.

Herramientas de diagnóstico basadas en oligonucleótidos del gen MSP10 se encuentran en desarrollo para *P.vivax* y están siendo evaluadas en nuestra región (82) lo que demuestra el potencial uso diagnóstico de PfMSP10 en el campo de la malaria.

Los productos obtenidos del trabajo serán sometidos a propiedad intelectual: Los plásmidos que originaron a rMSP10 serán depositados en el repositorio Addgene (Cambridge, MA, USA) (83) para su acceso y uso por la comunidad científica internacional, de la misma forma la proteína rMSP10 y su aplicación serológica será sometido a patente tal y como otros grupos alrededor del mundo han solicitado para rMSP4 y rMSP5 de *P.falciparum* (Recombinant plasmodium falciparum merozoite surface proteins 4 and 5 and their use WO 2007060550 A2) (84), en la actualidad sólo se encuentra disponible de forma comercial la proteína MSP10 expresada en levadura y bacteria (Bioclone Inc.)(85), lo versátil de la producción de rMSP10 obtenida en este estudio es su facilidad de obtención ya que el ser obtenidas a partir de células Sf9 puede reproducirse en cualquier laboratorio que tenga condiciones estándares de cultivos. Finalmente los péptidos y anticuerpos como sus aplicaciones serán sometidos a estudios de materia patentable, teniendo como precedente las patentes de anticuerpos otorgadas a grupos de investigación internacionales que realizan investigaciones en malaria (Novel anti-plasmodium parasite antibodies (EP 2692357 A1)) (86)).

6.1.1.- Recomendaciones

Esta tesis puede dar origen a distintos estudios dentro del campo de la malaria causada por *P. falciparum*. Desde investigación básica, como ensayos de funcionalidad de las proteínas (proteína total rMSP10), estudios de diversidad genética focalizados en las zonas de interés (Fernández, Carlos; Tesis de maestría en Bioquímica y Biología Molecular – UPCH) y ensayos de estimulación *in vitro* de PBMCs de individuos infectados con *P. falciparum*. Ensayos de investigación aplicados como el uso de los péptidos identificados para sistemas y/o ensayos automatizados en formato “beads” empleando la tecnología LUMINEX, estudios de validación de los péptidos de msp10 y rMSP10 como marcadores serológicos en estudios tipo cohorte de pacientes en la Región Amazónica con el fin de ver cambios en la transmisión. Uso de los anticuerpos obtenidos para llevar a cabo ensayos de bloqueo del proceso de invasión de *P.falciparum* en condiciones *in vitro* (Villasis, Elizabeth; Tesis de maestría en Microbiología - UPCH). Sin dejar de lado la aplicación de la tecnología de baculovirus para la expresión de proteínas de *P.vivax* (Garro, Katherine; Tesis de maestría en Bioquímica y Biología Molecular y Rodríguez, Pamela; Tesis de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, ambas tesis se vienen desarrollando también en los laboratorios de Malaria de la UPCH). De la misma forma realizar los estudios de sero-reactividad de rMSP10 en otras regiones amazónicas de países vecinos como (Colombia, Brasil y Ecuador). Considerar el uso de estas proteínas recombinantes rRh2b y rMSP10 para el desarrollo de pruebas rápidas de detección de anticuerpos para su uso como herramientas de diagnóstico en regiones alejadas donde no hay microscopia. Finalmente evaluar la posibilidad de aplicar el modelo planteado para otras regiones peruanas endémicas a malaria, como Piura, Tumbes (Costa norte) (79) y Cuzco (Selva central), los dos últimos que han reportado brotes de malaria *falciparum*, situación que ha llamado la atención en especial Cuzco ya que no se había reportado desde 1945 (79,80), en donde se requerirá monitorear con herramientas serológicas estos cambios bruscos en transmisión de la malaria.

6.1.2.- Conclusiones:

Tras el presente trabajo podemos mencionar que las proteínas de *P.falciparum* expresadas de forma recombinante o en péptidos y mediante el uso de herramientas complementarias contribuyeron en la identificación de potenciales marcadores serológicos para la región amazónica peruana.

De esta forma podemos resaltar los principales hallazgos en este trabajo:

6.1.2.1.- Se debe considerar a PfMSP10 como una proteína candidata a marcador serológico al presentar altos niveles de reactividad en sueros de individuos infectados con *P.falciparum*,

6.1.2.2.- De la misma forma se puede considerar al péptido (MSP10-2) como otra molécula candidata a marcador serológico.

6.1.2.3.- La proteína recombinante rRh2b presentó reactividad frente a los sueros de pacientes infectados, sin embargo, se debe continuar evaluando su potencial antigénico ya que los niveles de reactividad fueron más elevados que los obtenidos para rEBA175

6.1.2.4.- La proteína recombinante rEBA175 expresada en este trabajo no presentó reactividad frente a los sueros de pacientes evaluados.

6.1.2.5.- El uso de herramientas bioinformáticas contribuyó en acelerar el proceso de selección de péptidos inmunogénicos y por tanto de anticuerpos que ayuden a caracterizar estos marcadores serológicos.

6.1.3.- Limitaciones:

El presente trabajo (que debe ser considerado como un primer tamizaje de proteínas en la búsqueda de nuevos marcadores serológicos) durante su desarrollo se presentaron diferentes limitaciones de índole técnico que deben ser consideradas para futuros ensayos similares:

6.1.2.1.- En la selección de antígenos: Tener presente estudios de diversidad genética disponibles que incluyan muestras de diferentes regiones de la amazonia peruana, para las proteínas de interés previo a los ensayos de producción de proteína recombinante utilizando aislados de la región geográfica de interés.

6.1.2.2.- En los ensayos de clonación: No todos los genes pueden expresarse tras un paso de clonación, por lo que a veces es necesario un paso de síntesis de genes tras una optimización de codones al sistema de expresión a utilizarse.

6.1.2.3.- En la caracterización de proteínas nativas y recombinantes: La falta de disponibilidad de anticuerpos comerciales para las proteínas de interés, esto es una limitante para estudios de tipo locales y por tanto se debe adoptar estrategias para el desarrollo de los anticuerpos adaptados a las necesidades del investigador local. La producción de anticuerpos policlonales utilizando las proteínas recombinantes purificadas, debido a limitantes como la falta de facilidades para mantener animales experimentales para ensayos de inmunizaciones.

6.1.2.4.- En la evaluación de las proteínas recombinantes utilizando sueros de pacientes: La falta de sueros estándares, presencia de anticuerpos anti-*P.vivax* en muestras de sueros de pacientes *P.falciparum*, con el fin de mantener la repetitividad de los ensayos serológicos, por lo que se deben optimizar mediante el uso de sueros estándares disponibles en repositorios nacionales o internacionales.

6.1.2.5.- Considerar la reactividad cruzada que presenta rMSP10 frente a sueros de pacientes infectados con Leishmaniasis y Leptospirosis, infecciones que pueden presentarse en regiones en donde los casos de malaria están presentes; por lo que más estudios son necesarios para asegurar el uso de rMSP10 como marcador serológico.

6.2.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wellem TE, Walliker D, Smith CL, do Rosario VE, Maloy WL, Howard RJ, et al. A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of *Plasmodium falciparum*. *Cell*. 1987;49(5):633-42.
2. OMS. World Malaria report. 2015.
3. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PloS one*. 2015;10(9):e0137458.
4. V SMSD. Costo efectividad del cambio de los esquemas de tratamiento para malaria en el Perú (1999-2003). *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2004;21 (4).
5. MINSA DGdED-. Boletín Epidemiológico de Malaria. *Semana 1 del 2016*. AGREGAR EL LINK DE LA PAGINA WEB
6. Griffith KS, Lewis LS, Mali S, Parise ME. Treatment of malaria in the United States: a systematic review. *Jama*. 2007;297(20):2264-77.
7. Torres K. Evaluación de la respuesta inmune a Malaria Sintomática y Asintomática por *Plasmodium falciparum* en la Amazonía Peruana: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2015.
8. Dharia NV, Plouffe D, Bopp SE, Gonzalez-Paez GE, Lucas C, Salas C, et al. Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome research*. 2010;20(11):1534-44.
9. Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(5):341-54.
10. Mackinnon MJ, Li J, Mok S, Kortok MM, Marsh K, Preiser PR, et al. Comparative transcriptional and genomic analysis of *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000644.
11. Marty AJ, Thompson JK, Duffy MF, Voss TS, Cowman AF, Crabb BS. Evidence that *Plasmodium falciparum* chromosome end clusters are cross-linked by protein and are the sites of both virulence gene silencing and activation. *Molecular microbiology*. 2006;62(1):72-83.
12. Daily JP, Le Roch KG, Sarr O, Ndiaye D, Lukens A, Zhou Y, et al. In vivo transcriptome of *Plasmodium falciparum* reveals overexpression of transcripts that encode surface proteins. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(7):1196-203.
13. Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*. 2003;1(1):E5.
14. Mayer C, Slater L, Erat MC, Konrat R, Vakonakis I. Structural analysis of the plasmodium falciparum Erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) intracellular domain reveals a conserved interaction epitope. *The Journal of biological chemistry*.
15. Penman B, Gupta S. Evolution of virulence in malaria. *Journal of biology*. 2008;7(6):22.
16. Spycher C, Rug M, Pachlatko E, Hanssen E, Ferguson D, Cowman AF, et al. The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Molecular microbiology*. 2008;68(5):1300-14.
17. Chen Q, Schlichterle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(3):439-50.
18. Chaparro-Narvaez PE, Lopez-Perez M, Rengifo LM, Padilla J, Herrera S, Arevalo-Herrera M. Clinical and epidemiological aspects of complicated malaria in Colombia, 2007-2013. *Malaria journal*. 2016;15(1):269.
19. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673-9.
20. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):377-410.
21. Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, et al. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent *Plasmodium falciparum* exposure for individuals and communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(32):E4438-47.
22. King CL, Davies DH, Felgner P, Baum E, Jain A, Randall A, et al. Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(3 Suppl):16-27.
23. Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation

- of serological tools for malaria surveillance. *F1000prime reports*. 2014;6:100.
24. Victor ME, Bengtsson A, Andersen G, Bengtsson D, Lusingu JP, Vestergaard LS, et al. Insect cells are superior to *Escherichia coli* in producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. *Malaria journal*. 2010;9:325.
 25. TIMOTHY J. HAHN BW, JOHN KUTNEY, ED FIX, NANCY NIDEL, JAMES WONG, DANA JENDREK, CELIA BAULA, JODY LICHAA, , MIKE SOWERS YVL, JOHN HIGGINS, KWAN-HO ROH, ZHENG MENG, CYNTHIA OLIVER, ERICA SHANE, LARRY ELLINGSWORTH, SARATHI , BODDAPATI CM-P, ZIPING WEI, OLEG BORISOV, WIN CHEUNG, JINGNING LI, VICTOR GAVRILOV, KATHLEEN , CALLAHAN KLB, MAGNUS SÄVENHED, MATS SJÖLUND, SUSANNA MACMILLAR, MALIN SCHENERFELT, LINDA , STERTMAN CA, KATARINA RANLUND, JENNY REIMER, DENISE COURBRON, STEPHEN J. BEARMAN, VALERIE MOORE, , D. NIGEL THOMAS ABF, LOUIS F. FRIES, GREGORY M. GLENN, GALE E. , et al. Rapid Manufacture and Release of a GMP Batch of Zaire Ebola Virus Glycoprotein Vaccine Made Using Recombinant Baculovirus-Sf9 Insect Cell Culture Technology *BioProcessing Journal*. 2015;14(1).
 26. Wagner JM, Pajerowski JD, Daniels CL, McHugh PM, Flynn JA, Balliet JW, et al. Enhanced production of Chikungunya virus-like particles using a high-pH adapted *Spodoptera frugiperda* insect cell line. *PLoS one*. 2014;9(4):e94401.
 27. Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C, Tanaka T, et al. Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*. 2003;316(1):161-70.
 28. Mizutani M, Iyori M, Blagborough AM, Fukumoto S, Funatsu T, Sinden RE, et al. Baculovirus-vectored multistage *Plasmodium vivax* vaccine induces both protective and transmission-blocking immunities against transgenic rodent malaria parasites. *Infection and immunity*. 2014;82(10):4348-57.
 29. Nielsen MA, Resende M, Alifrangis M, Turner L, Hviid L, Theander TG, et al. *Plasmodium falciparum*: VAR2CSA expressed during pregnancy-associated malaria is partially resistant to proteolytic cleavage by trypsin. *Experimental parasitology*. 2007;117(1):1-8.
 30. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(2):264-71.
 31. Sala KA, Nishiura H, Upton LM, Zakutansky SE, Delves MJ, Iyori M, et al. The *Plasmodium berghei* sexual stage antigen PSOP12 induces anti-malarial transmission blocking immunity both in vivo and in vitro. *Vaccine*. 2015;33(3):437-45.
 32. Zerka A, Rydzak J, Lass A, Szostakowska B, Nahorski W, Wroczynska A, et al. Studies on Immunogenicity and Antigenicity of Baculovirus-Expressed Binding Region of *Plasmodium falciparum* EBA-140 Merozoite Ligand. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2016;64(2):149-56.
 33. Mena JA, Kamen AA. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert review of vaccines*. 2011;10(7):1063-81.
 34. van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *The Journal of general virology*. 2015;96(Pt 1):6-23.
 35. Hijar G, Padilla C, Marquino W, Falconi E, Montoya Y. Genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* isolates from Loreto, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96 Suppl 1:S137-40.
 36. Arrospide N, Hijar-Guerra G, de Mora D, Diaz-Cortez CE, Veloz-Perez R, Gutierrez S, et al. [Mutant alleles associated to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* of the Ecuador-Peru and Ecuador-Colombia borders]. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2014;31(2):282-7.
 37. Bacon DJ, Tang D, Salas C, Roncal N, Lucas C, Gerena L, et al. Effects of point mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteridine synthase genes on clinical outcomes and in vitro susceptibility to sulfadoxine and pyrimethamine. *PLoS one*. 2009;4(8):e6762.
 38. Pillai DR, Hijar G, Montoya Y, Marouin W, Ruebush TK, 2nd, Wongsrichanalai C, et al. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

- (pfmdr1) gene for *P. falciparum* malaria in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(1):107-10.
39. Vieira PP, Ferreira MU, Alecrim M, Alecrim WD, da Silva LH, Sihuíncha MM, et al. pfcrt Polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(2):417-24.
40. Zhou Z, Griffing SM, de Oliveira AM, McCollum AM, Quezada WM, Arrospide N, et al. Decline in sulfadoxine-pyrimethamine-resistant alleles after change in drug policy in the Amazon region of Peru. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(2):739-41.
41. Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, et al. Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;70(5):461-6.
42. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, et al. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):2042-51.
43. McKenzie FE, Wongsrichanalai C, Magill AJ, Forney JR, Permpnich B, Lucas C, et al. Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. *The Journal of parasitology*. 2006;92(6):1281-5.
44. Parekh FK, Hernandez JN, Krogstad DJ, Casapia WM, Branch OH. Prevalence and risk of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria among pregnant women living in the hypoendemic communities of the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(3):451-7.
45. Bordbar B, Tuikue Ndam N, Renard E, Jafari-Guemouri S, Tavul L, Jennison C, et al. Genetic diversity of VAR2CSA ID1-DBL2Xb in worldwide *Plasmodium falciparum* populations: impact on vaccine design for placental malaria. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;25:81-92.
46. Chenet SM, Branch OH, Escalante AA, Lucas CM, Bacon DJ. Genetic diversity of vaccine candidate antigens in *Plasmodium falciparum* isolates from the Amazon basin of Peru. *Malaria journal*. 2008;7:93.
47. Sutton PL, Neyra V, Hernandez JN, Branch OH. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Peruvian Amazon: propagation of complex, multiple allelic-type infections without super-infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;81(6):950-60.
48. Branch OH, Sutton PL, Barnes C, Castro JC, Hussin J, Awadalla P, et al. *Plasmodium falciparum* genetic diversity maintained and amplified over 5 years of a low transmission endemic in the Peruvian Amazon. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(7):1973-86.
49. Sutton PL, Torres LP, Branch OH. Sexual recombination is a signature of a persisting malaria epidemic in Peru. *Malaria journal*. 2011;10:329.
50. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American *Plasmodium falciparum* after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PloS one*. 2011;6(9):e23486.
51. Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*. 2010;5(1):e8091.
52. Lopez-Perez M, Villasis E, Machado RL, Povoia MM, Vinetz JM, Blair S, et al. *Plasmodium falciparum* field isolates from South America use an atypical red blood cell invasion pathway associated with invasion ligand polymorphisms. *PloS one*. 2012;7(10):e47913.
53. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Scientific reports*. 2013;3:2797.
54. Zervos TM, Hernandez JN, Sutton PL, Branch OH. Quantification of *Plasmodium falciparum* malaria from complex infections in the Peruvian Amazon using quantitative PCR of the merozoite surface protein 1, block 2 (PfMSP1-B2): in vitro dynamics reveal density-dependent interactions. *Parasitology*. 2012;139(6):701-8.
55. Hernandez-Rivas R, Hinterberg K, Scherf A. Compartmentalization of genes coding for immunodominant antigens to fragile chromosome ends leads to dispersed subtelomeric gene families and rapid gene evolution in *Plasmodium*

- falciparum. *Molecular and biochemical parasitology*. 1996;78(1-2):137-48.
56. Durand S, Ramal C, Huilca M, Cabezas C. Oportunidad en el diagnóstico y tratamiento de la Malaria en comunidades periurbanas de la Amazonia Peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2005;22(1).
 57. Rosas Aguirre AM, Llanos Zavalaga LF, Trelles de Belaunde M. [Cost-effectiveness ratio of using rapid tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2009;25(5):377-88.
 58. Griffing SM, Gamboa D, Udhayakumar V. The history of 20th century malaria control in Peru. *Malaria journal*. 2013;12:303.
 59. Kobayashi T, Gamboa D, Ndiaye D, Cui L, Sutton PL, Vinetz JM. Malaria Diagnosis Across the International Centers of Excellence for Malaria Research: Platforms, Performance, and Standardization. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(3 Suppl):99-109.
 60. Llanos-Zavalaga F, Villacorta J, Reyes R, Lecca L, Mendoza D, Mayca J, et al. Evaluación de la prueba ICT malaria P.f./P.v. (AMRAD®) para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* en una zona endémica de la amazonía peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2002;19(1).
 61. Bendezu J, Rosas A, Grande T, Rodriguez H, Llanos-Cuentas A, Escobedo J, et al. Field evaluation of a rapid diagnostic test (Parascreen) for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon. *Malaria journal*. 2010;9:154.
 62. 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 *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PloS one*. 2012;7(8):e43094.
 63. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. *PloS one*. 2015;10(7):e0131576.
 64. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(1):45-52.
 65. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria journal*. 2005;4:27.
 66. Parker BS, Paredes Olortegui M, Penataro Yori P, Escobedo K, Florin D, Rengifo Pinedo S, et al. Hyperendemic malaria transmission in areas of occupation-related travel in the Peruvian Amazon. *Malaria journal*. 2013;12:178.
 67. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-*Plasmodium falciparum* invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malaria journal*. 2012;11:361.
 68. Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH. Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malaria journal*. 2008;7:173.
 69. Yalcindag E, Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Durand P, Brisse S, et al. Patterns of selection on *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigens after the colonization of the New World. *Molecular ecology*. 2014;23(8):1979-93.
 70. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(8):1342-51.
 71. Ord RL, Rodriguez M, Lobo CA. Malaria invasion ligand RH5 and its prime candidacy in blood-stage malaria vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(6):1465-73.
 72. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2012;12(5):978-86.
 73. Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003;127(1):59-68.
 74. Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, Gelb MH, et al. Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Molecular and biochemical parasitology*. 2006;148(2):144-60.

75. Garraud O, Diouf A, Nguer CM, Dieye A, Longacre S, Kaslow DC, et al. Different Plasmodium falciparum recombinant MSP1(19) antigens differ in their capacities to stimulate in vitro peripheral blood T lymphocytes in individuals from various endemic areas. *Scandinavian journal of immunology*. 1999;49(4):431-40.
76. Ahmed Ismail H, Tijani MK, Langer C, Reiling L, White MT, Beeson JG, et al. Subclass responses and their half-lives for antibodies against EBA175 and PfRh2 in naturally acquired immunity against Plasmodium falciparum malaria. *Malaria journal*. 2014;13:425.
77. Pisitkun T, Hoffert JD, Saeed F, Knepper MA. NHLBI-AbDesigner: an online tool for design of peptide-directed antibodies. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;302(1):C154-64.
78. Stanisic DI, Fowkes FJ, Koinari M, Javati S, Lin E, Kiniboro B, et al. Acquisition of antibodies against Plasmodium falciparum merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infection and immunity*. 2015;83(2):646-60.
79. Baldeviano, G. C., et al. (2015). "Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012." *Emerg Infect Dis* 21(5): 797-803.
- 79.80 Okoth SA, Chenet SM, Arrospide N, Gutierrez S, Cabezas C, Matta JA, et al. Molecular Investigation into a Malaria Outbreak in Cusco, Peru: Plasmodium falciparum BV1 Lineage is Linked to a Second Outbreak in Recent Times. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;94(1):128-31.
81. - Rosas-Aguirre *et al*, Serological responses against species-specific recombinant MSP-10 antigens as markers of malaria exposure in the Peruvian Amazon. Poster presentado ESCIMID. 2016.
- 82.- Alnasser Y, Ferradas C, Clark T, Calderon M, Gurbillon A, et al. Correction: Colorimetric Detection of Plasmodium vivax in Urine Using MSP10 Oligonucleotides and Gold Nanoparticles. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(11): e0005143. 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0005143.
- 83.- ADEGENE. <https://www.addgene.org/contact/>. Accesado el 20/01/17.
- 84.- Longacre, S., et al. (2007). Recombinant plasmodium falciparum merozoite surface proteins 4 and 5 and their use, Google Patents. <http://www.google.co.ug/patents/WO2007060550A2?cl=zh>. Accesado el 20/01/17.
- 85.- Bioclone Inc. <http://www.bioclone.us/parasite-417-cdna-merozoite-surface-protein-10-msp10-plasmodium-falciparum.html>. Accesado el 20/01/17.
- 86.- Fendel, R. D., et al. (2014). Novel anti-plasmodium parasite antibodies, Google Patents. <https://www.google.com/patents/EP2692357A1?c1=en>. Accesado el 20/01/17.

ANEXOS

Capítulo 3:

3.1.- Experimentos suplementarios

3.1.1.- Clonación y expresión de la proteína EB175 de *Plasmodium falciparum* en el sistema de baculovirus.

A.- Diseño de experimentos de clonación:

Código PlasmoDB: PF3D7_0731500

Este gen se ubica en el cromosoma 7 del genoma y va desde el nucleótido 1358055 hasta el 1362929 que son 4874 pares de bases (pb) (figura 3S1).

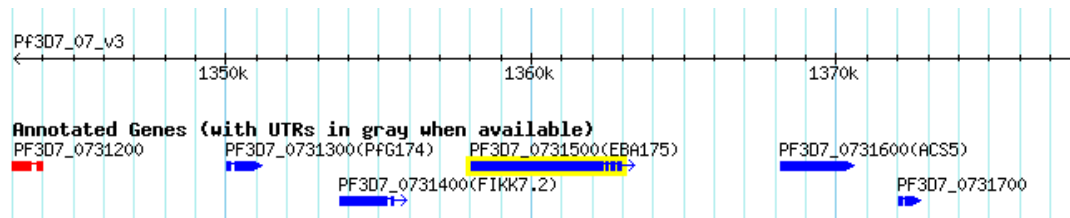


Figura 3S1.- Vista tomada del PlasmoDB y fue accesado el 13/01/14.

Luego se tomó la región codificante del gen 4874 pb y su secuencia FASTA se muestra a continuación:

```
ATGAAATGTAATATTAGTATATATTTTTTGGCTTCCTTCTTTGTGTTATATTTTTGCAAAA
GCTAGGAATGAATATGATATAAAAAGAGAATGAAAAATTTTTAGACGTGTATAAAGAAAAA
TTTAAATGAATTAGATAAAAAGAAATATGGAAATGTTCAAAAACTGATAAGAAAATATTT
ACTTTTATAGAAAATAAATTAGATATTTTAAATAATTCAAAATTTAATAAAAGATGGAAG
AGTTATGGAACCTCCAGATAATATAGATAAAAATATGTCTTTAATAAATAAACATAATAAT
GAAGAAATGTTTAAACAACAATTATCAATCATTTTTATCGACAAGTTCATTAATAAAGCAA
AATAAATATGTTCCATTAAACGCTGTACGTGTGTCTAGGATATTAAGTTTCTGGATTCT
AGAATTAATAATGGAAGAAATACTTCATCTAATAACGAAGTTTTAAGTAATTGTAGGGAA
AAAAGGAAAGGAATGAAATGGGATTGTAAAAAGAAAAATGATAGAAGCAACTATGTATGT
ATTCTGATCGTAGAATCCAATTATGCATTGTTAATCTTAGCATTATTA AACATATACA
AAAGAGACCATGAAGGATCATTTTCATTGAAGCCTCTAAAAAAGAATCTCAACTTTTGGCTT
AAAAAAATGATAACAAATATAATTCTAAATTTTGTAAATGATTTGAAGAATAGTTTTTTA
GATTATGGACATCTTGCTATGGGAAATGATATGGATTTTGGAGGTATTCAACTAAGGCA
GAAAACAAAATTCAGAAGTTTTTAAAGGGCTCATGGGGAATAAGTGAACATAAAATTT
AAAAATTTTAGAAAAAATGGTGGAAATGAATTTAGAGAGAAAACCTTTGGGAAGCTATGTTA
TCTGAGCATAAAAAAATAAATAAATAATTGTAAAAATATTTCCCAAGAAGAATTACAAATTT
ACTCAATGGATAAAAAGAATGGCATGGAGAATTTTTGCTTGAAAGAGATAATAGATCAAAA
TTGCCAAAAAGTAAATGTAAAAATAATACATTATATGAAGCATGTGAGAAGGAATGTATT
GATCCATGTATGAAATATAGAGATTGGATTATTAGAAGTAAATTTGAATGGCATAACGTTA
TCGAAAGAATATGAAACTCAAAAAGTTCCAAAGGAAAATGCGGAAAATTTAATCAAAA
ATTTTCAGAAAACAAGAATGATGCTAAAGTAAGTTTATTATTGAATAATTGTGATGCTGAA
TATTCAAAATATTGTGATTGTAAACATACTACTACTCTCGTTAAAAGCGTTTTAAATGGT
AACGACAATACAATTAAGGAAAAGCGTGAACATATTGATTTAGATGATTTTTCTAAATTT
GGATGTGATAAAAATTCGGTTGATACAAACACAAAGGTGTGGGAATGTAAAAAACCTTAT
```

AAATTATCCACTAAAGATGTATGTGTACCTCCGAGGAGGCAAGAATTATGTCTTGAAAC
ATTGATAGAATATACGATAAAAACCTATTAATGATAAAAAGAGCATATTCTTGCTATTGCA
ATATATGAATCAAGAATATTGAAACGAAAATATAAGAATAAAGATGATAAAGAAGTTTGT
AAAATCATAAAATAAACTTTTCGCTGATATAAGAGATATTATAGGAGGTACTGATTATTGG
AATGATTTGAGCAATAGAAAATTAGTAGGAAAAATTAACACAAATTCAAATTATGTTCCAC
AGGAATAAACAAAATGATAAGCTTTTTTCGTGATGAGTGGTGGAAAGTTATTAaaaaagat
GTATGGAATGTGATATCATGGGTATTCAAGGATAAAAACCTGTTTGTAAAGAAGATGATATT
GAAAATATAACCACAATTCTTCAGATGGTTTTAGTGAATGGGGTGTGATTATTGCCAGGAT
AAAACAAAAATGATAGAGACTCTGAAGGTTGAATGCAAAGAAAAACCTTGTGAAGATGAC
AATTGTAAACGTAATGTAATTCATATAAAGAATGGATATCAAAAAAAAAAGAAGATAT
AATAACAAGCCAAACAATACCAAGAATATCAAAAAGGAAATAATTACAAAATGTATTCT
GAATTTAAATCTATAAAACCAGAAGTTTTATTTAAAGAAATACTCGGAAAAATGTTCTAAC
CTAAATTTGGAAGATGAATTTAAGGAAGAATTACATTCAGATTATAAAAAATAAATGTACG
ATGTGTCCAGAAGTAAAGGATGTACCAATTTCTATAATAAGAAATAATGAACAAACTTCG
CAAGAAGCAGTTCCTGAGGAAAGCACTGAAATAGCACACAGAACGGAAACTCGTACGGAT
GAACGAAAAAATCAGGAACCAGCAAATAAGGATTTAAAGAATCCACAACAAAAGTGTAGGA
GAGAACGGAACTAAAGATTTATTACAAGAAGATTTAGGAGGATCACGAAGTGAAGACGAA
GTGACACAAGAATTTGGAGTAAATCATGGAATACCTAAGGGTGGAGGATCAAACGTTAGGA
AAATCTGACGCCATTCCAAACATAGGCGAACCCGAAACGGGAATTTCCACTACAGAAGAA
AGTAGACATGAAGAAGGCCACAATAACAAGCATTGTCTACTTCAGTCGATGAGCCTGAA
TTATCTGATACACTTCAATTGCATGAAGATACTAAAGAAAATGATAAACTACCCCTAGAA
TCATCTACAATCACATCTCCTACGGAAGTGGAAAGTTCTGATACAGAGGAAACTCCATCT
ATCTCTGAAGGACCAAAAGGAAATGAACAAAAAAAACGTGATGACGATAGTTTGAGTAAA
ATAAGTGTATCACAGAAAATCAAGACCTGAAACTGATGCTAAAGATACTTCTAACTTG
TTAAAATTAAGGAGATGTTGATATTAGTATGCCTAAAGCAGTTATTGGGAGCAGTCTT
AATGATAATATAAATGTTACTGAACAAGGGGATAATATTTCCGGGGTGAATTCTAAACCT
TTATCTGATGATGTACGTCCAGATAAAAAATCATGAAGAGGTGAAAAGAACATACTAGTAAT
TCTGATAATGTTCAACAGTCTGGAGGAATTTGTTAATATGAATGTTGAGAAAGAACTAAAA
GATACTTTAGAAAATCCTTCTAGTAGCTTGGATGAAGGAAAAGCACATGAAGAATTATCA
GAACCAATCTAAGCAGTGACCAAGATATGTCTAATACACCTGGACCTTTGGATAACACC
AGTGAAGAACTACAGAAAGAATTAGTAATAATGAATATAAAGTTAACGAGAGGGGAAGGT
GAGAGAACGCTTACTAAGGAATATGAAGATATTGTTTTGAAAAGTCATATGAATAGAGAA
TCAGACGATGGTGAATTATATGACGAAAATTCAGACTTATCTACTGTAAATGATGAATCA
GAAGACGCTGAAGCAAAAATGAAAGGAAATGATACATCTGAAATGTGCGATAATAGTAGT
CAACATATTGAGAGTGATCAACAGAAAAACGATATGAAAACCTGTTGGTGATTTGGGAACC
ACACATGTACAAAACGAAATTAGTGTTCCCTGTTACAGGAGAAAATTGATGAAAAATTAAGG
GAAAGTAAAGAATCAAAAATTCATAAGGCTGAAGAGGAAAAGATTAAGTCATACAGATATA
CATAAAATTAATCCTGAAGATAGAAATAGTAATACATTACATTTAAAAGATATAAGAAAT
GAGGAAAACGAAAGACACTTAACTAATCAAAAACATTAATATTAGTCAAGAAAGGGATTTG
CAAAAACATGGATTCCATACCATGAATAATCTACATGGAGATGGAGTTTCCGAAAGAAGT
TTAAATATGAGATCTAATAATAATAATTTTAATAATATTCCAAGTAGATATAAATTTATAT
GATAAAAAATTAGATTTAGATCTTTATGAAAACAGAAAATGATAGTACAACAAAAGAATTA
ATAAAGAAATTAGCAGAAAATAAATAAATGTGAGAACGAAATTTCTGTAAAAATATTGTGAC
CATATGATTCATGAAGAAATCCCATTAAAAAACATGCACTAAAAGAAAAACAAGAAATCTG
TGTTGTGCAGTATCAGATTACTGTATGAGCTATTTTACATATGATTCAGAGGAATATTAT
AATTGTACGAAAAGGGAATTTGATGATCCATCTTATACATGTTTCAGAAAGGAGGCTTTT
TCAAGTATGCCATATTATGCAGGAGCAGGTGTGTTATTTATTATATTGGTTATTTTAGGT
GCTTCACAAGCCAAATATCAAAGTTCTGAAGGAGTTATGAATGAGAATAATGAGAATAAT
TTTTTATTTGAAGTTACTGATAATTTAGATAAATTTATCCAATATGTTCAATCAACAAGTA
CAGGAAACTAATATCAACGATTTTTCTGAATACCATGAGGATATAAATGATATTAATTTT
AAGAAATGA

Luego dicha secuencia de nucleótidos fue tomada y transformada a secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta “**Translate tool**” en el servidor expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) y se obtuvo la siguiente secuencia:

```
MKCNISIIYFFASFFVLYFAKARNEYDIKENEKFLDVYKEKFNELDKKKYGNVQKTDKKIF
TFIENKLDILNNSKFNKRWKS YGTPDNIDKNMSLINKHNNEEMFNNNYQSFLSTSSLIKQ
NKYVPINAVRSRILSFLDSRINNGRNTSSNNEVLSNCREKRKGMKWDCCKKNDRSNYVC
IPDRRIQLCIVNLSIIKTYTKETMKDHFIEASKKESQLLLKKNNDNKYNSKFCNDLKN SFL
DYGHLAMGNDMDFGGYSTKAENKIQEVFKGAHGEISEHKIKNFRKKWWNEFREKLWEAML
SEHKNNINCKNIPQEELQITQWIKEWHGEFLLERDNRSKLPKSKCKNNTLYEACEKECI
DPCMKYRDWIIRSKFEWHTLSKEYETQKVPKENAENYLIKISENKNDKAVSLLLNNCDAE
YSKYCDCKHTTTLVKSVLNGNDNTIKEKREHIDLDDFSKFGCDKNSVDNTNTKVWECKKPY
KLSTKDVCPVRRQELCLGNIDRIYDKNLLMIKEHILAIAYESRILKRKYKNKDDKEVC
KIINKTFADIRDIIGGTDYWN DL SNRKLVGKINTNSNYVHRNKQNDKLF RDEWWKVIK KD
VWNVISWVFKDKTVCKEDDIENIPQFFRFSEWGDDYCQDKTKMIETLKVECKEKPCEDD
NCKRKCNSYKEWISKKKEEYKQAKQYQYQKGNKYMYSEFKSIKPEVYLKKYSEKCSN
LNFEDEFKEELHSDYKNKCTMCPEVKDVPISII RNNEQTSQEAVPEESTEIAHRTETRTD
ERKNQEPANKDLKNPQQSVGENGTDLLQEDLGGSRSEDEVTQEFVGNHGI PKGEDQTLG
KSDAIPNIGEPETGISTTEESRHEEGHNKQALSTSVDEPELSDTLQLHEDTKENDKLPLE
SSTITSPTESGSSDTEETPSISEGPKGNEQKKRDDDLSKISVSPENSRPETDAKDTSNL
LKLKGDVDI SMPKAVIGSSPNDNINVTEQGDNISGVNSKPLSDDV RPKDNHEEVKEHTSN
SDNVQQSGGIVNMNVEKELKDTLENPSSSLDEGKAHEELSEPNLSSDQDMSNTPGPLDNT
SEETTERISNNEYKVNREGERTLTKEYEDIVLKSHMNRESDDGELYDENS DLSTVNDES
EDAEAKMKGNDTSEMSHNS SQHIESDQKNDMKTVDLGTTHVQNEISVPVTGEI DEKLR
ESKESKIHKAEEERLSHTDIHKINPEDRNSNTLHLKDIRNEENERHLTNQNINISQERDL
QKHGFHTMNNLHGDGV SERSQINHSHHG NRQDRGGNSGNV LNMRSNNNNFN NIPSRYNLY
DKKLDLDLYENRNDSTTKELIKKLAE INKCENEISVKYCDHMIHEE IPLKTCTKEKTRNL
CCAUSDYCMSYFTYDSEEY NCTKREFDDPSYTCFRKEAFSSMPYYAGAGVLF IILVILG
ASQAKYQSSEGV MNENNENNFLFEVTDNLDKLSNMFNQVQETNINDFSEYHEDINDINF
KK
```

Utilizando la herramienta Pi/MW también en Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/), se calculó el peso molecular de la proteína de interés. Se obtuvo un peso molecular de **174.58 kDaltons**. En el sistema de expresión de células de insecto se tiene una correcta eficiencia de producción de hasta 150 kDaltons, optándose por tomar un segmento característico de la proteína.

Para tomar un región característica de la proteína se recurrió al PlasmoDB, en donde ya se tienen identificados epítopes reactivos de esta proteína frente a ensayos de linfoproliferación, entre otros ensayos, y esta información se encuentra en: **The immune epitope database 2.0** (http://www.iedb.org/epitope_details.php?epId=80296).

La figura adjunta muestra la lista de epítopes con alta reactividad en la proteína (High Confidence):

Epitope	Sequence	Location on Protein	Strain	Confidence
68237	VEKELKDTLENPSSSLDEGK	1035-1054	Plasmodium falciparum 3D7	Low
21682	GPLDNTSEETTERISNNEYK	1075-1094	Plasmodium falciparum 3D7	Low
15041	EYKVNERE	1092-1099	Plasmodium falciparum 3D7	Low
14085	ERTLTKEY	1101-1108	Plasmodium falciparum 3D7	Low
56123	RTLTKKEYE	1102-1109	Plasmodium falciparum 3D7	Low
65096	TLTKKEYED	1103-1110	Plasmodium falciparum 3D7	Low
65097	TLTKKEYEDIVLKSHMNRESDD	1103-1123	Plasmodium falciparum 3D7	Low
39984	LTKEYEDI	1104-1111	Plasmodium falciparum 3D7	Low
64557	TKEYEDIV	1105-1112	Plasmodium falciparum 3D7	Low
30669	KEYEDIVL	1106-1113	Plasmodium falciparum 3D7	Low
14991	EYEDIVLK	1107-1114	Plasmodium falciparum 3D7	Low
73631	YEDIVLKS	1108-1115	Plasmodium falciparum 3D7	Low
11361	EDIVLKSH	1109-1116	Plasmodium falciparum 3D7	Low
8810	DIVLKSHM	1110-1117	Plasmodium falciparum 3D7	Low
29345	IVLKSHMN	1111-1118	Plasmodium falciparum 3D7	Low
69571	VLKSHMNR	1112-1119	Plasmodium falciparum 3D7	Low
37018	LKSHMNRE	1113-1120	Plasmodium falciparum 3D7	Low
37019	LKSHMNRESDDGELYDENS	1113-1131	Plasmodium falciparum 3D7	Low
33339	KSHMNRES	1114-1121	Plasmodium falciparum 3D7	Low
58389	SHMNRES	1115-1122	Plasmodium falciparum 3D7	Low

Se identificaron 25 epítopes que se encuentran agrupados en la región carboxilo terminal de la proteína, por lo que se decide escoger toda esa región.

Cada uno de estas secuencias de aminoácidos se resaltó en amarillo en nuestra secuencia de aminoácidos (ver arriba). Observándose una región en donde estos epítopes reactivos se conglomeran: regiones III-IV y V. De esta forma nuestra nueva región comprendía **61.8 kDaltons**. Con la región elegida se procede a diseñar primers para clonar esta región del genoma de *P.falciparum* de la línea 3D7 (cepa representativa) en nuestro vector de expresión del sistema de baculovirus.

Servidor NEB builder (<http://nebuilder.neb.com/>):

Se utilizaron como moldes nuestra secuencia del gen y la secuencia del vector a utilizar, para este caso usamos el *pFastbacdual* (ver mapa del vector en descripción *pfmsp1*). El vector a utilizar contiene una región MCS (multiple cloning site) en donde se puede ingresar nuestras secuencias mediante el corte con enzimas de restricción, en nuestro caso usamos las enzimas **ECORI y HINDIII**.

User Selected Settings (características para la reacción)

Product Version E2611 - Gibson Assembly Master Mix

No. of Fragments 2-3 fragments (including vector)

Min. Overlap 15 bp

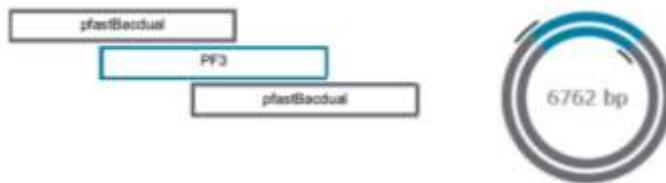
Min. Fragment Length 150 bp

PCR Polymerase Q5 High-Fidelity DNA Polymerase

PCR Primer Conc. 500 nM

Min. Primer Length 18 nt

Fragment Arrangement (Características de los primers)



Required Primers

Overlaps	Oligo (Uppercase = gene-specific primer)	Anneals	F/R	3' Tm	3' Ta *	6-Frame
pfastBacdual	gtccgaagcgcgggatgcatcaccatcaccatcacATGCCTAAAGCAGTTATTGG	PF3	Fwd	57.7°C	59.1°C	view
pfastBacdual	tctagtacttctcgacaTCATTTCTTAAAATTAATATCATTTATATCCTC	PF3	Rev	56.1°C	59.1°C	view

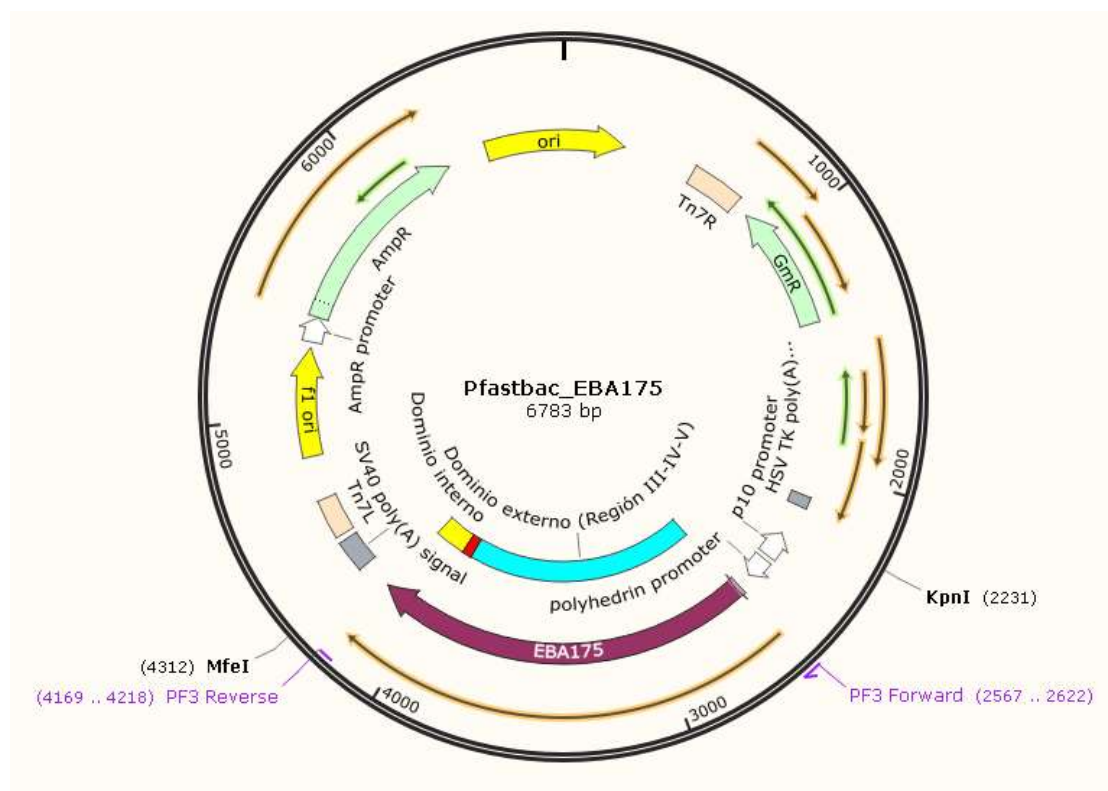
* 3' Ta (recommended annealing temperature) is calculated for the gene-specific portion of the primer for use with the selected PCR polymerase.

PF3 F gtccgaagcgcgggatgcatcaccatcaccatcacATGCCTAAAGCAGTTATTGG
PF3 R tctagtacttctcgacaTCATTTCTTAAAATTAATATCATTTATATCCTC

Para estos primers se nos brindó una temperatura de ensayo de PCR de 59.1°C, es decir al ADN de *P.falciparum* debemos amplificar una región de **1620 pb** aproximadamente. A este producto de PCR debemos mezclarlo con la enzima de Gibson y el plásmido digerido para obtener un nuevo plásmido recombinante cuyo peso molecular será de **6783 pb**, que será producto de la fusión de nuestro plásmido y fragmento de interés. Las cantidades para llevar a cabo la reacción se toman en cuenta de los anteriores ensayos con los otros genes.

De la misma forma el servidor nos arrojó un nuevo mapa del vector el cual llevaremos al software bioinformático SnapGene (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files), con el objetivo de graficar este nuevo plásmido recombinante.

MAPA DEL VECTOR (pFastbacdual-pfmSP10). PM: 6783 pb.



Secuencia del vector pFastBacdual – EBA175

```
TCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTT
ATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC
CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGCAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTAT
TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCAGACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAATAAATGGATGCCCT
GCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAACTGAACAAAATAGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAACTAGACAGAATAGT
TGTAAACTGAAATCAGTCCAGTTATGTGTGAAAAAGCATACTGGACTTTTGTATGGCTAAAGCAAACCTTTCATTTTCTGAAGTCAAAATT
GCCCGTCGTATTAAGAGGGGCGTGGCCAAGGCCATGGTAAAGACTATATTCGGCGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACCTCCGCGGCCGG
GAAGCCGACTCGGCTTGAACGAATTGTAGGTGGCGGTACTTGGGTCGATATCAAAAGTGCATCACTTCTCCCGTATGCCCAACTTTGTATA
GAGAGCCACTGCGGGATCGTACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCAAGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGA
GCGCGGTGGCAATGCCCTGCCTCCGGTCTCGCCGGAGACTGCGGAGATCATAGATATAGATCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTGGGCGAGA
ACGTAAGCCGCGAGAGCGCCAACAACCGCTTCTTGGTCAAGGACAGCAAGCGCGATGAATGCTTACTACGGAGCAAGTTCGAGGTAAT
CGGAGTCCGGCTGATGTTGGGAGTAGGTGGCTACGCTCCTCCAACTCACGACCGAAAAGATCAAGAGCAGCCCGCATGGATTGACTTGGTCA
GGCCGAGCCTACATGTGGAATGATGCCATACTTGAGCCACCTAATTTGTTTTAGGGGAGCTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTG
CGTAACATCGTTGCTGCCATAACATCAAACATCGACCCAGCGGTAACGCGCTTGTGCTTGGATGCCCGAGGCATAGACTGTACAAAAA
```

AACAGTCATAACAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCATACGC
TACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCAACTGGGTTTCGTGCCTTCATCCGTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTG
GGCAGCAGCGAAGTCGAGGCATTTCTGTCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGTCAGGCATTGGCGGCCCTTGCT
GTTCTTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGTAGACCTCGGCCGTGCGCGCGCTTGCCGGTGGTGCTGA
CCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCACGGACTCTAGCTATAGTTCTAGTGGTTGGCCTA
CGTACCCGTAGTGGCTATGGCAGGGCTTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTACCCGAACCTGGGGGTTGGGGTGGGGAAA
AGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGTCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAAC
AAACGACCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCGGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCTCCGTGTTTCAGTTAG
CCTCCCCATCTCCCGTACCGCATGCTATGCATCAGCTGCTAGCACCATGGCTCGAGATCCCGGGTGTACAAGTCTTCGTGAGTGTATTGTA
AATAAAATGTAATTTACAGTATAGTATTTTAATTAATATACAAATGATTGGATAATAATTTCTATTTAACTATAATATATTGTGTGGGTGGA
TTAAAGGTCGGTATACCTCCGGAATTAATAGATCATGGAGATAATAAAAATGATAACCATCTCGCAATAAAATAAGTATTTACTGTTTTCTG
TAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATATCCGGATTATTCATACCTGCCACCATCGGGCGCGGATCCCGTCCGAAGCGCGCGGAT
GCATCACCATCACCATCATGCTAAAGCAGTTATTGGGAGCAGTCTAATGATAATATAAATGTTACTGAACAAGGGGATAAATTTCCG
GGGTGAATTTAAACCTTATCTGATGATGTACGTCAGATAAAAAATCATGAAGAGGTGAAAGAACATACTAGTAATTTCTGATAATGTTCAA
CAGTCTGGAGGAATTGTTAATATGAATGTTGAGAAAGAACTAAAAGATACTTTAGAAAAATCCTTCTAGTAGCTGGATGAAGGAAAAGCAC
ATGAAGAATTATCAGAACCAATCTAAGCAGTGACCAAGATATGTCTAATACACCTGGACCTTGGATAACACCAGTGAAGAAAACACAGA
AAGAATTAGTAATAATGAATATAAAGTTAACGAGAGGGAAGGTGAGAGAACGCTTACTAAGGAATATGAAGATATTGTTTTGAAAAGTCAT
ATGAATAGAGAATCAGACGATGGTGAATATATGACGAAAATTCAGACTTACTACTGTAAATGATGAATCAGAAGACGCTGAAGCAAAAA
TGAAAGGAAATGATACATCTGAAATGTCGCATAATAGTAGTCAACATATTGAGAGTGATCAACAGAAAAACGATATGAAAACCTGTTGGTGA
TTTGGAAACCACACATGTACAAAACGAAATAGTGTCTCTGTACAGGAGAAAATTGATGAAAAATTAAGGGAAAGTAAAGAAATCAAAAATT
CATAAGGCTGAAGAGGAAAGATTAAGTCATACAGATATACATAAAATTAATCCTGAAGATAGAAAATAGTAATACATTACATTTAAAAGATA
TAAGAAATGAGGAAAACGAAAGACACTTAACCTAATCAAAACATTAATATTAGTCAAGAAAAGGGATTGCAAAAACATGGATTCCATACCAT
GAATAATCTACATGGAGATGGAGTTCCGAAAGAGTCAAATTAATCATAGTATCATGGAAAACAGACAAGATCGGGGGGAAAATTTCTGGG
AATGTTTTAAATATGAGATCTAATAATAATAATTTAATAATATTTCAAGTAGATATAATTTATATGATAAAAAATTAGATTTAGATCTTTAT
GAAAAACAGAAATGATAGTACAACAAAAGAAATTAATAAAGAAATTAGCAGAAAATAAATAAATGTGAGAACGAAATTTCTGTAATAATTTGG
ACCATATGATTCATGAAGAAATCCCATTAAAAACATGCACTAAAGAAAAACAAGAAATCTGTGTTGTGCAGTATCAGATTACTGTATGAGC
TATTTTACATATGATTCAGAGGAATATTATAATTTGACGAAAAGGGAAATTTGATGATCCATCTTATACATGTTTCAGAAAAGGAGCTTTTCA
AGTATGCCATATTATGCAGGAGCAGGTGTGTTATTTATTATATTGGTTATTTTAGGTGCTTACAAGCCAAATATCAAAGTTCTGAAGGAGTT
ATGAATGAGAATAATGAGAATAATTTTTATTGAAAGTTACTGATAATTTAGATAAATTTCCAATATGTTCAATCAACAAGTACAGGAAAC
TAATATCAACGATTTTTCTGAATACCATGAGGATATAAATGATAATTAATTTAAGAAATGATGTGAGAAAGTACTAGAGGATCATAATCAGC
CATAACCATTGTTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTGTT
AACTTGTTTTATTGAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGT
GGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGCTTGGAGCTAGGAGATCCGAACCAGATAAGTGAATCTAGTT
CCAACTATTTTGTCAATTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTCCCATCTATTTTGTCACTCTCCCTAAATAATCTTAAA
AACTCCATTTCCACCCCTCCAGTCCCAACTATTTTGTCCGCCACAGCGGGCATTTTTCTCTCTGTTATGTTTTAATCAACATCCTGCC
AACTCCATGTGACAAACCGTCATCTTCGGCTACTTTTTCTGTGCACAGAATGAAAATTTTCTGTCACTCTTCCGTTAATATGTTTGAAT
GACTGAATATCAACGCTTATTGTCAGCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATAAGCGCGGCGGGTGGTGGTTACGGC
CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGTTTCTCCCTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAA
GCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGTTCACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTACGTTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTTGTGTTCCAACTGGAACAACACTC
AACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTGCGGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAC
GCGAATTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGTGGCACTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTTATTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG
TGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCTGTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTG
GGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCAC
TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTT
GGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAC
ACTGCGGCCAACCTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTGA
TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTA
TTAACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGC
CCTTCCGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGGGTGAAGGCTGCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT

```
AAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA
GATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACT
CTTTTTCCGAAGGTAAC TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGA
CGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGT
```

En el mapa se puede apreciar que nuestro gen de interés está bajo la influencia del promotor PH, se le colocó una secuencia que originara una región 6his para su purificación. Esta proteína bajo el sistema *BAC to BAC* (pFastbacdual) codificaría una proteína de **61.8 kDa**, lo cual será del tipo no secretoria, ya que no se consideró ningún péptido señal y se purificará de lisados celulares de insecto.

3.1.2.- Ensayos de clonación del gen EBA175.

Con los primers PF3F y PF3R se amplificó el gen *pfeba175* y este se clonó en el plásmido *pfastbacdual* digerido previamente con las enzimas EcoRI y HindIII. Luego de los ensayos de clonación se realizó la digestión del plásmido recombinante con las enzimas KpnI y MfeI obteniendo un inserto liberado de 1600 pb aprox (**Figura 3S2**).



Figura 3S2.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa la liberación del inserto de 1,600 pb aprox (Cuadro rojo). En el carril 1: vector pFastBacTMDual con el gen nativo *pfeba175* sin digerir y el carril 2: el mismo vector digerido con KpnI y MfeI. Carril M: marcador DNA.

Se verificó la identidad del inserto mediante ensayos de secuenciación del plásmido (Figura 3S3)

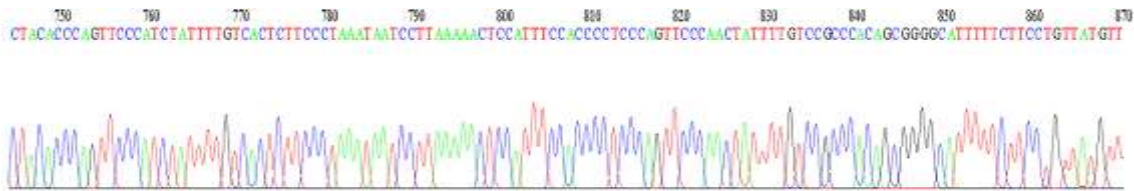


Figura 3S3.- Cromatogramas obtenidos de la reacción de secuenciación del plásmido pfastbacdual que contiene *eba175*.

3.1.3.- Obtención de baculovirus recombinante.

Con el plásmido confirmado se procedió con los pasos ya descritos para las proteínas rH2B y rMSP10. Luego de los ensayos de tranfección de células Sf9 se tomó el sobrenadante de los cultivos (conteniendo el baculovirus) para realizar extracción de ADN para los ensayos de PCR con el uso de primers PF3 (Figura 3S4).

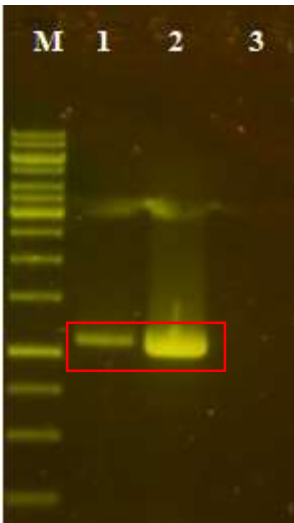


Figura 3S4.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe™ se observa la amplificación del inserto de 1,600 pb aproximadamente (cuadro rojo) que corresponde al gen *eba175* a partir de los baculovirus recombinantes obtenidos de las tranfección. En el carril 1: baculovirus de la generación P0; carril 2: Baculovirus de la generación P1; carril 3: baculovirus wilt-type. Carril M: marcador ADN.

3.1.4.- Expresión de la proteína rEBA175

Luego con los baculovirus recombinantes a un MOI de 2, se realizaron los ensayos de infección de células Sf9 y estas se cosecharon a los 3 días (Figura 3S5).

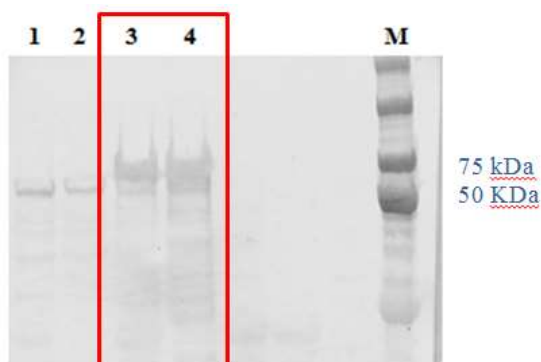


Figura 3S5.- Membrana de nitrocelulosa expuesta a anticuerpos anti-his se observa la banda de proteína rEBA175 (61kDa, Cuadro rojo) a partir de lisados de células de insecto infectados con los baculovirus recombinantes. En el carril 1: Lisado de células Sf9 cultivadas en 2% de suero fetal bovino e infectadas con baculovirus rRH2b (51kDa); carril 2: Lisado de células Sf9 sin suero fetal bovino e infectadas con baculovirus rRH2b; carril 3: Lisado de células Sf9 cultivadas en 2% de suero fetal bovino e infectadas con baculovirus rEBA175.; carril 4: Lisado de células Sf9 sin suero fetal bovino e infectadas con baculovirus rEBA175. Carril M: marcador de proteínas.

3.1.5.- Ensayos de MOI (Multiplicidad de infección) y TOI (Tiempo de infección).

Para este ensayo se procedió de la misma forma descrita para rRH2B y rMSP10. Se establecieron tiempos de producción y cantidad de virus infectivos. Según la tabla 1 se presenta que el MOI ideal es de 5 a un TOI de 96 horas (Tabla 3TS1).

Tabla 3TS1.- Cuantificación de rMSP10 utilizando un kit de ELISA para la detección de proteínas marcadas con histidinas.

rMSP10 – 6-HIS (ng/10 ⁶ Sf9 células)			
Horas pos- infección	MOI		
	1	5	20
48	0	30,3	176,5
72	20,7	110,6	201,5
96	110,4	200,4	150,0
120	125,8	100,4	30,6
144	90,2	50,6	10,1

3.1.6.- Purificación de rEBA175

El proceso de purificación se llevó a cabo según el protocolo de rRh2b y rMSP10. Se obtuvieron valores de purificación para rEBA175, obteniendo una proteína con una pureza de 81.25% y una eficiencia de recuperación de 54.92% (Tabla 3TS2).

Tabla 3TS2.- Características de la purificación de rEBA175.

Paso de purificación	Volúmen total (ml)	Proteína total (mg)	rEBA175 (mg)	Pureza (%)	Eficiencia de Recuperación (%)	Purificación factor
Initial batch	10	3.60	1.42	39.44	100.00	
Flow through	10	2.58	0.20	7.75	14.08	
Wash	20	0.68	0.09	13.23	6.33	
Eluted	4	0.96	0.78	81.25	54.92	2.06

Los eluidos fueron corridos en SDS-PAGE y se visualizó su pureza (Figura 3S6).

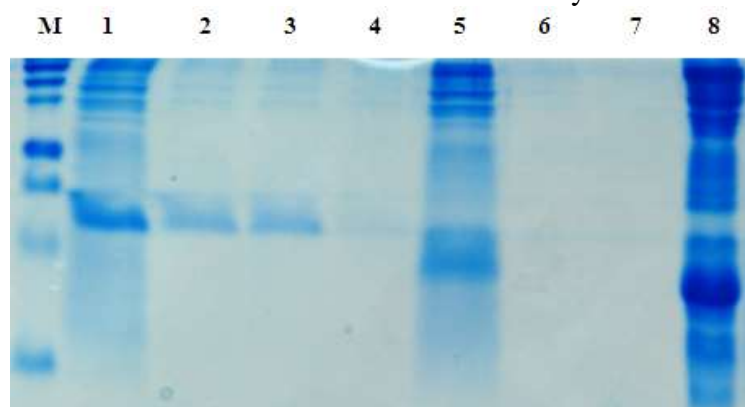


Figura 3S6.- SDS-PAGE de los eluidos obtenidos de la purificación empleando columnas de IMAC. Carril M: marcador de proteínas. Carril 1, lisado celular Sf9 con infectadas con baculovirus recombinante; carril 2 – 4: eluidos; carril 5: flow- through (Flujo de proteínas no retenidas); carril 6- 7: lavados; 8: células sanas.

3.1.7.- Ensayos de ELISA utilizando sueros de pacientes infectados con *P.falciparum*.

Con la proteína pura rEBA175 se realizó el ensayo de ELISA siguiendo los protocolos previamente establecidos para rRh2b y rMSP10. Los resultados se presentan en la Figura 3S7.

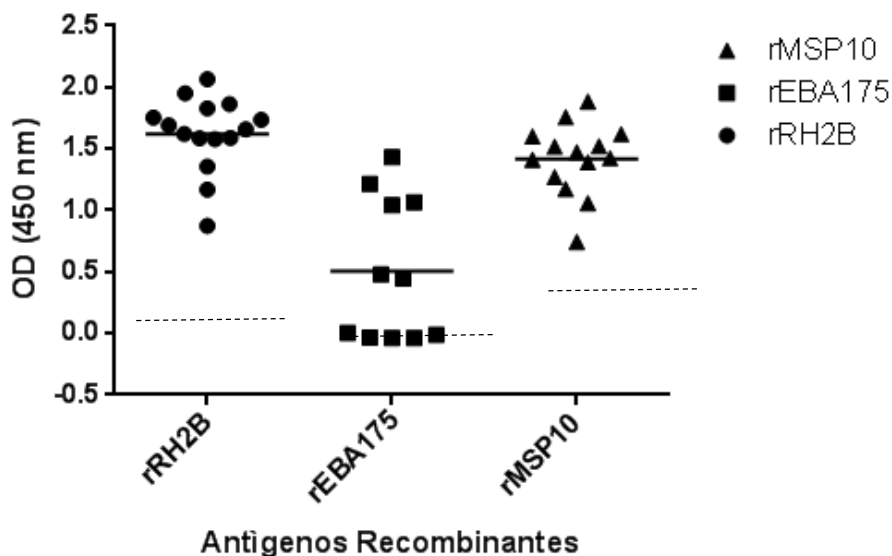


Figura 3S7.- Reactividad de 11 sueros ante rEBA175 (*cut-off*: 0.15), 15 sueros para rRH2b (*cut-off*: 0.25) y 14 sueros para rMSP10 (*cut-off*: 0.51) de pacientes infectados con *P.falciparum*. Las líneas punteadas horizontales indican el *cut-off* calculado en base a la reactividad de sueros de donadores sanos de regiones no endémicas. Las líneas horizontales indican la media de sero-reactividad para los grupos de sueros. * = $p < 0.001$.

3.2.- Observaciones:

Se logró la clonación y expresión de la proteína rEBA175, se obtuvieron valores de pureza de 81.25%; sin embargo esta sólo presentó reactividad en 6/11 sueros de individuos infectados con *P.falciparum* provenientes de una zona endémica para malaria, a diferencia de rRh2b (15/15) y rMsp10 (14/14); estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Capítulo 4:

4.1.- Secuencias:

```
>gi|692334050|gb|AIS19803.1| fiber-2 protein [Fowl aviadenovirus C]
MLRAPKRRHSENGKPEETEAGPSPAPIKRAKRMVRASQLDLVYPFDYVADPVGGLNPPFLGGSGPLVDQGG
QLTLNVTDP I I I IKNRSVDLAHDPSLDVNAQQQLAVAVDPEGALDITPDGLDVKVDGVTVMVNDWELAVK
VDPSGGLDSTAGGLGVSVDLTLVLDQGELGVHLNQQGPITADSSGIDLEINPNMFTVNTSTGSGVLELNL
KAQQGIQADSSGVGVSVDESLQIVNNTLEVKPDPSGPLTVSANGGLKLYDTNTLAVTAGALTVVGGGSVS
TPIATFVSGSPSLNTYNATTVNSSANAFSCAYYLQQWNIQGLLVTSLYLKLDSATMGNRPGDLNSANAKW
FTFWVSAYLQQCNPSGIQAGTVSPSTATLTD FEPMANRSVTSPTWYSANGYYEPSIGEFQVFSVVVTGAW
NPGNIGIRVLPVPSASGERYTLLCYSLQCTNASIFNPNSGMTIVGPVLYSCPAASLP
```

```
>gi|86171334|ref|XP_966190.1| Merozoite surface protein 10, PFMSPI0
[Plasmodium falciparum 3D7]
MMFFKCNQVFTLVFLLLLIFNNIVYTHVDDIKNTSQKKITYDKYNKNKENMNEKNDNKNKDNKIYNDNI
NNDNINNDNINNEDEYKFLSMKHYKDSL SNKLNNDHMYLIRKRKDNTOGSQHFNENIENNENVENNE
NIENNENNENIENIENNENNENNENIENNENNENNENS SIMNSESYNNI INSNEHNEEQIKKKEEDLIEA
FFPFILKKL DNESSLDNKYDDYYNLPNDHNDTHKENS SDHNLGKYLGNLKS YLIEENDV SQKKTDDI
NESASSDSENIQEILSTDSNTSHLKERKNQKAPPEHKPEVKNALLNSQVASPKGEDEKKSQPQHPLVNS
GDQLQHPKEIDENAEKIRRTLLKESRDIKNTTAI IDETVYKFEQLIMKGRYYATAVRNFVIFKVNYICEY
SKCGPNRRCYIVEKDKEQCRCRPNYIVDMSVNYFKCIPMKDMNCSKNNGGCDVNAECTIVEGAVKQCQSH
LYFGDGVFCVKNSQTKQTLYLIFIVILLVFNFFI
```

Figura 4S1.- Secuencias FASTA de la proteína Fibra-2 y PFMSPI0 obtenidas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2.- Experimentos suplementarios

Diseño de péptidos para las proteínas: Reticulocyte binding protein 2 homologue b y erythrocyte binding antigen 175 de *Plasmodium falciparum* para la obtención de anticuerpos.

4.2.1.- Reticulocyte binding protein 2 homologue b (Rh2b)

Selección de péptidos para la producción de anticuerpos para su posterior uso en la identificación de la proteína Rh2b y Eba175 de *P.falciparum*

1.- secuencias del NCBI.

A.- Rh2b

Se ingresó el código de acceso al NCBI (CAX64332.2) y se descargó la secuencia en formato FASTA de la proteína Rh2b.

>gi|1013064512|emb|CAX64332.2| reticulocyte binding protein 2 homologue b [Plasmodium falciparum 3D7]

MKTLTFCISIFSNCIFFFLLELSHEHFVQSSNTHGASSVTDNPFSEKNLKSFEGKNNNDNYASINRLY
RKKPYMKRSLINLENDLFRLEPISYIQRYYKKNINRSDIFHNKKEGSKVYSNVSSPHSFIQEGKEEVEV
FSIWGSNSVLDHIDVLRDNGTVVFSVQPYLDIYTCKEALFTTSFYKDLKSSITKINEDIKFNNEEII
KNEEQCIVGGKTDFDNLLIVLENAEKANVRKTLFDNTFNQYKNNKSSFYNCLKNKKNNDYDKKIKNKNEI
TKLLKNIESTGNMCKTESYVMNNNLYLLRVNEVKSTPIDLYLNRRAKELLESSKLVNPKMKLGDKNMY
SIGYIHDEIKDIKRYNPHLKHIEKGEYIKRITQANNIADKMKKDELIKKIFESSKHFASFKYSNEMIS
KLDSLFIKNEEILNLFNFIKFKKYETVDMKTESKYTVMTLSEHLLAYAMVLANPQKPIDPK
ANLDSVVLLQIKINEKSNELDNAISQVKTLLIIMKSFYDIISEKASMDMEKKELSLNNYIEKTDYIL
QTYNIFKSKSNIINNNSKNISSKYITIEGLKNDIDELNSLISYFKDSQETLIKDDDELKNMKTDLNNVK
YIEENVTHINEIILLKDSITQRIADIDELNSLNLININDFINEKNIHQEKVSYNLNKLYKGSFEELESEL
SHFLDTKYLFEHKKSVNELQTLNNTSNNECALKNFMSDNMNNNNNSNIINLLKTELSHLLSKENI
LLNHIEQNIQNSSNKYITITDINNRMEDYKEEIESLEVYKHTIGNIQKEYILHLYENDKNALAVHNTSM
QILQYKDAIQNKIKSDDIKILKKYKEMNQDLLNYEILDKKLDNTYIKEMHTASLVQITQYIPYEDK
TISELEQEFNNNQKLDNLLQDINAMNLINILQTLNIGINACNTNKNVHLLNKKIELKNIINDQMKI
IKNDI IQDNEKENFNSVNLKKEEKLKELDDIKFNLLKMDIHLKLLNSYDHTKQNIENSLNLDLSEFE
KDSVWHFKSTIDSLVVEYNICQKTHNTIKQQKNDIELLYKRIKIDINQEIIEKVDNYYSLSKALTKLK
SIFNIDKEKYKPKSQENIKLLEDVMILEKKIKEDKDALIQIKNLSHDHPVADNEKKKQKEEEDDE
QTHYSKRRKVMGDIYKDIKKNLDELNNKNIIDITLNEANKIESEYEKILIDDICEQITNEAKSDTIKEK
IESYKDDIYVVDVDSKTRNDHHLNGDKIHDSFFYEDTLNRYKAYFDKLDKLYENINKLTNESNGLKS
DAHNNNTQVQDKLEINLQVFSNLGNIKYVEKLENTLHELDKMYEFLLETIDINKLKS IHNSMKKSEESNET
KKIFEQSVNITNQFIEDVEILKTSINPNYESLDDQIDDNIKSLVKKKEEISEKRRKQVNYKITDIESNKE
QSDHLRYASRSIYVIDLFIKHEIINPSDGNFIDIKVKEMINKTKQVSNEMAYANKMDEKNKDIKIE
NELYNLNNNIRSLKGVKYEKVRQARNAIDDINNIHNSIKTILTKSKERLDEIKKQPNIKREGDVLNND
KTKIAYITIQINNGRIENSLNINLMKHNIDITLNMKAMVMDVSKSDQIVINIDSLMNDIYNKDKDLL
INILKEKQNMEEAYKMNEMNYVNETEKEIKKHKNYEIRIMEHIKKEETNEKKKFMESNNKSLTTLMD
SFRSMFYNEYINDYINENFEKHQNIENIYNGFNESYNIINTKMTIINDNLDYNEIKEIKEVAQTEYD
KLNKKVDELKNYLNNIKEQEGHRLIDYIKEIFNLYIKCSEQQNIIDDSYNYITVKKQYIKTIEDVKFLL
DSLNTIEEKNKSVANLEICTNKEDIKNLLKHVILANFSGIIVMSDNTTEITPENPLEDNDLNLQLYFE
RKHEITSTLENDSDLELDHLSGNSDESIDNLKVYNDIELHTYSTQILKYLDNIQKLGDCDNLVKDCKE
LRELSTALYDLKIQTISVINRENDISNNDIVSNKLEIDAIQYNFKEYKEIFDNVEEYKTLDDTKNAYI
VKKAEILKNVDINKTKEDLDIYFNDLEKSLTSLSNEMEKITVQNSYNSFDINKNINIDIKEMKTL
IPMLDELLEGNHIDI SLYNFIRNIQIKGNDIKNIREQENDTNI CFEYIQNNYVFIKSDISIFNKYDD
HIKVDNYISNNIDVNNKNSLSEHVINATNIENIMTSIVEINEDTEMNSLEETQDKLLELYENFKKEK
NINNNYKIVHFNKLEIENSLETYNSISTNFKINETQNIIDIKNEFNNIKTRINDKVKELVHVDSTLT
LESIQTFNNLYGDLMSNIQDVYKEDINNVELKVKLYIENITNLLGRINTFIKELDKYQDENNGIDKYI
EINKENNSYIILKKEKANLKENFSKLLQNIKRNETELYNINIKDDIMNTGKSVNNIKQKFSNLPKE
KLFQMEMLLNINIMNETKRI SNTDAYTNI TLDQIKSNKNKENNMMIETIDKLI DHIKIHNEKIQAEI
LLIIDDARRKVEITDNINKAFNEITENYNNENNGVKSANKIVDKATYLNNELDKFLKLLNELLSHNNND
IKDLGDKLLKKEEERKERERLEKAKQEEERKERERIEKEKQEKERLEREKQEQKKEALKKQEQERQE
QQQKEALKRQEQERLQKEEELKRQEQERLEREKQEQQLQKEEELRKKQEQEQQRNIQELEBQKPEIIN
EALVKGDKILEGSDQRNMEKSPVMSMDNTNNSPISNSEITESDDIDNSENIHTSHMSDIESTQTSHRSN
THGQISDIVEQDITPHSNIGGEKITHNDEISITGERNNISDVNDYSESSNIFENGSDTINTSTRNTSS
HDESHISPI SNAVDHVVS DNKKSMDENIKDKLKI DESITTDQIRLDDNSNIVRIDSTQDQDASSHGSSN
RDDDEISHVGSDIHMSVDIHDSIDTDENADHRHNVNSVDSLSSDYDTQKDFSSI IKDGGNKEGHAEN
ESKEYESQTEQTHEEGIMPNKYSISEVDGIKLNEAKHKITEKLVDIYFSTYRDLDEPMEHTGPNKFFH
MFGSPYVTBEDYTEKHQYDKHEDFNNERYSNHNKMDDFVYNAGGVCCVLFASITFFSMDRSNKDECCDF
DMCEEVNNDHLSNYADKEEIEIVFDENEKYYF

Dado que la proteína Rh2b posee regiones similares a la proteína Rh2a (Reiling et al 2010) se decide llevar a cabo un alineamiento entre las dos proteínas con el objetivo de identificar la región diferencial entre ambas proteínas para la selección de epitopes (Figura 4S2). Se puede apreciar un alineamiento común hasta el punto denominado “break point” ubicado en el aminoácido 2776 en donde se observa una baja identidad en las secuencias. Para el análisis sólo se incluirá la región comprendida entre el aminoácido 2700 y el extremo –COOH terminal de la proteína que son alrededor de 477 aminoácidos.

Rh2a MKTTLFCSISFCNIIFFFLELSHEHFVQGSSNTHGASSVTDNFNFSEEKNLKSFEKNNNN
Rh2b MKTTLFCSISFCNIIFFFLELSHEHFVQGSSNTHGASSVTDNFNFSEEKNLKSFEKNNNN

Rh2a DNYASINRLYRKKPYMKRSLINLENDLFRLEPISYIQRYKKNINRSDIFHNKKERGSKV
Rh2b DNYASINRLYRKKPYMKRSLINLENDLFRLEPISYIQRYKKNINRSDIFHNKKERGSKV

Rh2a YSNVSSFHSFIQEGKEEVEVFSIWGSNSVLDHIDVLRDNGTVVFSVQPYLDIYTCKEAI
Rh2b YSNVSSFHSFIQEGKEEVEVFSIWGSNSVLDHIDVLRDNGTVVFSVQPYLDIYTCKEAI

Rh2a LFTTSFYKDLKSSITKINEDIEKFNEEIIKNEEQCLVGGKTDFDNLLIVLENAEKANVR
Rh2b LFTTSFYKDLKSSITKINEDIEKFNEEIIKNEEQCLVGGKTDFDNLLIVLENAEKANVR

Región Polimórfica

Rh2a KTLFDNTFNDYKNNKSSFYNCLKNKKNDYDKKIKNIKNEITKLLKNIESTGNMCKTESYV
Rh2b KTLFDNTFNDYKNNKSSFYNCLKNKKNDYDKKIKNIKNEITKLLKNIESTGNMCKTESYV

Rh2a MNNNLYLLRVNEVKSTPIDLYLNRAKELLESSSKLVNPIKMKLGDNKNMYSIGYIHDEIK
Rh2b MNNNLYLLRVNEVKSTPIDLYLNRAKELLESSSKLVNPIKMKLGDNKNMYSIGYIHDEIK

Rh2a DIIKRYNFHLKHEGKEYIKRITQANNIADKMKKDELIKKIFESSKHFAFKYSNEMIS
Rh2b DIIKRYNFHLKHEGKEYIKRITQANNIADKMKKDELIKKIFESSKHFAFKYSNEMIS

Rh2a KLDLSFIKNEEILNNLFNNIFNIFKKKYETYVDMKTIESKYTTVMTLSEHLLEYAMDVLK
Rh2b KLDLSFIKNEEILNNLFNNIFNIFKKKYETYVDMKTIESKYTTVMTLSEHLLEYAMDVLK

Rh2a ANPQKPIDPKANLDSEVVKLQIKINEKSNELDNAISQVKTLIIIMKSFYDIIISEKASMD
Rh2b ANPQKPIDPKANLDSEVVKLQIKINEKSNELDNAISQVKTLIIIMKSFYDIIISEKASMD

Rh2a EMEKKELSLNNYIEKTDYILQTYNIFKSKSNIINNNSKNISSKYITIEGLKNDIDELNSL
Rh2b EMEKKELSLNNYIEKTDYILQTYNIFKSKSNIINNNSKNISSKYITIEGLKNDIDELNSL

Rh2a ISYFKDSQETLIKDELKKNMKTDLNNVKYEIENVTHINEIILLKDSITQRIADIDELN
Rh2b ISYFKDSQETLIKDELKKNMKTDLNNVKYEIENVTHINEIILLKDSITQRIADIDELN

Rh2a SLNLLININDFINEKNISQEKVSYNLNKLKYGSEFELESELSHFLDTKYLFEKKSVELQ
Rh2b SLNLLININDFINEKNISQEKVSYNLNKLKYGSEFELESELSHFLDTKYLFEKKSVELQ

Rh2a TILNTSNNECAKLNFMKSDNNNNNNNSNIINLLKTELSHLLSLKENI IKKLLNHIEQNIQ
Rh2b TILNTSNNECAKLNFMKSDNNNNNNNSNIINLLKTELSHLLSLKENI IKKLLNHIEQNIQ

Rh2a NSSNKYTITYTDINRMEDYKEEIESLEVKHTIGNIQKEYILHLYENDKNALAVHNTSM
Rh2b NSSNKYTITYTDINRMEDYKEEIESLEVKHTIGNIQKEYILHLYENDKNALAVHNTSM

Rh2a QILQYKDAIQNIKNKISDDIKILKYYKEMNQDLLNYEILDKCLKDNTYIKEMHTASLVQ
Rh2b QILQYKDAIQNIKNKISDDIKILKYYKEMNQDLLNYEILDKCLKDNTYIKEMHTASLVQ

Rh2a ITQYIPYEDKTI SELEQEFNNNNQKLDNILQDINAMNININILQTLNIGINACNTNNKNV
Rh2b ITQYIPYEDKTI SELEQEFNNNNQKLDNILQDINAMNININILQTLNIGINACNTNNKNV

Rh2a EHLLNKKIELKNILNDQMKI IKNDI IQDNEKENFSNVLKKEEEKLEKELDDIKFNNLKM
Rh2b EHLLNKKIELKNILNDQMKI IKNDI IQDNEKENFSNVLKKEEEKLEKELDDIKFNNLKM

Rh2a DIHKLLNSYDHTKQNIENLNKINLDSFEKEKDSWVHFKSTIDS LYVEYNICNQKTHNTIK
Rh2b DIHKLLNSYDHTKQNIENLNKINLDSFEKEKDSWVHFKSTIDS LYVEYNICNQKTHNTIK

Rh2a QQKNDI IELIYKRIKDINQEI IEKVDNYYSLSKALTKLKS IHFNIDKEKYKNPKSQENI
Rh2b QQKNDI IELIYKRIKDINQEI IEKVDNYYSLSKALTKLKS IHFNIDKEKYKNPKSQENI

Rh2a KLLDRVMILEKKIKEDKDALIQIKNLSHDHFVNADNEKKKQKEKEEDDEQTHYSKKRKV
Rh2b KLLDRVMILEKKIKEDKDALIQIKNLSHDHFVNADNEKKKQKEKEEDDEQTHYSKKRKV

Rh2a MGDIYKDIKKNLDELNNKNLIDITLNEANKIESEYEKILIDDI CEQITNEAKKSDTIKEK
Rh2b MGDIYKDIKKNLDELNNKNLIDITLNEANKIESEYEKILIDDI CEQITNEAKKSDTIKEK

Rh2a IESYKKDIDYVDVDVSKTRNDHHLNGDKIHDSFFYEDTLNYKAYFDKCLKDLYENINKLTN
Rh2b IESYKKDIDYVDVDVSKTRNDHHLNGDKIHDSFFYEDTLNYKAYFDKCLKDLYENINKLTN

Rh2a ESNGLKSDAHNNNTQVDKLKEINLQVFSNLGNI IKYVEKLENTLHELKDMYEFLETIDIN
Rh2b ESNGLKSDAHNNNTQVDKLKEINLQVFSNLGNI IKYVEKLENTLHELKDMYEFLETIDIN

Rh2a KILKSIHNSMCKSEEYSNETKKIFEQSVNITNQFIEDVEILKTSINPNYESLNDQIDDN
Rh2b KILKSIHNSMCKSEEYSNETKKIFEQSVNITNQFIEDVEILKTSINPNYESLNDQIDDN

Rh2a IKSLVLKKEEISEKRKQVNKYITDIESNKEQSDLHLRYASRSIYVIDLFIKHEIINPSDG
Rh2b IKSLVLKKEEISEKRKQVNKYITDIESNKEQSDLHLRYASRSIYVIDLFIKHEIINPSDG

Rh2a KNFDI IKVKEMINKTKQVSNEAMEYANKMDEKNKDI IKIENELYNLNNNIRSLKGVKYE
Rh2b KNFDI IKVKEMINKTKQVSNEAMEYANKMDEKNKDI IKIENELYNLNNNIRSLKGVKYE

Rh2a KVRKQARNAIDINNIIHSNIKTILTKSKERLDEIKKQPNIKREGDVLNNDKTKIAYITIQ
Rh2b KVRKQARNAIDINNIIHSNIKTILTKSKERLDEIKKQPNIKREGDVLNNDKTKIAYITIQ

Rh2a INNGRIESNLLNINLMKHNDITILNKAMDYMNDVSKSDQIVINIDSLNMNDIYNKDKDLL
Rh2b INNGRIESNLLNINLMKHNDITILNKAMDYMNDVSKSDQIVINIDSLNMNDIYNKDKDLL

```

*****
                Región Homóloga de 500 aa
Rh2a      INILKEKQNM EAEYKKMNEM YNYVNETEKEI IKHKKNYEIRIMEHIKKE TNEK KKKFMES
Rh2b      INILKEKQNM EAEYKKMNEM YNYVNETEKEI IKHKKNYEIRIMEHIKKE TNEK KKKFMES
*****

Rh2a      NNKSLTTL MDSFRSMFYNEY INDYNINENFEKHQNILNEIYNGFNESYNI INTKMTEI IN
Rh2b      NNKSLTTL MDSFRSMFYNEY INDYNINENFEKHQNILNEIYNGFNESYNI INTKMTEI IN
*****

Rh2a      DNLDYNEIKEIKEVAQTEYDKLNKKVDELKNYLNNI KEQEGHRLIDYIKEKIFNLYIKCS
Rh2b      DNLDYNEIKEIKEVAQTEYDKLNKKVDELKNYLNNI KEQEGHRLIDYIKEKIFNLYIKCS
*****

Rh2a      EQQNIIDDSYNYITVKKQYIKTIEDVKFLLDSLNTIEEKNKSVANLEICTNKEDIK NLLK
Rh2b      EQQNIIDDSYNYITVKKQYIKTIEDVKFLLDSLNTIEEKNKSVANLEICTNKEDIK NLLK
*****

Rh2a      HVIKLANFSGIIVMSDTNTEITPENPLEDNDLLNLQLYFERKHEITSTLENDSDLELDHL
Rh2b      HVIKLANFSGIIVMSDTNTEITPENPLEDNDLLNLQLYFERKHEITSTLENDSDLELDHL
*****

Rh2a      GSNSDESIDNLKVYNDI IELHTYSTQILKYLDNIQKLGDCNDLVKDCKE LRELSTALYD
Rh2b      GSNSDESIDNLKVYNDI IELHTYSTQILKYLDNIQKLGDCNDLVKDCKE LRELSTALYD
*****

Rh2a      LKIQITSVINRENDISNNIDIVSNKLNEIDAIQYNFEKYKEIFDNVEEYKTLDDTKNAYI
Rh2b      LKIQITSVINRENDISNNIDIVSNKLNEIDAIQYNFEKYKEIFDNVEEYKTLDDTKNAYI
*****

Rh2a      VKKAEILKNVDINKTKEDLDIYFNDLDELEKSLT LSSNEMEIKTIVQNSYNSFS DINKNI
Rh2b      VKKAEILKNVDINKTKEDLDIYFNDLDELEKSLT LSSNEMEIKTIVQNSYNSFS DINKNI
*****

Rh2a      NDIDKEMKTLIPMLDELLNEGHNIDISLYNF IIRNIQIKIGNDIKNIREQENDT NICFEY
Rh2b      NDIDKEMKTLIPMLDELLNEGHNIDISLYNF IIRNIQIKIGNDIKNIREQENDT NICFEY
*****

Rh2a      IQNNYNFIKSDISIFNKYDDHIKVDNYISNNIDV VNKHNSLLSEHVINATNIE NIMTSI
Rh2b      IQNNYNFIKSDISIFNKYDDHIKVDNYISNNIDV VNKHNSLLSEHVINATNIE NIMTSI
*****

Rh2a      VEINEDTEMNSLEETQDKLLELYENFKKEKNI INNNYKIVHFNKLKEIENSLETYNSIST
Rh2b      VEINEDTEMNSLEETQDKLLELYENFKKEKNI INNNYKIVHFNKLKEIENSLETYNSIST
*****

Rh2a      NFNKINETQNIDILKNEFNNIKTKINDKVKELVHVDSTLTLESIQTFNNLYGDLMSNIQD
Rh2b      NFNKINETQNIDILKNEFNNIKTKINDKVKELVHVDSTLTLESIQTFNNLYGDLMSNIQD
*****

Rh2a      VYKYEDINNV ELKVKLYIENITNLLGRINTFIKELDKYQDENNGIDKYIEINKENSSYI
Rh2b      VYKYEDINNV ELKVKLYIENITNLLGRINTFIKELDKYQDENNGIDKYIEINKENSSYI
*****

```

Rh2a IKLKEKANNLKENFSKLLQNIKRNETELYNINNIKDDIMNTGKSVNNIKQKFSSNLPLKE
Rh2b IKLKEKANNLKENFSKLLQNIKRNETELYNINNIKDDIMNTGKSVNNIKQKFSSNLPLKE

Rh2a KLFQMEEMLLNINNIMNETKRISNTAAYTNITLQDIENNKKNKENNNMIETIDKLIDHIK
Rh2b KLFQMEEMLLNINNIMNETKRISNTDAYTNITLQDIENNKKNKENNNMIETIDKLIDHIK

Rh2a IHNEKIQAELIIDDAAKRKVKEITDNINKAFNEITENYNNENNGVIKSAKNIVDEATYLN
Rh2b IHNEKIQAELIIDDAAKRKVKEITDNINKAFNEITENYNNENNGVIKSAKNIVDKATYLN

Rh2a NELDKFLLKLNELLSHNNNDIKDLGDEKLILKEEEERKERERLEKAKQEEERKERERIEK
Rh2b NELDKFLLKLNELLSHNNNDIKDLGDEKLILKEEEERKERERLEKAKQEEERKERERIEK

Rh2a EKQEKERLEREKQEQLKKEEELRKKEQERQEQQQKEEALKRQEQLQKEEELKRQEQLER
Rh2b EKQEKERLEREKQEQLKKE-ALKKQEQLERQEQQQKEEALKRQEQLQKEEELKRQEQLER

Break Point (2776 aa)

Región Repetitiva



Rh2a LEREKQEQLQKEEELKRQEQLERLQKEEALKRQEQLERLQ--KE----E-ELKRQEQLERLE
Rh2b LEREKQEQLQKEEELRKKEQEKQQQRNIQELEEQKKPEIINEALVKGDKILEGSDQRNME

Rh2a REKQEQLQKE---EELKR---QEQLERLQKEEALKRQEQLERLQKEEELKRQEQLERLERKKI
Rh2b LSKPNVSMNTNNSPISNSEITESDDIDNSENIGHTSHMSDIESTQTSRHSNTHG--QQIS
. * : . : . . . * . : . . . * : . . . : : * . : . : .

Rh2a ELAEREQHISKLES-----MVKIIKD-----ELTKEKDEI IKNKDIKLRHSLEQK
Rh2b DIVEDQITHPSNIGGEKITHNDEISITGERNNISDVNDYSESSNIFENGDSTINTSTRNT
: . * : * : : . : . * : : : . * . : * : * * . . . * . . .

Rh2a WLKHLQNILSLKIDSLNKNDEVIKDNETQL-----
Rh2b SSTHDE----SHISPI SNAYDHVVSDNKKSMDENIKDKLKIDESITTDEQIRLDDNSNIV
. * : * : . : * * . : * : . . .

Rh2a -----KTNILNSLK
Rh2b RIDSTDQRDASSHGSSNRDDDEISHVGSDIHMDSVDIHDSIDTDENADRHRHNVNSVDSLS
: . * : * : .

Rh2a NQLYLNLKRELNEI IKEYEENQKK-----ILHSNQ-----L
Rh2b SSDYTDQKDFSSI IKGGNKEGHAENESKEYESQTEQTHEEGIMPNKYSISEVDGIKL
.. * : : : : . * : : : : * : . * : *

Rh2a VNSLEQKTNRLVDIKPTKHGDIYTNKLSNETEMLITSK-EKKDETESTKRSKGTDHTNS
Rh2b NEEAKHKITEKLVDIYPSTYRTL-----DEPMETHGPNEKFFHMFSGSPYVTEEDYTEK
: : : . : * : * : * : * : : : * . * : * : * : *

Rh2a SESTTDDNTNDRNFSRKNLSVAIYTAGSVALCVLIFSSIGLLL IKTNSGDNNSNEINEA
Rh2b HDYDKHEDFNERNYSNHNKMDDFVYNAGGVVCCVLFASFITFFSMDRSNKDECFDMCEE
: . . : * : . : * . : : . : * . * . * . * : : . . * : . : * :

```

Rh2a      FEPND-DVLFKEKDEIIIEITFNDNDSTI-
Rh2b      VNNNDHLSNYADKEEIIIEIVFDENEKYF
          .: **      : :*:*****.*:~*:.

```

Figura 4S2.- Se presenta el alineamiento total entre las proteínas Rh2a y Rh2b de *Plasmodium falciparum* para presentar la diferencia entre estas y la región de interés. El cuadro negro presenta la región polimórfica; el cuadro rojo la región homóloga y el cuadro azul la región repetitiva y se presenta el break point (punto de inicio de la diferencia entre rh2a y rh2b) según Reiling *et al* 2010.

4.2.2.- Eba175

Se ingresó el código de acceso al NCBI (XP_001349207.2) y se descargó la secuencia en formato FASTA de la proteína.

```

>gi|296004911|ref|XP_001349207.2| erythrocyte binding antigen 175 [Plasmodium falciparum
3D7]

```

```

MKNISISYFFASFFVLYFAKARNEYDIKENEKFLDVYKEKFNELDKKKYGNVQKTDKKIFTFIENKLDIL
NNSKFNKRKWSYGTDPDNI DKNMSLINKHNNEEMFNNNYQSFLSTSLLIKQNKYVPIAVRVSRILSFLDS
RINNGRNTSSNNEVLSNCREKRRKGMKWDCCKKNDRSNYVICIPDRRIQLCIVNLSIIKTYTKETMKDHFIE
ASKKESQLLLKKNNDKYNKSFCDNLKNSFLDYGHAMGNDMDFGGYSTKAENKIQEVFKGAHGEI SEHKI
KNFRKKWWNEFREKLWEAMLSEHKNNINCKNI PQEELQITQWIKEWHGELFLERDNRSKLPKSKCKNNT
LYEACEKECIDPCMRYRDIWIRSKFEWHTLSKEYETQKVPKENAENYLIKI SENKNDAKVSLLLNDCDAE
YSKYCCKHTTTLVKSVLNGNDNTIKEKREHIDLDDFSKFGCDKNSVDNTTKVWECKKPYKLS TKDVCVP
PRRQELCLGNIDRIYDKNLLMIKEHILATAIYESRILKRKYKNKDDKEVCKI INKTFADIRDI IGGTDYW
NDLSNRKLVGKINTNSNYVHRNKQNDKLFREDEWVKVKKDVWVNI SWVFKDKTVCKEDDIENI PQFFRWF
SEWGDDYCQDKTKMIETLKECKEPCEDDNCRKRCNSYKEWI SKKKEEYNKQAKQYQEQYQKGNMYKYS
EFKSIKPEVYLKKYSEKSNLNFEDEFKEELHSDYKKNCTMCPKPEVKDVPISII RNNEQTSQEA VPEESTE
IAHRTETRLDERKNQEPANKDLKNPQQSVGENGTKDLLQEDLGGSRSEDEVTOEFGVNHGIPKGEDQTLG
KSDAIPNIGEPETGISTTEESRHEEGHNKQALSTSVDEPELSDTLQLHEDTKENDKLPLESSTITSPTES
GSSDTEETPSISEGPKGNEQKKRDDDLSKISVSPENSRPETDAKDTSNLLKLGKDVIDISMPKAVIGSSP
NDNINVTEQGDNI SGVNSKPLSSDVRPDKNHHEEVKEHTSNSDNVQQSGGIVNMNVEKELKDTLENPSSSL
DEGKAHEELSEPNLSSDQMSNTPGPLDNTSEETTERISNNEYKVNREGERLTKEYEDIVLKSHMNRE
SDDGELYDENS DLSTVNDESEDAEAKMKGNDTSEMHSNSQHIESDQKNDMKTVDLGTTHVQNEISVP
VTGEI DEKLRSEKESKI HKAEERLSHTDIHKINPEDRNSNTLHLKDIRNEENERHLTNQINISQERDL
QKHGFHTMNNLHGDGVSEERSQINSHSHGNRQDRGGNSGNVLMRNSNNNFNNI PSRYNLYDKKLDLDLYE
NRNDSTTKELIKKLAIEINKCENESVVKYCDHMIHEEIPLKTC'KEKTRNLCCA VSDYCMYFTYDSEYY
NCTKREFDDPSYTCFRKEAFSSMPYAGAGVLFII LVLILGASQAKYQSSEGMNENNNENFLFEVTDNLD
KLSNMFNQVQETNINDFSEYHEDINDINFKK

```

Según Adams *et al* 1992, Healer *et al* 2013 y Pedro-Silva *et al* 2011, Eba175 presenta 7 regiones: RI contiene el péptido señal, la RII que posee una región polimórfica llamadas F1 y F2, RIII que presenta un dimorfismo denominadas Fragmento F y C; y las regiones IV, V, VI y VII que no presentan reportes de polimorfismos. Debido a estos polimorfismos se eligen las regiones IV al VII para el diseño de péptidos. Esto comprende desde el aa 862 hasta el aa final 1502.

4.2.3.- Análisis AbDesigner

Rh2b presenta 3254 aa en total según el NCBI y para el análisis se seleccionó una región diferencial de 477 aminoácidos, los cuales según AbDesigner presentaría 541 péptidos candidatos con el *ig-score* desde 1,3 hasta 8,8. Para el caso de Eba175 (640 aa) se obtuvieron 628 péptidos cuyos *ig-score* iban desde 1,3 hasta 9,3 (Tabla 4TS1).

Tabla 4TS1.- Valores ig-score para las proteínas Rh2b y Eba175.

	Ig-Score	Péptidos Totales		Nº péptidos	
	Min-Max		≥4.5 (Bajo)	≥6.5 (Moderado)	≥8 (Alto)
Rh2b	1,3 - 8,8	541	505	186	22
Eba175	1,3 - 9,3	628	573	234	18

4.2.4.- Análisis Optimum Antigen™

Este análisis se realizó para filtrar los resultados de AbDesigner, un reporte de antigenicidad fue emitido por los laboratorios Genscript. Este reporte contempla valores de antigenicidad, superficie, hidrofiliicidad y un score de desorden los cuales en conjunto generan un ranking. Se identificaron 7 péptidos para la Rh2b y 10 péptidos para MSP10 los cuales se muestran en la tabla 4TS2.

Tabla 4TS2.- Resultados de análisis Optimum Antigen y AbDesigner para Fibra-2 y MSP10

Optimum Antigen				AbDesigner	
No	Antigenic Determinant	Antigenicity/Surface/Hydrophilicity	Disordered Score	Ig-Score	
	Rh2b				
				Rank (Score)	Carácter
1	YDKHEDFNERNYSN	3.22/0.86/0.93	NONE	9 (8,28)	Alto
2	TDQRDASSHGSSNR	3.21/1.00/0.96	0.1756	17 (8,05)	Alto
4	KGDKILEGSDQRNM	2.94/0.64/0.84	0.1054	162 (6,59)	Moderado
5	SIDTDENADHRHNV	2.52/0.71/0.85	0.0937	159 (6,62)	Moderado
6	KIDESITTDEQIRL	2.41/0.71/0.87	0.1844	483 (4,77)	Bajo
8	ISEVDGIKLNEEAK	2.14/0.57/0.72	NONE	493 (4,66)	Bajo
10	FFSMDRSNKDECDF	2.07/0.57/0.80	NONE	315 (5,98)	Bajo
	Eba175				
				Rank (Score)	Carácter
3	SSSLDEGKAHEELS	2.99/0.79/0.94	NONE	378 (5,89)	Bajo
5	SNNEYKVNENEREGER	2.88/0.86/1.11	0.1899	35 (7,34)	Moderado
7	KSHMNRESDDGELY	2.82/0.86/0.96	0.1332	99 (7,15)	Moderado
8	NSKPLSDDVRPDKN	2.80/0.86/1.01	NONE	20 (7,98)	Moderado
10	SHTDIHKINPEDRN	2.79/0.86/0.72	0.2211	109 (7,06)	Moderado
13	QHIESDQQKNDMKT	2.58/0.86/0.85	NONE	132 (6,97)	Moderado
15	SEYHEDINDINFKK	2.39/0.71/0.56	0.1700	260 (6,35)	Moderado
17	KDIRNEENERHLTN	2.31/0.86/1.02	0.0937	129 (6,97)	Moderado
18	KKLDDLTYENRNDS	2.21/0.71/0.83	NONE	140 (6,89)	Moderado
19	EVKEHTSNSDNVQQ	1.78/0.86/0.68	0.2009	188 (6,88)	Moderado

Según la tabla 5S2, los péptidos que fueron seleccionados tanto por AbDesigner y OptimumAntigen™ (Antígeno óptimo) para Rh2b fueron 4; los cuales presentaron un carácter “Alto” (YDKHEDFNERNYSN y TDQRDASSHGSSNR) y 2 con carácter “Moderado” (KGDKILEGSDQRNM y SIDTDENADHRHNV). Para el caso de Eba175 tras

el filtro con OptimunAntigen™ (Antígeno óptimo) se filtraron 10 péptidos de los cuales 9 tenían carácter moderado y con los cuales se prosigió con el análisis.

4.2.5.- Identificación de regiones

4.2.5.1.- Rh2b

Se procedió a armar un mapa con información recopilada para Rh2b (Jenning *et al* 2007; Engelberg *et al* 2013; DeSimone *et al* 2008 y Reiling *et al* 2010). Para ubicar de esta forma los péptidos seleccionados y evitar regiones de baja complejidad y zonas conservadas (Figura 4S3).

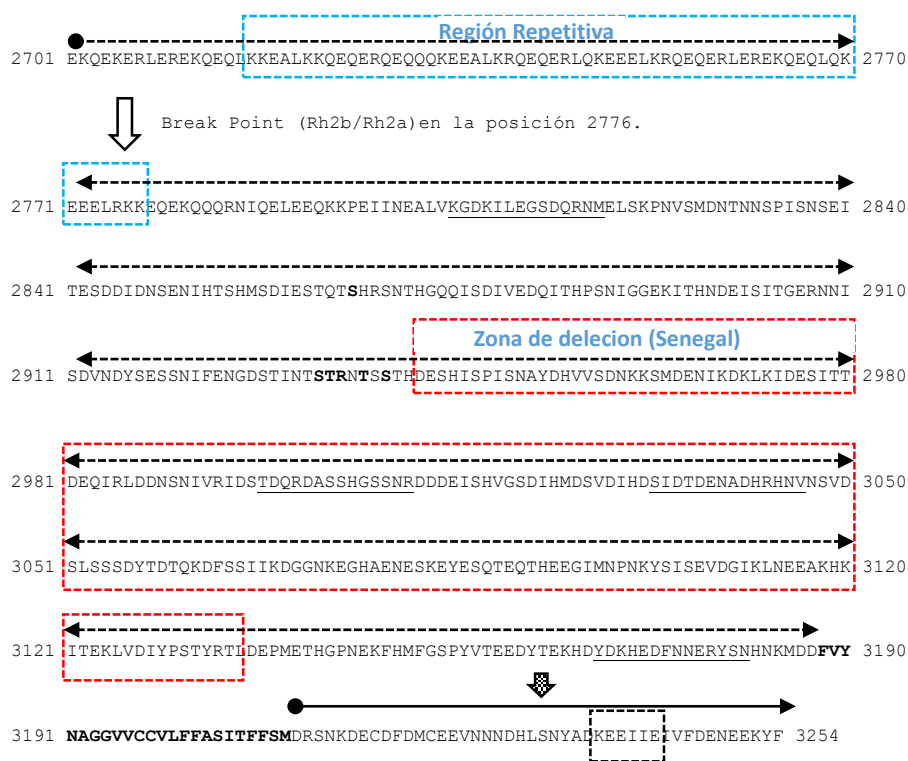


Figura 4S3.- Descripción de la región única y de interés en RH2b. Los péptidos candidatos son ubicados en la secuencia de proteína mediante subrayados. La región repetitiva (cuadro azul) y zonas de deleción reportada en muestras de Senegal en África (cuadro rojo) según Jennings *et al* 2007. La flecha con fondo punteado indica la modificación tipo fosforilación en la Serina 3233 según Engelberg *et al* 2013. Un motivo de dominio citoplasmático (cuadro negro) según DeSimone *et al* 2008. En Negrita se encuentra el dominio transmembrana, la flecha punteada indica el ectodominio y la flecha continua indica el dominio citoplasmático (Jennings *et al* 2007). La flecha con fondo claro indica la posición 2776 en donde de muestra el breakpoint entre las proteínas Rh2a y Rh2b (Reiling *et al* 2010).

Según la figura 5S2 todos los péptidos se ubican en la región conocida como ectodominio, 2 de los péptidos (TDQRDASSHGSSNR y SIDTDENADHRHNV) se ubican en la zona conocida como deleción, es decir hay reportes de proteínas de aislados parasitarios que no poseen este segmento de la proteína en especial las muestras de África (Jennings *et al* 2007).

El péptido YDKHEDFNENERYSN se encuentra alejado a 31 aminoácidos de distancia de esta zona de delecion.

4.2.5.2.-Eba175

En base a los reportes de Adams *et al* 1992, Healer *et al* 2013 y Perce-da-Silva *et al* 2011, se armó el mapa para Eba175 con las regiones IV la VII, para ubicar los péptidos seleccionados.

862	RHEEGHNKQALSTSVDEPELSDTLQLH	R - IV	KLPLESSTITSPTESGSSDTEETPSI	921
922	SEGPKGNEQKKRDDDSLKISVSPENSRPETDAKDTSNLLKLGVDVDSMPKAVIGSSPN			981
982	DNINVTEQGDNISGVNSKPLSDDVRPDKNH EEVKEHTS NSNDNVQ QSGGIVNMNVEKELKD			1041
1042	TLENPSSSLDEGKAHEELSEPNLSSDQDMSNTPGPLDNTSEETTERI		<u>SNNEYKVNERE</u> GE	1101
1102	<u>RTL</u> TKEYEDIVLKSHMNRESDDGELYDENSDLSTVNDESEDAEAKMKGNDTSEMHSN SSQ			1161
1162	<u>HIESDQQKNDMKT</u> VGDLGTTTHVQNEISVPVTGEI		DEKLRESKESKIHKAEEERLSHTDIH	1221
		R - V		
1222	<u>KINPEDRNSNTLHLKDIRNEENERHLT</u> NQININISQERDLQKHGFHTMNNLHGDGVSE RSQ			1281
1282	INHSHHGNRQDRGGNSGNVLMNRSNNNNFN NI PSRYNLYDKKLDLDLYENRNDSTTKELI			1341
		R - VI		
1342	KKLAEINKCENEISVKYCDHMIHEEIPLKTCTKEKTRNLCCA VSDYCMSYFTYDSEEYYN			1401
1402	CTKREFDDPSYTCFRKEAFSSMPYYAGAGVLFIIILVILGASQAKYQSSEGVMMNENNENNF			1461
		R - VII		
1462	LFEVTDNLDKLSNMFNQVQETNINDFSEYHEDINDINFKK			

Figura 4S4.- Descripción de las regiones IV (cuadro rojo), región V (cuadro azul), región VI (cuadro verde) y región VII conocida como dominio citoplasmático (cuadro naranja), la región transmembrana se presenta en negritas y los péptidos en subrayado. El mapa fue armado con información tomada de Adams *et al* 1992, Healer *et al* 2013 y Perce-da-Silva *et al* 2011.

Según la figura 4S4, 5 péptidos se ubican en la región IV, 2 en la región V, 1 en la región VI y 1 en la región VII o dominio citoplasmático.


```

      *           *           *           *           *           *
Query 211 SDVNDYSESSNIFENGSTINTSTRNTSSTHDESHISPISNAYDHVSDNKKSMDENIKDKLKIDESITT 280
Helix 211                                     HH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 280
Sheet 211                                     EEEEE   EEEE   EEEEEEE 280
Turns 211          T T      T TT          T      T      T T      T T      T 280
Struc 211 CCCCCCTCTCCCTCTTEEEEECCCCCCCCCTCCCCCCTHEEEECHTHHTHHHHHHHHHHHHHEEHH 280

      *           *           *           *           *           *
Query 281 DEQIRLDDNSNIVRIDSTQORDASSHGSSNRDDDEISHVGSDIHMDSVDIHDSIDTDENADHRHNVNSVD 350
Helix 281 HHHHHHHH      HH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 350
Sheet 281 EEEEE   EEEEEEE      EEEEEEE 350
Turns 281 T      T T      T TT      T      T      T      T      T 350
Struc 281 HHEEHHHTCTCEEEETCCTCCCCCTCCCCCHCCCETEHHHHEHHHTHHHHHHHHCCCCCCCCC 350

      *           *           *           *           *           *
Query 351 SLSSSDYTDQKDFSSIIKGGNKEGHAENESKEYESQTEQTHEEGIMNPNKYSISEVDGIKLNNEAKHK 420
Helix 351 HHHHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 420
Sheet 351 EEEEEEEEEE      EEEEEEE      EEEEEEE 420
Turns 351 TT      T      T      T T      T      T      T      T 420
Struc 351 CCTTCEEHHHTHEEEHCTCCHHHHHHTHHHHHHHHHHHHHHHCCCTCEEHHEHEEHHHHHHHH 420

      *           *           *           *           *           *
Query 421 ITEKLVDIYPSTYRTLDEPDMETHGPNKFMFGSPYVTEEDYTEKHVDYDKHEDFNERYSNHNKMDDFVY 490
Helix 421 HHHHHHHH      HH      HH      HHHHHHHHHHHHHHHHH 490
Sheet 421 EEEEEEEEEE      EEEEEEEEEE 490
Turns 421 T      T      T      T T      T      T      T      T 490
Struc 421 HHHHEEEEEEETEEEHHTCCCCCTCHHEEEETEEETHHHHHHHHHHHTHCCCTCCCTCCHHEEEEC 490

      *           *           *           *           *           *
Query 491 NAGGVVCCVLFASITFFSMDRSNKDECFDMCEEVNNNDHLSNYADKEEIIIEIVFDENEKYF 554
Helix 491 HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 554
Sheet 491 EEEEEEEEEE      EEEEEEE      EEEEE 554
Turns 491          T      T      T      TT      TTT      T T      T 554
Struc 491 CCCCEEEEEEHEEEEEEHHHTHHHTHHHHHHHHHECTCCCCCHHHHEEEHHHHHHHHHC 554

```

Figura 4S6- Resultados para Rh2b en el servidor CFSSP que muestran la potencial estructura secundaria de la proteína.

Eba175

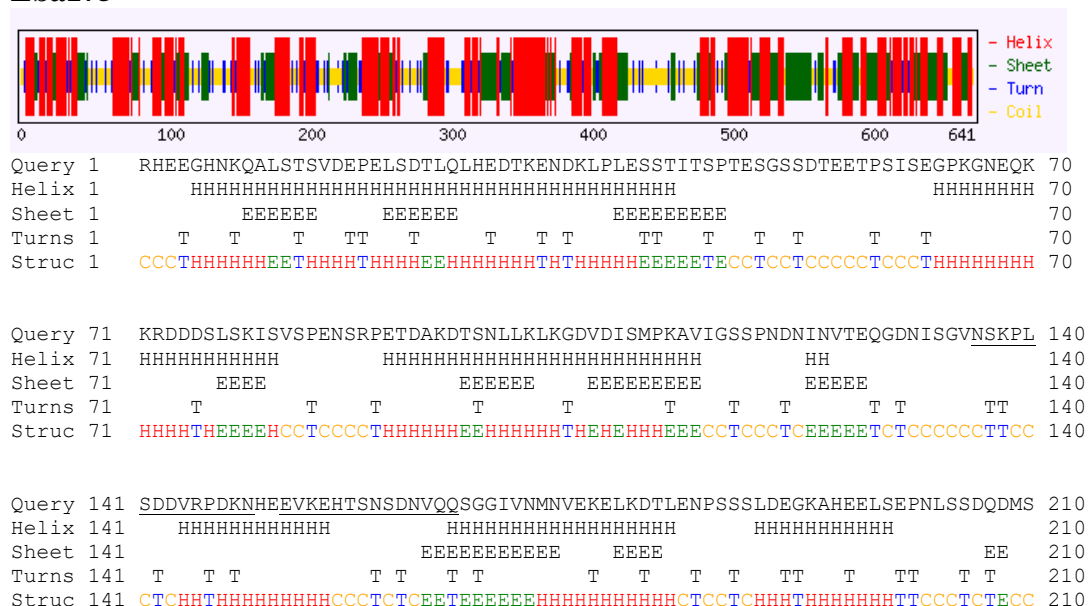


Tabla 4TS3.- Porcentajes de residuos en estructuras hélix, strand, turn y Coil según el servidor CFSSP. Además, se presenta los aminoácidos en zonas de desorden según el servidor GlobPlot 2. Los valores son relaciones entre el número de aminoácidos con la característica entre la cantidad de aminoácidos de cada péptido (n=14).

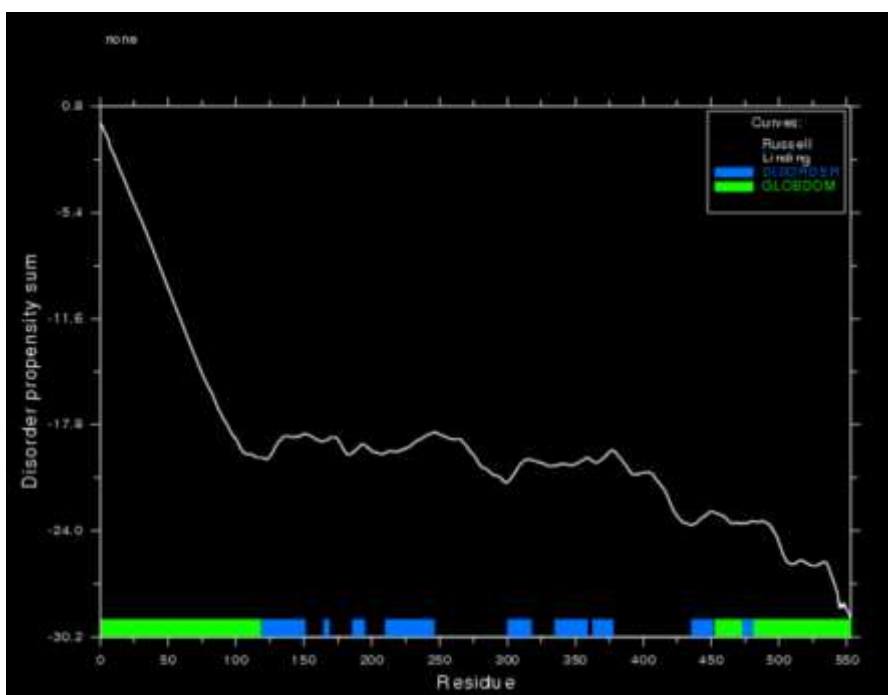
	Helix	Strand	Turn	Coil	Disorder
Rh2b					
YDKHEDFNTERYSN	5 (0,35)	0 (0)	4 (0,30)	5 (0,35)	9 (0,64)
TDQRDASSHGSSNR	0 (0)	0 (0)	3 (0,21)	11 (0,79)	12 (0,85)
KGDKILEGSDQRNM	12 (0,85)	0 (0)	2 (0,15)	0 (0)	2 (0,14)
SIDTDENADHRHNV	8 (0,57)	0 (0)	0 (0)	6 (0,43)	12 (0,85)
Eba175					
SNNEYKVNREGER	11 (0,78)	0 (0)	2 (0,14)	1 (0,08)	0 (0)
KSHMNRESDDGELY	3 (0,21)	0 (0)	3 (0,22)	8 (0,57)	7 (0,50)
NSKPLSDDVRPDKN	5 (0,35)	0 (0)	4 (0,28)	5 (0,37)	12 (0,85)
SHTDIHKINPEDRN	3 (0,21)	4 (0,28)	1 (0,07)	6 (0,42)	8 (0,57)
QHIESDQQKNDMKT	9 (0,64)	3 (0,21)	2 (0,14)	0 (0)	0 (0)
SEYHEDINDINFKK	9 (0,64)	4 (0,28)	0 (0)	1 (0,08)	6 (0,42)
KDIRNEENERHLTN	9 (0,64)	2 (0,14)	2 (0,14)	1 (0,08)	0 (0)
KKLDLDLYENRNS	7 (0,50)	1 (0,08)	2 (0,14)	4 (0,28)	0 (0)
EVKEHTSNSDNVQQ	4 (0,28)	2 (0,14)	2 (0,14)	3 (0,44)	7 (0,50)

Según la figura 5S6 y en la tabla 5S3, se muestran que los péptidos seleccionados presentan para Rh2b un porcentaje de aminoácidos en estructura turn + coil de 100% para el péptido TDQRDASSHGSSNR, un 65% para el péptido YDKHEDFNTERYSN, un 43% para el péptido SIDTDENADHRHNV y un 15% para el péptido KGDKILEGSDQRNM.

Para Eba175 los péptidos que presentaron aminoácidos formando turn + coil fueron KSHMNRESDDGELY con 79%, NSKPLSDDVRPDKN con 65% y SHTDIHKINPEDRN con 49%; mientras que algunos péptidos presentaron aminoácidos estructurales (Helix+strand) como SEYHEDINDINFKK con 98%, QHIESDQQKNDMKT con 85% y SNNEYKVNREGER con 78%.

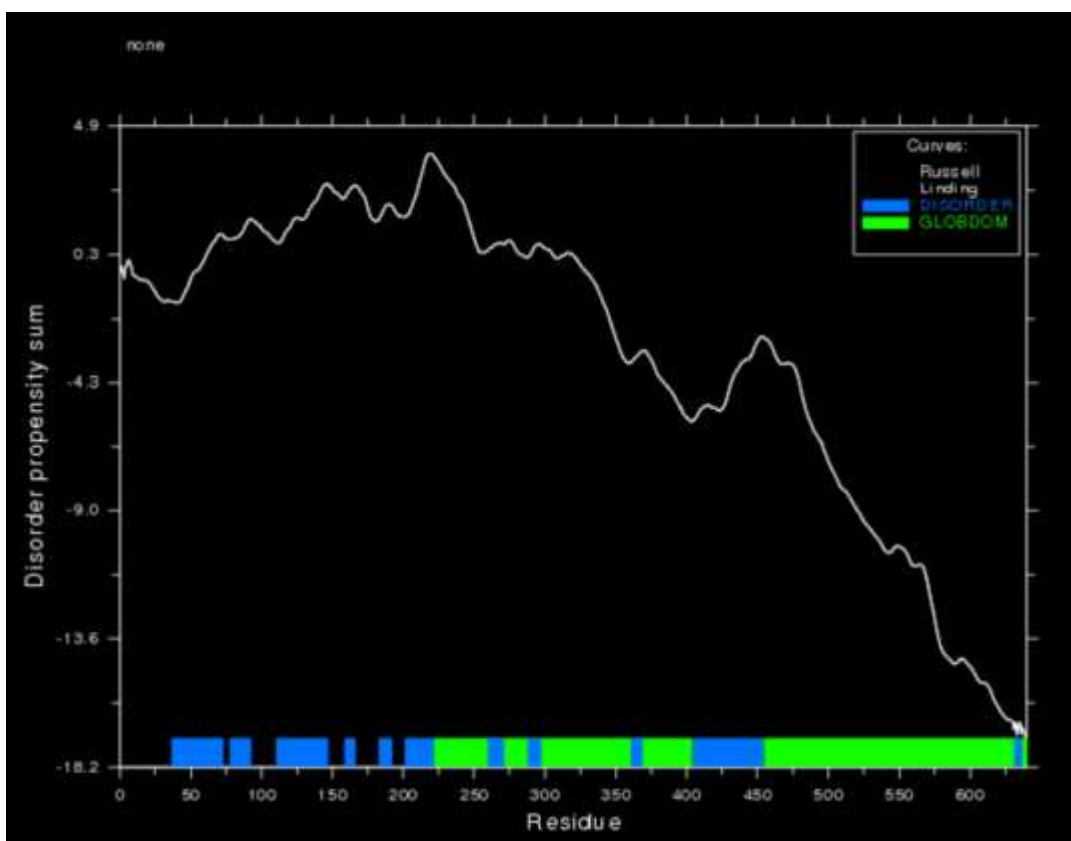
4.2.7.- Grado de desorden

Las estructuras desordenadas son un buen blanco para la elección de péptidos ya que al no tener una estructura definida estas pueden ser reconocidas por los anticuerpos, ya sea que la proteína se encuentre en su forma nativa o desnaturalizada. Para esto se utilizó el servidor GlobPlot 2 para identificar si nuestros péptidos se encuentran en estas regiones.



ekqekerler ekqeqlkkea lkkqeqrqe qqqkeealkr qeqlrlqkee elkrqeqlerl
 erekqeqlqk eeelrkkeqe kqqqrniqel eeqkkpeiin ealvkgdkil egdqqrn**EL**
SKPNVSMDNT **NNSPISN**SEI **TESDDID**NSE **N**ihtshmsdi estq**TSHRS**n thgqqisdiv
 edqith**SPSNI** **GGEKI**thnde isitgernn**I** **SDVNDY**SESS **NIFENG**DSTI **NTSTRN**TSST
HDESHIspis naydhvvsdn kksmdenikd klkidesitt deqirlldns nivridstd**Q**
RDASSHGSSN **RDDDEI**SHvg sdihmadvdi hdsi**DT**DENA **DHRHNV**NSVD **SLSSSD**YTDt
 qk**DFSSII**KD **GGNKEG**HAen eskeyesqte qtheegimnp nkysisevdg iklneeakhk
 iteklvdiyp styrt**LDEPM** **ETHGPNE**KFH **MF**gspyvtee dytekhdydk he**DFNNERY**S
Nhnkmddfvy naggvccvl ffasitffsm drsnkdecdf dmceevnnd hlsnyadkee
 iieivfdene ekyf

Figura 4S8.- Resultados de grado de desorden de Rh2b. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de Rh2b y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.



>Eba175

```
rheeghnkqa lstsvdepel sdtlqlhedt kendklPLES STITSPTESG SSDTEETPSI
SEGPKGNEQK KRDddsLSKI SVSPENSRPE TDakdtsnll klkgdvdism PKAVIGSSPN
DNINVTEQGD NISGVNSKPL SDDVRPdknh eevkehtsNS DNVQQsggiv nmnvekelkd
tLENPSSSLD EGkaheelse PNLSSDQDMS NTPGPLDNTS Eetterisnn eykvnerege
rtltkeyedi vlkshmnreS DDGELYDENS Dlstvndese daeakmkGND TSEMSHNssq
hiesdqknd mktvgdlgtt hvqneisvpv tgeideklre skeskihkae eerlshtdih
KINPEDRNSn tlhldirne enerhltqn inisqerdlq khgfHTMNNL HGDGVSERSQ
INHSHHGNRQ DRGGNSGNVL NMRSNNNNFN NIPSrynlyd kklldldlyen rndsttkeli
kklaeinkce neisvkycdh miheeiplt ctkektrnlc cavsdycmsy ftydseeyyn
ctkrefddps ytcfrkeafs smpyyagagv lfiiilvilga sqakyqsseg vmnennennf
lfevtdnldk lsnmfnqqvq etnindfsey HEDINDInfk k
```

Figura 4S9.- Resultados de grado de desorden de Eba175. Arriba: Mapa de análisis. Abajo: Secuencias de Eba175 y en negrita son las regiones que presentaron desorden. Subrayadas se encuentran los péptidos seleccionados.

Los resultados nos indican para Rh2b un alto porcentaje de aminoácidos (más 85%) en los péptidos **TDQRDASSHGSSNR** y **SIDTDENADHRHNV**; mientras que **YDKHEDFN**NERYSN presentó un 64% de sus aminoácidos en zonas desordenadas y **KGDKILEGSDQRNM** presentó un 14% de sus aminoácidos. Con respecto a los aminoácidos que contribuyen al desorden, 4 péptidos presentaron en su secuencia estos aminoácidos (**KSHMNRESDDGELY**, **NSKPLSDDVRPDKN**, **SHTDIHKINPEDRN** y **SEYHEDINDINFKK**) (Figuras 4S8 y 4S9).

.....S.....S.....Y.....ST.....	1341
.....YY..T.....SY.....S	1421
.....Y.....I.....	1501
		1502

Figura 4S11.- Secuencia de Eba175 presentando las modificaciones. Los puntos indican los aminoácidos. “S” significa una fosforilación en serina; “T” en treonina; “Y” en tirosina. “G” indica una modificación de azúcar. “I” indica una modificación de GPI.

Según la figura 4S11 sólo tres péptidos para EBA175 no presentaron modificaciones postraduccionales (QHIESDQQKNDMKT, KDIRNEENERHLTN y SEYHEDINDINFKK) mientras que los otros 6 péptidos presentaron entre uno y tres modificaciones.

4.2.9.- Especificidad

Con las secuencias de péptidos se procedió a realizar la búsqueda de posibles secuencias que compartan aminoácidos en común hasta una serie de 5 continuos, que puedan reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos diseñados.

4.2.9.1.- Ensayos de BlastP para Rh2b.

Los resultados de alineamientos se presentan en la tabla 4TS4. Para el péptido YDKHEDFNNERYSN se alineo a la reticulocyte binding protein 2, homolog b [Plasmodium falciparum 3D7] y parcialmente (5/14 aminoácidos) con la proteína CCR4 [Plasmodium falciparum 3D7]. Su presencia en su hospedero *Homo sapiens*, las secuencias formada por entre de 5-6 aminoácidos se encuentran presentes en 2 proteínas humanas. Su presencia en el organismo productor de anticuerpos (*Oryctolagus cuniculus*), 6 proteínas presentaron similar secuencia de 5 aminoácidos y no se pudo identificar algún motivo de aminoácidos conservado entre las proteínas. Para el péptido TDQRDASSHGSSNR, presento alineamientos parciales con 6 proteínas de *P.falciparum*. Con respecto a su hospedero se identificaron hasta 4 alineamientos parciales y con *O.cuniculus* fueron 13 las proteínas sin ninguna secuencia conservada entre estas. Para el péptido SIDTDENADHRHNV se alineo con 11 proteínas de *P.falciparum* y en 9 de estas se determinó “DTDENA” como secuencia conservada entre estas. Para el caso de *Homo sapiens* se alineo con 6 proteínas y con *O. cuniculus* fueron 7 proteínas. El péptido KIDESITTDEQIRL se alineo parcialmente con 11 proteína de *P.falciparum*, de los cuales 8 proteínas presentaron una la secuencia “TDEQIR”, 6 proteínas de *H.spaiens* fueron identificadas y 5 de ellas presentaron la secuencia “DEQIRL” en común y para *O.cuniculus* presentó 3 proteínas, 2 de ellas con la secuencia “DEQIR”. Finalmente el péptido KGDKILEGSDQRNM se identificó un alineamiento parcial en 15 proteínas de *P.falciparum* y 10 de ellas presentaron la secuencia “DKILE”; para *H.sapiens* se identificaron 12 proteínas y 10 de ellas presentaron la secuencia “DKILE” y para *O.cuniculus* presento 24 proteínas de las cuales 12 presentaron nuevamente la secuencia “DKILE”.

4.2.9.2.- Ensayos de BlastP para Eba175

Los resultados de alineamientos se presentan en la tabla 4TS5. Para el análisis de Blastp se eliminaron aquellos péptidos que no cuenten con aminoácidos en desorden y que presentaron entre 2 y más modificaciones pos-traduccionales quedándonos con los siguientes péptidos: NSKPLSDDVRPDKN, SHTDIHKINPEDRN, SEYHEDINDINFKK y EVKEHTSNSDQVQQ. Los resultados del análisis se muestran en la tabla S15.

Para el péptido NSKPLSDDVDPDKN se alinearon parcialmente con 7 proteínas de *P.falciparum*. Con *H.sapiens* se alineo con 15 proteínas cuya secuencia conservada fue “KPLSDD” en 10 de estas y con *O. cuniculus* presento 27 proteínas de las cuales 6 de ellas presentaron la secuencia “PLSDD” y 6 la secuencia “SDDVR”.

Con el péptido SHTDIHKINPEDRN se obtuvieron 14 alineamientos parciales con *P.falciparum*, de las cuales 6 presentaron la secuencia “IHKIN”. Con *H.sapiens* se alineo con 8 proteínas y 4 de ellas presentaron la secuencia “NPEDR” y con *O. cuniculus* 20 alineamientos parciales fueron obtenidos de los cuales 8 de ellos presentaron la secuencia “KINPDR”, 5 la secuencia “KINPE” y 4 la secuencia “NPEDR”.

Con SEYHEDINDINFKK se obtuvo un alineamiento parcial con 6 proteínas con *P.falciparum*, con *H.sapiens* fueron 4 proteínas y con *O.cuniculus* fueron 6 proteínas de las cuales 3 presentaron la secuencia “YHEDI”.

Finalmente con el péptido EVKEHTSNSDNVQQ se obtuvieron 8 alineamientos con las proteínas de *P.falciparum*, 2 con las proteínas de *H.sapiens* y 12 con *O.cuniculus* sin presentar secuencia conservada alguna.

Tabla 4TS5 (EBA-175)

														<i>Plasmodium falciparum</i>
N	S	K	P	L	S	D	D	V	R	P	D	K	N	Nombre
														erythrocyte binding antigen 175 [Plasmodium falciparum 3D7]
														Serine/Threonine protein kinase, FIKK family [Plasmodium falciparum 3D7]
														mannose-6-phosphate isomerase, putative [Plasmodium falciparum 3D7]
														DNA repair protein rad54, putative [Plasmodium falciparum 3D7]
														40S ribosomal protein S6, putative [Plasmodium falciparum 3D7]
														26S proteasome subunit, putative [Plasmodium falciparum 3D7]
														DNA-directed RNA polymerase 3 largest subunit [Plasmodium falciparum 3D7]
														conserved Plasmodium protein, unknown function [Plasmodium falciparum 3D7]
														<i>Homo sapiens</i>
														hypothetical protein [Homo sapiens]
														KIAA1543 protein [Homo sapiens]
														PREDICTED: calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3 isoform X3 [Homo sapiens]
														hCG2004001, isoform CRA_b [Homo sapiens]
														HCCA3 [Homo sapiens]
														proteasome assembly chaperone 2 isoform 2 [Homo sapiens]
														tumor necrosis factor superfamily, member 5-induced protein 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]
														HDCMC29P [Homo sapiens]
														PREDICTED: probable ATP-dependent RNA helicase DDX60 isoform X2 [Homo sapiens]
														hypothetical protein FLJ20035, isoform CRA_d [Homo sapiens]
														transposase-like protein [Homo sapiens]
														PREDICTED: glucokinase regulatory protein isoform X1 [Homo sapiens]

	Hidrofobicidad (Kcal /mol)	Carga neta	Punto isoeléctrico
Rh2b			
CYDKHEDFNENERYSN	+29,24	-2	4,46
CTDQRDASSHGSSNR	+26,47	0	7,13
KGDKILEGSDQRNMC	+27,54	0	6,37
CSIDTDENADHRHNV	+30,26	-3	4,40
Eba175			
NSKPLSDDVRPDKNC	+27,40	0	6,33
CSHTDIHKINPEDRN	+28,37	-1	6,06
CSEYHEDINDINFKK	+27,85	-2	4,46
EVKEHTSNSDNVQQC	+27,40	-2	4,31

C en negrita denota la cisteína agregada a cada péptido.

4.2.11.- Análisis de los pasos de selección

4.2.11.1.- Rh2b

Para la proteína Rh2b de 3254 aa se ubicó la región única (477 aa) con respecto a su homólogo Rh2a. Con dicha región se realizó el análisis con AbDesignerTM identificando 541 péptidos de los cuales 186 de ellos presentaron un ig-score mayor a 6.5. Luego el análisis con OptimunAntigenTM permitió filtrar 4 péptidos con carácter entre “Moderado y Alto”, estos péptidos fueron: KGDKILEGSDQRNM, SIDTDENADHRHNV, YDKHEDFNENERYSN y TDQRDASSHGSSNR. Según su ubicación en el mapa de la proteína, KGDKILEGSDQRNM se ubica entre la región en común con Rh2a (homólogo) y la zona de deleción. SIDTDENADHRHNV y TDQRDASSHGSSNR se ubicaron en la zona de deleción. YDKHEDFNENERYSN se ubicó entre esta zona de deleción y 6 aa del dominio transmembrana. Los péptidos que presentaron menos estructuras y presencia de turn+coil fueron: TDQRDASSHGSSNR y YDKHEDFNENERYSN. Con respecto a los péptidos con % de aminoácidos que contribuyen al desorden fueron: TDQRDASSHGSSNR, SIDTDENADHRHNV y YDKHEDFNENERYSN. Con respecto a las modificaciones postraduccionales sólo el péptido KGDKILEGSDQRNM no recibió ninguna predicción; mientras que los demás péptidos presentaron entre 1 y 3 modificaciones. Con respecto a la especificidad el péptido YDKHEDFNENERYSN presentó más especificidad al alinearse parcialmente con 1 proteína de *P.falciparum*. Para el péptido TDQRDASSHGSSNR, se alineó parcialmente con 4 proteínas de *P.falciparum*. Mientras que el péptido SIDTDENADHRHNV se alineó con 11 proteínas de *P.falciparum* y además presentó una secuencia conservada entre 9 de estas; para KGDKILEGSDQRNM presentó un alineamiento parcial con 15 proteínas de y una secuencia conservada entre 10 proteínas de *P.falciparum*; la misma secuencia que estuvo conservada en 10 proteínas de *H.sapiens* y 12 de *O.cuniculus*. Dos péptidos presentaron carga neta 0 (KGDKILEGSDQRNMC y CTDQRDASSHGSSNR).

Se eligió YDKHEDFNENERYSN por presentar conservación, por presentar pocas estructuras secundarias (Hélice o beta plegamiento) y aminoácidos que contribuyen al desorden, sin embargo su proximidad al dominio transmembrana y las 3 modificaciones son 2 características a tener en cuenta. Se eligió TDQRDASSHGSSNR que también presentó

conservación, menos aminoácidos en estructuras secundarias y desorden, sin embargo también presenta 3 modificaciones y carga neta 0 que puede comprometer su síntesis. Finalmente no se recomienda tomar los péptidos SIDTDENADHRHNV y KGDKILEGSDQRNM debido a la conservación presentada entre proteínas de *P.falciparum*, *H. sapiens* y *O. cuniculus*, por la presencia de aminoácidos que participan en estructuras secundarias (57-85%) y la carga 0 de KGDKILEGSDQRNM.

4.2.11.2.- Eba175

De los 1502 aminoácidos que presentan Eba175, los cuales están divididos en 7 regiones, se seleccionaron las regiones que presentaron reportes de variabilidad genética, seleccionando las regiones IV al VII lo que comprendían alrededor de 640 aa que generaron 628 potenciales péptidos (AbDesigner™) de los cuales 234 presentaron valores *ig-score* entre “Moderado” y “Alto”. Tras el filtro con OptimunAntigen™ se obtuvieron 10 péptidos, que presentaron caracteres “moderado” (9) y “Bajo” (1). Por lo que se eligió trabajar con los 9 péptidos para el posterior análisis. Según el mapa de la proteína Eba175, 5 péptidos se ubicaron en la región IV, 2 en la región V, 1 en la región VI y 1 en la región VII. Ningún péptido se ubicó de forma cercana a un dominio transmembrana. Con respecto a los aminoácidos que contribuyen a la formación de (α -turn +coil), se identificaron los péptidos KSHMNRESDDGELY, NSKPLSDDVRPDKN, SHTDIHKINPEDRN y EVKEHTSNSDNVQQ; mientras que los péptidos que contenían aminoácidos que contribuyen al desorden fueron: KSHMNRESDDGELY, NSKPLSDDVRPDKN, SHTDIHKINPEDRN, SEYHEDINDINFKK y EVKEHTSNSDNVQQ, por lo que de los 9 péptidos originales nos quedamos con estos 5 péptidos. Según los predictores de modificaciones postraduccionales se obtuvo para KSHMNRESDDGELY, 3 fosforilaciones); NSKPLSDDVRPDKN, SHTDIHKINPEDRN y EVKEHTSNSDNVQQ, 1 fosforilación cada uno, y SEYHEDINDINFKK no presentó modificación alguna. De estos 5 péptidos elegimos los 4 que tuvieron entre ninguna y una modificación para el análisis por Blastp. Según este análisis, SHTDIHKINPEDRN presentó secuencia conservada “IHKIN” en 6 proteínas de *P.falciparum* de 14 proteínas alineadas, mientras que los otros 3 péptidos no presentaron secuencias conservadas. Cuando se alinearon con las proteínas de hospedero (*H. sapiens*), el péptido SHTDIHKINPEDRN presentó la secuencia conservada “NPEDR” con 4 proteínas, NSKPLSDDVRPDKN la secuencia “KPLSDD”; mientras que SEYHEDINDINFKK y EVKEHTSNSDNVQQ no presentaron secuencias conservadas con las proteínas de *H.sapiens*. Al momento de alinearlos con *O. cuniculus*, NSKPLSDDVRPDKN presentó las secuencias “SDDVR” y “PLSDD” conservadas; SHTDIHKINPEDRN presentó en 8 proteínas de *O.cuniculus* la secuencia “KINPDR”, SEYHEDINDINFKK presentó 3 proteínas con la secuencia “YHEDI” y el péptido EVKEHTSNSDNVQQ no presentó ninguna secuencia conservada. Dado la conservación de secuencias en *P.falciparum*, *H.sapiens* y *O.cuniculus* presentado en 2 péptidos (NSKPLSDDVRPDKN y SHTDIHKINPEDRN), se decide no continuar con estos. Con los 2 péptidos que quedan (SEYHEDINDINFKK y EVKEHTSNSDNVQQ) se debe tener en cuenta el caso de SEYHEDINDINFKK ya que su ubicación es entre el espacio citoplasmático y al potencial punto de adición de GPI.

4.2.12.- Ensayos de inmunoblot utilizando los anticuerpos obtenidos a partir de los péptidos seleccionados.

Se sintetizaron 3 péptidos para cada proteína en total (RH2B, EBA175 y MSP10) (Tabla 4TS7) y se utilizaron para inmunizar conejos (Genscript, Piscataway, NJ, USA) de los cuales se aisló el antisuero para la purificación de estos anticuerpos.

Tabla 4TS7.- Lista de péptidos y anticuerpos evaluados

Anticuerpo	Regiones	Posición en la proteína (aa)	Secuencia Péptido
EBA-175 - 1	RIII - VII	1089 – 1102	CSNNEYKVNREGER
EBA-175 - 2	RIII - VII	1322 – 1335	KKLDLDLYENRNDSC
EBA-175 - 3	RIII - VII	1489 – 1502	CSEYHEDINDINFKK
RH2B - 1	Región única	2998–3011	CTDQRDASSHGSSNR
RH2B - 2	Región única	3168–3181	CSIDTDENADHRHNV
RH2B - 3	Región única	3207–3220	YDKHEDFNNERYSN
MSP10 - 1	N - terminal	50 – 63	NMNNEKNDNKDNKD
MSP10 - 2	Región Central	306 – 319	ERKNQKAPPGEHKP
MSP10 - 3	Región Central	368 – 381	RRTLLKESRDIKNT

Los 3 anti-EBA-175 y 3 anti-RH2B fueron incubados en tiras individuales de membrana de nitrocelulosa fijada con 500 ug/ml de proteína total de pellet de esquizontes, de acuerdo a las condiciones descritas en la sección Ensayos de Inmunoblot.

Los resultados revelaron la reacción de los anticuerpos contra bandas de proteínas múltiples, ninguna correspondiente al peso molecular reportado en la literatura científica para las proteínas en evaluación (Rh2b: 357kDa y Eba175:175kDa), evidenciándose así la inespecificidad de reacción de estos anticuerpos (Figura 5S11). Por tanto, estos anticuerpos no pasaron a ser evaluados por otros ensayos de caracterización de anticuerpos. No se detectaron bandas al evaluarse los anticuerpos contra glóbulos rojos no infectados como Control Negativo (Figura 4S12).

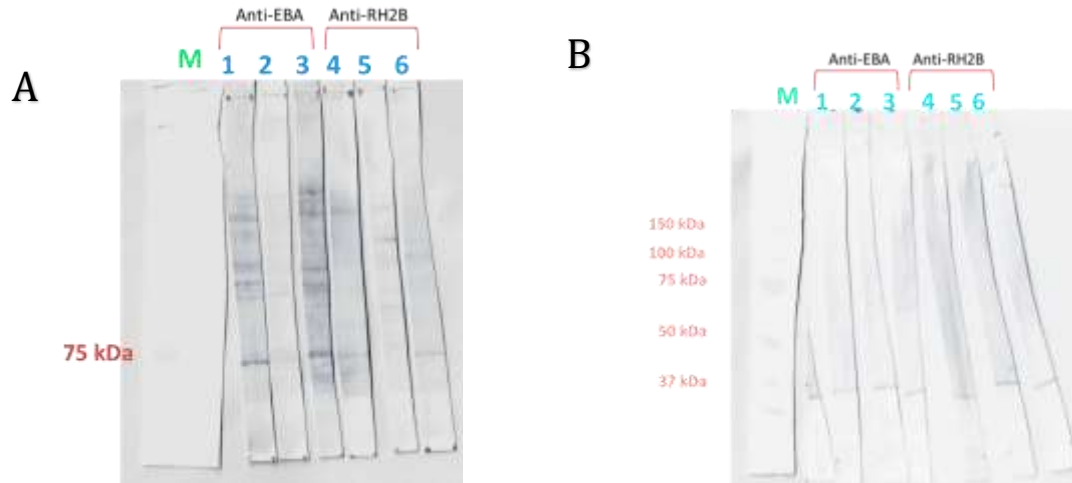


Figura 4S12: Evaluación de anticuerpos anti-RH2 y anti-EBA-175 por inmunoblot. A) 500 µg/ml de pellet de esquizontes purificados fueron fijados en una membrana de nitrocelulosa en condiciones denaturantes y enfrentados en ensayos de Inmunoblot contra los mAc anti EBA-175 (1, 2, 3) y anti-RH2B (4, 5, 6) respectivamente. Ninguno de los anticuerpos detectó una banda específica correspondiente al tamaño de sus respectivas proteínas. B) Los mAc anti-EBA-175 (1, 2, 3) y anti-RH2B (4, 5, 6) fueron enfrentados a glóbulos rojos sin infectar (control negativo). No se observó la presencia de bandas. (M) Marcador.

Los anticuerpos diseñados no pudieron detectar las formas recombinantes de las proteínas RH2B y EBA175 (Figura 4S13).

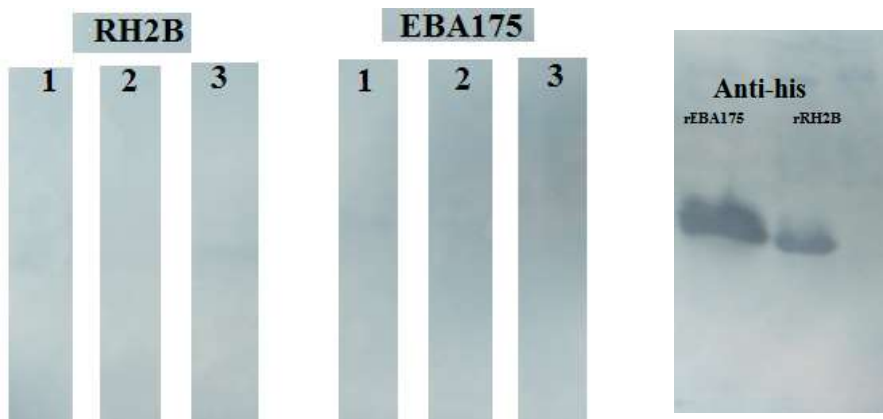


Figura 4S13.- Ensayos de western blot utilizando los anticuerpos producidos en base a los péptidos Rh2b y Eba175 (1,2 y3) (1:500). Se utilizó como controles de anticuerpos anti-his para la detección de las proteínas recombinantes.

4.3.- Observaciones finales:

Se logró diseñar 9 péptidos para las proteínas RH2B y EBA175. Sin embargo, estas tuvieron observaciones de diseño relacionadas a puntos de modificaciones postraduccionales de las proteínas nativas. Esto repercutió en las capacidades de los anticuerpos producidos al momento de poder reconocer las proteínas nativas de *P.falciparum*, a diferencia de los 3 anticuerpos obtenidos para PfMSP10 (Capítulo 4).

4.4.- Referencias anexas:

Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):7085-9.

DeSimone TM, Bei AK, Jennings CV, Duraisingh MT. Genetic analysis of the cytoplasmic domain of the PfRh2b merozoite invasion protein of Plasmodium falciparum. Int J Parasitol. 2009 Mar;39(4):399-405. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.008. Epub 2008 Sep 19.

Engelberg K1, Paul AS, Prinz B, Kono M, Ching W, Heincke D, Dobner T, Spielmann T, Duraisingh MT, Gilberger TW. Specific phosphorylation of the PfRh2b invasion ligand of Plasmodium falciparum. Biochem J. 2013 Jun 15;452(3):457-66. doi: 10.1042/BJ20121694. Healer J, Thompson JK, Riglar DT, Wilson DW, Chiu YH, Miura K, Chen L, Hodder AN, Long CA, Hansen DS, Baum J, Cowman AF. Vaccination with conserved regions of erythrocyte-binding antigens induces neutralizing antibodies against multiple strains of Plasmodium falciparum. PLoS One. 2013 Sep 10;8(9):e72504. doi: 10.1371/journal.pone.0072504. eCollection 2013.

Jennings CV, Ahouidi AD, Zilversmit M, Bei AK, Rayner J, Sarr O, Ndir O, Wirth DF, Mboup S, Duraisingh MT. Molecular analysis of erythrocyte invasion in Plasmodium falciparum isolates from Senegal. Infect Immun. 2007 Jul;75(7):3531-8. Epub 2007 Apr 30.

Perce-da-Silva DS, Banic DM, Lima-Junior JC, Santos F, Daniel-Ribeiro CT, de Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR. Evaluation of allelic forms of the erythrocyte binding antigen 175 (EBA-175) in Plasmodium falciparum field isolates from Brazilian endemic area. Malar J. 2011 May 26;10:146. doi: 10.1186/1475-2875-10-146.

Reiling L, Richards JS, Fowkes FJ, Barry AE, Triglia T, Chokeyjindachai W, Michon P, Tavul L, Siba PM, Cowman AF, Mueller I, Beeson JG. Evidence that the erythrocyte invasion ligand PfRh2 is a target of protective immunity against Plasmodium falciparum malaria. J Immunol. 2010 Nov 15;185(10):6157-67. doi: 10.4049/jimmunol.1001555. Epub 2010 Oct 20.

Capítulo 5:

Experimentos suplementarios

Sero-reactividad de las proteínas recombinantes rRH2b, rMSP10 y los péptidos de PFRH2B, PFEBA175 Y PFMSP10.

5.1.- Comparación de la sero-reactividad de un mismo panel de sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* frente a los antígenos.

Se comparó la sero-reactividad (OD/OD *pool*-) de un mismo panel de sueros frente a rMSP10 y rRH2b y se observó diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el nivel de reactividad. Se obtuvo una mayor reactividad para la proteína total rMSP10 (Figura 6S1), tras esta comparación se observa que la proteína rMSP10 presenta una mayor reactividad, por lo cual se utilizó esta para los ensayos de ELISA con sueros de individuos catalogados como sintomáticos, asintomáticos e infectados con *P.vivax*.

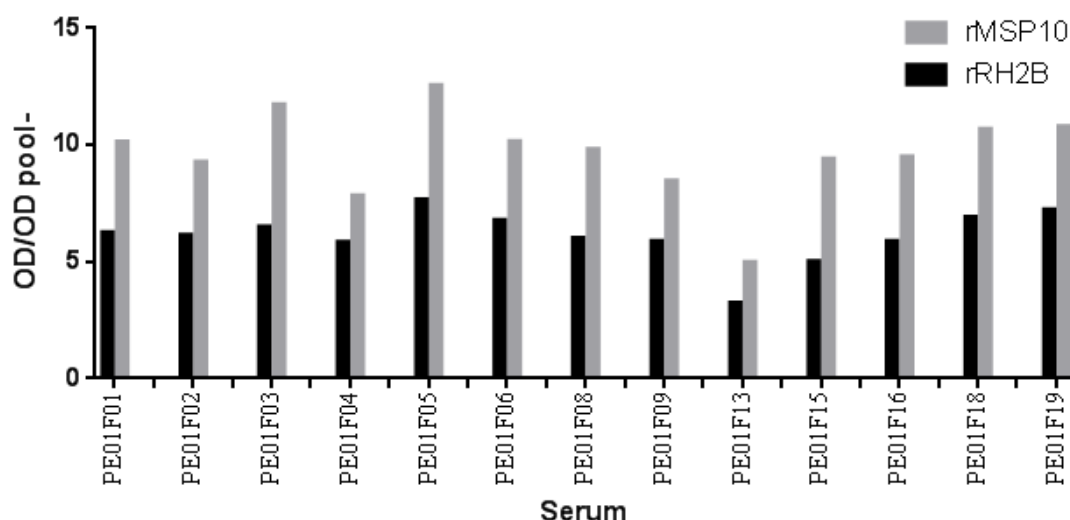


Figura 5S1.- Comparación de los niveles de sero-reactividad de un panel de sueros frente a los antígenos rMSP10 y rRH2b.

De este panel de sueros se identifica dos sueros: PE01F05 (rRH2b: 7.65; rMSP10: 10,25) y PE01F19 (rRH2b: 7.22; rMSP10: 12.75) que presentaron alta sero-reactividad a los antígenos para ser evaluados frente a los péptidos producidos en el capítulo 4.

5.2.- Sero-reactividad de un mismo panel de sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* frente a los péptidos diseñados de las proteínas PFRH2B, PFEBA175 Y PFMSP10.

Se fijaron los péptidos a la placa de ELISA según el protocolo descrito en el capítulo 6, y se evaluó utilizando dos sueros controles (PE01F05 y PE01F19) y un *pool* negativo de sueros de donantes de zonas no endémicas para malaria. Los resultados se grafican en la figura 5S2.

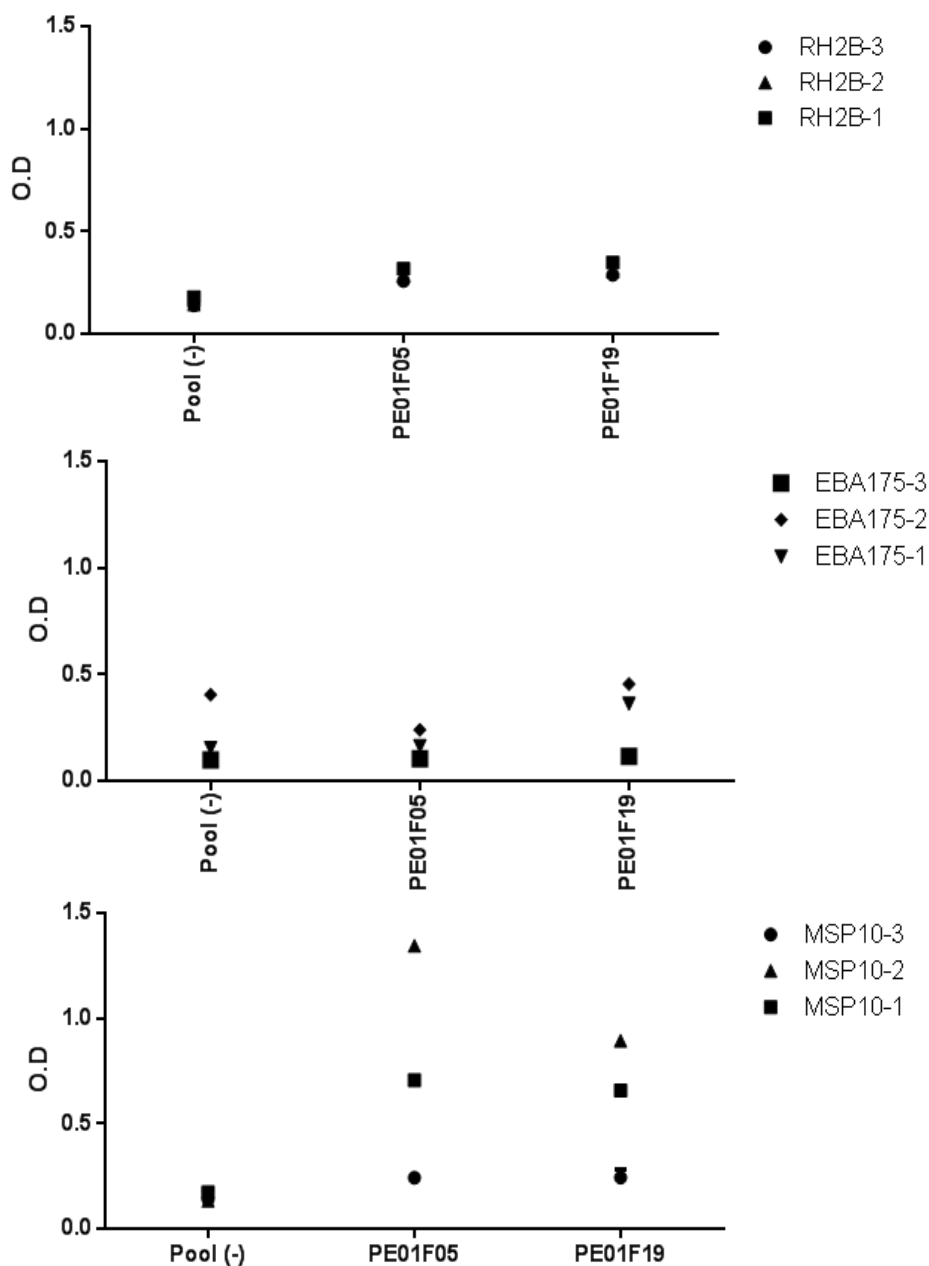


Figura 5S2.- Resultados de sero-reactividad de los sueros controles frente a los péptidos sintéticos diseñados para las proteínas PFRH2B, PFEBA175 Y PFMSP10. Se puede observar una reactividad para los péptidos MSP10-1 y MSP10-2 (2 péptidos); mientras que para los otros 7 péptidos sus OD obtenidos eran valores cercanos al *pool*

negativo. Sin embargo el péptido Rh2b-1 presenta valores de OD ligeramente altos; para descartar una falsa elección de péptidos por el número reducido de controles, se decidió evaluar los péptidos de rRH2b utilizando un panel de 30 sueros (Figura 5S3).

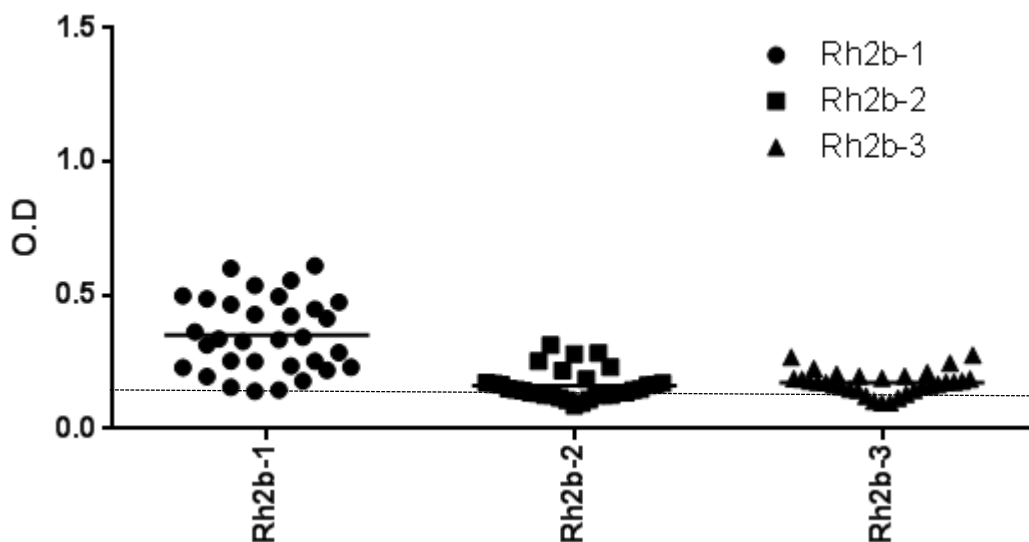


Figura 5S3.- Sero-reactividad de un panel de 30 sueros de pacientes infectados con *P.falciparum* frente a los péptidos de la proteína PFRH2B. La línea horizontal punteada indica el *cut-off* (0.08). Las líneas horizontales continuas indican la media.

Según los resultados, se obtuvo para el péptido RH2B-1 una ligera respuesta en los sueros positivos a *P.falciparum*, indicándonos que este podría ser un potencial péptido a ser evaluado. Tras esto se evaluó su capacidad de reactividad cruzada de los 3 péptidos frente a 13 sueros de pacientes infectados con *P.vivax* (Figura 5S4). Se observó para RH2B-1, reactividad cruzada entre este péptido específico de *P.falciparum* con los sueros de pacientes infectados con *P.vivax* (8/11), descartando su uso como potencial marcador serológico específico para *P.falciparum*.

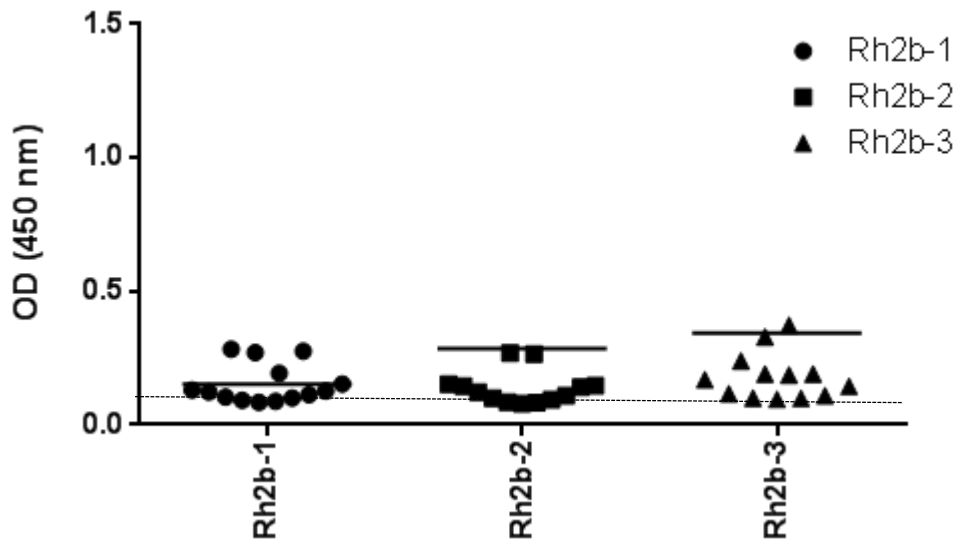


Figura 5S4.- Sero-reactividad de un panel de 11 sueros de pacientes infectados con *P. vivax* frente a los péptidos de la proteína PFRH2B. La línea horizontal punteada indica el *cut-off* (0.075). Las líneas horizontales continuas indican la media.