



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Caracterización molecular de la proteína Pv-110 y el gen que la codifica.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la Br. Andrea Michinaux A. como
requerimiento parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Mariana Hidalgo

Asesor académico: Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela

Julio - 2018

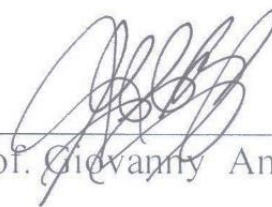
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. ANDREA MICHINAUX**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Andrea Michinaux Amundarain, C.I: 20.976.267 titulado “**Caracterización molecular de la proteína Pv-110 y el gen que la codifica**”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 23 días del mes de julio del año 2018, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



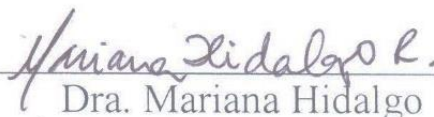
Prof. Victoria Navas



Prof. Giovanni Angiolillo



Profa. Guillermina Alonso
(Tutora - Coordinadora)



Dra. Mariana Hidalgo
(Tutor)

Agradecimientos

A todos los que hicieron que llegara a este punto: gracias.

A la Universidad Central de Venezuela y mi querida Facultad de Ciencias, por ser mi segunda casa.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por acogerme y permitirme realizar este trabajo.

A mis padres: a mi mamá por apoyarme en todo, escucharme, entenderme y estar conmigo. Por alegrarse por mí cuando le dije que había quedado en *nuestra* Facultad de Ciencias, y por seguirme apoyando aun cuando le dije que quería seguir estudiando biología al reprobar matemáticas por “milésima” vez, gracias a ti, estamos aquí. A mi papá, por todo el apoyo brindado en estos últimos tiempos. Sin tu ayuda no lo hubiera logrado y saber que siempre, aunque no estuvieras presente, podía contar contigo.

A mis abuelas: gracias a ustedes por hacer mi vida más feliz. Las abuelas son el mejor regalo que la vida nos puede dar. Abu, sé que te hubiera gustado verme en este punto. Gracias por escucharme siempre y consentirme. Sé que te gustaría estar aquí y ver a tu niña a punto de graduarse. Abue, gracias por apoyarme en todo y cumplir un papel que no te correspondía, que, aunque no me entiendas muchas veces y hubieras preferido que estudiara ingeniera, me apoyaste siempre.

A mi familia: por estar siempre allí. Gracias, German por todo el apoyo brindado hasta ahora, a José Andrés, haces mi vida más feliz, a mis tíos que siempre me han apoyado: Isbelia, Jhon, Lisandro, Mariu, Rosa y Rosa E.; a mis primos: Alejandra, Javier, Gabriela, Marianna, Nicole, Valeria, Zoe. Gracias a todos.

A mis amigos: aquellos que me acompañaron todos estos años, me apoyaron siempre y me escucharon sin entender nada. Gracias Alonso, Daniela, Daniel, Marian, Victoria, Sara. A esos amigos, tan maravillosos, que la carrera me regalo, que, aunque no todos estemos en el mismo huso horario, con ellos puedo decir, ¡Lo logramos, muchachos! ¡Sobrevivimos! Carla, gracias por ayudarme con el Ps y las figuras en este trabajo, Daniela, Diego, Fernando, Juan, Luz, Kelly. Gracias por hacer este duro camino más tolerable, los quiero a todos.

A Erik: gracias por apoyarme, escucharme y entenderme, aunque hay veces que ni yo misma me entiendo.

A la profesora Guillermina Alonso, gracias por encaminarme y aconsejarme cuando más lo necesitaba.

A mi laboratorio de Inmunoparasitología: gracias por adoptarme y enseñarme todo lo que estuvo en sus manos. Gracias a todo el equipo, a los que no están ahora, pero que me enseñaron como es trabajar en equipo y lograme adaptar con personas totalmente desconocidas, espero nos podamos reencontrar.

A mi tutora, Mariana, gracias por todo, las palabras sobran para decir lo agradecida que estoy. Gracias por hacerme parte del equipo, guiarme en toda esta travesía llamada tesis de grado y en el cambio de pasar de estudiante de biología al trabajo que haré de ahora en adelante como investigador, gracias.

Gracias a todos.

Resumen

La malaria, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo por la morbilidad y mortalidad asociada a ella. Alrededor de la mitad de la población mundial está expuesta a la malaria, causando problemas socio-económicos en países endémicos. El diagnóstico y el tratamiento temprano atenúan la incidencia de la enfermedad, reducen sus efectos mortales y contribuyen a prevenir su transmisión. Las especies de *P. falciparum* y *P. vivax* han desarrollado diferentes patrones de resistencia a los medicamentos en diferentes regiones geográficas y por ello se han ido modificando estos tratamientos antimaláricos. En los últimos años, se han reportado fallos en tratamiento antimaláricos estándar en varias zonas geográficas. Para prevenir una potencial emergencia de salud pública, el arsenal antimalárico debe contener productos terapéuticos con nuevos mecanismos de acción. La percepción de la amenaza de *P. vivax* se ha visto opacada en el mundo por la subestimación de la morbilidad y mortalidad asociada a esta especie, y la escasez de literatura, pero ésta es la especie con mayor incidencia en Venezuela y es necesario una mejor comprensión de la biología fundamental de *P. vivax* para lograr un control eficaz. Por tal razón el objetivo de este trabajo es discernir y caracterizar una proteína de secreción de *Plasmodium vivax*, de la cual se tiene evidencia de interactuar con otras proteínas que actúan dentro del metabolismo del parásito, teniéndose como resultado que Pv-110 presenta símiles antigénicos en *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. chabaudi*. Además, Pv-110, es altamente conservada, se expresa durante todo el ciclo eritrocítico, se exporta y es detectada en sobrenadante de cultivo, posee el motivo PEXEL, es detectada en muestras de orina a distintas parasitemias y en suero sanguíneo, está fosforilada, por todo lo antes expuesto proponemos seguir el estudio y realizar análisis funcionales de Pv-110, para determinar su función dentro del desarrollo de *P. vivax*, ya que ésta es candidata como posible blanco de diagnóstico y terapéutico.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, Proteínas.

Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Resumen	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Introducción	1
Malaria	1
Epidemiología de la malaria.....	1
Malaria en Venezuela	1
Control de la malaria en Venezuela.....	3
Tratamiento en malaria	5
Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	7
Modificaciones del glóbulo rojo parasitado (GRP).....	9
Secreción de proteínas en género <i>Plasmodium</i>	10
Proteínas de tráfico como blanco de Drogas.....	12
Antecedentes	14
Objetivos.....	15
Materiales y métodos.....	16
Resultados.....	28
Para determinar si la proteína <i>pv110</i> se expresa en distintas especies del género <i>Plasmodium</i> :	28

Para investigar si la proteína pv110 es secretada fuera del GRP.	37
Para conocer si la proteína Pv110 se expresa en todos los estadios del ciclo eritrocítico del parásito.....	39
Para amplificar la secuencia del gen que codifica para la proteína pv110 y determinar si es conservada en diferentes especies del parásito.	42
Discusión	55
Recomendaciones.....	64
Conclusiones	65
Bibliografía	66

Índice de figuras

Figura 1. Número de casos notificados de malaria. Venezuela, 1988-2016. (OPS, 2017)....	2
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i>	8
Figura 3. Modelo de translocación de proteínas a través de la membrana de la vacuola parasitófora de <i>P. falciparum</i> en un eritrocito infectado.	12
Figura 4. Técnica de extendido y gota gruesa, diagnostico parasitológico.....	17
Figura 5. <i>Slot Blot</i> de proteínas totales de <i>P. vivax</i>	28
Figura 6. <i>Slot Blot</i> de proteínas totales de <i>P. vivax</i> obtenida en agrupaciones de muestras de sangre de pacientes.	28
Figura 7. <i>Slot Blot</i> de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por <i>P. chabaudi</i>	29
Figura 8. <i>Slot Blot</i> de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por <i>P. yoelii</i> y <i>P. berghei</i>	29
Figura 9. <i>Slot Blot</i> de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por <i>P. chabaudi</i> y <i>P. berghei</i>	30
Figura 10. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectado con <i>P. chabaudi</i>	31
Figura 11. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. chabaudi</i>	32
Figura 12. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. falciparum</i> . No hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.	33
Figura 13. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. yoelii</i>	33

Figura 14. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. malariae</i> . No hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.	34
Figura 15. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. vinckei</i> no hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.....	34
Figura 16. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con <i>P. berghei</i>	35
Figura 17. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectadas con <i>P. berghei</i>	35
Figura 18. Gel de poliacrilamida teñido con SYPRO ® Ruby red de Pv-110.	36
Figura 19. Gel de poliacrilamida teñido con Pro-Q® Diamond de Pv-110.	37
Figura 20. <i>Slot Blot</i> de proteínas aisladas de orina, suero sanguíneo y sobrenadante de cultivo de <i>P. chabaudi</i>	38
Figura 21. <i>Slot Blot</i> de proteínas de <i>P. yoelii</i> en orina y suero sanguíneo.	38
Figura 22. <i>Slot Blot</i> de proteínas de <i>P. berghei</i> en orina.....	39
Figura 23. Estadios eritrocíticos (anillo, trofozoíto y esquizonte) de <i>P. chabaudi</i> visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de ratón infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.....	40
Figura 24. Estadios (trofozoíto y esquizonte) de <i>P. vivax</i> visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de paciente infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.	40
Figura 25. Estadios (anillo y trofozoíto) de <i>P. yoelii</i> visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de paciente infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.	40
Figura 26. <i>Slot Blot</i> de proteínas aisladas de cultivo sincronizado de <i>P. chabaudi</i>	41
Figura 27. <i>Slot Blot</i> de proteínas aisladas de cultivo sincronizado de <i>P. yoelii</i>	41

Figura 28. Esquema de secuencias compartidas de otros organismos con la secuencia nucleotídica de <i>pv-110</i> (XM_00161564). Aquí podremos observar que zonas de la secuencia eran únicas dentro de la secuencia de <i>pv-110</i> . Para identificar los colores asignados a cada organismo en <i>tabla 3</i>	46
Figura 29. Amplificación de <i>pv-110</i> con AM1-AM2.	49
Figura 30. Amplificación de <i>pv-110</i> con AM1-AM2.	49
Figura 31. Amplificación en gradiente de <i>pv-110</i> con AM3A-B y AM4A-B.	51
Figura 32. Amplificación en gradiente de <i>pv-110</i> con AM5A y AM5B.	51
Figura 33. Re-amplificación de <i>pv-110</i> con AM1-AM2.	52
Figura 34. Re-amplificación de <i>pv-110</i> con AM1-AM2 suplementado con betaina (1).	53
Figura 35. Re-amplificación de <i>pv-110</i> con AM1-AM2 suplementado con betaina (2).	53

Índice de tablas

Tabla 1. Matriz de identidad de secuencias de diferentes especies del género Plasmodium (BioEdit).....	42
Tabla 2. Matrix de distancia evolutiva: estimación divergencia evolutiva entre secuencias de diferentes especies del género Plasmodium (MEGA 7).	43
Tabla 3. Secuencias compartidas de la secuencia de pv-110 con otros organismos parásitos y de humanos.	44
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados en base a las regiones únicas en la secuencia de pv-110.	47
Tabla 5. Resultados obtenidos a partir del diagnóstico molecular especie específico de las muestras de los diferentes estados endémicos de Venezuela.	48
Tabla 6. Esquema de gradientes de temperaturas en el termociclador y del uso de éstas por los distintos oligonucleótidos.....	50

Lista de abreviaturas

AcMon: Anticuerpo Monoclonal. ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BLAST: Herramienta de búsqueda básica de alineamiento de tipo local.

GRP: Glóbulo rojo parasitado.

IVIC: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

NCBI: Centro nacional para la información biotecnológica (National Center Bank Information).

OMS (WHO): Organización Mundial de la Salud.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

Introducción

Malaria

La Malaria es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo, debido a su amplia distribución geográfica, morbilidad, mortalidad e impacto socio-económico que impone en los países endémicos. Es causada por protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium*, cinco especies pueden infectar al humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, las cuales, se transmiten por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* infectados, vectores de la enfermedad (OMS,2017). El género *Plasmodium* presenta, más de 100 especies que pueden infectar muchas otras especies animales como reptiles, aves y varios mamíferos (CDC - Malaria, 2016).

P. falciparum y *P. vivax* son las especies más prevalentes, la primera es de mayor importancia médica en el continente africano y es responsable de la mayoría de las muertes provocadas por el paludismo en todo el mundo (OMS, 2017). Mientras que *P. vivax* es la especie con mayor distribución en Asia y América (OMS, 2017).

Epidemiología de la malaria

Según la OMS, cerca de la mitad de la población mundial está expuesta a la malaria o paludismo. En el mundo existen 3200 millones de personas en riesgo, que habitan en 97 países considerados endémicos, cada año, ocurren aproximadamente 198 millones de casos y 584 mil muertes cada año debidas a esta enfermedad (OMS, 2016).

Malaria en Venezuela

En Venezuela se estima que 5.721.000 personas habitan en áreas endémicas; durante el año 2016 se registraron 240.613 casos de malaria, 74,62% debidos a *P. vivax*, 19,32% a *P.*

falciparum, 0,01% a *P. malariae* y 6,03% fueron infecciones mixtas de *P. vivax* más *P. falciparum*. Estas cifras representaron un incremento de 56,1% con respecto al año 2015.

Según el Informe Mundial sobre el Paludismo, publicado por la OMS en el 2016, en Venezuela ha habido un incremento estimado >20 % en la incidencia de la enfermedad (es decir, el número de casos nuevos entre las poblaciones en riesgo) y en la tasa de mortalidad en Venezuela durante el período 2010-2015, lo que corresponde a lo publicado por la OPS (2017) dónde vemos un incremento del número de casos reportados en desde el año 1992 hasta el año 2016 (figura 1). En Venezuela la malaria presenta letalidad baja, no así la morbilidad la cual es muy elevada, ocasionando repercusiones significativas en la salud y en los aspectos socio-económicos (M.P.P.S., 2011)

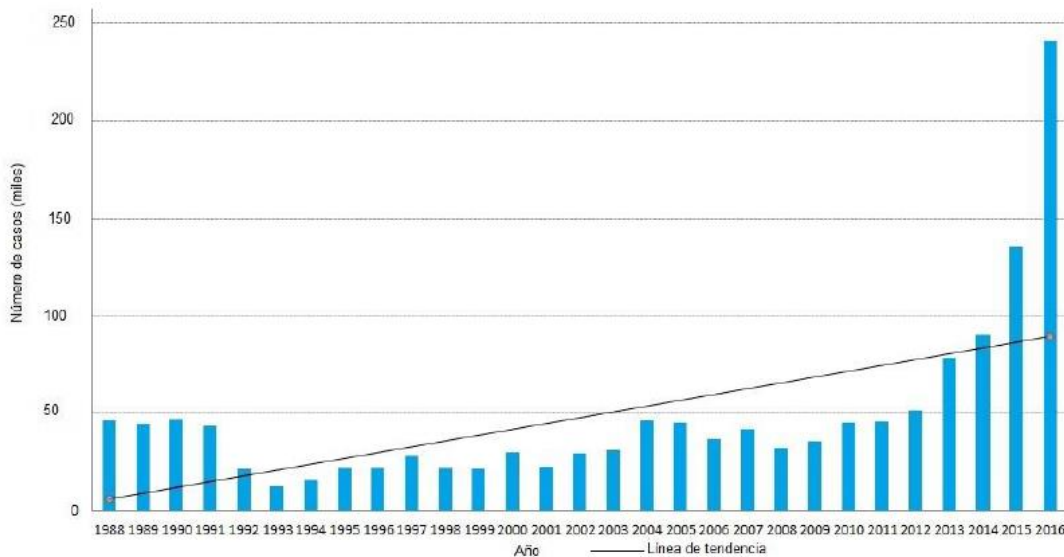


Figura 1. Número de casos notificados de malaria. Venezuela, 1988-2016. (OPS, 2017)

En Venezuela existen tres focos maláricos (Consenso de Malaria, 2006):

- Foco Malárico Occidental: Conformado por los estados Zulia, Táchira, Barinas, Mérida, parte occidental de Apure, Portuguesa, Yaracuy y Trujillo.
- Foco Malárico Meridional: Conformado por los estados Bolívar y Amazonas.

- Foco Malárico Oriental: Conformado por los estados Sucre, Anzoátegui, Monagas y la parte occidental de Delta Amacuro.

En las últimas décadas en Venezuela, la mayor prevalencia de la enfermedad ocurrió en los estados Bolívar, Sucre y Amazonas siendo estos los focos remanentes de Malaria desde la época de erradicación. Para el 2016 se registraron casos en 16 de los 24 estados del país (OPS/OMS, 2017). El principal foco de transmisión de *P. vivax* en Venezuela es el Estado Bolívar, en el cuál durante, el periodo 2001-2010 reportó 235.288 casos (Cáceres, 2011). Bolívar es el estado con mayor morbilidad, por el auge de la explotación de oro y la movilización de personas procedentes de otros estados y países, que se establecen en condiciones propicias para la transmisión de la enfermedad (OPS/OMS, 2017), siendo las poblaciones de más alto riesgo los adultos jóvenes con ciertas ocupaciones como mineros, agricultores y militares, y las comunidades amerindias (malaria laboral y de fronteras) (Fundamentos Diagnóstico y control de la malaria, 2011b) (Villegas y col., 2011b).

Control de la malaria en Venezuela

De acuerdo con los lineamientos de la Estrategia Mundial para el Control de la Malaria (EMCM), las acciones fundamentales para el control de la enfermedad consisten en la interceptación de los vectores, el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno a los pacientes (Cáceres, 2010). Mientras, que lo pautado en la Asamblea Mundial de la Salud (AMS) de 2005 fue: mosquiteros tratados con insecticida para las personas en riesgo, medicamentos antimaláricos apropiados para los enfermos con malaria probable o confirmada, rociamiento con insecticidas de acción residual para hogares en riesgo, y tratamiento preventivo intermitente durante el embarazo (Cáceres, 2010).

Actualmente, el reto para el control de la malaria consiste en la persistencia de la transmisión de la malaria tras haber logrado controlar al vector con intervenciones locales a las que sería normalmente susceptible (WHO, 2016), ésto se le denomina malaria residual. Tanto el comportamiento de las poblaciones humanas como del vector son responsables de esta transmisión residual, por ejemplo, que las personas estén al aire libre sin precauciones contra los mosquitos, dormir sin mosquiteros o desplazarse en zonas con alta transmisión sin las precauciones necesarias o que las especies locales del vector muestren un comportamiento que les permita evitar las intervenciones básicas, como la resistencia a insecticidas o cambios en la conducta de las poblaciones (WHO, 2016) .

Además, se puede decir que ya infección no es sinónimo de enfermedad, dado a que frecuentan los portadores asintomáticos se estima que existen tres casos asintomáticos por cada caso diagnosticado lo que contribuye a la transmisión de la enfermedad y por ende a la malaria residual (Fundamentos Diagnóstico y control de la malaria, 2011b).

La transmisión de la malaria también puede ocurrir de humano a humano, ya que el parásito vive en los eritrocitos, la enfermedad puede ser transmitida de una persona a otra a través del trasplante de órganos, uso compartido de jeringas y transfusiones de sangre. Una madre infectada también puede transmitir la malaria a su bebé durante el parto (nacimiento), esto se conoce como malaria congénita ("PALUDISMO - Información sobre el paludismo", 2017).

Tratamiento en malaria

El tratamiento antimalárico es indispensable para evitar que haya transmisión y de esta forma interrumpir la cadena epidemiológica, un individuo con malaria funciona como fuente de infección para los *Anopheles*.

El diagnóstico y el tratamiento tempranos del paludismo atenúan la incidencia de la enfermedad, reducen sus efectos mortales y contribuyen a prevenir su transmisión. El tratamiento debe guiarse por tres factores principales: 1) La especie infectante de *Plasmodium*. 2) El estado clínico del paciente y 3) La susceptibilidad de los parásitos a los medicamentos según el área geográfica y los antecedentes de uso de antipalúdicos (CDC - Malaria, 2016).

La determinación de la especie infectante de *Plasmodium* para el tratamiento es muy importante, ya que las infecciones por *P. falciparum* y *P. knowlesi* pueden causar manifestaciones graves o muerte, mientras que las otras especies tienen menos probabilidades de causar manifestaciones graves, es por ello que el inicio precoz de la terapia apropiada es especialmente crítico (CDC - Malaria, 2016). Por otro lado, las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* requieren tratamiento adicional para las formas de hipnozoitos que permanecen latentes en el hígado y pueden causar una infección recidivante (CDC - Malaria, 2016). Por último, las especies de *P. falciparum* y *P. vivax* tienen diferentes patrones de resistencia a los medicamentos en diferentes regiones geográficas (CDC - Malaria, 2016).

El estado clínico del paciente se clasifica en paludismo no complicado o paludismo grave. Los pacientes diagnosticados con el primero pueden tratarse eficazmente con antipalúdicos orales. Sin embargo, pacientes que presentan cuadros clínicos graves como: alteración de la conciencia/coma, anemia normocítica [hemoglobina <7 g/dL], insuficiencia

renal, síndrome de dificultad respiratoria aguda, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, hemorragia espontánea, acidosis, hemoglobinuria, ictericia, convulsiones generalizadas repetidas y / o parasitemia de $\geq 5\%$, deben tratarse agresivamente con terapia antipalúdica parenteral (CDC - Malaria, 2016).

El tratamiento estándar en Venezuela para infecciones por *P. vivax* de malaria no complicada: cloroquina: 25 mg/kg de peso para administrar en tres días (10 mg/kg de peso D1 y D2, 5mg/ kg de peso D3) + primaquina: 0,25 mg /kg/día para administrar por 14 días consecutivos (Noya y Wide, 2011). Mientras que, la mejor opción terapéutica disponible, especialmente para malaria por *P. falciparum*, es el tratamiento combinado con artemisinina (OMS, 2016)

La resistencia a los antipalúdicos es un problema recurrente. Las resistencias de *P. falciparum* a generaciones anteriores de fármacos como la cloroquina y la sulfadoxina-pirimetamina se generalizaron durante las décadas de 1950 y 1960, socavando la lucha contra el paludismo y revirtiendo la mejora progresiva en la supervivencia infantil (OMS, 2017). En infecciones con *P. falciparum* o sospecha de *P. vivax* resistente a la cloroquina, se deben realizar frotis de sangre para confirmar la respuesta parasitológica al tratamiento (disminución de la densidad del parásito) (CDC - Malaria, 2016). No se ha reportado evidencia de resistencia a la cloroquina en *P. malariae* y *P. knowlesi*; por lo tanto, esta droga aún se puede usar para estas dos infecciones (CDC - Malaria, 2016).

Ciclo de vida de *Plasmodium*

El ciclo de vida de *Plasmodium* involucra a dos hospederos, un invertebrado y un vertebrado. Los *Anopheles* participan como hospedadores definitivos, ya que en ellos el *Plasmodium* se reproduce sexualmente, mientras que los humanos y otras especies de vertebrados actúan como hospederos intermediarios, al parásito multiplicarse asexualmente en los mismos (Fundamentos Diagnóstico y control de la malaria, 2011b).

El mosquito *Anopheles* infectado con *Plasmodium* sp. infecta al hospedero vertebrado con esporozoítos, los cuales, invaden las células hepáticas donde experimentan un ciclo de replicación asexual (esquizogonía exoeritrocítica) allí maduran en esquizontes, lisan la célula hospedera y liberan merozoítos a la circulación periférica. Sin embargo, algunas especies como *P. vivax* y *P. ovale*, presentan una fase latente denominada hipnozoítos que puede persistir en el hígado y causar recaídas reactivando la infección meses o, incluso años después (CDC - Malaria, 2016).

Los merozoítos liberados hacia el torrente sanguíneo, infectan glóbulos rojos donde sufren un ciclo de reproducción asexual (esquizogonia eritrocítica), en el cual se desarrollan secuencialmente en: anillos, trofozoítos inmaduros y finalmente esquizontes. Una vez el esquizonte está maduro (segmentado) produce la ruptura de la célula que provoca la liberación de nuevos merozoítos. Algunos merozoítos se diferencian en estadios sexuales, gametocitos hembras (macrogametocitos) y machos (microgametocitos), los cuales, infectan al mosquito *Anopheles* al ser ingeridos por un mosquito *Anopheles* durante su ingesta de sangre al picar al vertebrado (CDC - Malaria, 2016).

La multiplicación de los parásitos en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico, una vez ingeridos los gametocitos, ocurre la reproducción sexual en el estómago del

mosquito, el microgameto (♂) penetra el macrogameto (♀) generando un cigoto. Los cigotos a su vez se vuelven móviles y alargados (ooquistes) e invaden la pared del intestino medio del mosquito donde se desarrollan en oocitos. Los ooquistes crecen, se rompen y liberan esporozoítos, que se desplazan a las glándulas salivales del mosquito. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo hospedero vertebrado perpetúa el ciclo de vida de *Plasmodium* (CDC - Malaria, 2016).

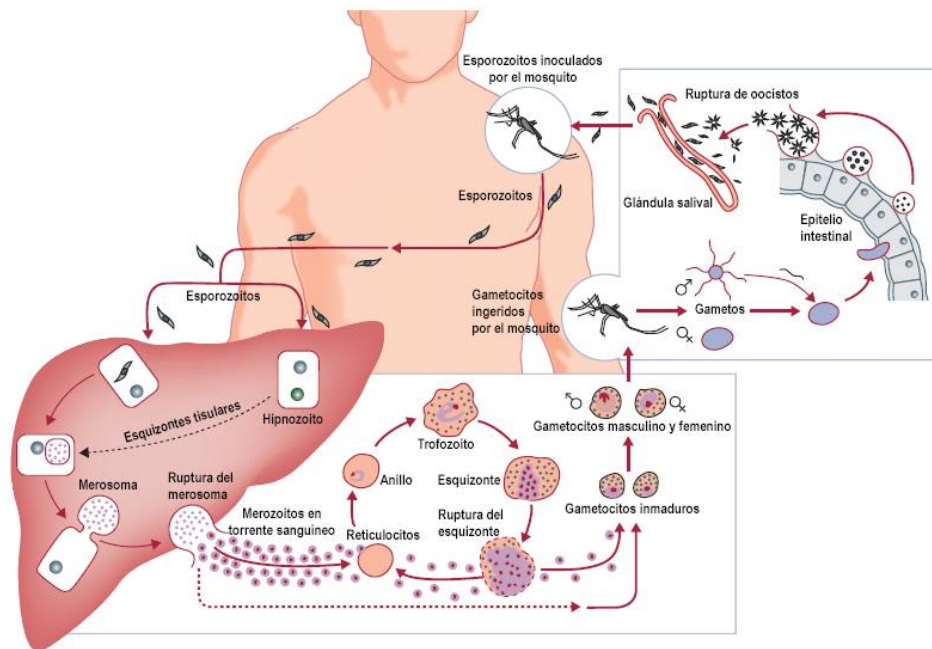


Figura 2. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. Tomada y modificada Mueller y col. (2009).

Debido a lo antes expuesto se han utilizado en el laboratorio modelos de infecciones murinas, para los estudios de esta especie, utilizando especies de plasmodio infectantes de roedores como *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii*.

Modificaciones del glóbulo rojo parasitado (GRP)

La mayor parte de la morbilidad causada por los plasmodios está relacionada con su desarrollo intracelular en el eritrocito hospedero (Bracho y col. 2002). Debido a que el eritrocito humano carece de la maquinaria para la biosíntesis de lípidos y proteínas, los parásitos del género *Plasmodium* instalan un sistema de transporte a través del citoplasma de la célula hospedera y de la membrana del eritrocito, de esta manera se establecen y se desarrollan dentro de su célula hospedera. En consecuencia, el parásito sintetiza activamente y exporta proteínas y lípidos más allá de su membrana plasmática. Bracho (2002), señala que dentro del citoplasma del eritrocito hospedero *P. vivax* induce una serie de modificaciones que serán dependientes del estadio en el que se encuentre el parásito. A través de estudios de microscopía electrónica se han identificado una serie de estructuras de membrana generadas por el parásito que parecen estar involucrados en el transporte de proteínas del parásito a la superficie del eritrocito; estructuras como caveolas (invaginaciones de la membrana plasmática), vesículas y hendiduras. En estadios de trofozoítos maduro se encontraron hendiduras con una organización muy compleja de membranas parecida a la distribución clásica del aparato de Golgi, una elaborada red tubovesicular membranosa (TVM) con caveolas ubicadas en sus regiones terminales (Bracho y col., 2002). La red TVM descrita probablemente podría estar involucrado en el control, la exportación e importación de moléculas entre el parásito y la célula hospedera; debido a la presencia de dos marcadores de proteínas no eritrocíticas dentro de la red TVM, que se visualizaron mediante lo ensayos de inmunomarcaje realizado por los investigadores, apoya la idea de que las proteínas codificadas por parásitos pueden alcanzar la superficie de la célula hospedera a través de estas estructuras.

Plasmodium se replica y se desarrolla en una vacuola parasitófora (VP) dentro del eritrocito, la condición evolutiva de habitar una célula sin núcleo pone al parásito en una difícil situación, él debe servirse de nutrientes externos esenciales para su reproducción y crecimiento, al depender de sustento externos al eritrocito hospedero lo hace vulnerable para ser reconocido por el sistema inmunológico del organismo hospedero que reconoce y remueve eritrocitos senescentes de circulación continuamente; por ello el parásito modifica la célula hospedera exportando sus propias proteínas dentro del citoplasma y a la membrana plasmática del eritrocito, estableciendo mecanismos de evasión inmune y creando caminos permeables para la toma de nutrientes (Przyborski & Lanzer, 2004).

Las caveolas y los complejos vesícula-caveola (CVC) tienen un papel importante en el tráfico de proteínas entre el parásito y el citosol del GRP, estas estructuras proteicas se desarrollan en la membrana de los eritrocitos hospederos en los estadios sanguíneos del *Plasmodium vivax* (Bracho y col., 2006).

Secreción de proteínas en género *Plasmodium*

Como *Plasmodium* reside en la VP permanentemente, las proteínas exportadas deben ingresar a la vía secretora del parásito y luego cruzar la membrana plasmática del parásito y la membrana VP (MVP) para llegar a la célula hospedera (Marti & Spielmann, 2013). Se han identificado varias familias de proteínas de *P. falciparum* (entre 250 y 300 proteínas) que contienen un motivo de exportación en su secuencia aminoacídica (Marti y col. & Hiller y col., 2004), la cual, se llamó motivo PEXEL (Plasmodium Export Element) con la secuencia consenso RxLxE / Q / D (Marti & Hiller, 2004; Marti y col., 2004).

Además, se conoce que este motivo se expresa en al menos 91 proteínas de función desconocida, pero que al menos unas 50 de estas proteínas se expresan durante la etapa

sanguínea de la infección por el parásito en el hospedero, lo que sugiere que el parásito induce cambios moleculares complejos en el eritrocito hospedero (Hiller y *col.*, 2004).

El motivo PEXEL es necesario para que la proteína sea exportada a través de un translocón de membrana específico denominado PETEX, que corresponde a un mecanismo exclusivo de exportación en *Plasmodium* sp. (ver *figura 3*), el translocón está ubicado en la vacuola parasitófora permitiendo la exportación de proteínas parasitarias al eritrocito hospedero (Przyborski & Lanzer, 2004). Estudios demostraron que, al eliminar este motivo en una serie de proteínas reporteras, éstas se acumularon en la vacuola parasitófora, y no alcanzaron el citoplasma del eritrocito, demostrando que éste es necesario para la exportación de proteínas solubles (Marti y *col.*, 2004). El motivo PEXEL se conserva en todo el género *Plasmodium*; lo que plantea la posibilidad de nuevas estrategias para interrumpir el desarrollo del parásito utilizándolo como objetivo terapéutico (Marti y *col.*, 2004).

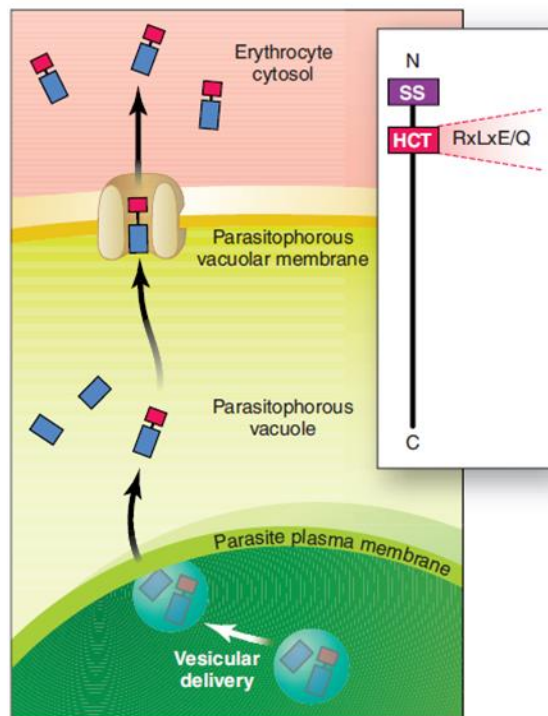


Figura 3. Modelo de translocación de proteínas a través de la membrana de la vacuola parasitófora de *P. falciparum* en un eritrocito infectado.

Tomado de Przyborski & Lanzer (2004).

Proteínas de tráfico como blanco de Drogas

Muchos de los agentes microbianos que infectan y causan patologías en humanos han desarrollado resistencia a las drogas anti infección existentes más rápido de lo que se esperaba. Esta resistencia a drogas anti-infectivas cuesta tanto dinero como vidas humanas, ya que las infecciones causadas por estos patógenos resistentes aumentan la morbilidad y mortalidad, prolongando así la estadía de los pacientes en hospitales, generando costos directos e indirectos, prolongando periodos de infección y generando oportunidades para infectar a otras personas (Heymann, 2006).

Los parásitos del género *Plasmodium* pertenecen al Phylum Apicomplexa, y por ende tienen un apicoplasto, el cual, es un complejo apical vestigio de un plastidio, una colección de estructuras anteriores que permiten al parásito invadir a la célula hospedera y establecerse allí; este organelo posee cuatro membranas y no es la única característica que hace que el parásito apicomplexa sea parecido a una planta, la presencia de factores de transcripción AP2 y la ruta de biosíntesis de carotenoides (ruta de los isoprenoides) han recordado la historia endosimbiótica del parásito (Lim & McFadden, 2010). Desde la identificación del apicoplasto hace 13 años, a medida que se ganan conocimientos de las vías únicas en el parásito, se revela un mundo nuevo y excitante de propuestas para nuevos fármacos contra el parásito, para ello es imprescindible seguir el desarrollo en la búsqueda de nuevos objetivos de drogas (Lim & McFadden, 2010).

Otra particularidad de estos parásitos, es la ruta de biosíntesis de isoprenoides del metileritritol fosfato (MEP) es una ruta metabólica esencial encontrada en los parásitos plasmodios, pero ausente en mamíferos ya que es realizada en el apicoplasto, por ende las moléculas que intervienen en ella constituyen un objetivo muy atractivo para el descubrimiento de nuevas terapias antimaláricas, ya que no tienen homólogas en mamíferos; y son esenciales para la replicación asexual de *Plasmodium* (Price y col., 2016) y el transporte de azúcares activados en la síntesis de glicoproteínas y algunos polisacáridos (Alberts y col., 2011).

Antecedentes

La proteína Pv-110, fue aislada en el Laboratorio de Inmunoparasitología del IVIC empleando el anticuerpo monoclonal 7C5G33, el cual reconoció un antígeno de 110KDa en condiciones nativas y 50KDa en condiciones reductoras, además, se determinó mediante técnicas de microscopía electrónica que dicha proteína acompaña al parásito durante todo su ciclo eritrocítico y además presenta símiles antigénicos en *P. yoelii*, *P. chabaudi* y *P. berghei*, y es exportada desde el citoplasma del parásito hacia el citoplasma y membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado (Bracho y col. 1996).

Esta proteína fue purificada y sometida a metodologías de secuenciación peptídica *de novo* utilizando espectrometría de masas en tándem acoplada a nano cromatografía líquida MALDI-TOF/TOF, de esta manera se identificó la proteína en cuestión la cual correspondía a una proteína hipotética (sin función conocida) de *P. vivax*, además se investigó la secuencia del gen *pv-110*, encontrándose que estaba presente y conservado (entre 75 – 89% de identidad) en todos los aislados de *P. vivax* evaluados, tanto de Venezuela (de los estados Amazonas, Bolívar y Sucre) como de otros países donde este parásito es endémico como Colombia, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Indonesia, Corea, Tailandia y Vietnam. Adicionalmente la secuencia de esta proteína, reveló que la misma presentaba el Motivo PEXEL (⁶³-RLLYD-⁶⁷), el cual indica que la proteína es exportada fuera de los límites de la membrana parasitofórica. También, se encontraron sitios de N-myristoilación, fosforilación y glicosilación. Por otra parte, se determinó que estaba relacionada con las proteínas transcetolasa, 1 Deoxy-D-Xilulosa-5 fosfato reductoisomerasa (PRK) y una ATPasa de transporte, lo que sugiere su posible relación con el metabolismo central del parásito (Hidalgo, 2010)

Objetivos

General

Caracterizar molecularmente la proteína Pv-110 en especies del género *Plasmodium*.

Específicos

1. Determinar si la proteína Pv-110 se expresa en distintas especies del género *Plasmodium*.
2. Investigar si la proteína Pv-110 es secretada fuera del GRP.
3. Conocer si la proteína Pv-110 se expresa en todos los estadios del ciclo eritrocítico del parásito.
4. Amplificar la secuencia del gen que codifica para la proteína Pv-110 y determinar si es conservada en diferentes especies del parásito.

Materiales y métodos

Muestras:

Se utilizaron muestra de sangre periférica de individuos con diagnóstico parasitológico de malaria (n=88), residentes de diversos estados endémicos de malaria en Venezuela como Amazonas (n=28), Bolívar (n= 30), Miranda (n= 20) y Sucre (n = 10). Estas muestras se tomaron previo consentimiento informado dentro del marco del proyecto “Epidemiología, Inmunobiología y Diagnóstico de la Malaria” y se encuentran almacenadas en el banco de muestras del Laboratorio de Inmunoparasitología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Además, se utilizaron muestras de Suero/Plasma, Orina y GR obtenidas a partir de ratones (NMR1) infectados con *P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii*; y muestras de cultivo celular de *P. chabaudi* y *P. yoelii*. Aprobado por el comité de bioética del IVIC, tomadas dentro del marco de los proyectos “Elucidación estructural de una helicasa de *Plasmodium vivax*: búsqueda diseño y su tesis de posibles inhibidores” y “Evaluación de la susceptibilidad de *Plasmodium* sp. a compuestos de malaria box en el desarrollo eritrocítico”.

También, se utilizaron muestras de *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. vivax* obtenidas mediante la técnica de Cromatografía de Inmunofinidad proporcionadas por: Msc. Ninomar Mundaray, quien trabajaba en el Laboratorio de Inmunoparasitología del IVIC.

Para la realización del protocolo IFA, se utilizaron láminas portaobjeto multtipozo para microscopía fijadas con acetona, las cuales se encontraban almacenadas en el banco de muestras del Laboratorio de Inmunoparasitología del IVIC.

Para cumplir los siguientes objetivos específicos: Determinar si la proteína Pv110 se expresa en distintas especies del género *Plasmodium*; investigar si la proteína Pv110 es secretada fuera del GRP y conocer si la proteína Pv110 se expresa en todos los estadios del ciclo eritrocítico del parásito. Se realizó la siguiente metodología:

Realización de frotis de sangre parasitada.

Para la realización del extendido se depositó una gota de sangre en el centro de una lámina (porta objetos) limpia. El extendido se realizó empleando el borde de otra lámina (limpia y estéril), la gota fue extendida por toda la superficie desde del medio hasta un extremo de la misma, como se puede apreciar en la *figura 4*.

Para la realización de la técnica de gota gruesa, se depositó una gota de sangre en el centro de una lámina (porta objetos) limpia. Y empleando la punta de otra lámina (limpia y estéril), se extiende de manera circular para realizar una película gruesa de alrededor de un centímetro de diámetro.



Figura 4. Técnica de extendido y gota gruesa, diagnóstico parasitológico.

Tomado de Basic MALARIA MICROSCOPY. Part I. Learner's guide.

Tinción Giemsa.

Giemsa es la tinción estándar para láminas de diagnóstico de malaria, es la técnica con mayor fiabilidad. Se preparó en una botella oscura (ámbar) se agregó 3,8 g de colorante Giemsa y 250 mL de metanol, se agitó hasta mezclar bien (2-3min) y se agregó 250 mL de glicerol. Se coloca la lámina con el extendido, se deja secar la muestra y se fija con metanol durante unos 3 minutos; luego se cubrió la extensión con la tinción y se dejó actuar durante 25 minutos. Una vez transcurrido el tiempo estimado, se escurrió el exceso de tinción con agua (Modificado de WHO, 1983).

Aislamiento de Proteínas totales de GRP.

Se realizó el aislamiento de proteínas totales de sangre infectada con *Plasmodium*. Se centrifugó la alícuota a velocidad máxima durante 5 min, se descartó el sobrenadante de la muestra centrifugada y se resuspendieron los GR 1/9 (v/v) en solución tampón de lisis (SDS 1,25%; Tris-HCL 300mM; NaCl 60mM; Sacarosa 5%; EDTA 10mM) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM; iodoacetamida 1mM; TLCK 1mM; EDTA 1mM; aprotinina $7,6 \times 10^{-3}$ mM; leupeptina $4,2 \times 10^{-2}$ mM; pepstatina 10,03 mM; fenantrolina 10 mM).

Las células lisadas se centrifugaron a 2.700 g durante 5min, se colectó el sobrenadante y se mezcló con tampón de muestra (Tris-HCL 0,5M pH 6.8; SDS 10%; Glicerol 20% y Bromofenol 0,04%) en proporción 3/1 (v/v), suplementado con DTT 100mM. Para luego llevar a ebullición durante 5 min (Modificado de Harris & Angal, 1989).

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Para observar las proteínas se realizó una corrida en un gel SDS- PAGE 15%. Se preparó un gel separador o inferior al 12% de 10mL: 3,76 ml agua bidestilada ddH₂O; 3,76mL acrilamida 40%/bis; 2,5mL Tris 1,5M, pH 8,8; 100µL persulfato de amonio 10%; 10µL TEMED. Para preparar el gel de *stacking* o apilamiento al 4% de 5mL: 3,13mL agua bidestilada ddH₂O; 0,6mL 40% acrilamida/bis; 1,25mL tris 1,5, pH 6,8; 50µL persulfato de amonio 10%; 4µL TEMED. Se teñirá el gel con azul de Coomasie R-250, siguiendo las indicaciones recomendadas por la casa comercial BIO-RAD.

Slot Blot.

En una cámara de *Slot Blot* se colocó una membrana de nitrocelulosa previamente cortada al tamaño necesario de la cámara de vacío para *Slot Blot*, se identificó cual será el frente de la membrana. Se sembró entre 20 µL y 50 µL de las proteínas totales aisladas de sobrenadante y taco de cultivo sincronizados de GR parasitados con *P. chabaudi*, en cada pocillo; se dejó secar la membrana con la bomba de vacío al menos durante 1 hora (Modificado de Harris & Angal, 1989). Además, se sembró muestras de proteínas aisladas de sangre, orina y suero de ratones balb/c infectados con *P. chabaudi* y de muestras de sangre a diferentes porcentajes de parasitemia de *P. yoelii* y *P. berghei*.

Revelado de *Blot*.

Una vez la muestra estuvo fija en la membrana de nitrocelulosa se colocó en un recipiente con tampón de lavado (EDTA 1mM pH8 + Tritón X100 0,1 % en PBS 1X) hasta cubrir la membrana para posteriormente ser colocada en agitación constante, se le retiró todo el tampón de lavado y se procedió a descartar. Luego se incubó durante 1 hora con tampón

de bloqueo (4% BSA en PBS-Tritón X100), se retiró y descartó todo el líquido del recipiente. Se procedió a incubar 1 hora con el anticuerpo primario monoclonal 7C5- G33 diluido 1/2500 (v/v) en BSA 4% en Tritón X100. Se procedió a lavar rápidamente 2 veces con PBS – Tritón X100; se realizó una serie de lavados, un lavado de 1 min con Urea-glicina- Tritón (2M Urea; 0,1 M Glicina; 0,1% Tritón 100X), luego 4 lavados de 10 min con PBS- Tritón X100; entre lavado y lavado, se retiró y se descartó el líquido. Luego se dejó incubar 1 hora con el anticuerpo secundario un anti-ratón o anti-humano (según el caso) IgM marcado con peroxidasa diluido 1/5000 (v/v) en BSA 4% - Tritón X100, en oscuridad, de aquí en adelante los pasos se realizan en oscuridad. Después de la incubación se procedió a lavar rápidamente 2 veces con PBS – Tritón X100; después se realizó una serie de lavados, un lavado de 1 min con Urea-glicina- Tritón (2M Urea; 0,1 M Glicina; 0,1% Tritón 100X), luego 4 lavados de 10 min con PBS- Tritón X100; entre lavado y lavado, se extrae y se descartó el líquido.

Posteriormente se reveló la membrana en una placa de auto radiografía por método convencional fotográfico utilizando luminol. (Modificado de Harris & Angal, 1989).

Determinación de proteínas fosforiladas con Pro-Q® Diamond.

Después de haber realizado el gel de poliacrilamida, se le hizo una tinción con Pro-Q® Diamond (Invitrogen™). Lo primero que se le hizo al gel de poliacrilamida fue fijar las proteínas en 100mL de solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético) dos veces por 30 min, después se realizaron tres lavados con agua ultra pura de 10 min cada uno, la coloración/tinción se hizo incubando en oscuridad en un período entre 60-90 min con Pro-Q® Diamond, al finalizar se procedió a colocar el gel en 100mL de solución decolorante (20% acetronilo, 50 mM acetato de sodio; pH 4) tres veces por 30 min, después se realizó 2 lavados de 5 min en 100 mL de agua ultra pura; según instrucciones de la casa comercial.

Tinción SYPRO® Ruby red de geles de poliacrilamida.

Se colocó el gel durante 15 en 100mL solución fijadora [50% metanol; 7% ácido acético] dos veces, para la tinción se colocó el gel en 60 mL de la solución de SYPRO® Ruby red (Invitrogen™) durante toda la noche, para luego lavarla en 100 mL por 30 min de solución descolorante [10% metanol; 7 ácido acético]. Según instrucciones de la casa comercial.

Microscopía de Inmunofluorescencia - Protocolo IFA con Anticuerpo monoclonal

En láminas de microscopía multipozo con células previamente fijadas con acetona, de sangre anticoagulada de ratón (5 – 10 % parasitemia) o humano se incubaron con albumina sérica bovina (BSA) 3% en PBS; 1 hora a temperatura ambiente; luego se le colocó el AcMon 7C5-G33 diluido 1/1000 en BSA 3% + 0,1 % tritón 100X en PBS, sirviéndose 20µL por pozo y se incubó a 37 °C por una hora en cámara húmeda. A continuación, se realizaron 3 lavados del AcMon con 0,01 % Tritón 100X en PBS por 10 min cada uno. Una vez realizado los lavados, se preparó el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-humano IgM conjugado con Rodamina B diluido 1/2000 en BSA 3% - 0,01 % Tritón 100X en PBS, sirviéndose 20µL por pozo, se procedió a incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se le realizaron nuevamente 3 lavados del anticuerpo con 0,01 % Tritón 100X en PBS por 10 min cada uno. Se dejó secar, luego se colocó la solución de montaje, Mowiol – DABCO y se cubrió con una laminilla.

Para cumplir el objetivo específico: Amplificar la secuencia del gen que codifica para la proteína Pv110 y determinar si es conservada en diferentes especies del parásito. Se realizará la siguiente metodología:

Muestras

Se tomaron muestras de sangre periférica de individuos con diagnóstico parasitológico de malaria, residentes de diversas zonas endémicas en Venezuela (Estados Miranda, Bolívar, Amazonas y Sucre). Estas muestras se tomaron previo consentimiento informado en el marco del proyecto “Epidemiología, Inmunobiología y Diagnóstico de la Malaria” y se encuentran almacenadas en el banco de muestras del Laboratorio de Inmunoparasitología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Extracción de ácidos nucleicos (aislamiento de ADN).

A 88 de muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico parasitológico de malaria, 20 muestras del edo. Miranda, 28 del edo. Amazonas, 30 del edo. Bolívar y 10 del edo. Sucre se le realizó centrifugación para separar el sedimento de GR del plasma sanguíneo. Al taco de GR obtenido, se le agregó un volumen en proporción 1/9 (v/v) de buffer de lisis (50 mM tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS Y 50 mM NaCl), y se procedió a mezclar por inversión o vortex.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó a velocidad máxima (10.600 g) por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se descartó el sedimento. Al sobrenadante colectado se le agregó 1 volumen de una mezcla Cloroformo:Fenol y se centrifugó a 10.600 g por 10 min, se recuperó la fase acuosa o soluble (dónde se encuentra los ácidos nucleicos) y se repitió el procedimiento una vez más. A la fase acuosa que se recuperó se le agregó 2,5 volúmenes de

etanol 100%, la mezcla se centrifugó a velocidad máxima por 10 min. El sobrenadante fue descartado y al sedimento se le agregó 500 µL de etanol al 70% e igualmente se centrifugó a velocidad máxima por otros 10 min, finalmente se descartó y se secó en un rotaevaporador al vacío, los ácidos nucleicos purificados serán resuspendidos en 50 µL de H₂O ultra pura y se solubilizarán colocándolos en una plancha de calentamiento a 45 °C por 5 min. (Modificado de Sambrook y *col.*,1989)

Integridad del ADN.

Para verificar la integridad del ADN y conocer si la extracción de ácidos nucleicos se hizo correctamente se realizó una electroforesis de corrida horizontal en gel de Agarosa (Invitrogen™) al 1%. Para preparar el gel se disolvió 1g de agarosa en 100mL de buffer Tris-Borato EDTA (TBE) [Tris Base 0,089 M; Ác. Bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M] y se calentó hasta que la solución estuviera homogénea, se agregó SYBR™ Safe DNA (Invitrogen™) a la solución como revelador fluorescente antes de que ésta polimerizara. Por cada bolsillo se sirvió 10 µL de muestra y 3 µL de 6X Blue/Orange Loading Dye (Promega™) y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™). (Modificado de Sambrook & Russell, 2006)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada para identificación de *Plasmodium sp.*

Debido a que es necesario determinar la especie infectante en cada una de las muestras a estudiar, se realizó diagnóstico molecular mediante un PCR anidado especie específico.

Siguiendo el protocolo de diagnóstico propuesto por Snounou G y col. (1993) y modificado por Singh y col. (1999), donde se amplifican los genes de la sub unidad 18S de ARN ribosomal del género *Plasmodium*.

Ronda 1 género específica: se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos rPLU1 (5' – TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA – 3') y rPLU5 (5'- CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC – 3') que amplifican una región de 1640 pb. Siguiendo el siguiente protocolo: para un volumen total de 25 µL: 12,5 µL de Master Mix (1X) (Promega™), 2µL de rPLU1 (10 mM), 2 µL de rPLU5 (10mM), 5 µL de ADN y 3,5 µL de H₂O ultra pura.

Ronda 2 género específica: se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos rPLU3 (5'- TTT TTA TAA GGA TAA CTA GGG TGT – 3') y rPLU4 (5'- TAC CGG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC- 3') quienes amplifican una región de 240 pb. Siguiendo el siguiente protocolo: para un volumen total de 25 µL: 12,5 µL de Master Mix (1X) (Promega™), 2µL de rPLU3 (10 mM), 2 µL de rPLU4 (10mM), 3 µL de producto de la ronda 1 y 5,5 µL de H₂O ultra pura.

Ronda 3 especie específica: se utilizarán 3 grupos de oligonucleótidos, un par para amplificar una región específica del gen en *P. vivax*, un par para amplificar la región especie específica del gen *P. malariae* y otro par para amplificar la región específica del gen en *P. falciparum*. Se seguirá el siguiente protocolo: para un volumen total de 25 µL: 12,5 µL de Master Mix (1X) (Promega™), 2µL de primer 1 (10 mM), 2 µL de primer 2 (10mM), 3 µL de producto de la ronda 2 y 5,5 µL de H₂O ultra pura. Para *P. falciparum*, oligonucleótidos rFAL1 (5'- TTA AAC TGG AAA ACC AAA TAT ATT – 3') y rFAL2 (5'– ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA ACT CCC GTC- 3') que amplifican una región de 205 pb. Para *P. vivax*, oligonucleótidos rVIV1 (5' – CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA

TAC – 3’) y rVIV2 (5’ – ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AA TCC TTA – 3’) que amplifica una región de 117 pb. Para *P. malariae*, oligonucleótidos rMAL1 (5’ – ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC – 3’) y rMAL2 (5’- AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA – 3’) que amplifica una región de 144 pb.

Las condiciones en el termociclador para la ronda 1 de amplificación fue: 94°C x 4 min; [94° C x 30 s; 55° C x 1 min; 72 ° C x 1 min] 35 ciclos; 72° C x 4 min; mientras que las condiciones en el termociclador para las rondas 2 y 3 de amplificaciones fueron: 94°C x 4 min; [94° C x 30 s; 62° C x 1 min; 72 ° C x 1 min] 35 ciclos; 72° C x 4 min.

Posteriormente se realizó análisis por electroforesis en gel de Agarosa (Invitrogen™) al 2 % para observar los resultados de la PCR anidada, utilizando SYBR™ Safe DNA (Invitrogen™) como revelador, en cada pozo se sembrará 5 µL de muestra con 3µL 6X Blue/Orange Loading Dye (Promega™) y se utilizará un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

Diseño de oligonucleótidos.

Con el código de acceso de la secuencia nucleotídica que se obtuvo a través de la secuencia aminoacídica de la proteína (Hidalgo, 2010), se buscó la secuencia en el banco de genes del *National Center for Biotechnological Information* (NCBI). Se realizó el análisis de la secuencia buscando alineamientos con otras especies de *Plasmodium* a ver si en sus cromosomas presentan secuencias homólogas con la secuencia nucleotídica de la proteína *pv-110*, a las secuencias homólogas se le realizó un análisis con el programa MEGA 7 para determinar distancia evolutiva. Además de alinear y comparar la secuencia *pv-110* con secuencias de humanos y otras especies de parásitos para ver si existen secuencias

compartidas con el gen de interés. Una vez hechos todos los análisis de las secuencias, se procedió a escoger regiones conservadas en el gen, que no eran compartidas con ninguna otra especie de *Plasmodium*, ni de otros parásitos o humanos; se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos con el programa OligoExplorer (2010) de GeneLink™, Inc que amplifican 4 regiones distintas de ± 800 pb.

Una vez diseñados los oligonucleótidos se probaron en el explorador de *Primer Blast* para determinar eficiencia y si sólo amplificaban la secuencia deseada (ver oligonucleótidos en la sección de resultados: *tabla 4*).

Amplificación por PCR del gen de *pv-110*.

Una vez diseñado los oligonucleótidos se procedió a la amplificación del gen que codifica para *pv-110*.

Utilizando los oligonucleótidos AM1-AM2:

Siguiendo el siguiente protocolo: para un volumen total de 25 μ L: 12,5 μ L de Master Mix (1X) (Promega™), 2 μ L de AM1 (10 mM), 2 μ L de AM2 (10mM), 5 μ L de ADN, 0,4 μ L de MgCl₂, 1,5 μ L de Betaina y 1,6 μ L de H₂O ultra pura.

Las condiciones en el termociclador para la ronda de amplificación fueron: 94°C x 4 min; [94° C x 30 s; 64,5° C x 1 min; 72 ° C x 1 min] 35 ciclos; 72° C x 4 min.

Utilizando los oligonucleótidos AM3A-AM3B, AM4A-AM4B y AM5A-AM5B:

Siguiendo el siguiente protocolo: para un volumen total de 25 μ L: 12,5 μ L de Master Mix (1X) (Promega™), 2 μ L de AM1 (10 mM), 2 μ L de AM2 (10mM), 5 μ L de ADN, 0,4 μ L de MgCl₂ y 3,1 μ L de H₂O ultra pura.

Las condiciones en el termociclador para la ronda de amplificación fueron: 94°C x 4 min; [94° C x 30 s; Gradiente de temperatura 48°C- 61°C (*ver tabla 6*) x 2 min; 72 ° C x 1 min] 35 ciclos; 72° C x 4 min.

Evaluación *in silico* de las secuencias.

Una vez determinadas las secuencias nucleotídicas homólogas con la secuencia de *pv-110*, se procedió a realizar análisis en los siguientes portales: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) y en los programas los programas: BioEdit (versión 7.2.6.1), MEGA 7 (versión 7.0.26).

Resultados

Para determinar si la proteína *pv110* se expresa en distintas especies del género

***Plasmodium*:**

Detección de proteínas mediante *Slot Blot*:

En muestras de proteínas totales aisladas de sangre humana infectada con *P. vivax* (figura 5) y *pools* de muestras de sangre de individuos infectados por *P. vivax* (figura 6), podemos apreciar que hay reconocimiento por parte del AcMon 7C5-G33 hacia la proteína Pv-110.

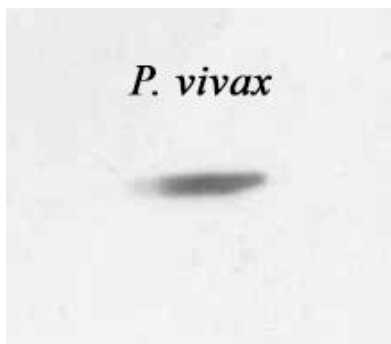


Figura 5. *Slot Blot* de proteínas totales de *P. vivax*. Resultado señalado con *P. vivax* en la imagen, observamos el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por la proteína pv-110 en la muestra.

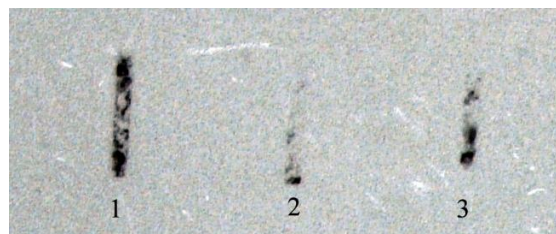


Figura 6. *Slot Blot* de proteínas totales de *P. vivax* obtenida en agrupaciones de muestras de sangre de pacientes.

Observamos el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por la proteína pv-110 en las muestras señaladas como 1, 2 y 3 en la imagen, cada una perteneciente a una agrupación distinta.

Por otro lado, observamos que el AcMon 7C5-G33 reconoce a símiles antigénicos en muestras de sangre de ratón infectada por *P. chabaudi* (figura 7), *P. yoelii* y *P. berghei* (figura 8).

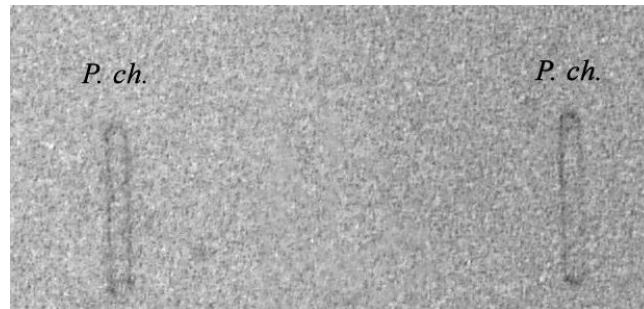


Figura 7. *Slot Blot* de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por *P. chabaudi*.

Observamos el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por símiles antigénicos de la proteína pv-110 en la muestra., señalado como P.ch. en la imagen.

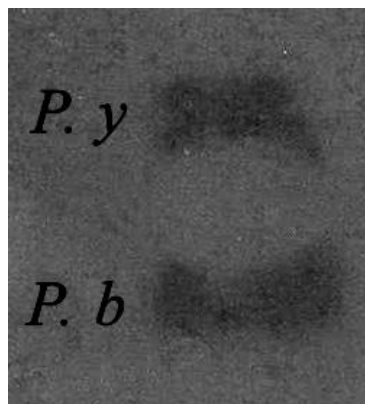


Figura 8. *Slot Blot* de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por *P. yoelii* y *P. berghei*.

Señalados en la figura a *P. yoelii* como P. y y *P. berghei* como P. b, observamos el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por símiles antigénicos de la proteína pv-110 en las muestras.

El anticuerpo monoclonal 7C5-G33 reconoce a símiles antigénicos de la proteína de pv-110 en muestras de sangre infectada por *P. chabaudi* y *P. berghei* (figura 9), en la figura no sólo observamos un control positivo señalado como Cp proveniente de la proteína pv-110

aislada por cromatografía en columna de inmutofafinidad de sangre infectada por *P. vivax*, sino, que además, podemos tener una idea de la sensibilidad del método de detección a diferentes niveles de parasitemia en sangre de ratón infectada por *P. chabaudi* y por *P. berghei*, como en parasitemia bajas en el caso del pocillo señalado como *P. berghei* cuya parasitemia era menor a 1 %, considerando que un índice parasitario de 1% en infecciones por *Plasmodium* en humanos ya se considera elevada (Alger, 2001) y la media para un paciente infectado es un índice de parasitemia de 10^{-3} % o 10^{-4} %.

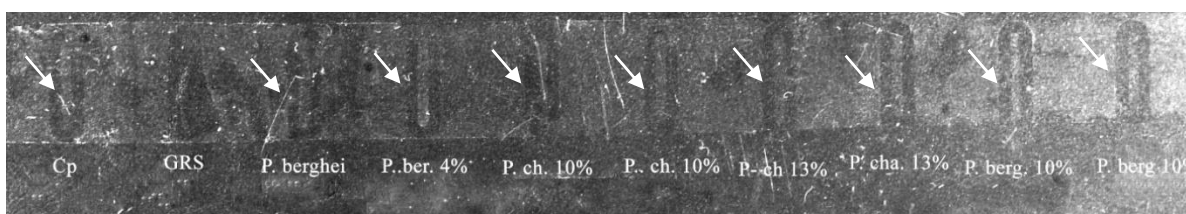


Figura 9. *Slot Blot* de proteínas totales obtenida a partir de sangre de ratón infectado por *P. chabaudi* y *P. berghei*.

Muestras a distintas parasitemia, observamos el reconocimiento del anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por la proteína pv-110 en las muestras (flecha blanca). Cp =control positivo, GRS= glóbulos rojos sanos, P. berg =*P. berghei* y P.ch. =*P. chabaudi*.

Inmunofluorescencia:

Se realizaron ensayos de microscopia de inmunofluorescencia con el AcMon 7C5-G33 para ubicar la proteína en glóbulos rojos infectados con *P. chabaudi*, *P. falciparum*, *P. yoelii*, *P. malariae*, *P. vinckei* y *P. berghei* para determinar si éste AcMon reconocía a símiles antigénicos en otras especies del género *Plasmodium* no evaluadas previamente.

En las imágenes de microscopia de inmunofluorescencia de *P. chabaudi* (figura 10 y 11), se observa la florescencia en toda la célula, lo que corresponde a la membrana de la célula (glóbulo rojo parasitado), en concordancia a lo que se obtuvo en el *Slot Blot* (figura 7). En la figura 10 no sólo se observa la fluorescencia en el glóbulo rojo parasitado también

la podemos observar en el medio extracelular, quedando plasmado que la proteína sale del GRP; en la *figura 11* se puede apreciar fluorescencia en dos células.

En *P. berghei* (*figura 16* y *17*) se puede ver como toda la membrana del glóbulo rojo emite fluorescencia, correspondiendo a que la proteína se encuentra también en esta especie de *Plasmodium* como se obtuvo en *el Slot Blot* (*figura 8*), además en ambas *figura 16* y *17* se puede apreciar fondo en la imagen, lo que concierne al medio extra celular correspondiendo con lo observado en las otras especies *P. chabaudi* (*figura 10*) y *P. yoelii* (*figura 13*) que la proteína es exportada fuera del glóbulo rojo parasitado, siendo así que el medio extracelular observado en la *figura 14* y la *figura 15* obtengamos florescencia, pero se desconoce el estadio de desarrollo del parásito al momento de la fijación.

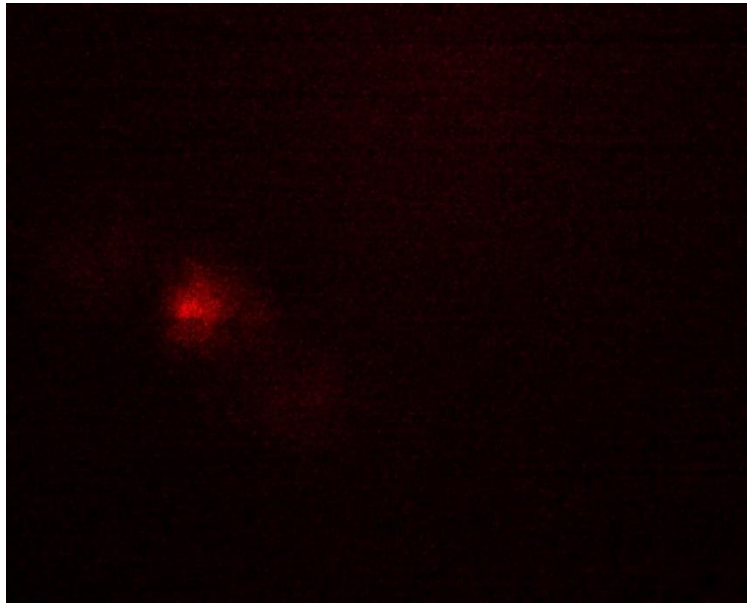


Figura 10. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectado con *P. chabaudi*. El GRP es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33. La proteína emite fluorescencia en toda la membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado.



Figura 11. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. chabaudi*. El GRP es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33. La proteína emite fluorescencia en toda la membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado.

En *P. falciparum* (figura 12), *P. vinckei* (figura 15) y *P. malariae* (figura 14) no se observó fluorescencia, ni en la célula, ni en el medio extracelular. En *P. yoelii* (figura 9) se puede apreciar fluorescencia en la célula parasitada, lo que corresponde a la membrana celular y en el medio extracelular lo que coincide con los resultados anteriores para *P. chabaudi* (figura 10) y para la presencia de un similar antigénico de pv-110 en *P. yoelii* obtenido en el *Slot Blot* (figura 8).



Figura 12. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*. No hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.

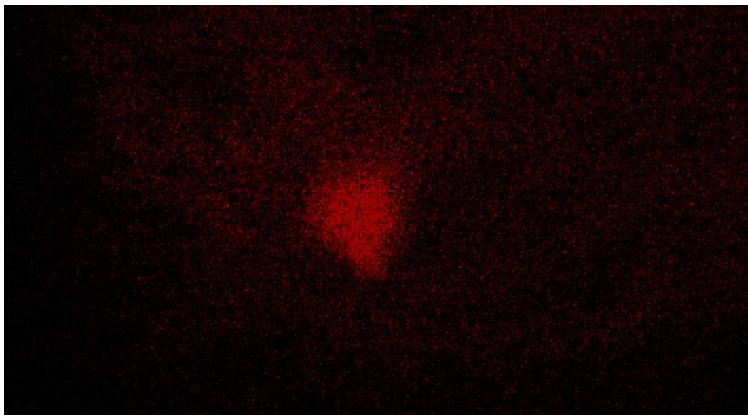


Figura 13. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. yoelii*. El GRP es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33. La proteína emite fluorescencia en toda la membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado y en el medio extracelular.



Figura 14. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. malariae*. No hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.

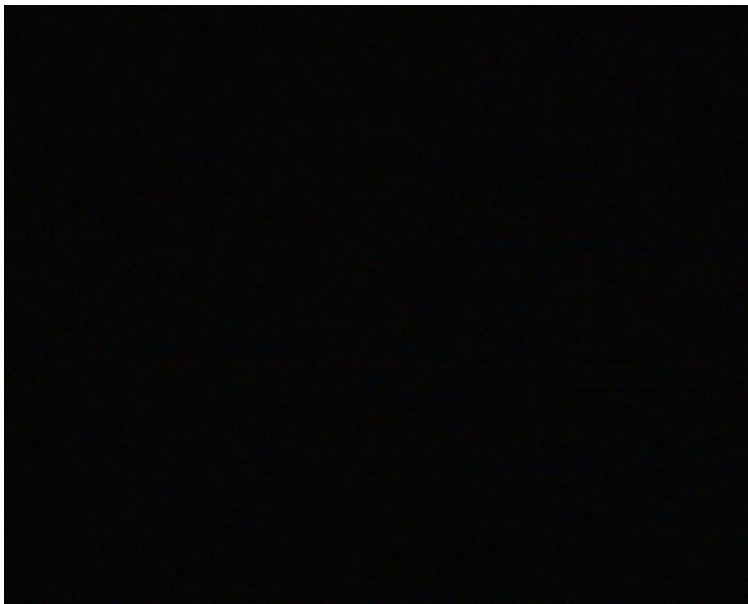


Figura 15. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. vinckei* no hay reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33 por el GRP.

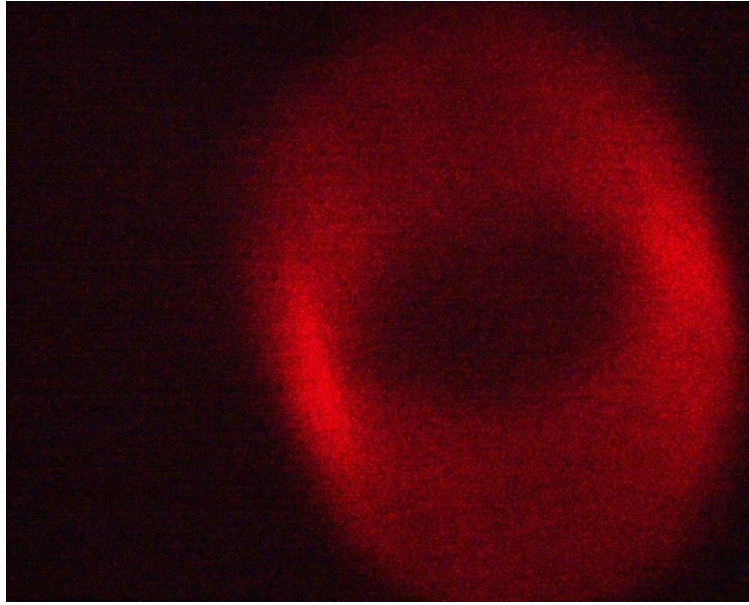


Figura 16. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectados con *P. berghei*. El GRP es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33. La proteína emite fluorescencia en toda la membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado y en el medio extracelular.

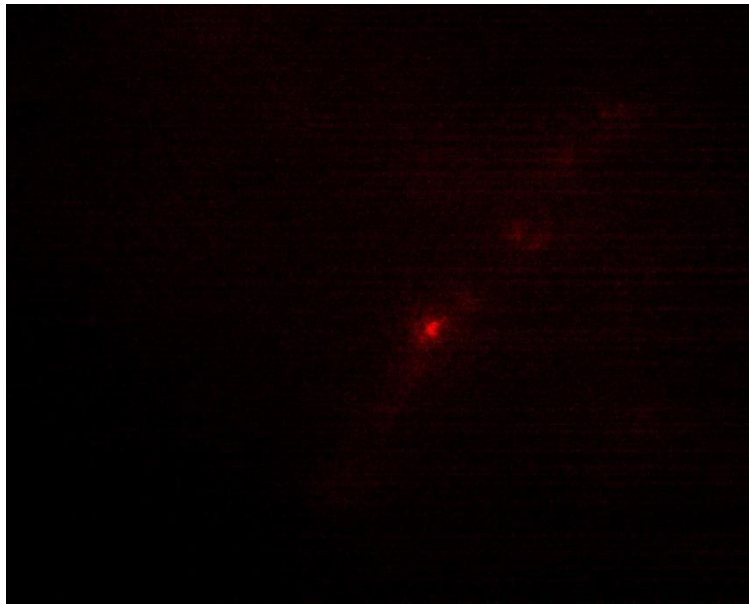


Figura 17. Microscopia de Inmunofluorescencia, glóbulos rojos infectadas con *P. berghei*. El GRP es reconocido por el anticuerpo monoclonal 7C5-G33. La proteína emite fluorescencia en toda la membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado y en el medio extracelular.

Detección de proteínas fosforiladas con Pro-Q® Diamond y tinción con SYPRO® Ruby red:

Para determinar si la proteína *pv-110* es fosforilada, debido a que se encontraron motivos de fosforilación en la secuencia aminoacídica reportado por Hidalgo (2010), se realizó un gel de poliacrilamida con proteínas obtenidas previamente mediante cromatografía en columna de inmunoafinidad de *pools* de muestras, uno de sangre de pacientes infectados por *P. vivax*, uno de sangre de ratón infectado por *P. berghei* y otro por *P. yoelii*, sin distinción de estadios de desarrollo. Se utilizó primero tinción con Pro-Q® Diamond (*figura 19*) para observar proteínas fosforiladas y una posterior una tinción con SYPRO® Ruby red (*figura 18*) para teñir todas las proteínas. Sólo se observó fluorescencia en las muestras de *P. yoelii* señaladas con una ovalo blanco en la *figura 15*.

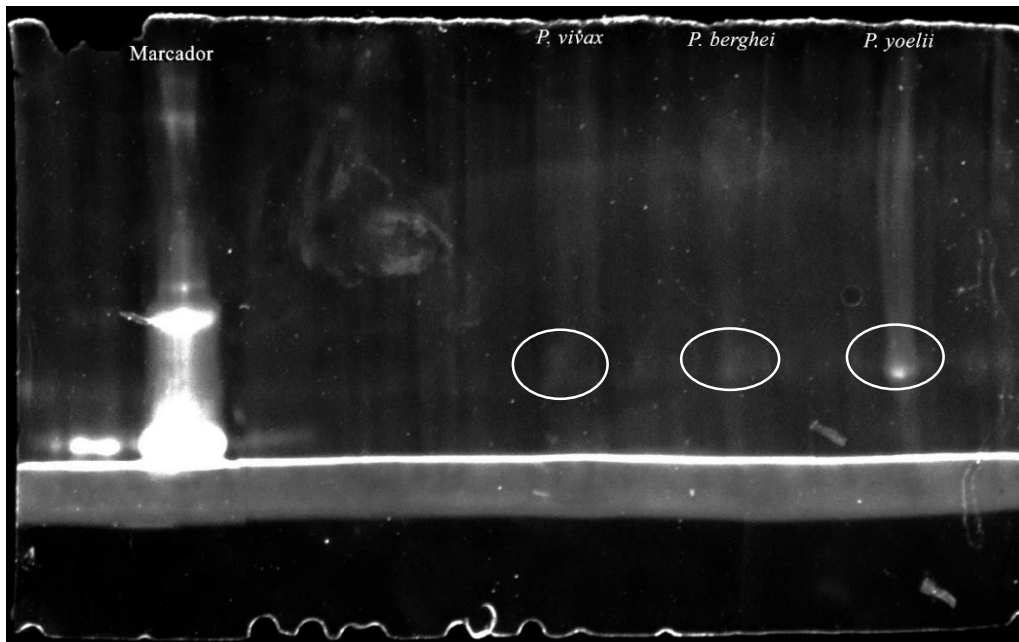


Figura 18. Gel de poliacrilamida teñido con SYPRO® Ruby red de Pv-110. Proteínas aisladas mediante cromatografía en columna de inmunoafinidad de muestras de sangre de humana infectada con *P. vivax* y de muestras de sangre de ratón infectada con *P.*

berghei y *P. yoelii*. Se observa fluorescencia al teñir las proteínas, éstas son señaladas por un ovalo blanco.

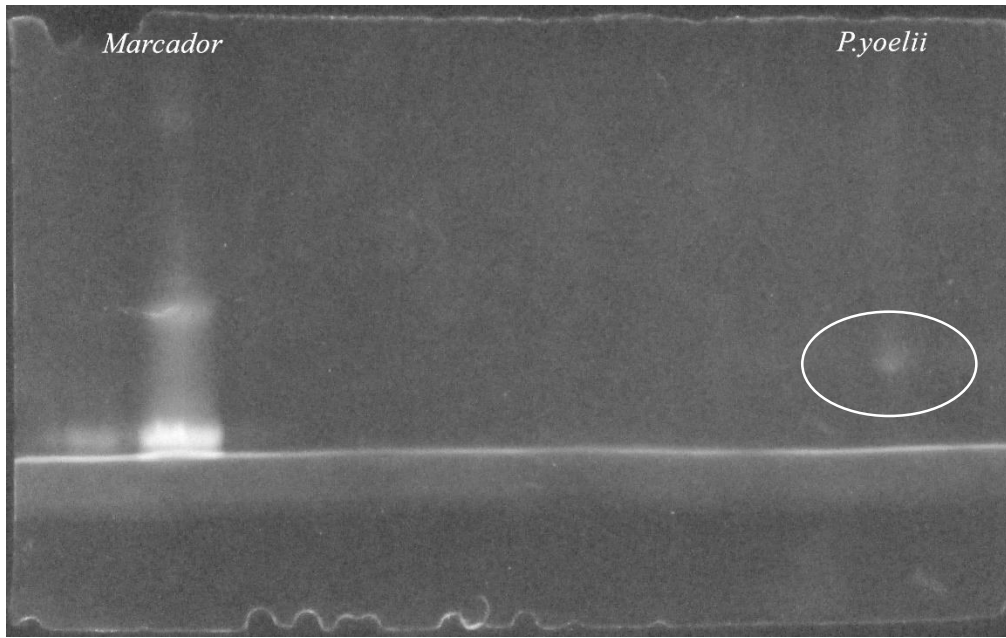


Figura 19. Gel de poliacrilamida teñido con Pro-Q® Diamond de Pv-110. Proteínas aisladas mediante cromatografía en columna de inmunoafinidad de muestras de sangre de humana infectada con *P. vivax* y de muestras de sangre de ratón infectada con *P. berghei* y *P. yoelii*. Se observa fluorescencia cuando la proteína esta fosforilada al momento de la tinción, ésta es señalada por un ovalo blanco.

Para investigar si la proteína pv110 es secretada fuera del GRP.

Se realizó detección de proteínas mediante *Slot Blot*:

Utilizando el AcMon 7C5-G33 sobre sobrenadante de cultivo de *P. chabaudi* y muestras de orina y plasma de ratón infectado con *P. chabaudi* (figura 20), obteniéndose resultados positivos, confirmando que la proteína sale del GRP y la podemos encontrar en el medio extracelular. Además, también la pudimos detectar en orina y en plasma de ratones infectados con *P. yoelii* (figura 21). Mientras que en la figura 22 se puede observar que podemos encontrarla a diferentes porcentajes de parasitemia y estadios diferenciales en muestras de

orina de ratón infectado con *P. berghei*, dónde evaluamos parasitemias de 1,5 % de anillos y 4% de trofozoítos.

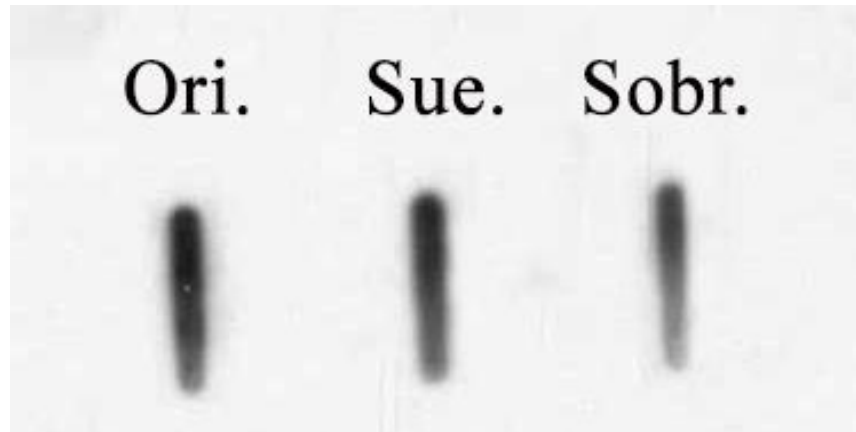


Figura 20. *Slot Blot* de proteínas aisladas de orina, suero sanguíneo y sobrenadante de cultivo de *P. chabaudi*.

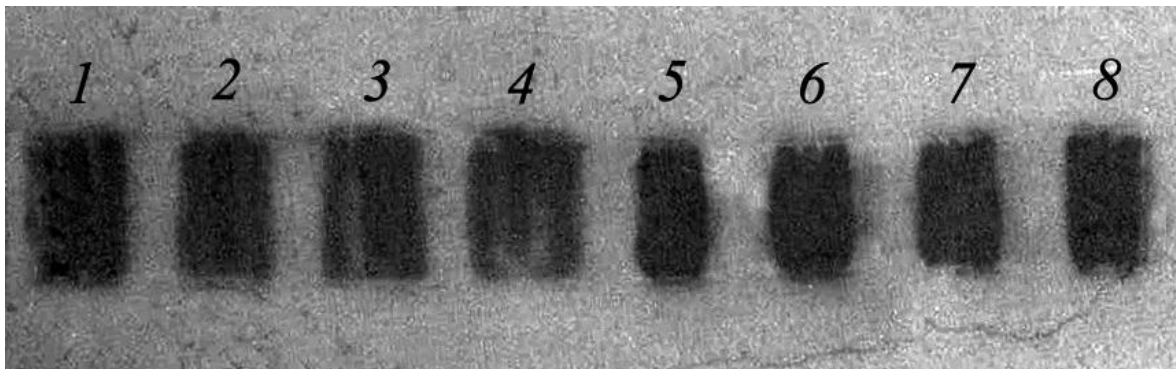


Figura 21. *Slot Blot* de proteínas de *P. yoelii* en orina y suero sanguíneo.

Proteínas aisladas mediante cromatografía en columna de inmunoafinidad de plasma sanguíneo (bolsillos del 1 al 4) y de orina (bolsillos del 5 al 8) de ratones infectados con *P. yoelii*.

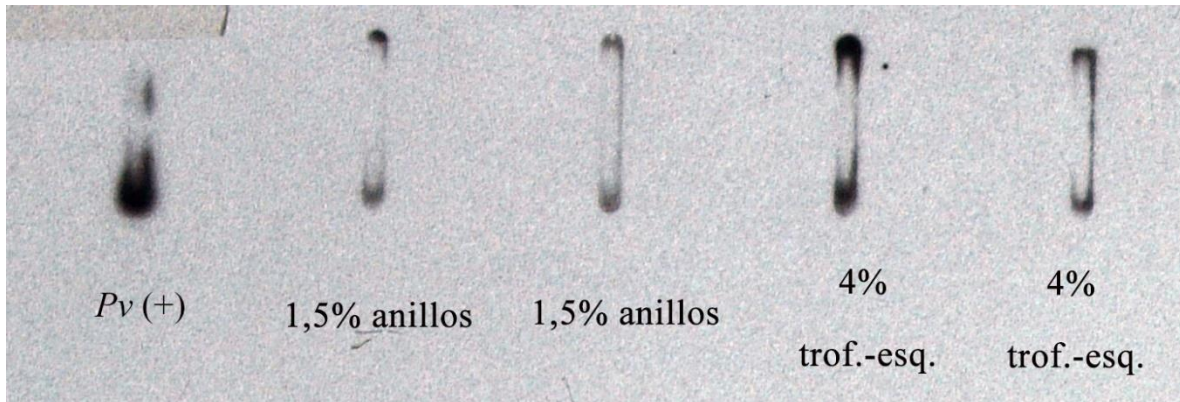


Figura 22. *Slot Blot* de proteínas de *P. berghei* en orina. Proteínas aisladas mediante cromatografía en columna de inmunoafinidad de orina de *P. berghei* a diferentes parasitemia: 1,5 % de anillos y 4% de trofozoítos y esquizontes.

Para conocer si la proteína Pv110 se expresa en todos los estadios del ciclo eritrocítico del parásito.

Como método de identificación de los estadios eritrocíticos en los distintos *Plasmodium* que se utilizaron en esta investigación se realizó frotis sanguíneo para reconocer el desarrollo de éstos en los eritrocitos infectados, se observó por microscopia de luz estadios de anillo, trofozoíto maduro) y esquizontes para *P. chabaudi* (figura 23); trofozoítos (inmaduro y maduro) y esquizontes para *P. vivax* (figura 24) y por último estadios de anillo y trofozoítos maduros para *P. yoelii* (figura 25).



Figura 23. Estadios eritrocíticos (anillo, trofozoíto y esquizonte) de *P. chabaudi* visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de ratón infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.

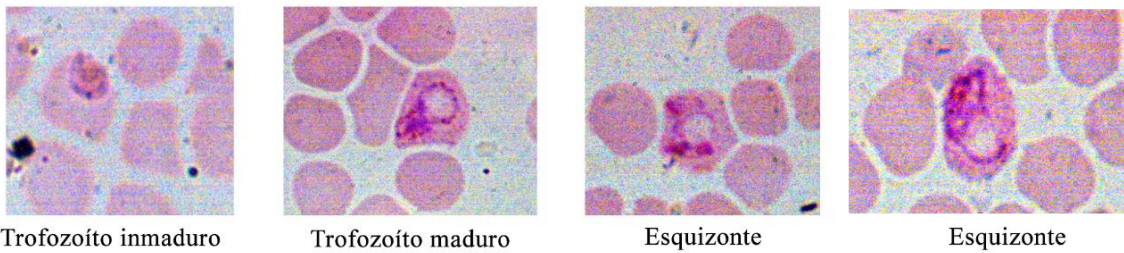


Figura 24. Estadios (trofozoíto y esquizonte) de *P. vivax* visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de paciente infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.

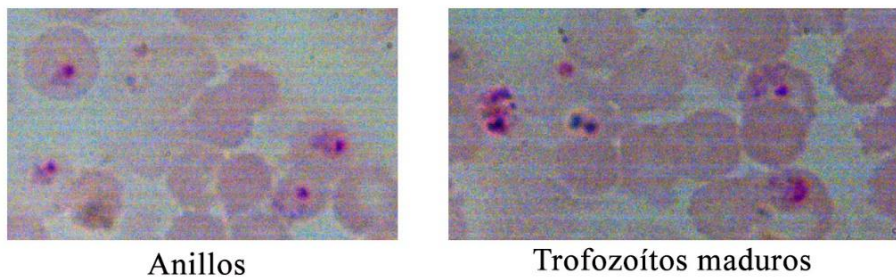


Figura 25. Estadios (anillo y trofozoíto) de *P. yoelii* visto mediante técnica de frotis sanguíneo de sangre de paciente infectada, tinción Giemsa. Microscopia de luz 100X.

Se realizó un *Slot Blot* con el AcMon 7C5-G33 frente a proteínas totales, aisladas de diferentes tiempos de un cultivo sincronizado de *P. chabaudi* (figura 26) y *P. yoelii* (figura 27), lo que permitió garantizar tener todos los estadios del ciclo eritrocítico del parásito en el cultivo: anillos a las 5 horas, trofozoítos a las 10 horas y esquizontes a las 22 horas, y se observó reacción positiva en todos los casos, lo que significa que la proteína se expresa en todos los estadios eritrocíticos de estos parásitos. Adicionalmente, en el caso de *P. yoelii* se evaluó la presencia de la proteína en los mismos tiempos en la fracción celular y en el sobrenadante (medio de cultivo) y se pudo observar que en todos los tiempos estudiados la proteína fue secretada.

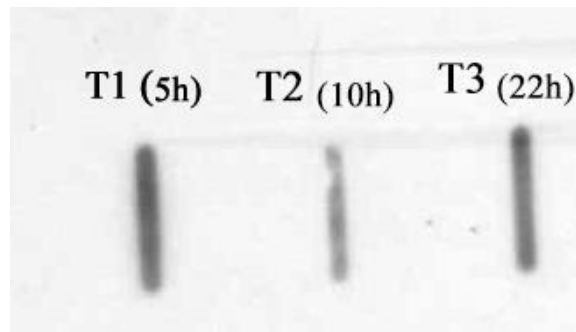


Figura 26. *Slot Blot* de proteínas aisladas de cultivo sincronizado de *P. chabaudi*.

Proteínas aisladas a diferentes tiempos de cultivo sincronizado, a las 5 horas, 10 horas y 22 horas.

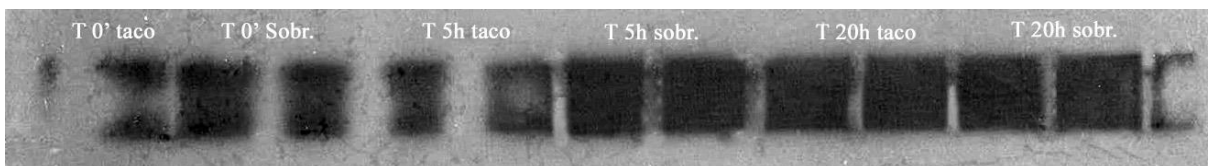


Figura 27. *Slot Blot* de proteínas aisladas de cultivo sincronizado de *P. yoelii*.

A diferentes tiempos de cultivo sincronizado, de taco y sobrenadante. A las 0 horas, 5 horas, y 20 horas de cultivo.

Para amplificar la secuencia del gen que codifica para la proteína pv110 y determinar si es conservada en diferentes especies del parásito.

Se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica de *pv-110* (XM_001615643) el cual consta de 1980 pb. Mediante un BLAST contra la base de datos de la NCBI (Zhang y col. 2000; Morgulis y col., 2008) se identificaron ortólogos en el género *Plasmodium* y con el programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999) se determinó y se evaluó los polimorfismos de las mismas. Obteniendo lo siguiente:

Tabla 1. Matriz de identidad de secuencias de diferentes especies del género Plasmodium (BioEdit).

<i>Seq-></i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. inui</i>	<i>P. fragile</i>	<i>P. vinckei</i>	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. gaboni</i>	<i>P. reichenowi</i>
<i>P. vivax</i>	ID	0,693	0,786	0,785	0,38	0,377	0,382	0,384
<i>P. knowlesi</i>	0,693	ID	0,75	0,728	0,398	0,398	0,391	0,39
<i>P. inui</i>	0,786	0,75	ID	0,814	0,419	0,418	0,413	0,413
<i>P. fragile</i>	0,785	0,728	0,814	ID	0,399	0,395	0,4	0,4
<i>P. vinckei</i>	0,38	0,398	0,419	0,399	ID	0,94	0,495	0,493
<i>P. chabaudi</i>	0,377	0,398	0,418	0,395	0,94	ID	0,488	0,486
<i>P. gaboni</i>	0,382	0,391	0,413	0,4	0,495	0,488	ID	0,872
<i>P. reichenowi</i>	0,384	0,39	0,413	0,4	0,493	0,486	0,872	ID

Los valores observados en la *tabla 1* implican que mientras más cercano es el valor a 1, mayor es el porcentaje de identidad entre las secuencias, es decir, que hay mayor similitud entre las secuencias nucleotídicas que codifican para las distintas proteínas pertenecientes a las distintas especies de *Plasmodium*. La *tabla 1* muestra que, entre las especies evaluadas, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, *P. reichenowi* y *P. gaboni* fueron las que mostraron mayor polimorfismo para el gen *pv-110*.

Igualmente, con el programa MEGA 7 se estimó la divergencia evolutiva de la secuencia nucleotídica que codifica para *pv-110* y ortólogos. Obteniendo lo siguiente:

Tabla 2. Matriz de distancia evolutiva: estimación divergencia evolutiva entre secuencias de diferentes especies del género Plasmodium (MEGA 7).

	Especie	Código de acceso de la secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>P. vivax</i>	XM_001615643.1	1,00							
2	<i>P. knowlesi</i>	XM_002260131.1	0,208	1,00						
3	<i>P. inui</i>	XM_008815705.1	0,168	0,151	1,00					
4	<i>P. fragile</i>	XM_012482699.1	0,201	0,174	0,145	1,00				
5	<i>P. vinckei</i>	XM_008624025.1	0,847	0,793	0,765	0,789	1,00			
6	<i>P. chabaudi</i>	XM_726785.2	0,846	0,796	0,761	0,793	0,045	1,00		
7	<i>P. gaboni</i>	XM_018788374.1	0,868	0,805	0,827	0,810	0,616	0,627	1,00	
8	<i>P. reichenowi</i>	XM_012910283.1	0,869	0,822	0,837	0,822	0,613	0,619	0,100	1,00
										0

Esta matriz (*tabla 2*) estima el número de sustituciones de bases por sitio entre las secuencias. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo con el programa MEGA7, el cual utiliza el modelo de máxima verosimilitud compuesta (Tamura y col., 2014), para el análisis se incluyeron 8 secuencias nucleotídicas. El programa incluyó todos los posibles marcos abiertos de lectura y eliminó todas las posiciones con datos faltantes (Kumar y col., 2016). Los valores mostrados en la *tabla 2* van de 0 a 1, mientras más cercano es a 1 menor es la divergencia. La *tabla 1* muestra que, entre las especies evaluadas, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, *P. reichenowi* y *P. gaboni* fueron las que mostraron menor divergencia para el gen *pv-110*, contrario a lo observado para la identidad de las secuencias (*tabla 1*).

Además, a la secuencia *pv-110* se le realizó otro BLAST contra la base de datos completa del NCBI, pero esta vez excluyendo todas las secuencias del género *Plasmodium*,

esto con la finalidad de conocer si este gen tenía homólogos en otros organismos. Sólo se tomó en consideración y se evaluó aquellas secuencias de organismos parásitos y de humano (tabla 3), con la finalidad de poder diseñar oligonucleótidos en regiones conservadas de *pv-110*, evitando así inespecificidades en la amplificación con secuencias del genoma humano o de algún otro parásito circulante.

Tabla 3. Secuencias compartidas de la secuencia de pv-110 con otros organismos parásitos y de humanos.

Organismo	Código de acceso en la NCBI	Secuencia de la proteína Pv-110 [pb]	Secuencia en el organismo [pb]
<i>Strongyliodes stercoralis</i> ●	LL999051	143 - 186	740436 - 740479
<i>Spirometra erinaceieuropaei</i> ●	LN045861.1	171 - 201	3894 - 3863
<i>Hymenolepis diminuta</i> ●	LM383430.1	159 - 195	273978 - 274013
<i>Schistosoma caproni</i> ●	LL247957.1	143 - 172	15721 - 15692
<i>Ascaris lumbricoides</i> ●	LK872111.1	1790 - 1822	45364 - 45332
<i>Onchocerca flexuosa</i> ●	LK872995.1	142 - 181	44005 - 44044
<i>Wucheneria bancrofti</i> ●	LM546267.1	146 - 178	243 - 211
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> ●	LM566685.1	1661 - 1710	804 - 760
<i>Strongyloides papillosus</i> ●	LM006101	142 - 166	11602 - 11578
<i>Strongyloides venezuelensis</i> ●	LK939599.1	1134 - 1162	121550 - 1212522
<i>Trypanosoma bruci</i> ●	LM525618.1	1656 - 1703	130576 - 130622
	LM525011.1	1571 - 1613	34961 - 34920
	LM525371.1	1656 - 1703	1490 - 1536
	AC103580.4	1660 - 1690	59727 - 59758
	NG_029581.1	1566_1620	41598 - 41542
	ACO68298.19		121764_121713
	NG_032693.1	1567 - 1615	295292 - 295338
	AL354824.8		
	NG_012160.1		7797 - 7831
	AC012640.12	1653- 1687	126800 - 126766

El gen *pv-110* no estaba presente en otros organismos que no pertenecieran al género *Plasmodium*, por lo que sólo se encontraron ortólogos en secuencias de otras especies de *Plasmodium*, y que existen algunas similitudes en secciones de la secuencia *pv-110* con otros organismos (Tabla 3); lo que nos permitió definir cuales zonas de la secuencia eran conservadas para el correcto diseño de los oligonucleótidos.

Una vez obtenida toda esta información, se seleccionaron las zonas que eran únicas dentro de la secuencia de *pv-110*, y sobre éstas se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos, que posteriormente se utilizaron para amplificar el gen que codifica a la proteína *pv-110*, quedando el esquema así (*figura 28*):

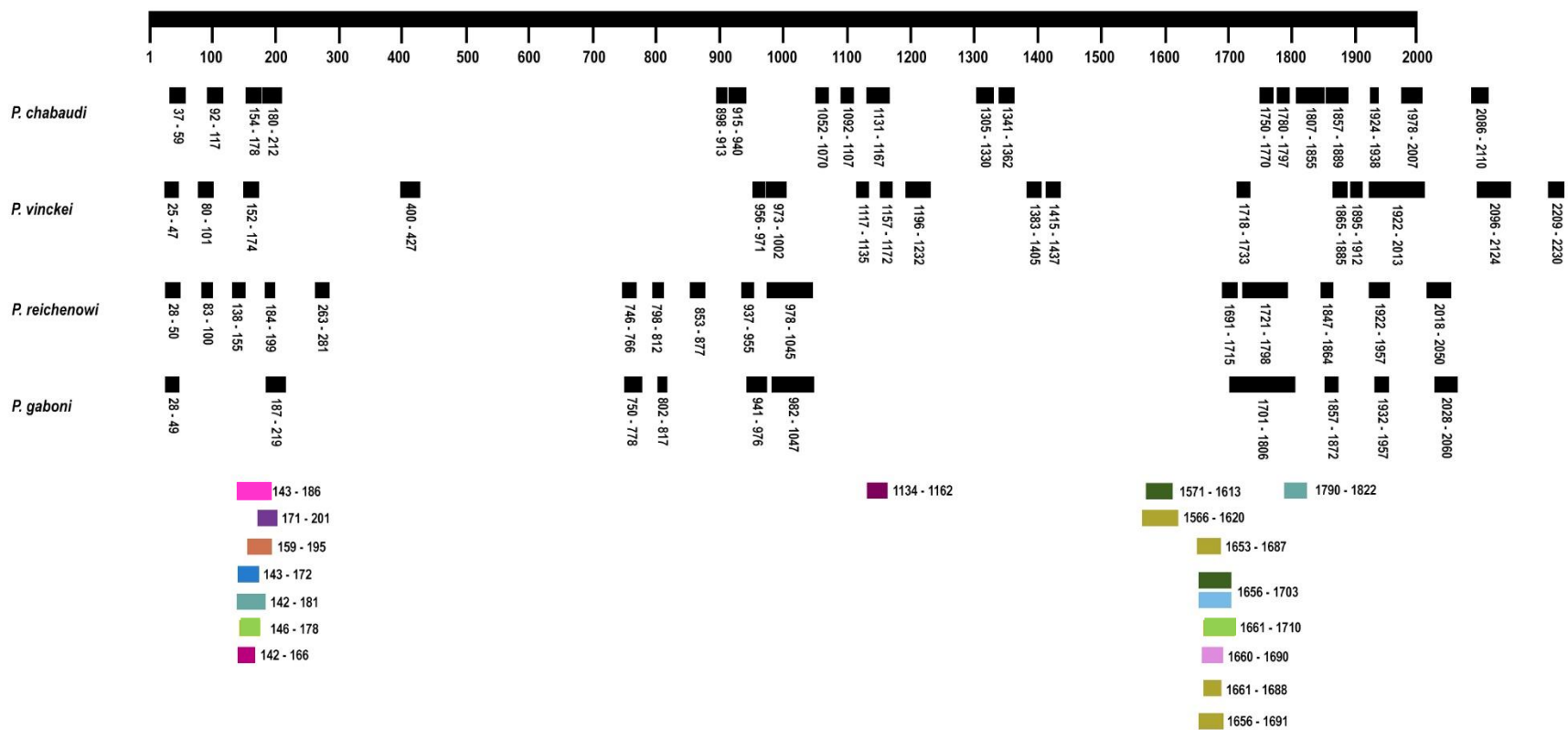


Figura 28. Esquema de secuencias compartidas de otros organismos con la secuencia nucleotídica de *pv-110* (XM_00161564). Aquí podremos observar que zonas de la secuencia eran únicas dentro de la secuencia de *pv-110*. Para identificar los colores asignados a cada organismo en *tabla 3*.

Diseño de Oligonucleótidos:

Se diseñaron los pares de oligonucleótidos sobre la secuencia nucleotídica hipotética obtenida a través del siguiente código de acceso en NCBI XM_001615643, una secuencia de 1980 pb obtenida a través del mRNA:

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados en base a las regiones únicas en la secuencia de pv-110.

Oligonucleótido	Región que amplifica entre:	Longitud del amplicón	Secuencia del oligonucleótido
AM	478-1510 pb	1033 pb	1 5' – GCG AAG CAG GAG GGT GAA GG - 3'
			2 5' – GGT GTG CCA TAA GAC GAG CG -3'
AM3	226-1133 pb	908 pb	A 5'- TCA GTG GAG AGA GAA AAG TG – 3'
			B 5' - AGT AAA AAG CGA AAG TGG TG – 3'
AM4	1090-1951 pb	862 pb	A 5' -CTG GCT GTT AAG GCG GAT TC – 3'
			B 5' – GTT TCG CTC CGG GGG CAC AC – 3'
AM5	191-961 pb	771 pb	A 5'-TAC TCT ATG ACA GTT CCT CC-3'
			B 5'-AAT CAG CCG TGT TTA GGT AC-3'

Determinación de especies en muestras:

Se aisló ADN de 88 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico parasitológico de malaria de 4 estados endémicos de Venezuela: Bolívar (30 muestras); Amazonas (28 muestras), Sucre (10 muestras) y Miranda (20 muestras). Para luego realizarle diagnóstico molecular especie específico siguiendo el protocolo de diagnóstico propuesto por Snounou G y col. (1993) y modificado por Singh y col. (1999), donde se amplifican los genes de la sub unidad 18S de ARN ribosomal del género *Plasmodium* (tabla 5), debido a que el gen que codifica para *pv-110* sólo lo encontramos en *P. vivax* de todos los plasmodios que

infectan a humanos, era necesario identificar molecularmente a la especie infectante para probar los oligonucleótidos sólo en las muestras positivas para *P. vivax*, e ir probando paulatinamente en *P. falciparum* y aquellas que fueran de infección mixta.

Tabla 5. Resultados obtenidos a partir del diagnóstico molecular especie específico de las muestras de los diferentes estados endémicos de Venezuela.

Estado	Numero de muestras	Negativos	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Infecciones mixtas (<i>P.v</i> + <i>P.f</i>)
Miranda	20	/	14	/	6
Sucre	10	3	3	1	3
Bolívar	30	3	15	2	10
Amazonas	28	3	20	3	2

Amplificación del gen *pv-110*:

Se realizó una primera amplificación con los oligonucleótidos AM1 y AM2, que amplifican una región de 1033 pb utilizando como temperatura de alineamiento 64,5 °C a la temperatura de *melting* promedio de ambos oligonucleótidos, se utilizó una sola muestra, la cual, era positiva para *P. vivax* y se observó el producto en un gel de agarosa de 1 % con otras muestras, se observó una banda de menor tamaño de lo esperado en el carril 3 de la *figura 29*.

Se realizó un segundo PCR con los oligonucleótidos AM1-2, utilizando una sola muestra de ADN y un control negativo, los productos se observaron en un gel de agarosa al 2% para obtener mejor resolución de la banda obtenida (*figura 30*) en donde se sirvió no sólo los productos del nuevo PCR (carril 2 y 3) si no también el producto del realizado con anterioridad (carril 4), del carril 5 al 8 se sirvieron otras muestras. Observando una mejor

resolución de las bandas, se observa dímeros en todos los productos, pero sólo en los carriles 2 y 4 se observa una amplificación (menor a los 500 pares de bases), menor de lo esperada.

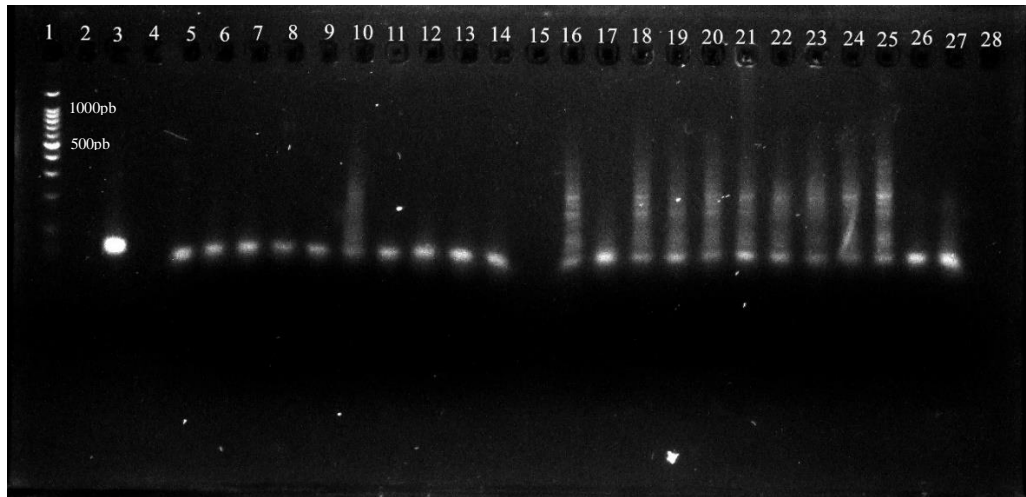


Figura 29. Amplificación de *pv-110* con AM1-AM2.

Productos amplificados de diferentes PCR en gel de agarosa 1%, en el carril 3 se puede apreciar la amplificación de los oligonucleótidos AM1 y AM2. Marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

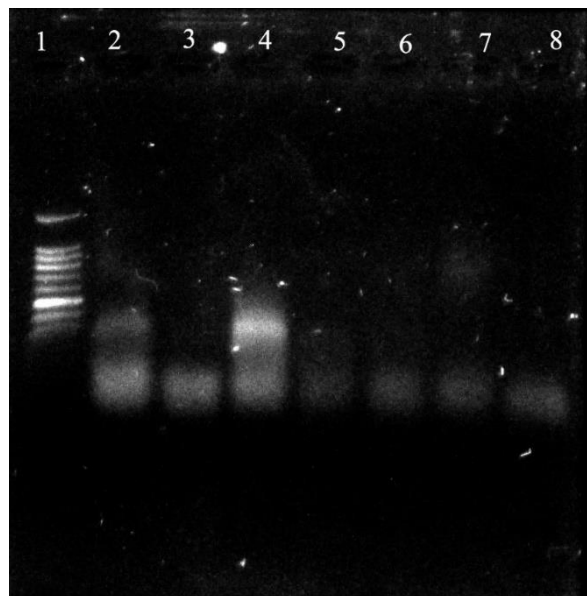


Figura 30. Amplificación de *pv-110* con AM1-AM2.

Productos amplificados de diferentes PCR en gel de agarosa 2%, del carril 2 al 3 se puede apreciar la amplificación de los oligonucleótidos AM1 y AM2. En los carriles 2 y 4 tenemos

dos muestras distintas para los oligonucleótidos AM1-2 y en el carril tres tenemos el control negativo. Marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

Se realizó una PCR en gradiente para los pares de oligonucleótidos AM3, AM4 y AM5, siguiendo el esquema de temperaturas en el termociclador (*tabla 6*) de acuerdo a sus temperaturas de alineamientos obtenidas a partir del promedio de la temperatura de fusión de cada par de oligonucleótidos, se utilizó una sola muestra ADN para cada par de oligonucleótidos para mantener la homogeneidad de la amplificación y sólo variar la temperatura. De los productos a distintas temperaturas de los pares de oligonucleótidos AM3A-B y AM4A-B (*figura 31*) no se observó amplificación, sólo se observó dímeros para todos los productos. Se obtuvo resultados positivos para el oligonucleótido AM5A-B a 3 temperaturas distintas (*figura 32*) a 53.6 °C, 55.8 °C y 57.6 °C, dónde se esperaba una amplificación de 771 pb, en la *figura 32* podemos observar una amplificación de una banda del peso esperado, ya que el marcador no corrió bien, pero se puede apreciar la altura de los 500 pares de base y de las 1500 pares de bases del marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

Tabla 6. Esquema de gradientes de temperaturas en el termociclador y del uso de éstas por los distintos oligonucleótidos.

Columnas en el termociclador	Temperatura (°C)	Oligonucleótidos		
		AM3A-B	AM4 A-B	AM5 A-B
1	48.0		B1	
2	48.3	A2		
3	49.0	A3	B3	
4	50.1	A4	B4	
5	51.7	A5	B5	
6	53.6	A6	B6	C6
7	55.8	A7	B7	C7
8	57.6			C8
9	59.0			C9
10	60.0			C10
11	60.8			C11
12	61.0			C12

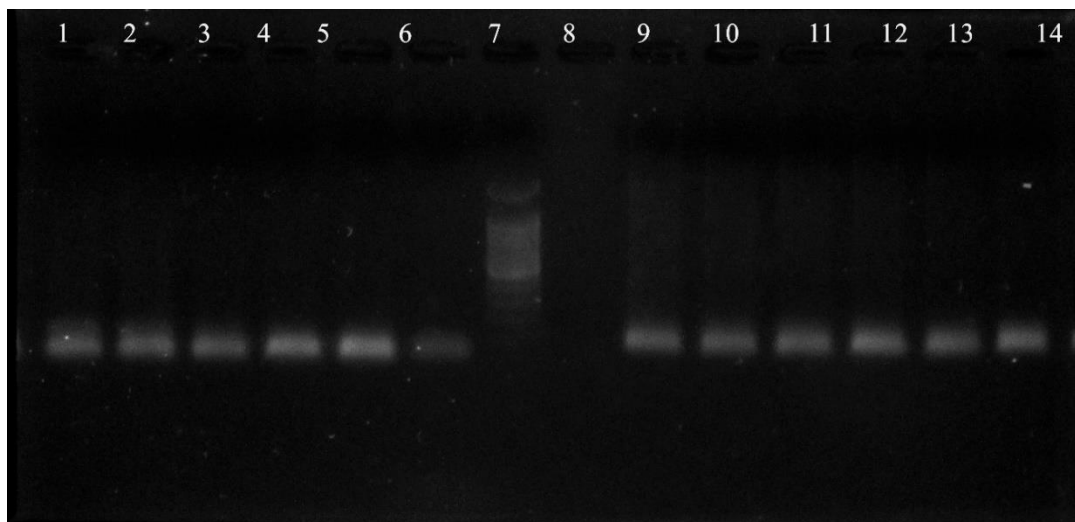


Figura 31. Amplificación en gradiente de *pv-110* con AM3A-B y AM4A-B. Productos amplificados en gel de agarosa 2%. Del carril 1 al 6 se puede apreciar los productos de los oligonucleótidos AM3A-B del 9 al 14 los productos de los oligonucleótidos AM4A-B. En el carril 7 observamos el marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

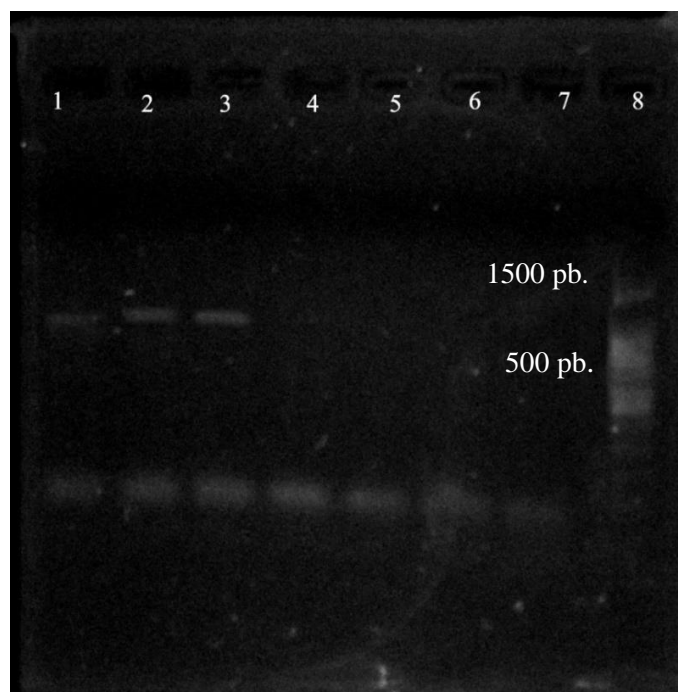


Figura 32. Amplificación en gradiente de *pv-110* con AM5A y AM5B. Productos amplificados de PCR en gradiente para AM5A-B en gel de agarosa 2%. Del carril 1 al 3 se puede apreciar los productos amplificados de los oligonucleótidos AM5A-B. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

Se realizó una re-amplificación para AM1-2, utilizando distintas muestras de ADN positivas para *P. vivax*, *P. falciparum* y de infección mixta. Obteniéndose una banda difusa en las muestras positivas para *P. vivax* y para muestras con infección mixta (*figura 33*) y ninguna amplificación para las muestras positivas para *P. falciparum*, pero al no ser una banda, no se pudo determinar el peso molecular de la amplificación. En la *figura 33*: los carriles 2, 3, 4, 7 y 8 eran de muestras positivas a *P. vivax*; los carriles 1, 5, 9 y 10 muestras que eran positivas para infecciones mixta; y los carriles 6 y 11 eran positivas para *P. falciparum* y el carril 12 era control negativo. Observamos amplificación únicamente en muestras positivas para *P. vivax* y algunas para infecciones mixtas.

Se realizó de nuevo la re-amplificación, pero agregando betaina a la mezcla para evitar inespecificaciones en la amplificación y utilizando un mayor número de muestras, obteniéndose una banda difusa en la amplificación (*Figura 34 y 35*) dónde todavía no podemos determinar el peso de la amplificación, pero más concentrada que en el caso anterior (*figura 33*). Aun así, sin tener una banda en la amplificación pudimos comprobar que los oligonucleótidos funcionan y que no amplifican a muestras positivas a *P. falciparum*.

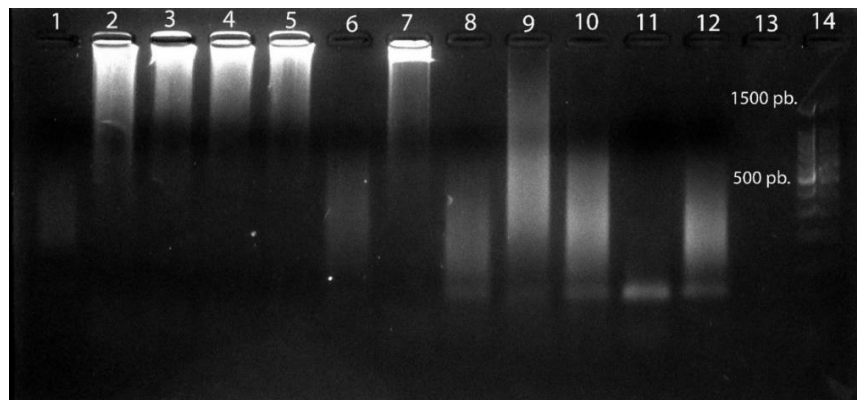


Figura 33. Re-amplificación de *pv-110* con AM1-AM2.

Productos amplificados de PCR para AM1-2 en gel de agarosa 2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

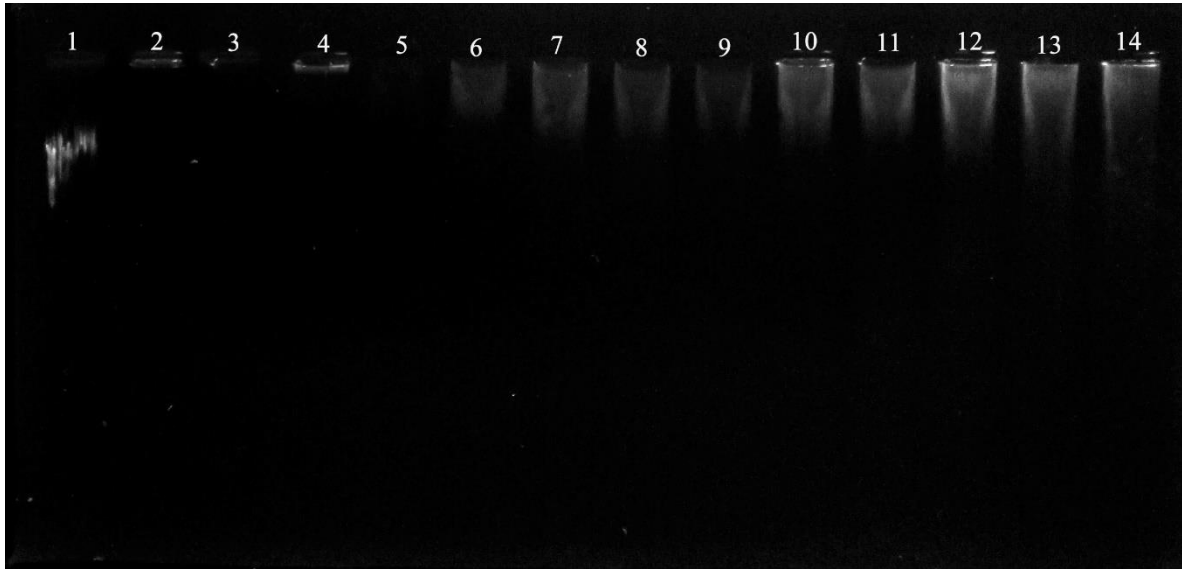


Figura 34. Re-amplificación de *pv-110* con AM1-AM2 suplementado con betaina (1). Productos amplificados de PCR para AM1-2 en gel de agarosa 2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

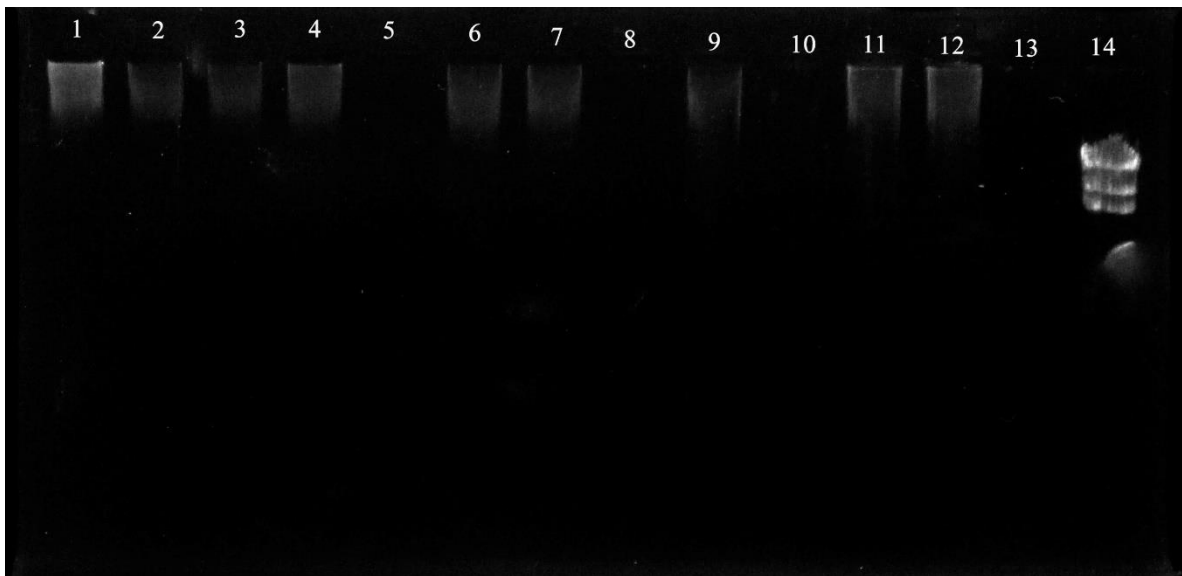


Figura 35. Re-amplificación de *pv-110* con AM1-AM2 suplementado con betaina (2). Productos amplificados de PCR para AM1-2 en gel de agarosa 2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega™).

La secuencia *pv-110* fue actualizada en el GenBank el 17 de abril de 2018, dentro del marco del NCBI Genome Project, que está en estado de revisión bajo *Direct Submission, Submitted (17-APR-2018) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA*. La secuencia es de una proteína hipotética, la cual es conservada y fue obtenida antes a través de ARN mensajero. Se realizó un Blast de la secuencia *pv-110* (XM_001615643.1) contra todo el género *Plasmodium*, obteniendo lo siguientes proteínas hipotéticas o no caracterizadas de otras especies de *Plasmodium*:

Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de proteínas hipotéticas o no caracterizadas de diferentes especies de *Plasmodium* similares a la secuencia nucleotídica de *pv-110*.

Especie	Código de acceso en el Gen Bank	E value	Porcentaje de Identidad (%)	Cobertura de la secuencia
<i>P. coatneyi</i>	XM_020061196.1	0.0	84%	100%
<i>P. fragile</i>	XM_012482699.1	0.0	80%	99%
<i>P. cynomolgi</i>	XM_004223788.1	0.0	86%	86%
<i>P. knowlesi</i>	XM_002260131.1	0.0	82%	69%
<i>P. inui</i>	XM_008815705.1	0.0	81%	76%

En consecuencia, del resultado obtenido por el reconociendo del AcMon 7C5-G33 por símiles antigénicos en *P. chabaudi* (figura 7, figura 10, figura 11), *P. yoelii* (figura 4, figura 13) y *P. berghei* (figura 8, figura 16, figura 17), se realizó un Blast de la secuencia nucleotídica de *pv-110* (XM_001615643.1) actualizada con las especies de *P. chabaudi*, *P. berghei* y *P. yoelii*, pero no se encontró similitud significativa entre la secuencia de *pv-110* y éstas especies.

Discusión

Durante el período 2000-2014 en Latinoamérica se reportaron 4,68 millones de infecciones por *P. vivax* (OPS, 2016) en ese mismo período Venezuela incrementó en 76% el número de casos de reportados de malaria, posicionándose por primera vez por encima de Brasil y el municipio Sifontes del estado Bolívar fue el que presentó mayor prevalencia en la subregión Amazónica (2014-2016). El número de personas que fallecieron por malaria en Latinoamérica aumentó en 33% con respecto al 2010, y se estima que la mitad de estas defunciones pudieron haber ocurrido en Venezuela (OPS, 2017).

Algunos investigadores sugieren que los estudios sobre *P. vivax* han sido desatendidos (Baird, 2007; Mueller y col., 2009), Mueller y col. (2009) plantean que la búsqueda de intervenciones eficaces contra *P. vivax* sigue siendo un desafío formidable. Dada la gran diferencia en la biología, genética, patogénesis y epidemiología de *P. vivax* con respecto a *P. falciparum*, no se puede suponer que las intervenciones desarrolladas y probadas para el control de este último tendrán éxito cuando se usen para *P. vivax*. Desgraciadamente, la creencia de que las infecciones por *P. vivax* eran benignas frente a la severidad de *P. falciparum* aunado a la imposibilidad de mantener cultivos continuos *in vitro* de *P. vivax* hubo un descuido relativo en la investigación de este parásito, por lo que hasta ahora se desconocen muchos aspectos de su biología y epidemiología, sin embargo recientemente se ha comenzado a comprender la respuesta inmune del hospedero, encontrando evidencias que apoyan el desarrollo racional de nuevas intervenciones contra el parásito (Mueller y col.; 2009).

Para abordar las brechas cruciales en nuestro conocimiento sobre *P. vivax* y acelerar el desarrollo de métodos útiles de control, es necesario un aumento sustancial en la inversión,

que van desde investigaciones en biología básica, epidemiología y clínica que potencialmente deriven en el desarrollo de nuevas estrategias para diagnóstico y terapias (Mueller y col.; 2009).

Adicionalmente, se han reportado casos de malaria severa por *P. vivax*, (Alexandre y col., 2010; Andrade y col., 2010; Kochar y col., 2009, 2005; Baird, 2007). Kochar y col. (2009) en su estudio sobre la malaria severa por *P. vivax* realizaron una recopilación de todos los síntomas de malaria cerebral reportados para esta especie, los cuales son: convulsiones y estado epiléptico, anemia severa, disfunción hepática e ictericia, lesión pulmonar aguda, dificultad respiratoria aguda, síndrome (SDRA) y edema pulmonar, estado de shock, ruptura esplénica, insuficiencia renal aguda y trombocitopenia grave con o sin sangrado en diferentes partes del cuerpo. Esto es otra evidencia de la importancia que tiene el estudio de la biología de *P. vivax* y la necesidad de desarrollo de nuevas estrategias de control, que abarquen el mejoramiento de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas, así como la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

En este estudio se trabajó con la proteína Pv-110, la cual fue aislada en el Laboratorio de Inmunoparasitología del IVIC con la ayuda del anticuerpo monoclonal 7C5G33, el cual reconoció un antígeno en *P. vivax* de 110KDa en condiciones nativas y 50KDa en condiciones reductoras. Además, se determinó mediante técnicas de microscopia electrónica que dicha proteína es exportada desde el citoplasma del parásito hacia el citoplasma y membrana plasmática del glóbulo rojo parasitado (Bracho y col., 1996). En este trabajo se determinó que el AcMon es capaz de reconocer a símiles antigénicos en *P. chabaudi* (figuras 7, 10 y 11), *P. yoelii* (figuras 4 y 13) y *P. berghei* (figuras 8, 16 y 17). Lo antes expuesto nos confiere ventajas para su estudio, ya que al identificar homólogos esta

proteína en especies de *Plasmodium* que infectan roedores disponemos de modelos para trabajar en el laboratorio y así estudiar su función.

Utilizando estos modelos muridos (*P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii*), se determinó que el AcMon 7C5-G33 es capaz de reconocer símiles antigénicos de Pv-110 independientemente del porcentaje de parasitemia (<1%, 4%, 10% y 13%) (*figura 9*), lo cual es fundamental para el diagnóstico ya que con este AcMon se pudo detectar parasitemias por debajo de 1%, sin embargo, habría determinar el límite de detección con una curva de parasitemia.

Es importante resaltar que el AcMon no reconoce a símiles antigénicos en *P. falciparum* (*figura 12*), *P. malariae* (*figura 14*) ni *P. vinckei* (*figura 15*), siendo las primeras dos, especies de *Plasmodium* que infectan a humanos, y que además son endémicas en Venezuela (OMS, 2016). Esta proteína podría ser utilizada entonces como diagnóstico diferencial para identificación de *P. vivax*, la especie más prevalente en nuestro país.

Además, determinamos que la proteína Pv-110 se expresa en todos los estadios del desarrollo eritrocítico, para *P. chabaudi* (*figura 23*) pudimos apreciar que la proteína estaba presente a diferentes tiempos de cultivo, se encontró en anillos, trofozoítos y esquizontes, lo que corresponde a todo el desarrollo dentro del GR. En cultivos de *P. yoelii* también se encontró en estadios de trofozoítos y de esquizontes (*figura 24*). Igualmente observamos que la proteína estuvo presente en el sobrenadante de cultivo (*figuras 20 y 24*), es decir, se halla fuera del GRP, también se encontró en plasma sanguíneo y orina de ratones infectados con *P. chabaudi* y *P. yoelii* (*figuras 20 y 21* respectivamente). Las evaluaciones con *P. berghei* nos permitieron determinar que la proteína se encuentra en orina de ratones infectados con ésta especie a diferente índices de parasitemia (*figura 22*) y en las diferentes etapas del

desarrollo del parásito. Que la proteína Pv-110 sea exportada fuera del glóbulo rojo parasitado quiere decir que no sólo supera la barrera de la membrana plasmática del parásito y la vacuola parasitófora, como habían reportado Bracho y col. (1996), sino que además, es transportada fuera del glóbulo rojo parasitado, tal como describen Marti & Spielmann (2013) para el transporte de proteínas que presentan el motivo PEXEL en *Plasmodium*. La proteína Pv-110 la podemos encontrar tanto en la membrana del glóbulo rojo, como en el medio extra celular (*figuras 20, 21 y 22*), lo que corresponde a lo reportado por Hidalgo (2010), dónde dice que la secuencia de esta proteína reveló que la misma presentaba el Motivo PEXEL (63-RLLYD-67).

La proteína Pv-110, al expresarse en todos los estadios de la esquizogonía eritrocítica, poseer el motivo PEXEL, ser expulsada fuera del GRP, y encontrarse en orina y suero sanguíneo, puede ser utilizada como blanco de diagnóstico diferencial para *P. vivax*, empleando muestras no invasivas como orina, algo realmente novedoso dentro del diagnóstico inmunológico de malaria, los cuales convencionalmente utilizan muestras de sangre periférica para este tipo de diagnóstico.

Utilizando la proteína Pv-110 se puede desarrollar un método de diagnóstico inmunológico para la detección de antígenos que nos permita diagnosticar infecciones actuales. Tomando en cuenta que el diagnóstico inmunológico en malaria puede ser realizado por dos técnicas que son de fácil realización: detección de antígenos o detección de anticuerpos (OMS, 2016). La detección de anticuerpos frente a antígenos parasitarios indica infecciones actuales, recientes o inclusive exposición al parásito sin infección, mientras que la detección de antígenos sólo identifica infecciones actuales. En los últimos años se han desarrollado métodos de diagnóstico rápido (MDR), que son técnicas de

inmuncromatográficas que detectan anticuerpos monoclonales en sangre frente a antígenos maláricos liberados por los eritrocitos parasitados (Puente y col.; 2005). OptiMAL es una prueba rápida (10 min) del tipo MDR que utiliza una varilla recubierta con anticuerpos monoclonales contra una enzima metabólica intracelular del parásito, la lactato deshidrogenasa (pLDH). Dado que pLDH es producida solo por parásitos vivos de *Plasmodium*, esta prueba tiene la capacidad de diferenciar infecciones actuales (Palmer y col., 1998). La prueba ParaSight-F es una prueba de diagnóstico cualitativa de *P. falciparum*, basada en la detección de un antígeno soluble especie específico, proteína rica en histidina (HRP-II), por un anticuerpo monoclonal en sangre completa y se puede realizar sin equipo especial. El resultado se observa mediante una reacción colorimétrica cuando el anticuerpo se acopla con liposomas cargados con colorante; cuando es positivo, aparece una línea rosa (Uguen y col., 1995). Sin embargo, estas pruebas son poco sensibles para el diagnóstico de *P. vivax* dando lugar a un gran número de falsos negativos. Por ello es recomendable el desarrollo de nuevas pruebas con blancos especie específicos.

Actualmente, el diagnóstico de malaria ha ido migrando hacia el diagnóstico molecular y se han utilizado convencionalmente genes conservados como el 18S rARN (Singh y col. 1999, Snounou y col. 1993, Kochar y col. 2005), no obstante, sabiendo que la proteína Pv-110 es un potencial blanco para el diagnóstico inmunológico quisimos saber si se podría utilizar para el diagnóstico molecular por PCR.

El gen *pv-110* tiene ortólogos en *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. fragile*, *P. vinckei*, *P. chabaudi*, *P. gaboni*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi* y *P. reichenowi*. Las especies *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. fragile*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi*, *P. reichenowi* y *P. gaboni* infectan primates, mientras que *P. knowlesi* también infecta humanos (Tang y col. 2010); *P. vinckei* y *P.*

chabaudi infectan roedores, es importante resaltar que no se encontraron ortólogos en otros *Plasmodium* que infectan a humanos, lo que apoya la hipótesis de que este gen puede ser empleado para el diagnóstico diferencial de *P. vivax*.

Cabe destacar que, aunque algunas especies presentan símiles antigénicos (son reconocidas por el AcMon 7C5G33) no se les ha reportado una secuencia ortóloga y viceversa, esto se explica ya que el epítipo del AcMon es una secuencia corta lineal por lo que no necesariamente toda la secuencia del gen tiene que ser conservada y por otro lado no todos los genomas de *Plasmodium* están reportados en el banco de genes. Además, los análisis de polimorfismo y divergencia evolutiva indican que *P. knowlesi*, *P. inui* y *P. fragile* son las más divergentes respecto a *pv-110*, mientras que las más conservadas fueron *P. reichenowi*, *P. gaboni*, *P. vinckei* y *P. chabaudi*.

En nuestro estudio, se buscó amplificar toda la secuencia de *pv-110*, es por ello que los oligonucleótidos se diseñaron en zonas únicas de *pv-110* (secuencias que no eran similares a ninguna otra del Gen Bank), para evitar amplificaciones inespecíficas. Se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos que amplificaban regiones solapadas de alrededor de 800 pb (tabla 4). En muestras de ADN total de sangre parasitada de individuos infectados por *P. vivax* se obtuvo la amplificación con dos pares de oligonucleótidos (AM1-AM2 y AM3A-AM3B). La reamplificación del producto de PCR con AM1-AM2 permitió obtener el fragmento del tamaño esperado (>1000pb), sin embargo, la resolución de la banda no fue óptima. Las dificultades para amplificación de estas muestras pueden deberse a que este gen es de copia única en el genoma y que las parasitemias presentes en las muestras evaluadas eran menores a 10⁻⁵%.

Sin embargo, es importante resaltar que las muestras en las que se observó amplificación de fragmentos de tamaños no esperados eran aquellas infectadas con *P. vivax*, aquellas infectadas con *P. falciparum* no amplificaron en ninguna de las PCRs con estos oligonucleótidos. Lo que indica que la PCR fue específica para *P. vivax*, siendo esta una posible prueba de diagnóstico molecular diferencial para éste parásito. No obstante, en vista de los resultados obtenidos sería más conveniente el uso de la proteína para el diagnóstico inmunológico, que el gen para el diagnóstico molecular.

Siguiendo la caracterización de la proteína, un análisis bioinformático de la secuencia de Pv-110 indicó que ésta tenía sitios de fosforilación y la tinción con Pro-Q® Diamond mostró que la proteína de *P. yoelii* efectivamente está fosforilada, lo que coincide a lo reportado por Hidalgo (2010), mientras que las proteínas de *P. vivax* y *P. berghei*, no lo estuvieron, pero el hecho de que no se encontraron fosforiladas puede deberse a diversas razones, la fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes, la extensa mayoría de las fosforilaciones son transitorias, estas tienen la función de regular actividad biológica y son reversibles, debido a la adición y la eliminación de grupos fosfatos en residuos de serina, treonina, tirosina o histidina (Lodish y col., 2006) . La proteína puede tener los motivos de fosforilación en su secuencia aminoacídica y estar fosforilada o no, debido a que no es un estado constante lo que correspondería con el resultado obtenido para *P. vivax* y *P. berghei*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hidalgo en el 2010, donde análisis bioinformáticos mostraron que Pv-110 interactuaba con la DXR, enzima perteneciente a la ruta de biosíntesis de los isoprenoides, la cual es esencial para el desarrollo y la replicación asexual del parásito, pero se encuentra ausente en mamíferos.

Por ende, otro factor a discutir sería considerar a Pv-110 como blanco terapéutico para *P. vivax*, debido a que:

1) Es altamente conservada.

2) Se expresa durante todo el ciclo eritrocítico, y la morbilidad causada por los plasmodios está relacionada con el desarrollo del parásito dentro de eritrocito hospedero (Bracho y col. 2002).

3) Se exporta en cantidades tales que puede ser detectada en sobrenadante de cultivo, tomando en cuenta que posee el motivo PEXEL, único en *Plasmodium* (Marti y col., 2004), que es reconocido por un translocón (PETEX) y realiza transporte activo, es decir, cada molécula que es secretada implica un gasto de una molécula de ATP (Desai & Miller, 2014) además, la podemos encontrar en muestras de orina a distintas parasitemias y en suero sanguíneo. Hiller y col. (2004) destacan el alto valor que tienen las proteínas de exportación con motivo PEXEL como candidatos a análisis funcionales y blancos terapéuticos.

4) La proteína Pv-110 está fosforilada, por lo que probablemente cumpla la función de regular alguna actividad biológica, además está relacionada con la ruta biosintética de los isoprenoides (Hidalgo, 2010) y moléculas de esta ruta constituyen un objetivo muy atractivo para el descubrimiento de nuevas terapias antimaláricas (Price y col., 2016).

Esta información nos hace pensar y concluir que Pv-110 y sus símiles antigénicos en *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. chabaudi* están íntimamente relacionados con el metabolismo del parásito, en este punto es imposible determinar la función de la proteína con la información que tenemos, pero sabiendo que es secretada fuera de los límites del GRP en concentraciones tan altas considerando el gasto energético involucrado, nos hace pensar que

esta proteína podría ser imprescindible. Lo que nos lleva a proponer seguir el estudio de esta proteína para determinar su función dentro del desarrollo de *P. vivax* y de todas las proteínas homólogas de función desconocida que son similares antigénicas de Pv-110 en las otras especies: *P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii*.

Recomendaciones

Se recomienda seguir el estudio de esta proteína para lograr la caracterización, estructural y funcional, con el fin de determinar el papel que cumple dentro del metabolismo de *P. vivax* y sus homólogos en otras especies de *Plasmodium*, a través de técnicas de clonaje molecular tanto por clonación celular como acelular, para poder realizar la técnica de proteínas recombinantes, también recomendamos PCR en tiempo real o RT-PCR que nos permitiría cuantificar la expresión de la proteína y la futura secuenciación de la secuencia nucleotídica, o utilizando el método CRISPR, para estudios de función de la proteína.

Además, recomendamos seguir el estudio de la secuencia nucleotídica, ya que observamos que con una sola ronda de amplificación no se obtuvo el resultado esperado, tal vez diseñando un PCR anidado, en el cuál se realicen al menos tres rondas de amplificación se podría utilizar para diagnóstico de *P. vivax*.

Conclusiones

1. Pv-110 se expresa en *P. vivax*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* y *P. berghei*.
2. Pv-110 es secretada desde el parásito, hacia el citoplasma y fuera del GRP, encontrándose en sobrenadantes de cultivo de *P. chabaudi* y *P. yoelii*, y en plasma y orina de ratones infectados con *P. chabaudi*, *P. berghei* y *P. yoelii*.
3. Pv-110 se expresa en anillos, trofozoítos y esquizontes de *P. yoelii* y *P. chabaudi*.
4. *pv-110* tiene ortólogos en *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. fragile*, *P. vinckei*, *P. chabaudi*, *P. gaboni*, *P. coatneyi*, *P. cynomolgi* y *P. reichenowi*. Y las más conservadas fueron *P. reichenowi*, *P. gaboni*, *P. vinckei* y *P. chabaudi*, mientras que *P. knowlesi*, *P. inui* y *P. fragile* son las más divergentes respecto a *pv-110*.
5. *pv-110* puede ser amplificada con los oligonucleótidos AM1-AM2.
6. Pv-110 puede ser considerada como un blanco terapéutico y de diagnóstico.

Bibliografía

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., & Raff, M. et al. 2011. Introducción a la biología celular (3rd ed., pp. 55; 71). México, D.F.: Médica Panamericana.
- Alexandre, M. A., Ferreira, C. O., Siqueira, A. M., Magalhães, B. L., Mourão, M. P. G., Lacerda, M. V., & Alecrim, M. das G. C. (2010). Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 16(10), 1611–1614. <https://doi.org/10.3201/eid1610.100685>
- Alger, J. 2001. Densidad Parasitaria en Malaria: Métodos de determinación y su interpretación. *Revista Médica Hondureña*, 69, 118-120.
- Andrade, B. B., Reis-filho, A., Souza-neto, S. M., Clarêncio, J., & Camargo, L. M. A. (2010). Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance, 1–8.
- Baird, J. K. (2007). Neglect of Plasmodium vivax malaria. *Trends in Parasitology*, 23(11), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.011>
- Bracho, C y Perez, HA. 1996. Sensitive detection of *Plasmodium vivax* in blood by a cell-ELISA using a monoclonal antibody. *J of Immunoassay*, 17:155- 174.
- Bracho, C., Dunia, I., De La Rosa, M., Benedetti, E. L., & Perez, H. A. 2002. Traffic pathways of Plasmodium vivax antigens during intraerythrocytic parasite development. *Parásitolo. Res.*, 88(3), 253-258.

- Bracho, C., Dunia, I., Romano, M., Raposo, G., De La Rosa, M., Benedetti, E. L., & Perez, H. A. 2006. Caveolins and flotillin-2 are present in the blood stages of *Plasmodium vivax*. *Parásitol. Res.*, 99(2), 153-159.
- Cáceres, J. 2010. Situación epidemiológica de la malaria en Venezuela. Año 2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* v.50 n.2 Maracay dic. 2010. ISSN 1690-4648.
- Cáceres, J. L. 2011. La malaria en el estado Bolívar, Venezuela: 10 años sin control. *Bol. de Mal. Salud Amb.*, 51(2), 207-214.
- Desai S.A & Miller L.H. 2014. Protein-export pathway illuminated. *Nature*. Vol, 551. 541-542.
- Dirección General de Salud Ambiental, MPPS. 2011c. TRATAMIENTO DE LA MALARIA. Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria (pp. 184-195). República Bolivariana de Venezuela: Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harris, E. L., & Angal, S. (1989). *Protein purification methods*. IRL Press at Oxford University Press.
- Herraiez, A., & Sánchez, Á. H. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética*. Elsevier Health Sciences.
- Heymann, D. 2006. Resistance to Anti-Infective Drugs and the Threat to Public Health. *Cell*, 124(4), 671–675. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.009

- Hidalgo R., M. 2010. Caracterización de la proteína de tráfico intracelular Pv-148 de la fase eritrocítica de *Plasmodium vivax*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., & Haldar, K. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, 306(5703), 1934-1937.
- Kochar, D. K., Das, A., Kochar, S. K., Saxena, V., Sirohi, P., Garg, S., ... Gupta, V. (2009). Severe Plasmodium vivax malaria: A report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 194–198. <https://doi.org/80/2/194> [pii]
- Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., & Das, A. (2005). Plasmodium vivax malaria. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 132–134. <https://doi.org/10.3201/eid1101.040519>
- Kumar S., Stecher G., & Tamura K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets*. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Kwiatkowski, D. P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. J. Hum. Genet.*, 77(2), 171-192.
- Lim, L., & McFadden, G. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 749-763. doi:10.1098/rstb.2009.0273
- Llanos, C., Flórez, M. H., Arévalo Herrera, M., & Herrera, S. (2004). Mecanismos de generación de anemia en malaria. *Colombia Médica*, 35(4).

- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. 2006. *Biología celular y molecular*. 5ta ed. Buenos aires, médica Panamericana.
- Marti, M., & Spielmann, T. (2013). Protein export in malaria parasites: many membranes to cross. *Curr. Opin. Microbiol.*, 16(4), 445-451.
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E., & Cowman, A. F. 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306(5703), 1930-1933.
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. (2008). *Database Indexing for Production MegaBLAST Searches*". *Bioinformatics* 24:1757-1764.
- MPPS- Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2016. *Boletín Epidemiológico*, Semana epidemiológica n° 52. Año de edición LX.
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases*, 9(9), 555-566.
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax* , a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(9), 555–566. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
- Noya G, O., & Wide, A. (2011). TRATAMIENTO DE LA MALARIA. *Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria* (pp. 183-209). República Bolivariana de Venezuela: Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). www.paho.org • © OPS/OMS, 2017.
Alerta Epidemiológica: Aumento de casos de malaria, 15 de febrero de 2017.
- Organización Panamericana de la Salud, OMS. (2016). Informe de la situación de la Malaria en las Américas, 2014. Washington, D.C.: PAHO, 2017. ISBN: 978-92-75-31928-4
- Organización Panamericana de la Salud, OMS. (2017). *Situación de la Malaria en la Región de las Américas, 2000-2016*. Programa Regional de Malaria, Organización Panamericana de la Salud.
- Palmer, C. J., Lindo, J. F., Klaskala, W. I., Quesada, J. A., Kaminsky, R., Baum, M. K., & Ager, A. L. (1998). Evaluation of the OptiMAL Test for Rapid Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Malaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 203–206.
- Price, K., Armstrong, C., Imlay, L., Hodge, D., Pidathala, C., Roberts, N., ... John, A. (2016). Molecular Mechanism of Action of Antimalarial Benzoisothiazolones: Species-Selective Inhibitors of the Plasmodium spp. MEP Pathway enzyme, IspD. *Sci Rep*, 6(1), 36777. doi:10.1038/srep36777
- Przyborski, J., & Lanzer, M. (2004). The Malarial Secretome. *Science*, 306(5703), 1897–1898. doi:10.1126/science.1107072
- Puente, S., García-Benayas, T., Seseña, G., & González-Lahoz, J. M. (2005). Malaria: conceptos clínicos y terapéuticos. *Enfermedades Emergentes*, 7(1), 34-39.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. S. (2002). *Molecular Cloning: A laboratory manual* Volume 1. Third Edition. ISBN 978-087969-576-7.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. S. (2006). The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual (No. Sirsi) i9780879697723).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Singh, B., Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M. S., & Rahman, H. A. (1999). A genus-and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(4), 687-692.
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., do Rosario, V. E., ... & Brown, K. N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61(2), 315-320.
- Tamura K., Nei M., & Kumar S. (2004). *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
- Tang, T. H. T., Salas, A., Ali-Tammam, M., del Carmen Martínez, M., Lanza, M., Arroyo, E., & Rubio, J. M. (2010). First case of detection of Plasmodium knowlesi in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia. *Malaria journal*, 9(1), 219.
- Uguen, C., Rabodonirina, M., De Pina, J. J., Vigier, J. P., Martet, G., Maret, M., & Peyron, F. (1995). ParaSight-F rapid manual diagnostic test of Plasmodium falciparum infection. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(5), 643–649.

- Villegas, L., Hernández, N., & Guevara, M. (2011). EPIDEMIOLOGÍA DE LA MALARIA EN VENEZUELA. *Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria* (pp. 41-58). República Bolivariana de Venezuela: Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).
- Villegas, L., Hernández, N., & Guevara, María E. (2011b). TRATAMIENTO DE LA MALARIA. *Fundamentos en el Diagnóstico y Control de la Malaria* (pp. 43-64). República Bolivariana de Venezuela: Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS).
- WHO malaria terminology, Global Malaria Programme. 2016. WHO website (www.who.int). © World Health Organization 2016.
- World Health Organization. (2015). Guidelines for the treatment of malaria. *World Health Organization*.
- World Malaria Report 2016, publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 13 de diciembre 2016.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000). *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*. J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Consultas en línea:

- CDC - Malaria. Page last updated: March 1, 2016. *Cdc.gov*. [En línea] Disponible: <https://www.cdc.gov/malaria/index.html> [Consulta: 9 octubre 2017]
- Consenso de malaria (2006) *Sociedad Venezolana de Infectología - Malaria*. (2017). *Svinfectologia.org*. Disponible en: <http://www.svinfectologia.org/index.php/publicaciones/consensos/28-generales/62-malaria.html> [Consulta: 8 noviembre 2017].

- Manual *Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen™)*. 18 May, 2010. *www.thermofisher.com* [Documento en línea] Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp33300.pdf> [Consulta: 1 noviembre 2017]
- Manual *SYPRO® Ruby red (Invitrogen™)*. 20 Nov, 2007. *Invitrogen. www.thermofisher.com* [Documento en línea] Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp12000.pdf> [Consulta: 1 noviembre 2017]
- Organización Mundial de la Salud (OMS) [En línea]. Paludismo. 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>. [Consulta: 27 septiembre 2017]
- PALUDISMO - Información sobre el paludismo. 2017. [En línea] Paludismo.org. Disponible: <http://www.paludismo.org>. [Consulta: 9 octubre 2017]
- Torrús Tendero, D. (2017). Malaria. [En línea] Webconsultas.com. Disponible en: <http://www.webconsultas.com/malaria/malaria-4039>. [Consulta: 1 octubre 2017]