



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO



Perfil transcripcional de genes que codifican proteínas de invasión a eritrocito, pertenecientes a las familias de ligandos *PfEBA* y *PfRh* de la cepa fCB2 de *Plasmodium falciparum*

PRESENTADO POR:

ZULMA JULIETH FLÓREZ ARENAS

ASESORES:

MÓNICA ARARAT SARRIA

MAURICIO HUMBERTO RODRIGUEZ PANDURO

EPIDEMIOLOGÍA MALARIA

A NIVEL MUNDIAL (año 2017)

219 millones de casos de malaria

- ▶ Africa (92% de los casos)
- ▶ *P. falciparum* es la especie predominante.

435.000 muertes

- ▶ Africa (93%)
- ▶ Niños menores de 5 años (66%)

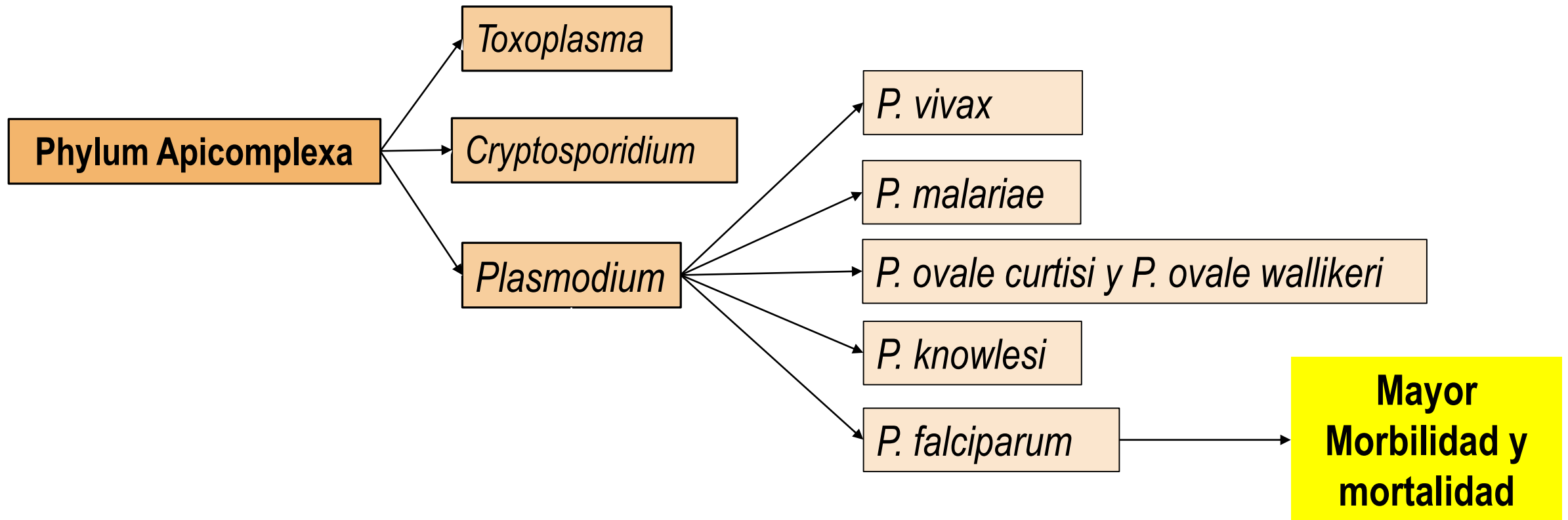
EN COLOMBIA (año 2018)

62.141 de casos notificados

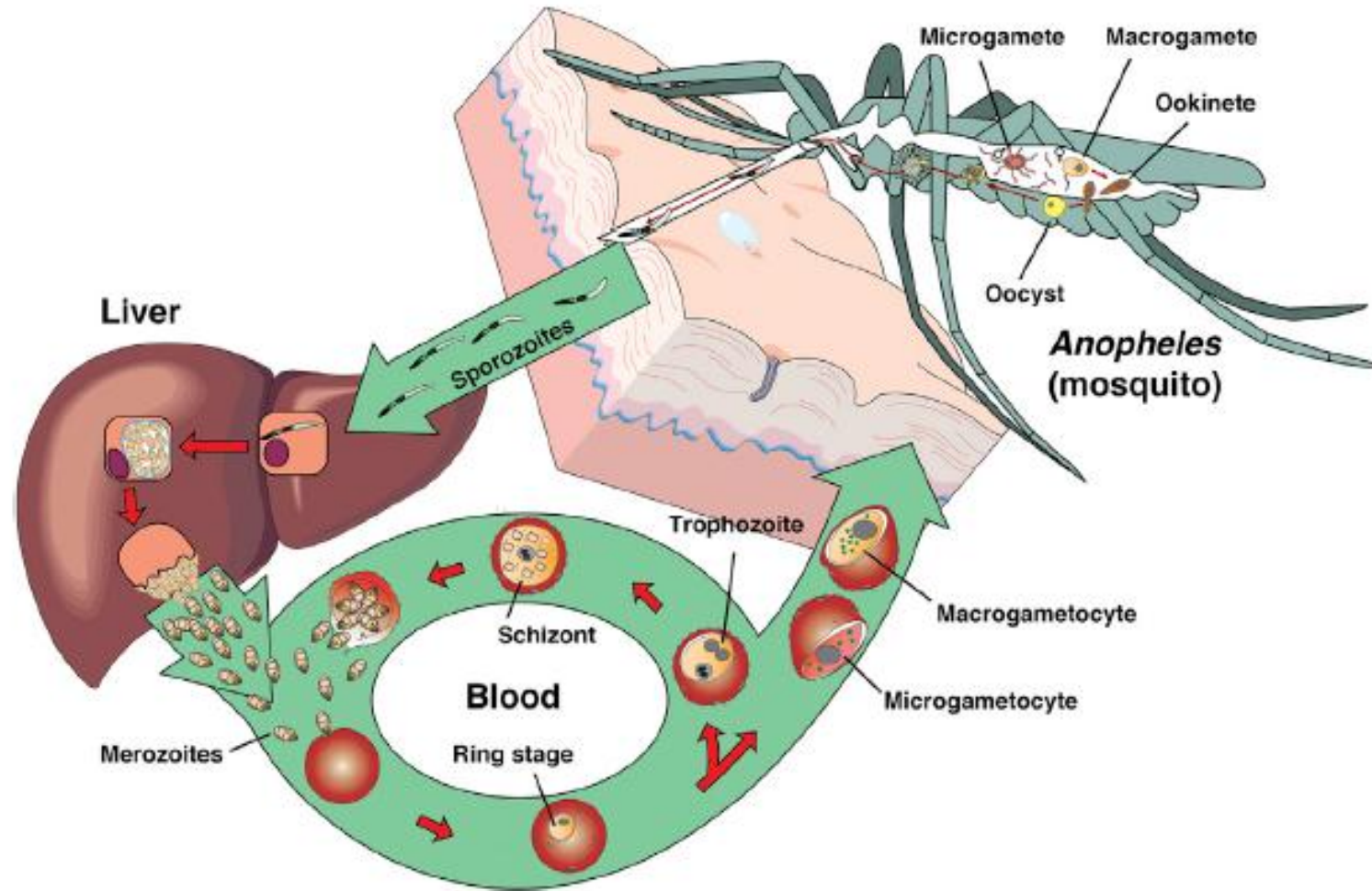
- ▶ *P. vivax* (**50,1%**)
- ▶ *P. falciparum* (**47,9%**)
- ▶ Población afrocolombiana (**40,4%**)

- ▶ Aumento del 138% de los casos procedentes del exterior

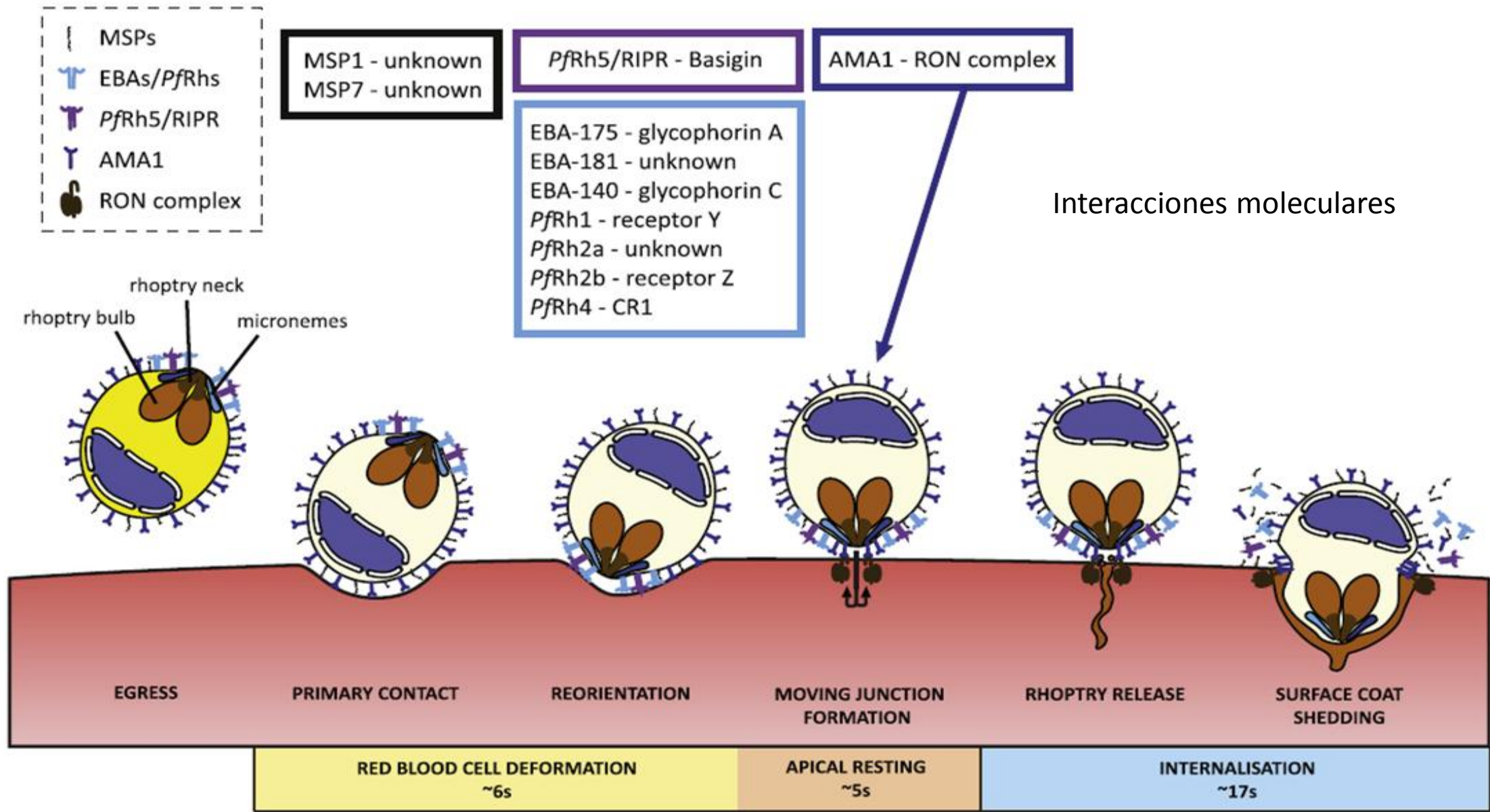
GENERALIDADES



CICLO BIOLÓGICO DE *P. falciparum*



Tomado de: Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. (2016) Malaria: Biology and Disease. Cell [Internet]. 2016;167(3):610–24.



Tomado de : Harvey KL; Gilson PR; Crabb BS. (2012). A model for the progression of receptor–ligand interactions during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum.

Plasmodium falciparum

Vías alternas de invasión

Antígenos de unión a eritrocito (EBAs)

Proteínas homologas de unión a reticulocito (Rh)

PfEBA175

PfEBA140

PfEBA181

PfRh1

PfRh2a/b

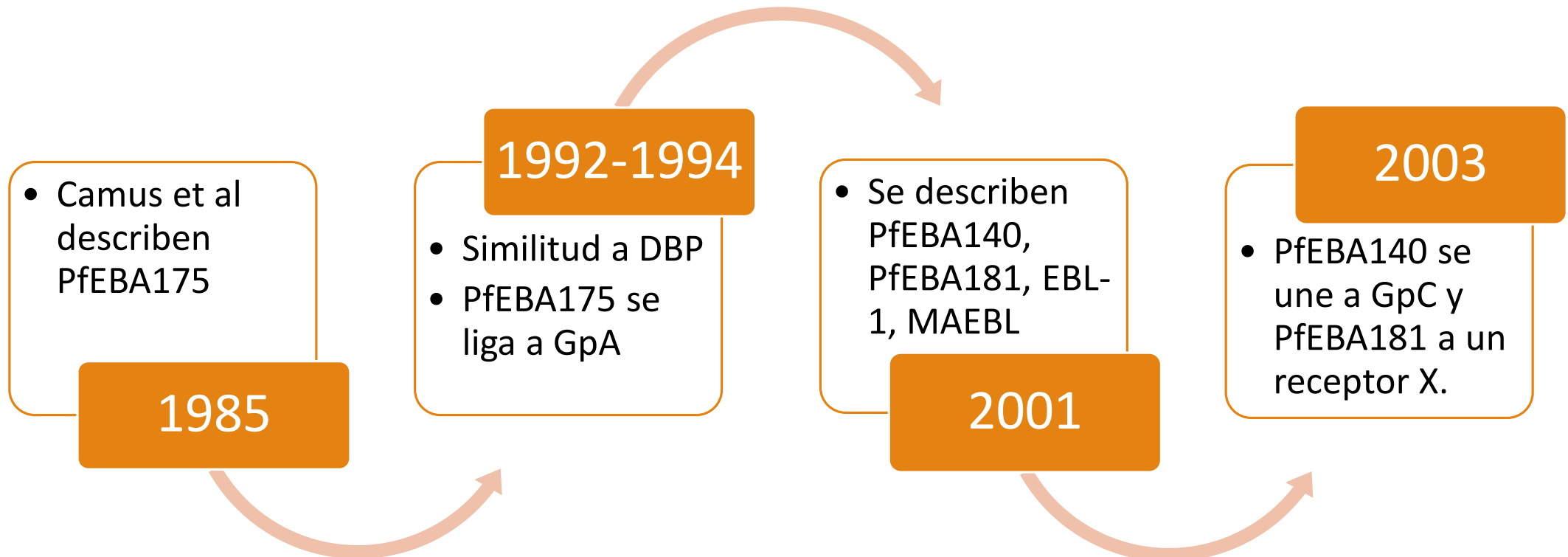
PfRh4

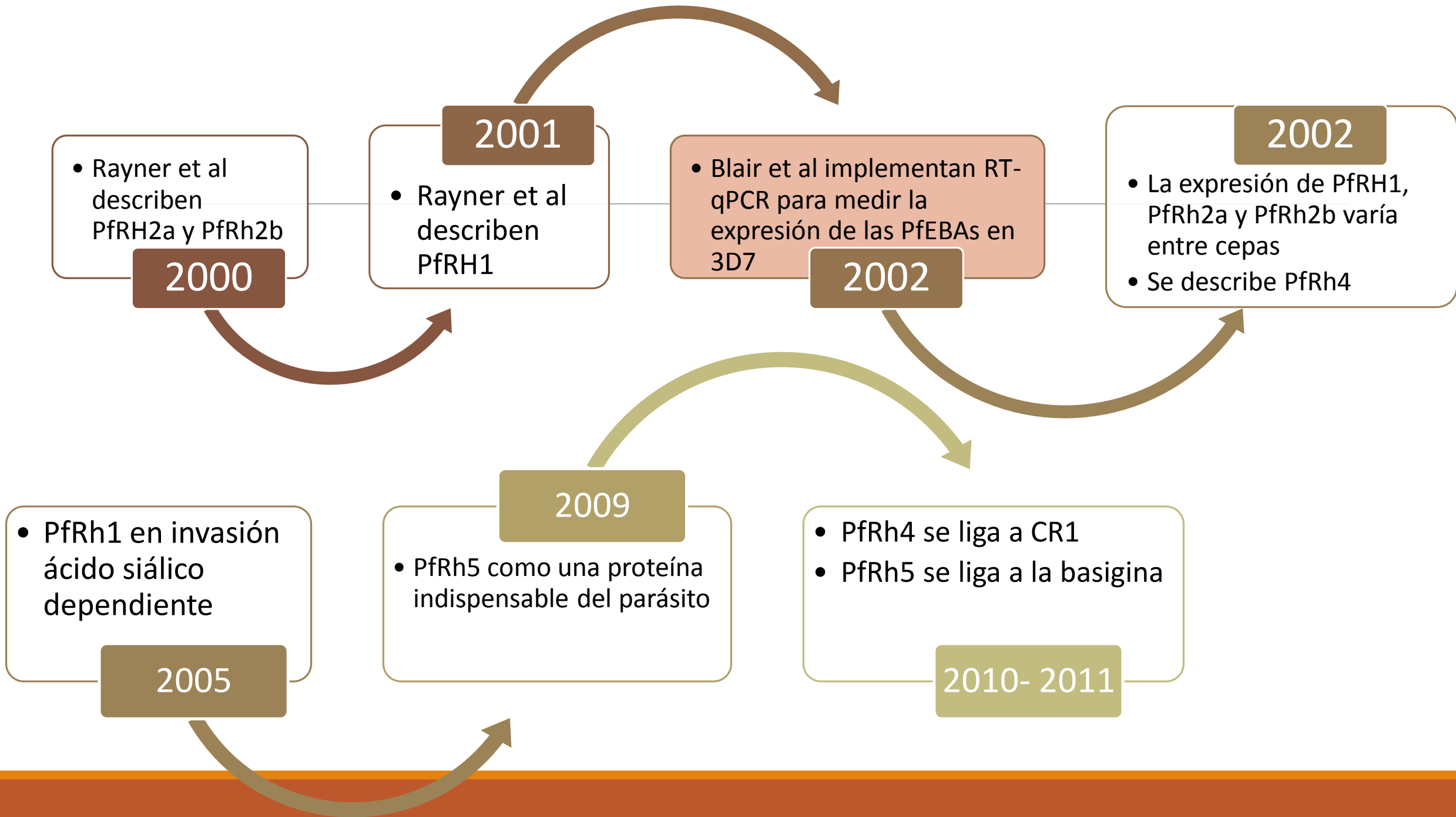
PfRh5

**Dependientes de ácido
sialico**

**Independientes de ácido
sialico**

ANTECEDENTES





Cepa FCB2 (*Falciparum* COLOMBIA BOGOTÁ 2)

1982

Espinal et al, aíslan FCB2 de un paciente del Meta.

Es una cepa resistente a cloroquina, sensible a quinina con alta producción de gametocitos y que no forma nodulaciones eritrocitarias.

2006, Garavito Et al: Actividad antimalárica de plantas nativas contra esta cepa.

2008, Arando Et al: Susceptibilidad in vitro de aislados clínicos a antimaláricos.

2011, Curtidor et al: análisis de HABPs en esporozoito, para desarrollo de vacunas

2013, Garcia Huertas et al, Efecto citotóxico y antimalárico de *Solanum nudum*

2013, Fenotipos de invasión de aislados de Brasil, Colombia y Perú.

¿Cuál es el perfil transcripcional de los principales genes involucrados en el proceso de invasión a eritrocitos de la cepa FCB2 de P. falciparum?

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil transcripcional de los genes pertenecientes a las familias de ligandos de invasión a eritrocito *Pfeba* y *Pfrh* de la cepa FCB2 de *P. falciparum* en estadios de esquizonte, por medio de la técnica RT-qPCR.

1er objetivo

Estandarizar la técnica de RT-qPCR para el análisis de la expresión transcripcional de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* de la cepa FCB2 de *P. falciparum*.

Cultivo y sincronización del parásito

**FCB2
3D7***



Medio RPMI 1640:

- Eritrocitos O+
- Plasma (10%)
- Hipoxantina 0,1M
- Hapes 1M
- Gentamicina 50ug/mL

Condiciones de incubación:

- O₂ 5%
- CO₂ 5%
- N 90%
- 37 ° C

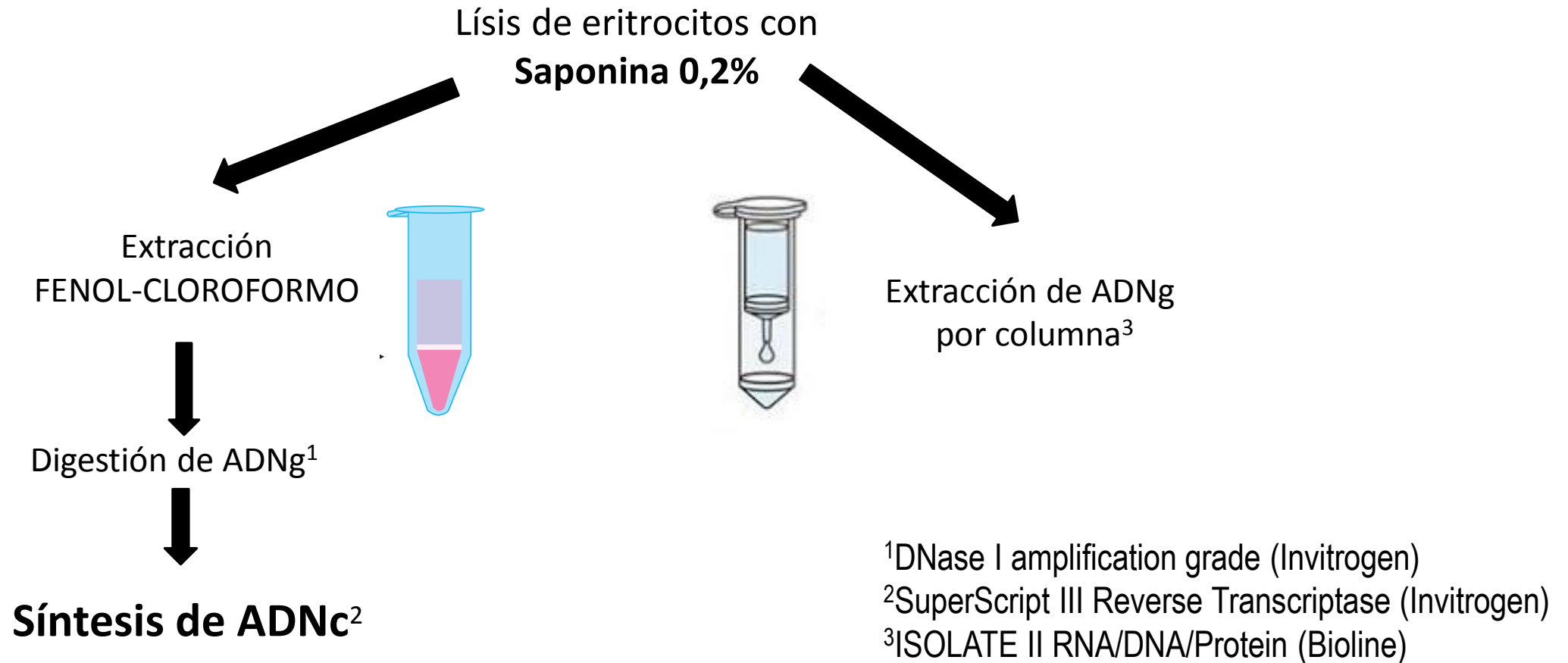
Sincronización con sorbitol al 5%

**Únicamente
Anillos de 6H**

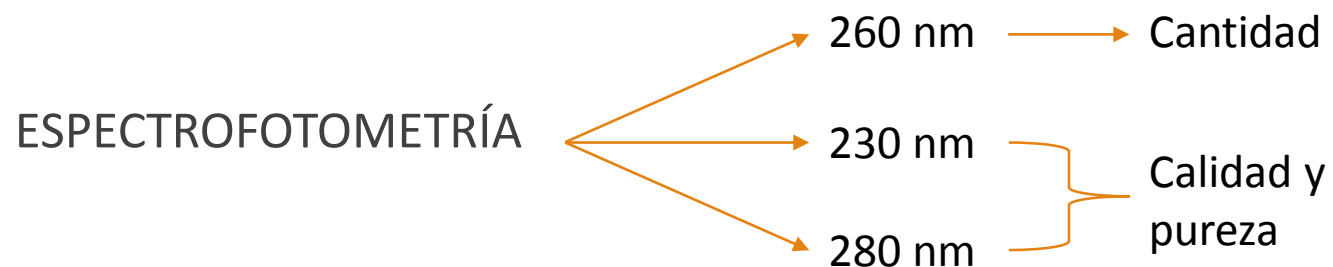
Obtención de parásitos en estadio de esquizonte aproximadamente 40H después

*BEI Resources Repository

Extracción y síntesis de ácidos nucleicos



Cuantificación de ácidos nucleicos



ADNc

<i>Cepa</i>	<i>Concentración ng/ul</i>	<i>Calidad</i>	
		<i>260/230</i>	<i>260/280</i>
FCB2 1	99,1	1,67	0,86
FCB2 2	149,8	1,69	0,34
3D7 1	96	1,55	1,03
3D7 2	135,2	1,71	0,68

ADNg

<i>Cepa</i>	<i>Concentración ng/ul</i>	<i>Calidad</i>	
		<i>260/230</i>	<i>260/280</i>
FCB2 1	19,3	1,33	0,24
FCB2 2	6,3	2,62	0,19
3D7 1	2,8	2,5	0,02
3D7 2	5,6	2,35	0,5

Estandarización de la técnica RT-qPCR

Diseño de cebadores y sonda en el programa Primer3web.

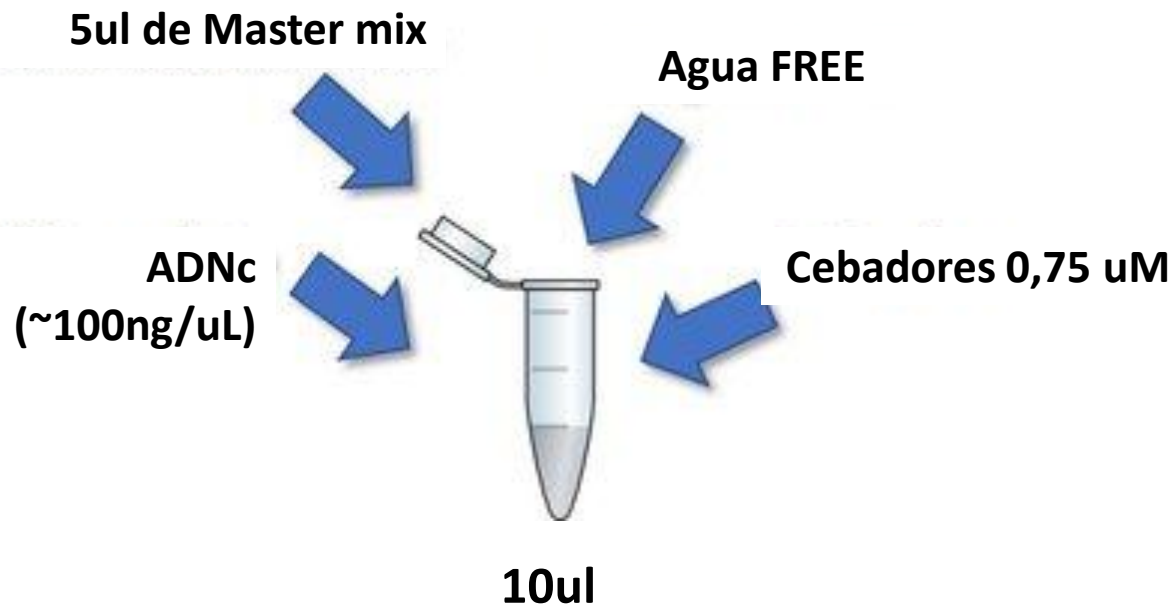
Gen	Cebador	Secuencia cebador(5'-3')	Sonda
<i>Pfeba140</i>	Directo	ACCGGGTCCTTGTTCTAGAGA	CY5 – AAGCGAGGGTCAATCAAGCATTCCCTT – BHQ2
	Reverso	TCTTCATTACTTTTCCCCATTCTAGA	
<i>Pfeba175</i>	Directo	TGTACGAAAAGGGAATTTGATGATCC	CY5 – CAGAAAGGAGGCTTTTTCAAGTATGCCA – BHQ2
	Reverso	ACTCCTTCAGAACTTTGATATTTGGC	
<i>Pfeba181</i>	Directo	ACATGTTCTGAAGACAAAAGGT	CY5-TGCCGGGGGTGGTATAATAGCC-BHQ2
	Reverso	AAAAGCAGAATCATTTAAATTAGAATCG	
<i>Pfrh1</i>	Directo	TGATAATAATTATGAACCTACCCCTTCA	CY5 – CTTACATGGGTAACGGTAGTAACTCGA – BHQ2
	Reverso	AATACCGTTTTCTCTTCTCGATAG	
<i>Pfrh2a</i>	Directo	ACAGAATCAACTAAAAGATCAGGAACA	FAM – ACAGCAGGAAGTGTAGCTTTATGTGTGT – BHQ1
	Reverso	ACATCATCATTCGGTTCAAAGCT	
<i>Pfrh2b</i>	Directo	AGTCCTATCAGCAATGCGTATGA	FAM – TGACCAACGTGATGCTAGTAGTCATGGT – BHQ1
	Reverso	CCATATGAATGTCGCTACCAACA	
<i>Pfrh4</i>	Directo	TGCCTATAACTCAACAGCAACTT	FAM – TGAGGAGGAAAATGAAATGGGATATGGCA – BHQ1
	Reverso	TGCTTGCTCTCCTATGGTGGT	
<i>Pfrh5</i>	Directo	AGTCCTCTACATATGGAAAGTGT	FAM – ATGAAACATATGACAAAAGTGAAAAGT – BHQ1
	Reverso	CGGTTTCATCATCTGTCTTCA	
<i>Pfama1</i>	Directo	GGATTATGGGTCGATGGAAATTGTG	HEX – CCGAAGCACTCAATTCA – BHQ1
	Reverso	CATAATCTGTAAATGTTGTTTCATATTGTTTAGGTTGAT	

Nery et al. (2006)



PCR punto final

GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega)



CONDICIONES DE TERMOCICLADO

95°C por 2 min (denaturación inicial)

95°C por 15 s (denaturación)

55°C por 1 (anillamiento)

75°C por 30s (extensión)

72°C por 2 min (extensión final)

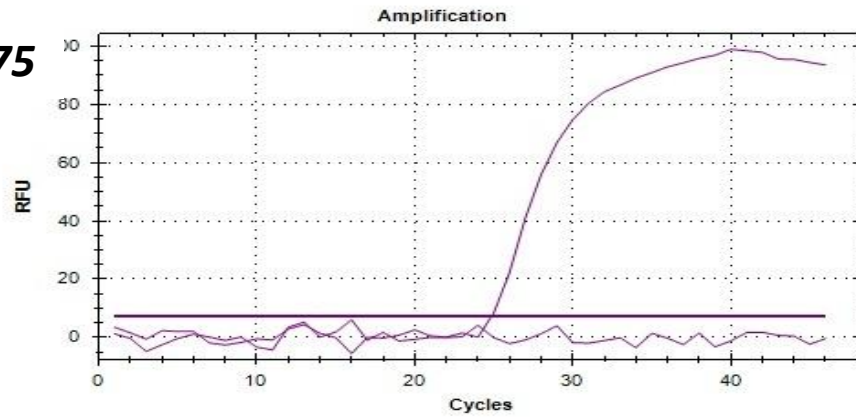
45
Ciclos

Electroforesis

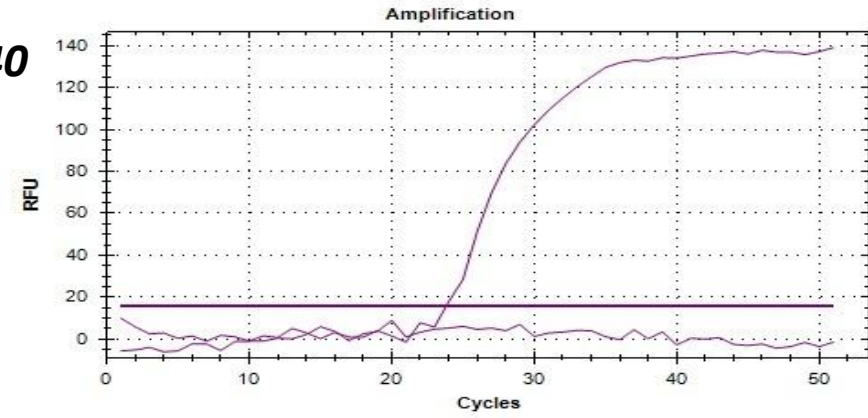


RT-qPCR

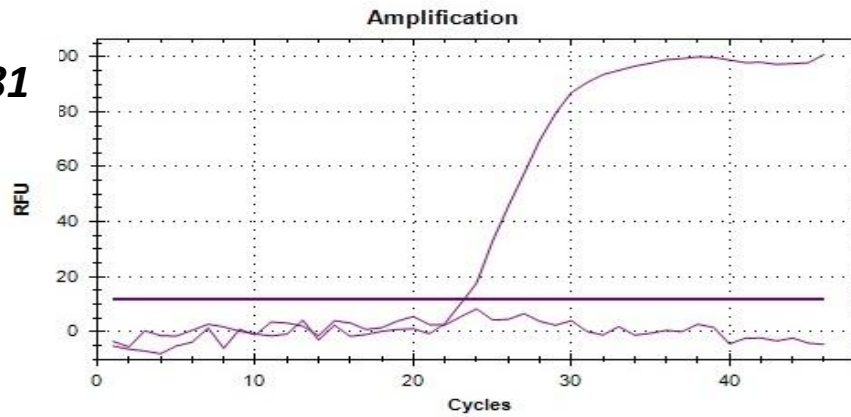
Pfeba175



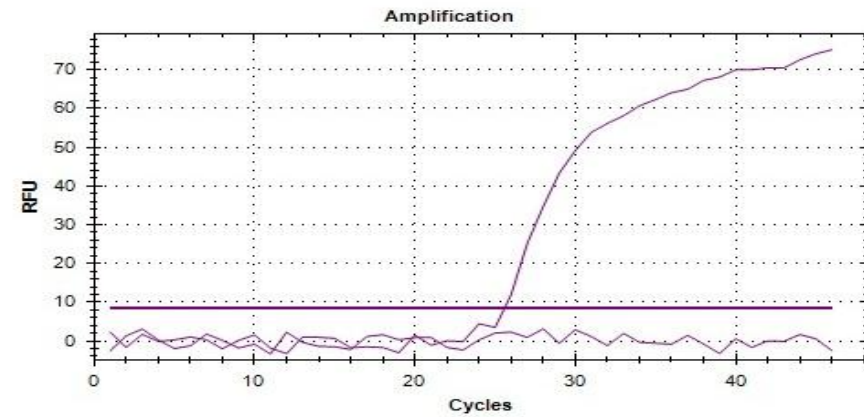
Pfeba140



Pfeba181

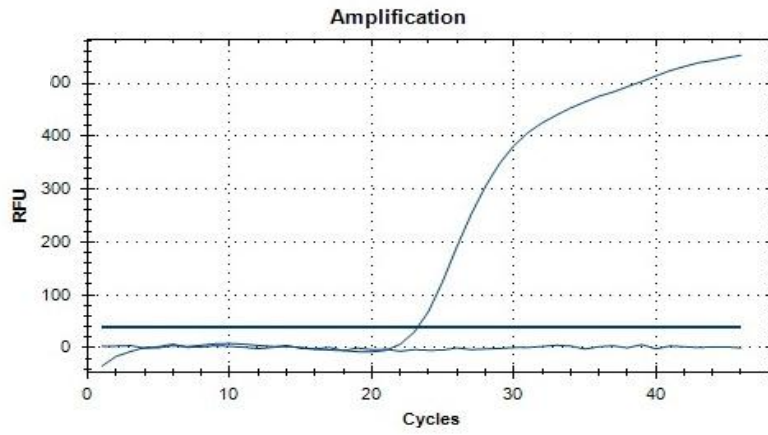


PfRh1

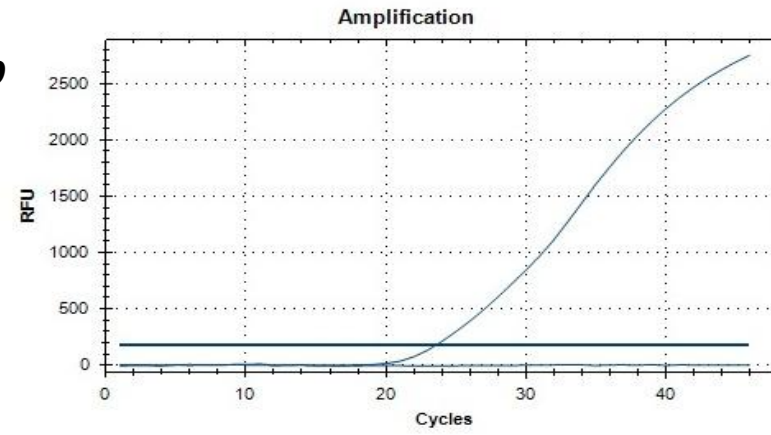


FLUOROFORO CY5

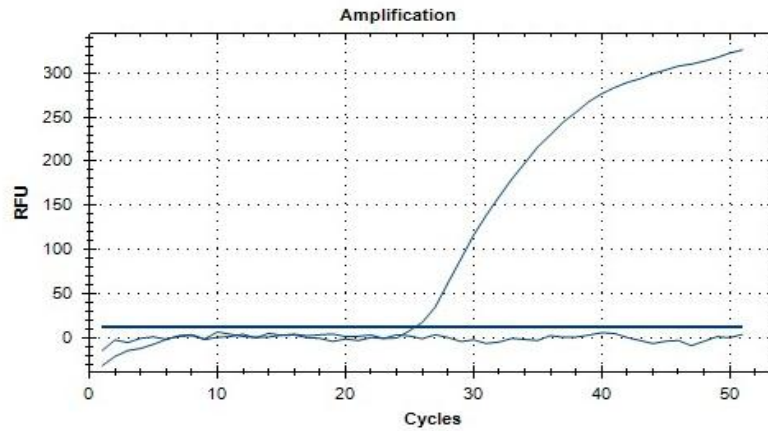
PfRh2a



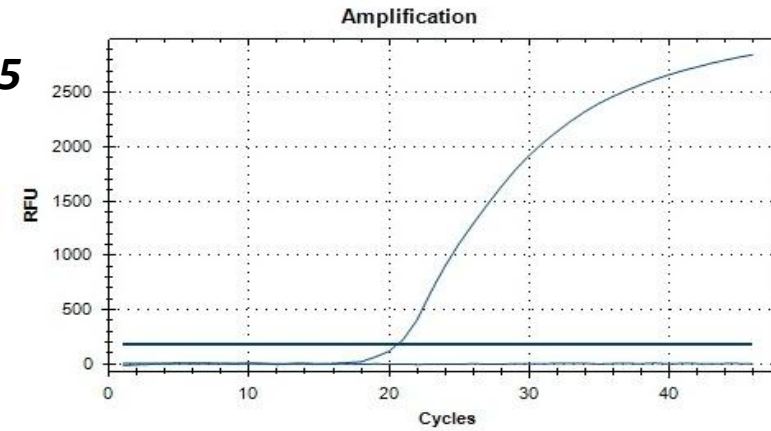
PfRh2b



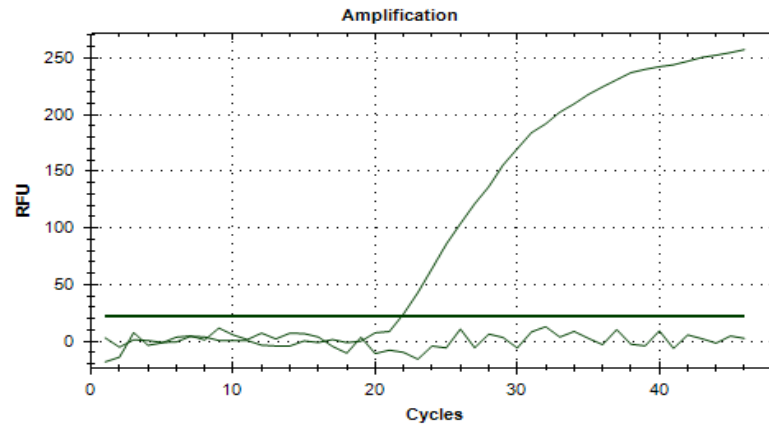
PfRh4



PfRh5



Pfama-1



FLUOROFORO FAM

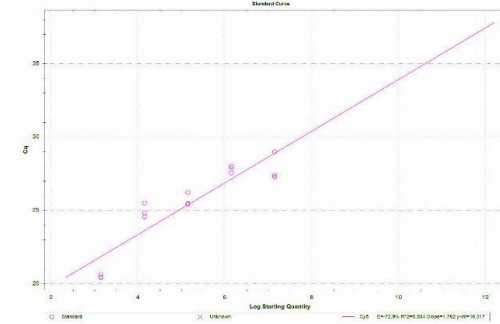
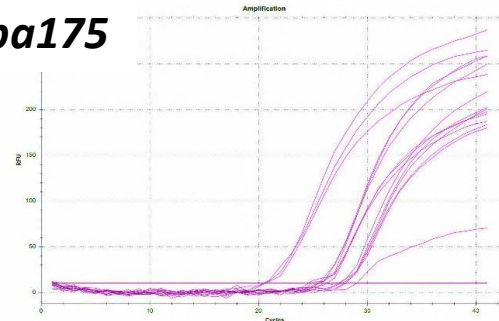
FLUOROFORO HEX

2do objetivo

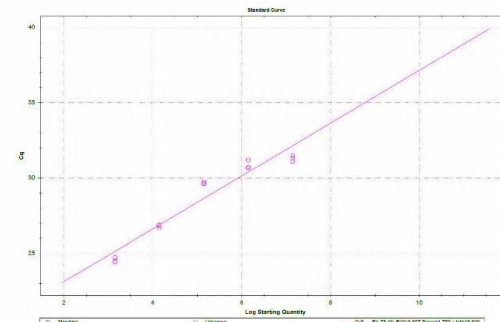
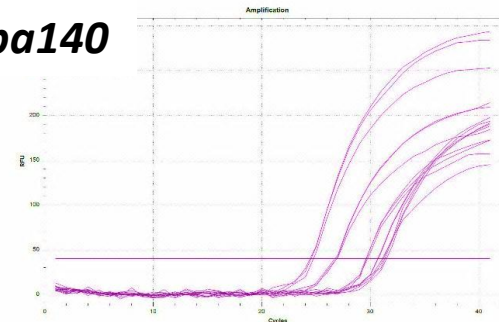
Cuantificar mediante RT-qPCR, la expresión de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5* de la cepa FCB2 de *P. falciparum*.

Curvas de estandarización

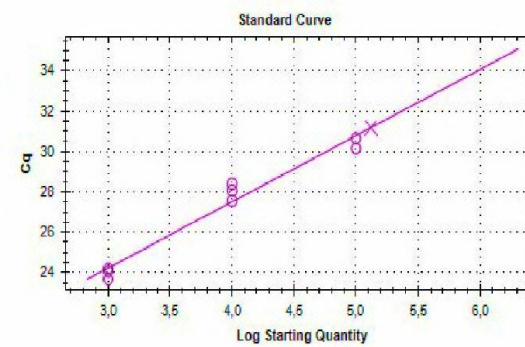
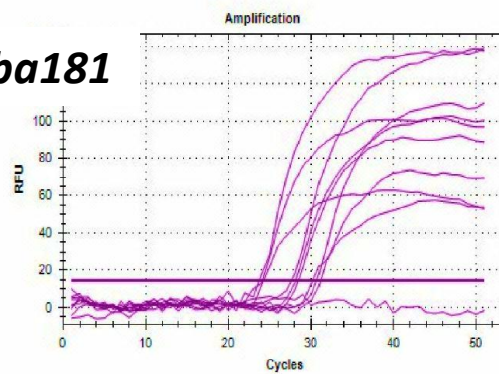
Pfeba175



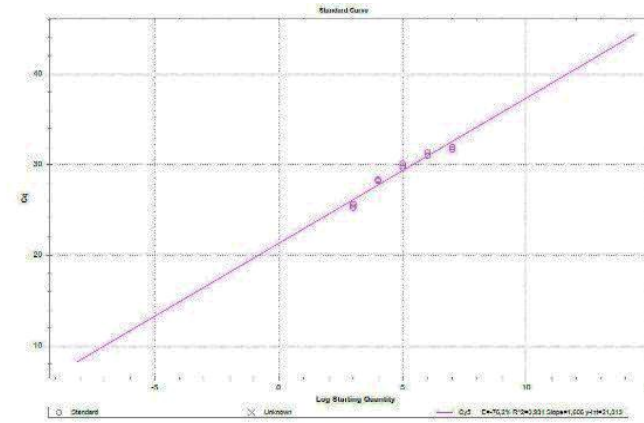
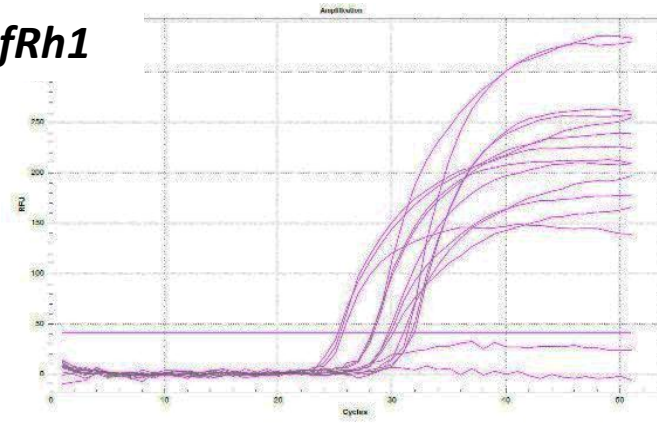
Pfeba140



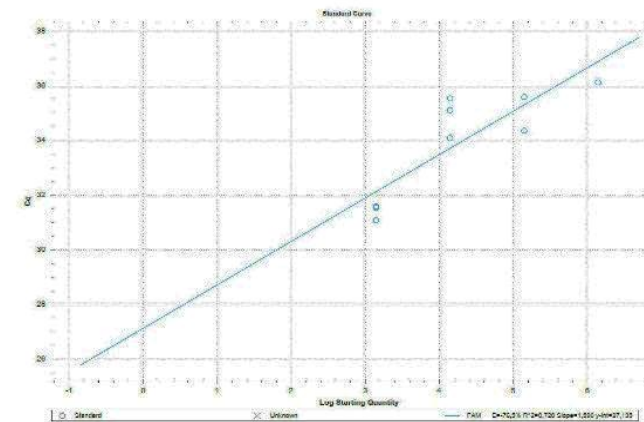
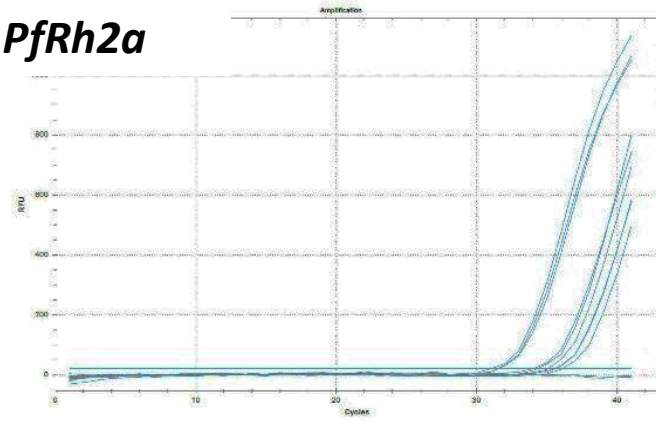
Pfeba181



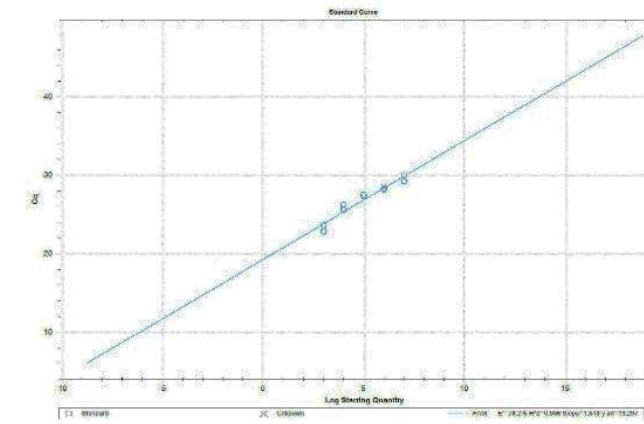
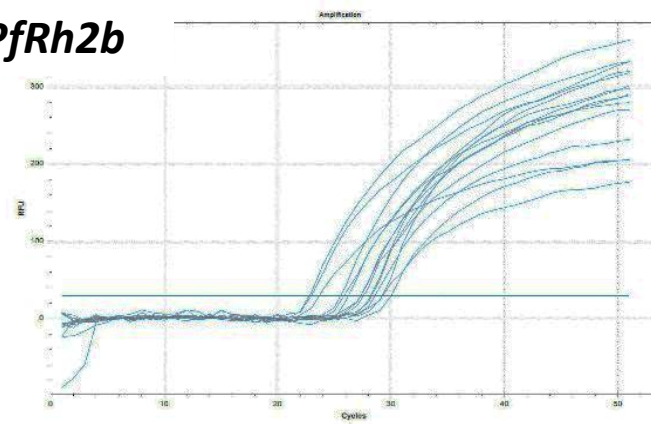
PfRh1



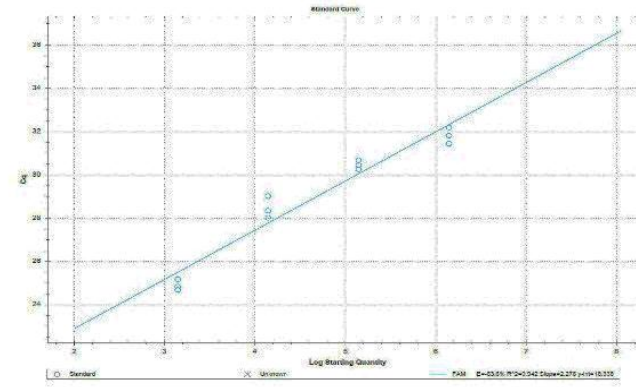
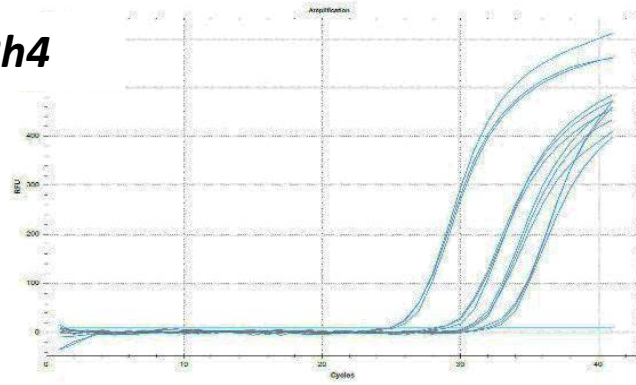
PfRh2a



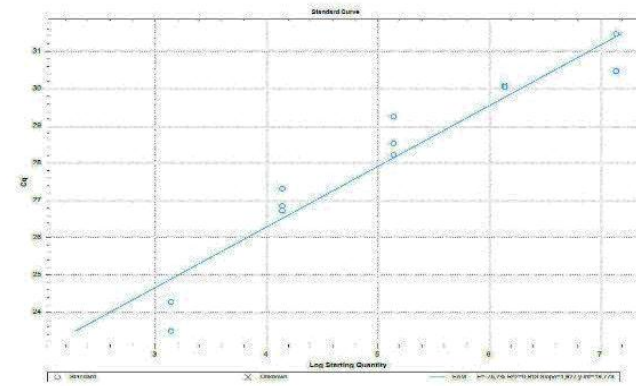
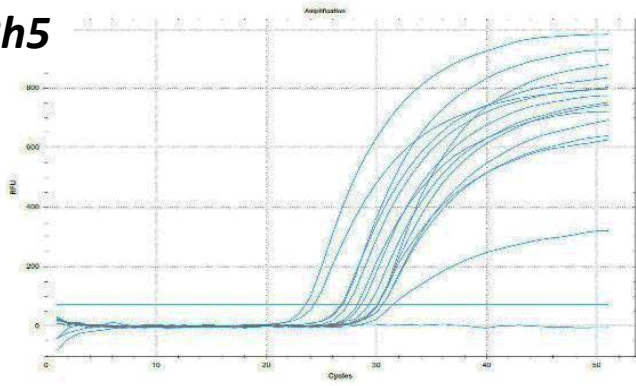
PfRh2b



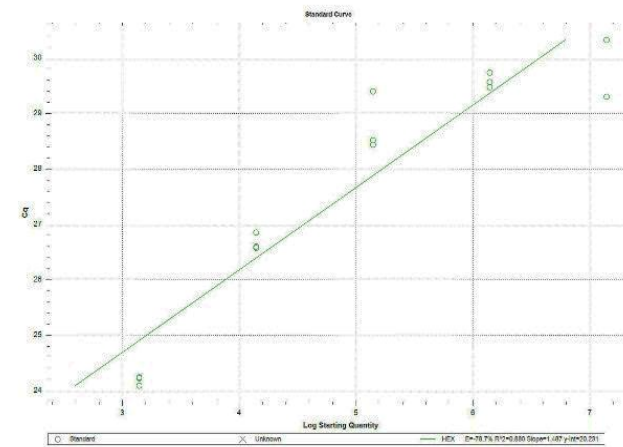
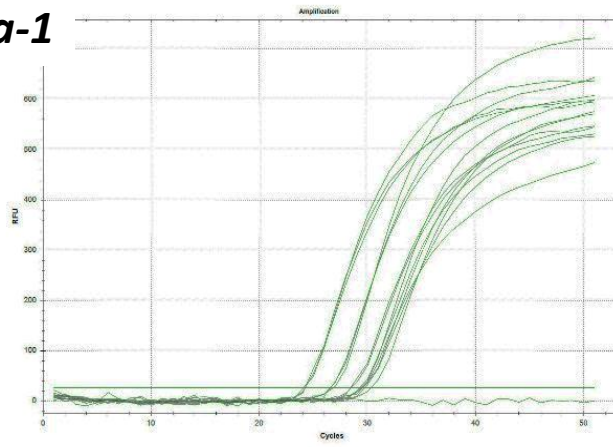
PfRh4



PfRh5



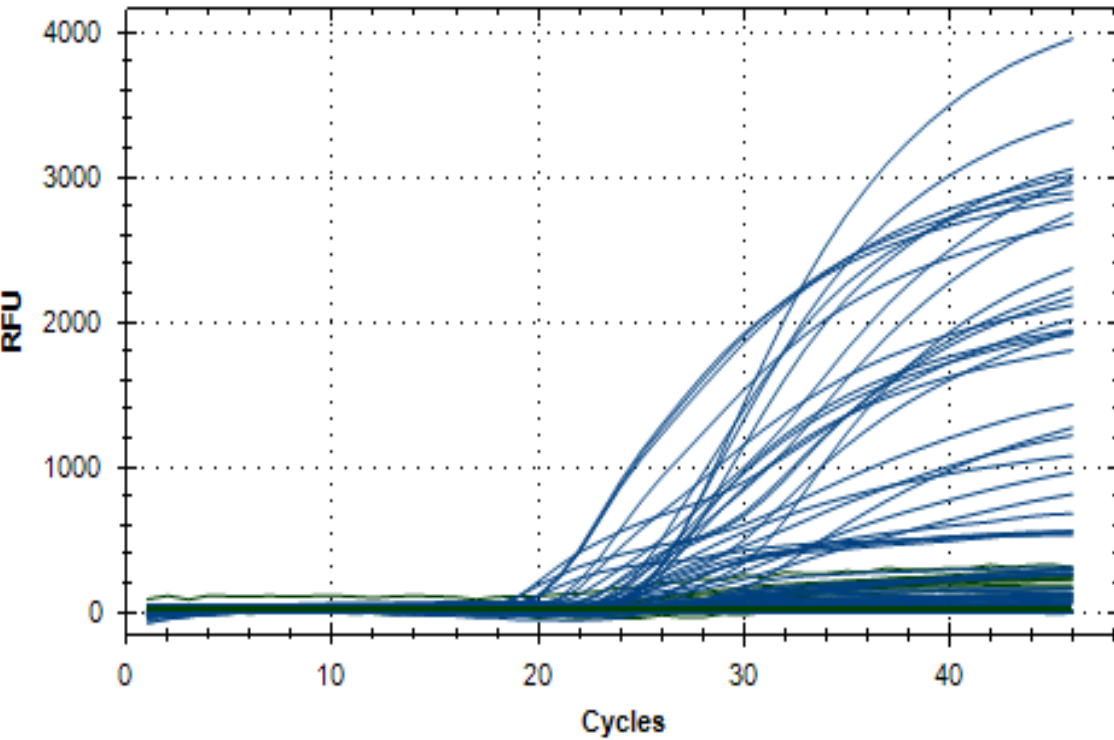
Pfama-1



E = 60 -78%
R2=0.88-0.96

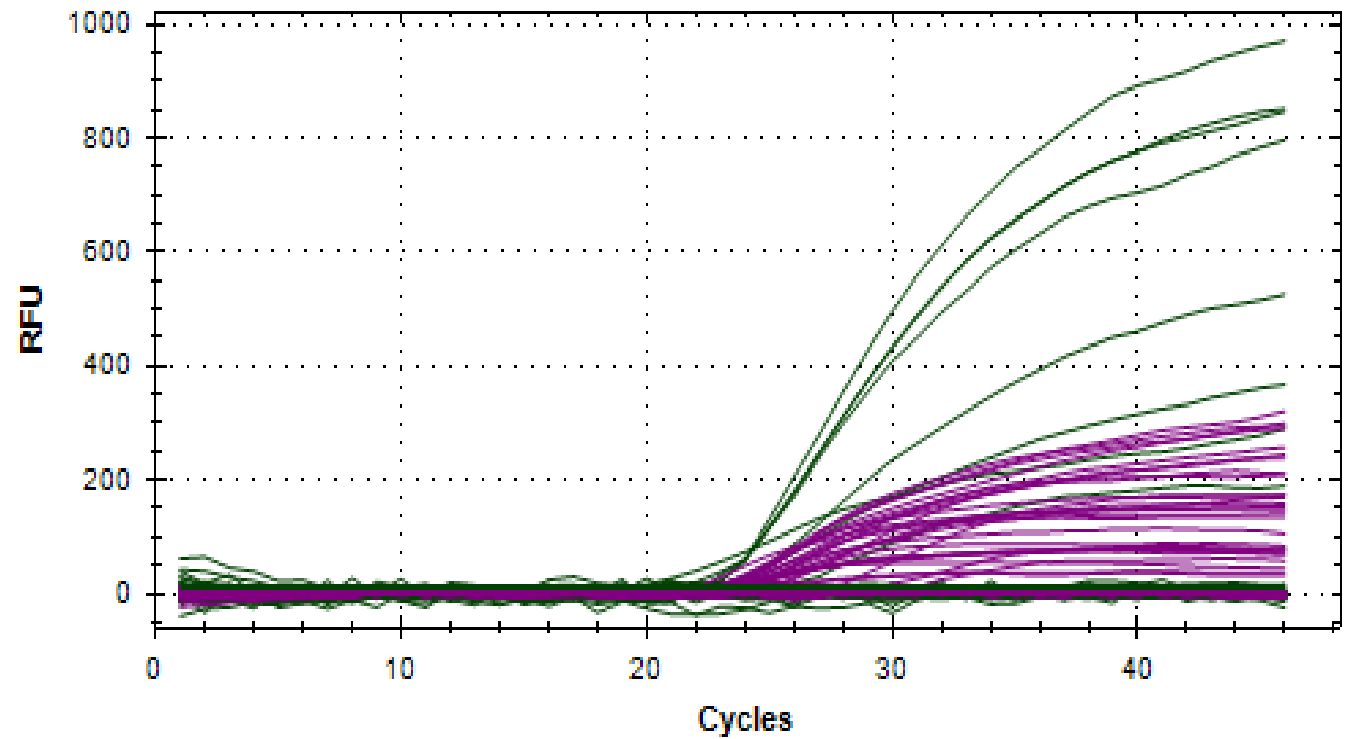
Montaje de placas

Amplification



Fluoroforo FAM (genes *PfRH*)

Amplification

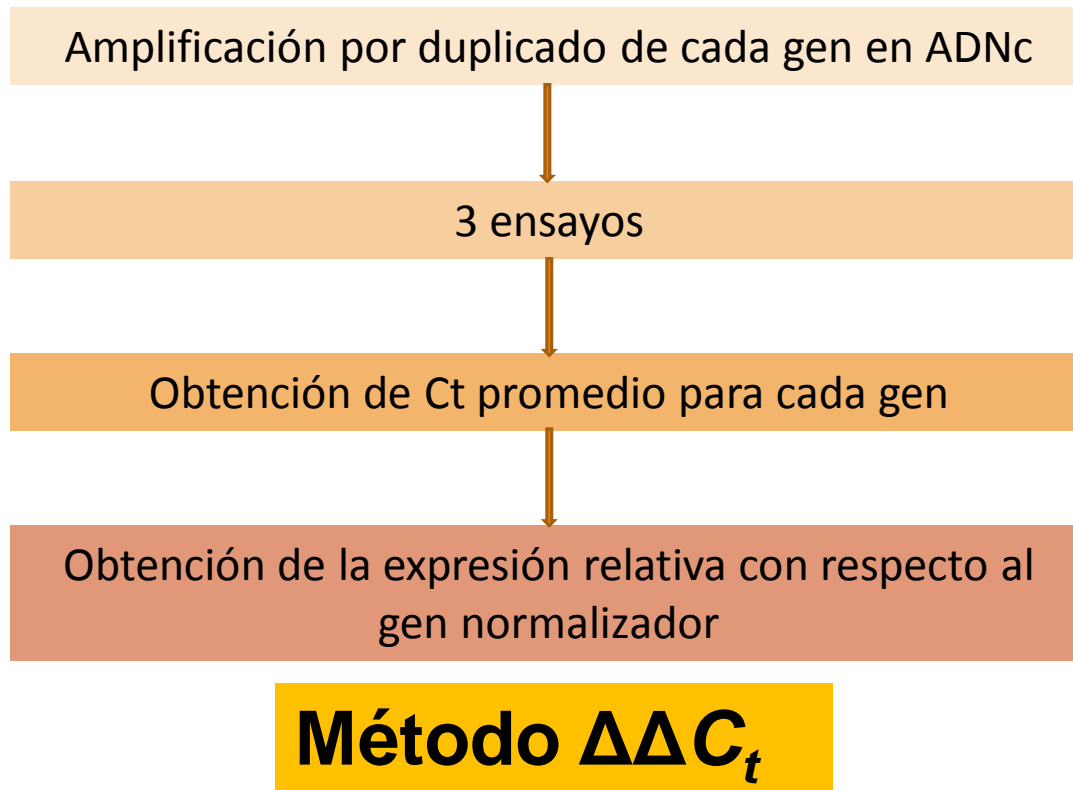


Fluoroforo Cy5

3er objetivo

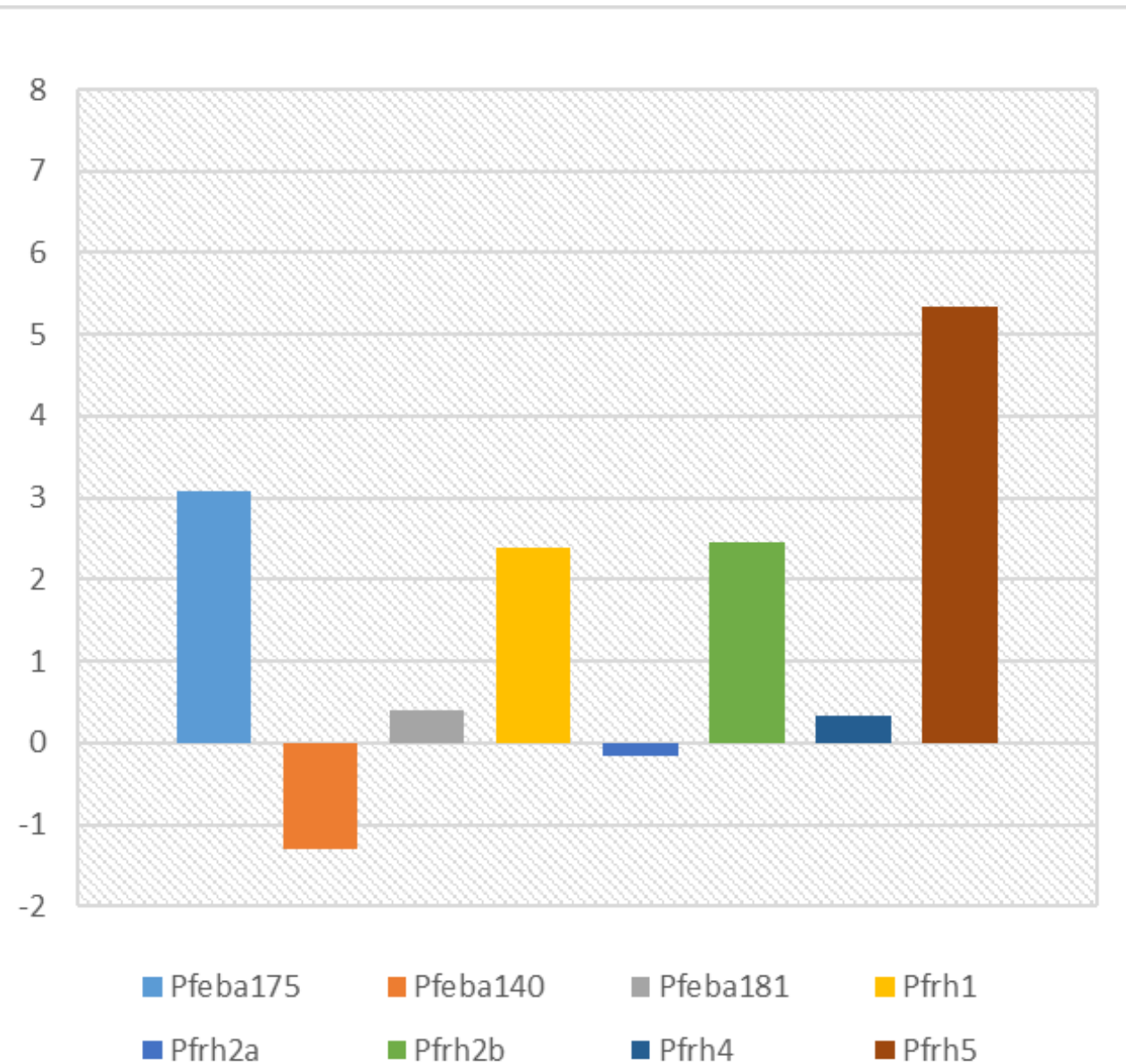
Describir el perfil transcripcional de los genes de invasión a eritrocito *Pfeba175*, *Pfeba140*, *Pfeba181*, *Pfrh1*, *Pfrh2a*, *Pfrh2b*, *Pfrh4* y *Pfrh5*, de la cepa FCB2 de *P. falciparum* en el estadios de esquizonte.

DETERMINACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE INVASIÓN



Genes	Ct promedio	Expresión relativa
<i>Pfeba175</i>	24,755	3,085
<i>Pfeba140</i>	29,145	-1,305
<i>Pfeba181</i>	27,45	0,39
<i>Pfrh1</i>	25,46	2,38
<i>Pfrh2a</i>	28,01	-0,17
<i>Pfrh2b</i>	25,39	2,45
<i>Pfrh4</i>	27,5	0,34
<i>Pfrh5</i>	22,5	5,34
<i>Pfama-1</i>	27,84	

**PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS
GENES PERTENECIENTES A LA
FAMILIA PFEBA y PFRh RESPECTO A
PfAMA-1**



CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica RT-qPCR para el análisis de los 8 genes a estudiar, incluyendo el gen normalizador, sin embargo es necesario optimizar la técnica para obtener resultados más reproducibles.
- En los merozoitos de la cepa FCB2 se transcriben los 8 genes de estudio en diferentes proporciones, de manera preliminar se puede observar que hay una mayor expresión de los genes pertenecientes a la familia *PfRh*, en comparación a la familia *PfEBA*.
- Posiblemente y en concordancia con estudios previos de aislamientos obtenidos en Colombia, puede que FCB2 invada eritrocitos en una vía independiente de ácido siálico.

RECOMENDACIONES

Lo ideal es optimizar la técnica y complementar el trabajo mediante la utilización de ensayos de invasión a eritrocitos tratados enzimáticamente y técnicas como citometría de flujo, para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

THANK YOU

GRACIAS
ARIGATO
SHUKURIA

DANKSCHEEN
JUSPAXAR

TASHAKKUR ATU
YAQHANYELAY
SUKSAMA
EKHMET
MEHRBANI
GRAZIE
MAAKE
PALDIES
KOMAPSUNNIDA
GOZAIMASHITA
EFCHARISTO

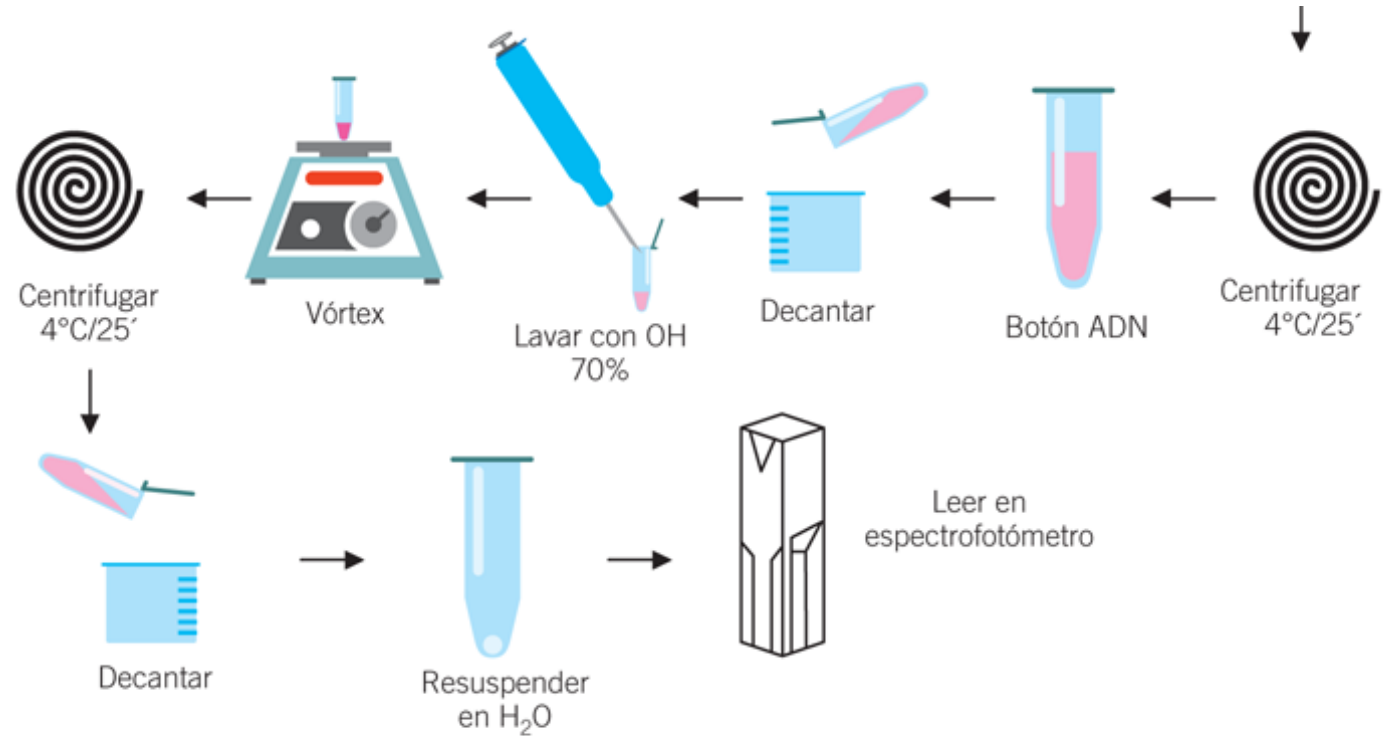
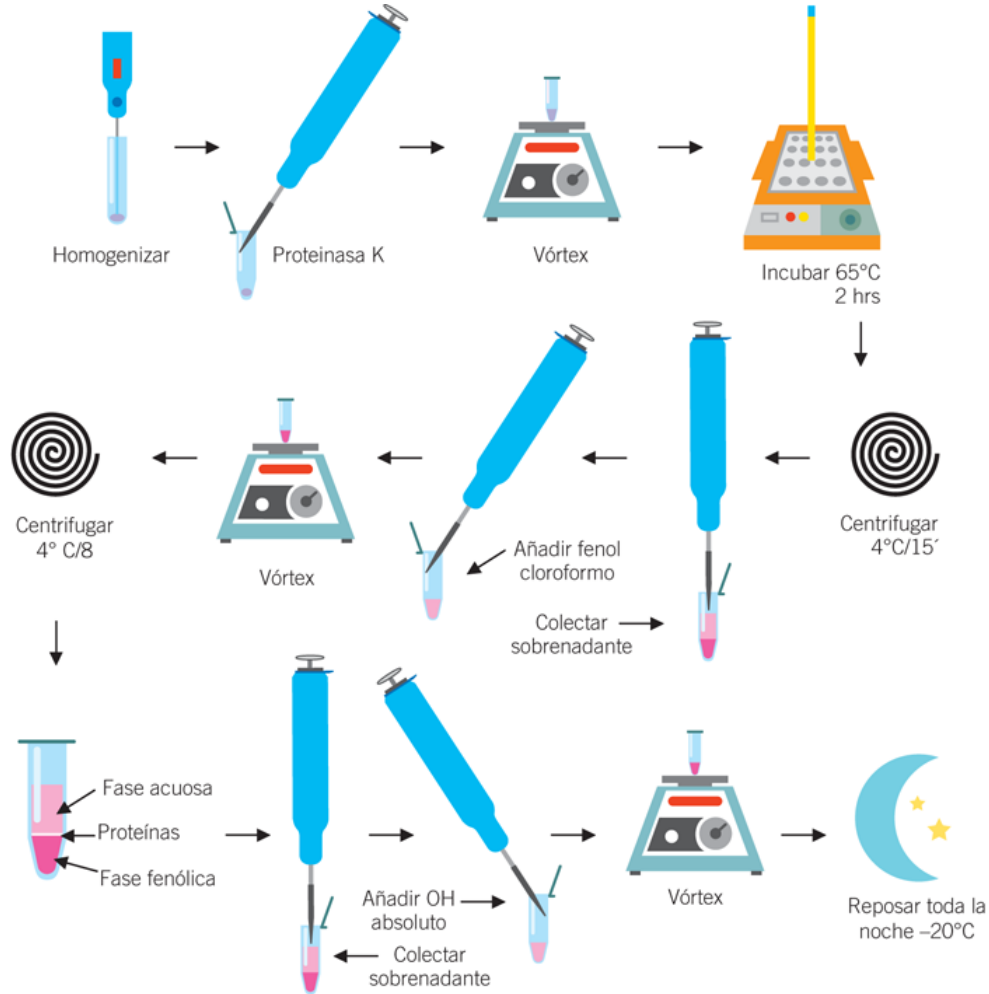
BIYAN
SHUKRIA
TINGKI
BOLZIN
MERCI

SPASIBO
SNACHALNYA
NOHON
CHILTU
YUPEKABATAM
MADEEJA
MAITEKA
IRI
SHUNYABAD
ATTO
AMBA
SHIBESI
SPASIBO
DENKOUJA
HEMACHALNYA
UNALCHESH
UNALCHESH
HATUR SU
EXOU
SIKOMO
MAKETAJ
MBIMONCHAR
SAVCO
HERASTAWY
GAEJTNO
TAYTAPUCH
MEDAWAGSE
BAKKA
AGUYJE
FAKAAUE

DIAPPOSITIVAS DE APOYO

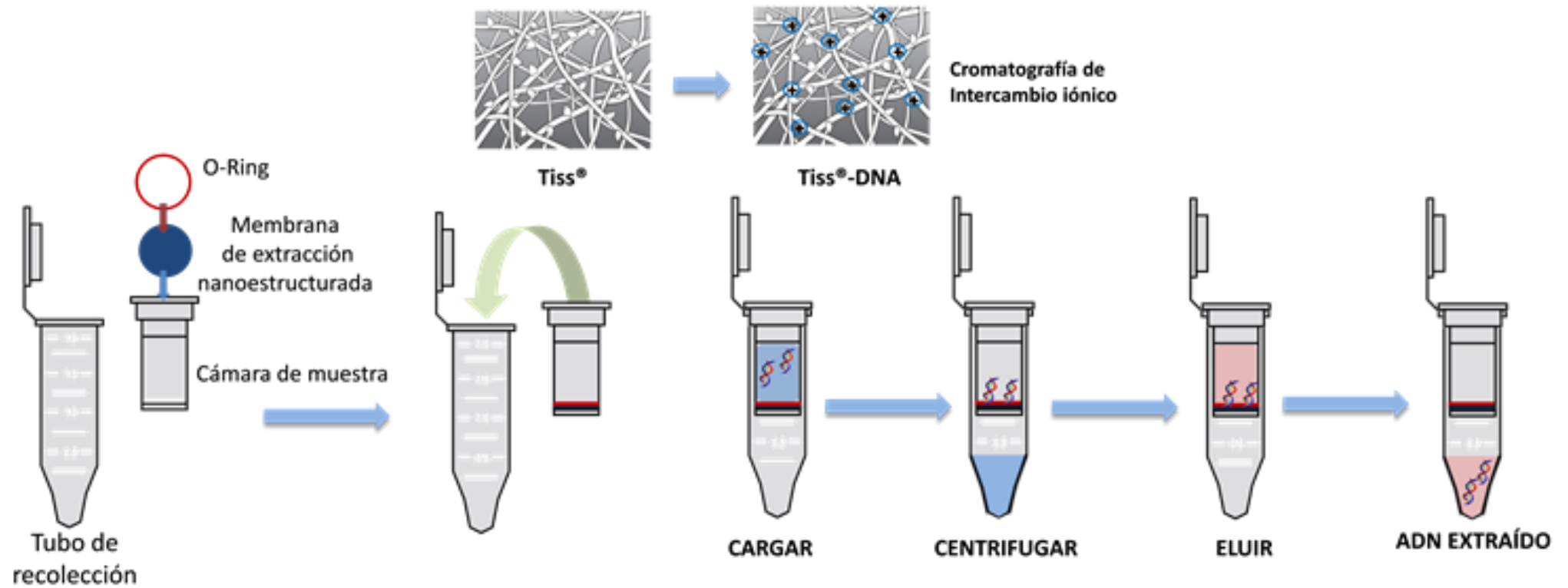


Extracción FENOL-CLOROFORMO



Fuente: Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez, Juan Socorro Armendáriz Borunda: *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Extracción por columna



<http://blog.nanomyp.com/tiss-dna-extraccion-selectiva-de-adn>

Retrotranscripción



El primer oligo dT se une al mRNA



La transcriptasa reversa copia la primera cadena de cDNA



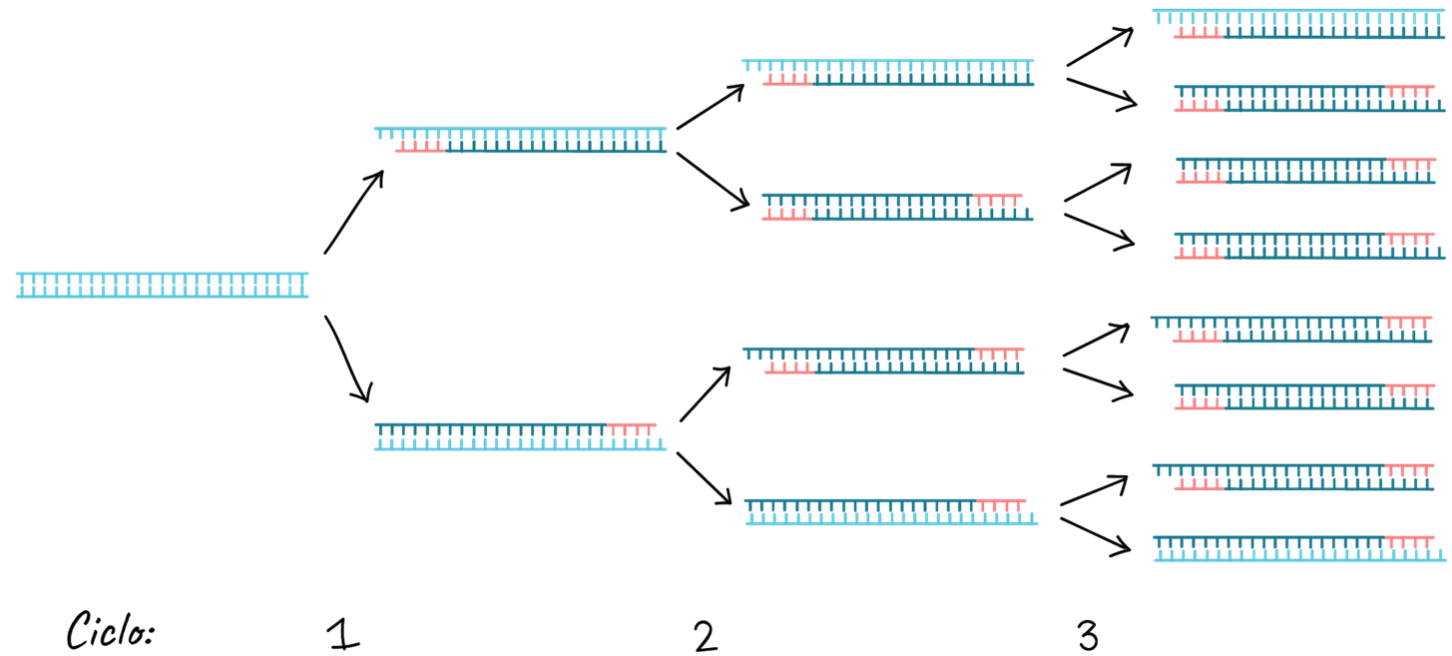
La transcriptasa reversa digiere y remueve el mRNA y copia la segunda cadena de cDNA



cDNA de doble cadena

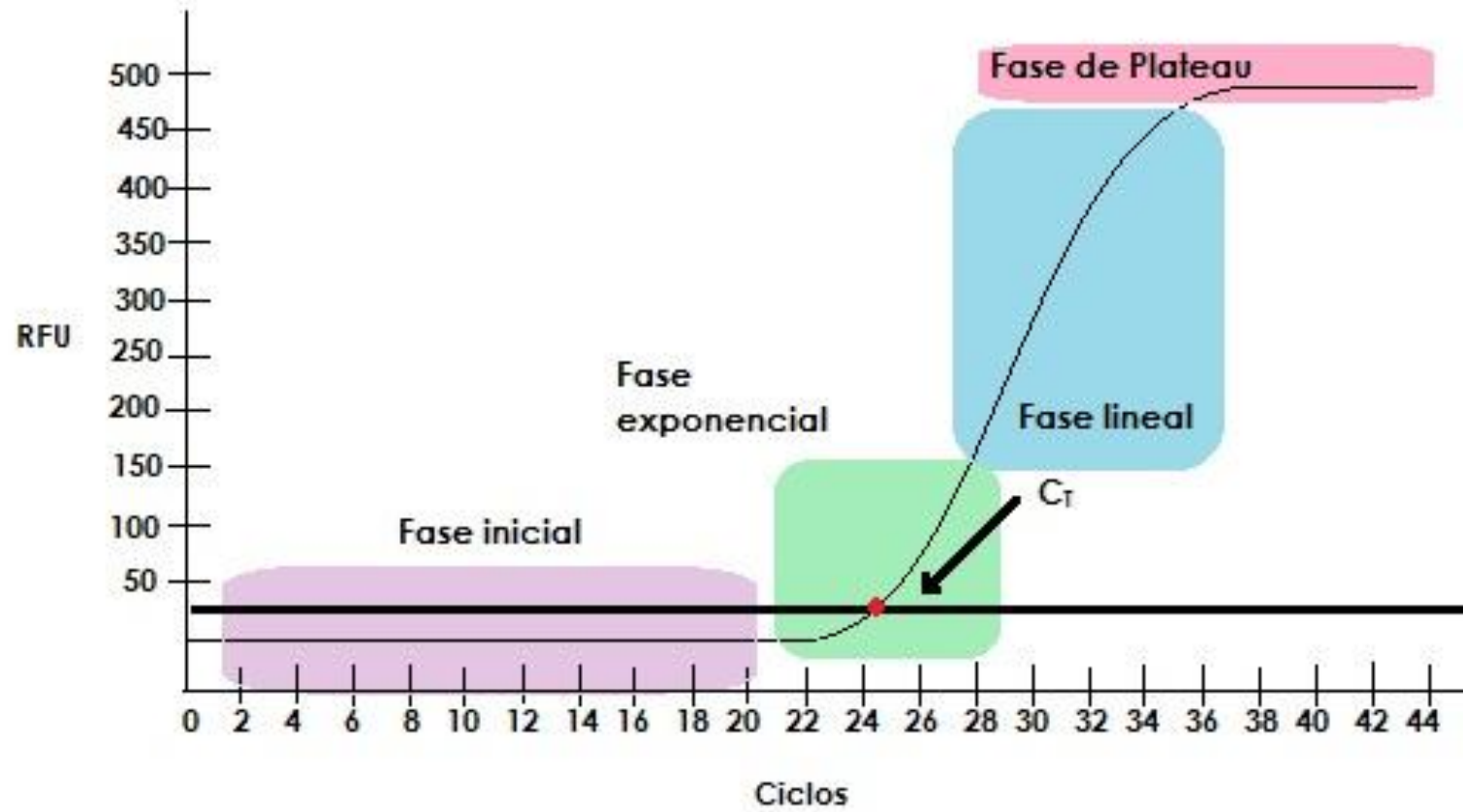
PCR

- PCR convencional
- PCR anidada
- qPCR
- RT-PCR
- PCR Multiplex
- PCR In Situ
- PCR mutagénesis

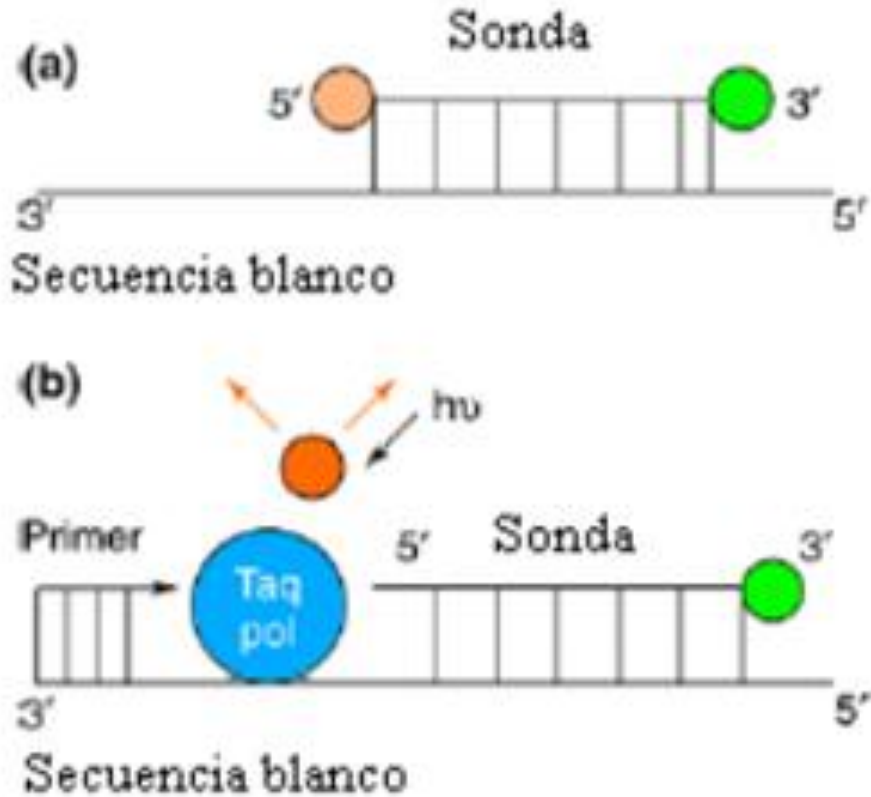


<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

qPCR

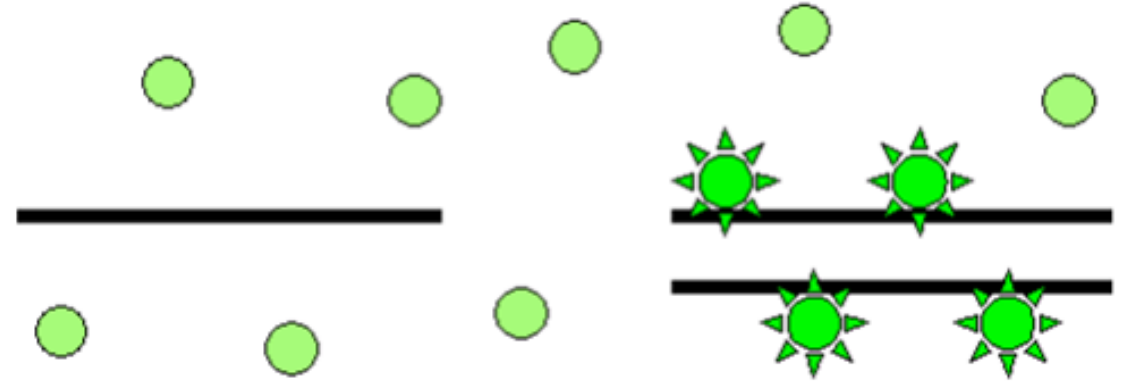


Sonda de hidrólisis (TaqMan)



- 5' a 3'
- Fluoróforo y quencher
- Específico

SyBr Green ($C_{32}H_{37}N_4S$)



- Agente intercalante
- Es inespecífico
- Curva de Melting

Cuantificación absoluta

- Estudio de un solo gen
- Curva estándar de gDNA de diferentes concentraciones

Cuantificación relativa

- Estudio de varios genes
- Curva estándar de gDNA de diferentes concentraciones
- Genes Housekeeping