



**Estudio preliminar de la expresión de un fragmento de la proteína hipotética
PFL1395c de *Plasmodium falciparum* en un sistema heterólogo.**

**Yuri Tatiana Cárdenas Galindo
Jeymy Victoria Contreras Jiménez**

**Edith del Carmen Hernández Rojas - MSc
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Asesora Interna**

**Gladys Thalía Cortés Cantín - cPh.D.
Docente Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia
Asesora Externa**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2019**



**Estudio preliminar de la expresión de un fragmento de la proteína hipotética
PFL1395c de *Plasmodium falciparum* en un sistema heterólogo.**

**Yuri Tatiana Cárdenas Galindo
Jeymy Victoria Contreras Jiménez**

Trabajo de grado para optar el título de bacteriólogo y laboratorista clínico

**Edith del Carmen Hernández Rojas - MSc
Docente Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Asesora Interna**

**Gladys Thalía Cortés Cantín - cPh.D.
Docente Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia
Asesora Externa**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C
2019**

Dedicatoria

A nuestros padres, como una forma de agradecimiento por su apoyo y amor incondicional.

Agradecimientos

A Dios por darnos la fuerza y sabiduría para lograr finalizar con éxito este trabajo de grado.

A nuestros padres por su apoyo y motivación diaria.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por todo el apoyo y comprensión recibidos.

A la Universidad Nacional de Colombia por habernos brindado la oportunidad de realizar este trabajo de grado en sus instalaciones y especialmente a nuestro grupo de investigación, Biología Celular por todo el aprendizaje brindado durante el desarrollo del mismo.

A nuestra asesora, la Dra. Gladys Thalía Cortés Cantín, por su apoyo incondicional, por su paciencia, confianza y aprendizaje brindado.

A nuestra asesora, Edith del Carmen Hernández Rojas por todo su apoyo, orientación y comprensión durante la realización de éste trabajo.

A la Dra. Gabriela Arévalo por su colaboración, comprensión y aportes durante el desarrollo de nuestro trabajo de grado.

A la Facultad de Medicina por permitirnos elaborar el trabajo de grado en sus instalaciones.

A los coordinadores de los siguientes laboratorios:

Doctora Myriam Navarrete (Microbiología/Inmunología, Facultad de Ciencias). Doctor Claudio Jaime Gómez (Farmacia, Facultad de Ciencias). Yolanda Cárdenas (Equipos comunes, Facultad de Medicina).

Dirección de investigación y extensión de la Universidad Nacional de Colombia.

Por último, agradecemos a todas las personas que nos brindaron su colaboración y conocimientos durante la realización de este trabajo de grado.

Tabla de contenido

Pág.

Lista de Figuras	10
Lista de Tablas	11
Lista de anexos	12
Glosario	13
Resumen	15
Abstract	16
INTRODUCCIÓN	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. General	21
2.2. Específicos	21
3. MARCO REFERENCIAL	22
3.1. Antecedentes	22
3.2. Marco teórico	25
3.2.1. Malaria.	25
3.2.2. Ciclo biológico	26
3.2.3. Modificaciones postraduccionales	27
3.2.4. Principales proteínas de <i>Plasmodium</i>	29
3.2.4.1 Proteínas de choque térmico de <i>Plasmodium</i>	29
3.2.4.2 HSP70	29
• HSP70-2	31
3.3. Proteína hipotética de función desconocida PFL1395c.	31
3.4. Rutas de exportación de proteínas	32
3.4.1 Ruta clásica o del Retículo endoplasmático (RE).	33
3.5. Vectores de clonación.	34
3.5.1. Vector de clonación y expresión pGEX.	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Diseño metodológico	37
4.1.1 Universo, Población, Muestra.	37
4.1.2 Técnicas y procedimientos	37
4.1.2.1 Descongelación de las células <i>E. coli</i> XL1 Blue con el vector pGEX 4-T3	37
4.1.2.2 Reactivación de células <i>E. coli</i> XL1-Blue transformadas con el vector pGEX4T-3.	37
4.1.2.3 Purificación de ADN plasmídico	38
4.1.2.4 Cuantificación de ADN plasmídico	39
4.1.2.5 Amplificación por PCR del ADN plasmídico obtenido.	39
4.1.2.6 Visualización de los amplímeros obtenidos por PCR.	40

4.1.2.7 Secuenciación del ADN purificado extraído	40
• Análisis Bioinformático	40
4.1.2.8 Preparación de células competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	41
4.1.2.9. Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	42
4.1.2.10 Expresión del fragmento de la proteína hipotética PFL1395c en células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	42
4.1.2.11 Visualización de del fragmento expresado por medio de electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (método de Laemmli)	43
4.1.2.12. Inmunodetección del fragmento expresado	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Recuperación de células <i>E. coli</i> XL1-Blue en medio LB/amp.	45
5.2. Cuantificación de ADN plasmídico.	46
5.3. Visualización de los amplímeros en electroforesis en geles de agarosa	46
5.4. Análisis de la secuencia de ADN plasmídico	47
5.5. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	48
5.6. Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	49
5.7. Inmunodetección de la proteína obtenida	51
6. CONCLUSIONES	56
Referencias bibliográficas	57
Anexos	66

Lista de Figuras

Figura 1. Número de casos reportados de Malaria a nivel mundial.....	25
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	26
Figura 3. Dominios de la proteína HSP70.....	29
Figura 4. Compartimentos del retículo endoplasmático (RE).....	32
Figura 5. Vector de expresión y clonación pGEX4T-3.....	35
Figura 6. Recuperación de células XL1-BLUE.....	44
Figura 7. Amplificación de ADN plasmídico subclonado en el vector pGEX4T-3....	46
Figura 8. Análisis de búsqueda de homologías.....	47
Figura 9. Aislamiento de las células transformadas.....	49
Figura 10. Electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos.....	50
Figura 11. Inmunoblot tipo Dot blot.....	51
Figura 12. Alineamiento múltiple.....	65
Figura 13. Marco de lectura abierta.....	68
Figura 14. BLAST clon 6.....	68

Lista de Tablas

Tabla 1. Primers.....	38
Tabla 2. Valores obtenidos durante la cuantificación de ADN.....	45
Tabla 3. Lecturas de las absorbancias obtenidas durante la incubación de las células competentes <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	48

Lista de anexos

Anexo 1. Alineamiento de las muestras.....	65
Anexo 2. Fragmento de lectura abierta (ORF).....	67
Anexo 3. BLAST Clon 6.....	68

Glosario

(aa)	Aminoácidos
(Acetil CoA)	Acetil coenzima A
(AcM 7)	Anticuerpo Monoclonal 7
(AcsMcs)	Anticuerpos Monoclonales
(ADNc)	Ácido Desoxirribonucleico Codificante
(ASF1)	Anti-silencing Function protein 1
(BFA)	Brefeldina A
(Bip)	Proteína de Unión a Inmunoglobulina
(CaCl ₂)	Cloruro de Calcio
(DO)	Densidad Óptica
(DUF47)	Domain of Unfunction Function 47
(EN)	Envoltura nuclear
(ERGIC)	Compartimiento Intermedio Denominado RE-Golgi
(g)	Gravedades
(GH)	Di péptido de guanina-histidina
(Grp78)	Proteína Regulada por la Glucosa
(GST)	Glutación S Transferasa
(HPD)	Tripéptido que contiene histidina, prolina y ácido aspártico
(HSP70-2)	Heat Shock Protein 70-2
(HSPs)	Heat Shock Proteins
(IFI)	Inmunofluorescencia Indirecta
(IPTG)	Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranósido
(KCL)	Cloruro de Potasio
(LB)	Luria Bertani
(LB/amp)	Luria Bertani con ampicilina
(mA)	Miliamperios
(MEMs)	Membrane Erythrocyte Structures still remain in supernatants of <i>In vitro</i> continuous cultures of <i>P. falciparum</i>
(MPGR)	Membrana Plasmática del Glóbulo Rojo
(MPP)	Membrana Plasmática del Parásito

(MSC)	Clonación de Múltiple Expandido
(MVP)	Membrana Vacuolar Parasitófora
(NCBI)	National Center for Biotechnology Information
(OMS)	Organización Mundial de la Salud
(OPS)	Organización Panamericana de la Salud
(PCR)	Reacción en Cadena de la Polimerasa
(PEC)	Compartimento Exportador de Proteínas
(PFL1395c)	<i>Plasmodium falciparum</i> 1395c
(RE)	Retículo Endoplasmático
(REr)	Retículo Endoplasmático Rugoso
(REs)	Retículo Endoplasmático dominio liso
(REt)	Retículo Endoplasmático de Transición
(RPM)	Revoluciones Por Minuto
(SDS-PAGE)	Electroforesis en Geles Discontinuos de Poliacrilamida
(SOC)	Super Optimal Broth with Glucose
(SsiGMol)	Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular
(VTC)	Agrupaciones Vesículo-Tubulares
(WD)	Di péptido compuesto por triptófano y ácido aspártico
(μ L)	Microlitros

Resumen

La malaria es una enfermedad causada por hemoparásitos del género *Plasmodium*; existen cinco especies capaces de infectar al ser humano, entre ellas se encuentra *Plasmodium falciparum*, especie causante de la mayoría de muertes en el mundo durante el año 2018 según la organización mundial de la salud (OMS).

El presente trabajo tiene como objetivo la expresión de un fragmento de la proteína hipotética PFL1395c de *P. falciparum* en un sistema heterólogo. Para lo cual se partió de la reactivación de las células *E. coli* XL1-Blue, las cuales contenían el vector de clonación y expresión pGEX4T-3, obtenidas en trabajos anteriores por el grupo de investigación, Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Luego se extrajo el ADN plasmídico de estas células y se purificó mediante el uso del kit Miniprep de *Thermo Fisher*, posteriormente se amplificó por PCR, se visualizó y analizó a través de geles de agarosa, el ADN plasmídico se envió a secuenciar y las secuencias obtenidas se analizaron mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas. Seguidamente se indujo la expresión del fragmento de la proteína PFL1395c mediante el uso de Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido (IPTG), y finalmente se analizó la expresión de la proteína mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida y se comprobó su presencia mediante una inmunodetección de tipo Dot blot usando el anticuerpo monoclonal 7 (AcM7).

En conclusión el desarrollo de este trabajo permitió avanzar en el estudio de *P. falciparum* y en la estandarización de un método de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c.

Palabras claves: Anticuerpo monoclonal (AcM7), expresión heteróloga de proteínas, proteína PFL1395c, pGEX 4T-3, *Plasmodium falciparum*.

Abstract

Malaria is a disease caused by hemoparasites of the genus *Plasmodium*; there are five possibilities to infect humans, among them are *Plasmodium falciparum*, which causes the most deaths in the world during 2018 according to the World Health Organization (WHO).

The present work aims at the expression of a fragment of the hypothetical protein PFL1395c of *P. falciparum* in a heterologous system. To this end, we started with the reactivation of the E. coli XL1-Blue cells, which contained the cloning vector and expression pGEX4T-3, obtained in previous works by the research group, Cell Biology of the Faculty of Medicine of the National University of Colombia Bogota headquarters. The plasmid DNA was then extracted from these cells and purified by the use of the Thermo Fisher Miniprep kit, subsequently amplified by PCR, visualized and analyzed through agarose gels, the plasmid DNA was sent to be sequenced and the sequences obtained they were analyzed by using different bioinformatics tools. Subsequently, the expression of the PFL1395c protein fragment was induced by the use of Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and finally the expression of the protein was analyzed by electrophoresis in discontinuous polyacrylamide gels and its presence was checked by means of an immunodetection of type Dot blot using monoclonal antibody 7 (AcM7).

In conclusion, the development of this work allowed advancing in the study of *P. falciparum* and in the standardization of a method of low-scale expression of a fragment of the protein PFL1395c.

Key words: Monoclonal antibody (AcM7), heterologous expression of proteins, protein PFL1395c, pGEX 4T-3, *Plasmodium falciparum*.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad de amplia distribución mundial causada por hemoparásitos del género *Plasmodium*, actualmente existen cinco especies de *Plasmodium* capaces de infectar al ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*, siendo *P. falciparum* y *P. vivax* las responsables de la mayoría de muertes en el mundo ⁽¹⁾. En Colombia para la semana 28 del boletín epidemiológico semanal (BES) del 2.018 se reportaron 31.470 casos de malaria, de los cuales el 50.1 % (16.876) fueron causados por *P. falciparum* ⁽²⁾, el mismo año hasta la tercera semana del mes de julio se reportaron 6 muertes debido a esta enfermedad ⁽³⁾.

El ciclo de vida de *Plasmodium* es muy complejo debido a sus múltiples estadios en el mosquito y en el ser humano. Este inicia con la inoculación de esporozoitos en el torrente sanguíneo tras la picadura del mosquito, allí los esporozoitos viajan al hígado donde comienzan su desarrollo asexual, el cual culmina con la liberación de los merozoitos al sistema circulatorio, estos merozoitos invaden a los eritrocitos, en donde crecen y se replican hasta liberar más merozoitos, algunos de estos merozoitos pueden madurar en formas sexuales denominadas gametocitos, este ciclo se repite cada 48 horas ⁽¹⁾.

Durante su ciclo intraeritrocitario el merozoito genera cambios en la célula infectada tras la invasión al eritrocito, por ejemplo, *Plasmodium falciparum* exporta cientos de proteínas al citoplasma de la célula hospedera, las cuales alteran la permeabilidad, rigidez y citoadherencia del eritrocito infectado ⁽⁴⁾. Muchas de las proteínas generadas por el parásito cumplen funciones de suma importancia para la supervivencia del mismo, como es el caso de las proteínas de choque térmico, según sus siglas en inglés (HSPs); cuya función consiste en proteger al parásito contra los cambios fisiológicos, como el aumento de la temperatura. Estas proteínas por lo general se clasifican por su peso molecular (HSP40, HSP60, HSP70 y HSP110) siendo la HSP70 una de las familias más importantes, por otra parte es importante señalar que algunas de las investigaciones realizadas en los últimos años se han centrado en el estudio de

la HSP70 citosólica, *Pf* HSP70-1, y la *Pf* Hsp70-2 del retículo endoplasmático (RE) implicadas en funciones tales como el plegamiento de proteínas y la homeostasis celular ^(5,6).

Muchas de las proteínas que produce *P. falciparum* no están caracterizadas experimentalmente, incluida la PFL1395c, proteína de función desconocida, conservada en parásitos del género *Plasmodium*, cuya estructura presenta 4 dominios: el dominio ASF1, el dominio J, el dominio WD40 (Di péptido compuesto por triptófano y ácido aspártico), y el dominio DUF47, por sus siglas en inglés (*Domain of unknown function 47*) ⁽⁷⁾. El grupo de investigación, de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá tiene como una de sus finalidades profundizar en el estudio de *P. falciparum* y en especial en una de sus proteínas, la PFL1395c, debido a esto el desarrollo de este trabajo tiene como objetivo principal aportar en el estudio de esta proteína y para ello se buscó la estandarización de un método de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c.

La expresión de la proteína PFL1395c se realizó a partir la reactivación de las células *E. coli* XL1-Blue, las cuales contenían el vector de clonación pGEX4T-3, obtenidas en trabajos anteriores por el grupo de investigación, Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Se extrajo el ADN plasmídico, se purificó, se amplificó por PCR, se visualizó y analizó a través de geles de agarosa, luego se transformaron las células *E. coli* BL21 (DE3) y se estimularon con Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido (IPTG), seguidamente se analizó la expresión del fragmento mediante la electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida y se comprobó su presencia mediante una inmunodetección de tipo Dot blot usando el anticuerpo monoclonal 7 (AcM7) para su detección. Aunque la información que se tiene en la actualidad de la proteína PFL1395c es muy reducida se ha encontrado asociada con proteínas de choque térmico de gran importancia para el parásito, por lo cual su investigación resulta ser un asunto relevante en el estudio de la biología de *P. falciparum*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La malaria es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial. En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportaron una tendencia creciente de los casos de malaria siendo los países más afectados Brasil, Ecuador, México, Nicaragua, Venezuela, Cuba, Costa Rica y Honduras ⁽⁸⁾.

El ciclo biológico de *Plasmodium* es complejo; durante la etapa intraeritrocítica asexual, el merozoito invade la célula hospedera e inicia su remodelación exportando proteínas hacia el citosol de la célula infectada, generando a su alrededor una membrana vacuolar parasitófora donde se desarrolla hasta ser rodeado por tres membranas: la membrana plasmática del parásito (MPP), la membrana vacuolar parasitófora (MVP) y la membrana plasmática del glóbulo rojo (MPGR) ⁽⁴⁾.

El grupo de investigación, de Biología Celular de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá generó los anticuerpos monoclonales AcMIG2, AcM4F8, AcM22/44 y AcM7 a partir de un preparado de estructuras membranales que permanecen en el sobrenadante de los cultivos continuos de *P. falciparum*, según sus siglas en inglés (MEMs) ⁽⁹⁾, una vez los merozoitos salen de su célula hospedera, como se describió en Cortés ⁽¹⁰⁾; estos anticuerpos han sido caracterizados de manera preliminar. Igualmente, se han propuesto las proteínas Pf68kDa, Pf45kDa, Pf44/22kDa como residentes del compartimento exportador de proteínas (PEC) o en su defecto como un dominio del retículo endoplasmático (RE) ^(10,11). Uno de los anticuerpos más avanzados en su caracterización es el AcM7, el cual reconoce una proteína de una masa molecular de 68kDa, de acuerdo con su migración electroforética. Recientemente se encontró que el AcM7 reconoce la proteína homóloga de *P. falciparum*, identificada como proteína de choque térmico 70-2 (HSP70-2), (*en proceso de publicación*).

En consecuencia la expresión de un fragmento de la proteína hipotética PFL1395c en un vector heterólogo permitirá evaluar si este fragmento es reconocido por el AcM7, así mismo se pretende mostrar el potencial que puede brindar este anticuerpo como una herramienta adicional para el estudio de *Plasmodium* y en especial de las proteínas del PEC o en su defecto del RE, al cual se ha encontrado asociado ^(12,13), Por tal motivo se planteó la siguiente pregunta.

¿Es posible expresar el ADNc codificante de un fragmento de la proteína hipotética PFL1395c en un vector heterólogo?

2. OBJETIVOS

2.1. General

Realizar un estudio preliminar de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c en un sistema de expresión heterólogo.

2.2. Específicos

- Estandarizar un método de expresión a baja escala de un fragmento de la proteína PFL1395c utilizando para esto expresión heteróloga
- Determinar la presencia de un fragmento de la proteína PFL1395c de *P. falciparum* expresada en un sistema heterólogo a través de un inmonoblot tipo Dot blot

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Antecedentes

Los trabajos pioneros del grupo de investigación en Biología Celular describen algunas estructuras halladas mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y video filmación⁽⁴⁾. Estos se enfocaron en el estudio de remanentes encontrados en los sobrenadantes de medios de cultivo denominados estructuras membranales o MEMs por su siglas en inglés: *Membrane Erythrocyte Structures still remain in supernatants of in vitro continuous cultures of P. falciparum*⁽¹⁴⁾. Sin embargo, Winograd en 1998⁽¹⁴⁾, menciona que el conocimiento referente a la salida de los merozoitos de su célula hospedera es limitado. Adicionalmente Winograd en el año 1999⁽¹²⁾ propone que la salida de los merozoitos de su célula hospedera podría explicarse a través de un evento de fusión de membranas (MVP y MPGR), se cree que al salir los merozoitos de su célula hospedera podría estar asociado con las MEMs. Es importante resaltar que estas estructuras membranales fueron el insumo utilizado para generar los anticuerpos monoclonales (AcSMcs) el PEC (compartimento exportador de proteínas) o en su defecto un dominio del retículo endoplasmático. La proteína PFL1395c es una de las proteínas que parece encontrarse ubicada en las MEMs⁽¹³⁾. Se ha evidenciado que estas MEMs poseen estructuras en su interior, un ejemplo de ellas son las hendiduras de Maürer, al igual que otras membranas aún de origen desconocido, las cuales son reconocidas por los AcSMcs generados por el grupo de investigación de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

A continuación, se describen los anticuerpos monoclonales generados por el grupo de investigación de Biología Celular antes mencionado:

- I. AcM7 el cual reconoce la proteína Pf68kDa.
- II. AcMIG2 que reconoce una proteína de igual masa molecular de aprox. 68kDa, de la cual no se tiene conocimiento si esta reconoce epítopes distintos a los que reconoce el AcM7.
- III. El AcM4F8 el cual reconoce una proteína de masa molecular de 45kDa.
- IV. El AcM134 que reconoce una proteína de 44/22kDa.

De todos los anteriores, el AcM7 es el más avanzado en su caracterización ^(13, 15, 16,17).

Wiser en 1997⁽¹⁸⁾, plantea la existencia de dos vías de secreción paralelas, una intracelular y una vía alterna de exportación de proteínas; para ello se infectaron eritrocitos con *P. berghei*, los cuales se trataron con Brefeldina A (BFA), con el fin de evaluar la vía alterna de exportación, como consecuencia de lo anterior, la BFA utilizada en los eritrocitos infectados inhibió la exportación de proteínas y así generó una acumulación de las mismas en un compartimento ubicado en la periferia del parásito ⁽¹⁸⁾. Posteriormente se localizaron estas proteínas en los diferentes compartimentos del eritrocito utilizando anticuerpos monoclonales ^(6, 11,19).

Las proteínas reconocidas por esta serie de anticuerpos monoclonales han sido previamente caracterizadas mediante la técnica de *Western-blotting*. El resultado del procedimiento previo es el reconocimiento unánime de las estructuras membranales ⁽¹³⁾. Las proteínas que reconocen esta serie de anticuerpos se han propuesto como proteínas residentes del PEC o en su defecto un dominio del retículo endoplasmático ^(10,11). Estos anticuerpos generados por el grupo de investigación, de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá reconocen varias proteínas localizadas en el RE como lo son:

- La proteína Pf68kDa reconocida por el AcM7 ⁽¹⁰⁾.
- La proteína Pf45kDa reconocida por el AcM4F8 ⁽¹⁰⁾.
- La proteína Pf44/22kDa reconocida por el AcM134 ⁽¹⁰⁾.
- El antígeno Pf68kDa que reconoce una proteína integral de membrana soluble en Tritón X-100 ⁽¹⁰⁾.

Dado que el estudio de las proteínas localizadas en el RE ha sido preliminar, el espacio de desarrollo empírico aún es amplio y relevante. Su mayor importancia radica en que son proteínas naturalmente localizadas en el PEC o un dominio del retículo endoplasmático en ausencia de BFA ^(10,11).

Recientemente en el documento final de tesis la doctoral (*en proceso de publicación*) titulada: Identificación, mapeo antigénico de la proteína de *P. falciparum* denominada

Pf68kDa reconocida por el AcM7, en la cual se describe por primera vez la proteína hipotética PFL1395c en donde se le asocia con la proteína HSP70-2 (PFI0875w) mediante un epítipo común (*en proceso de publicación*). La proteína PFL1395c fue rastreada mediante el análisis de librerías de expresión de *P. falciparum* usando el AcM7. Sin embargo, pese a que se estimuló la expresión de PFL1395c y se detectó con el AcM7.

Cortés en el 2011⁽¹³⁾, logró reforzar la caracterización de las estructuras membranales mediante microscopía electrónica de transmisión, insertando una sonda lipofílica DiLC 16 y una sonda de lípidos fluorescentes en la superficie de los eritrocitos infectados, para luego ser observados durante las próximas 48 horas (tiempo de duración del ciclo eritrocitaria asexual); siendo esta la descripción más completa que se haya hecho de las MEMs por microscopía electrónica de transmisión y así aportando evidencias, sobre la salida de los merozoítos de su célula hospedera ⁽¹³⁾.

Se cree que dentro de las MEMs hay membranas que son reconocidas por los anticuerpos monoclonales que se generaron y por lo tanto es posible que haya membranas reconocidas por el AcM7, a las que puede estar unida la PFL1395c, ya que se cree que esta proteína es transmembranal. Por lo cual poder expresar PFL1395c ayudaría a estudiar el evento de salida de merozoítos de su célula hospedera.

3.2. Marco teórico

3.2.1. Malaria.

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal causada por hemoparásitos del género *Plasmodium* ⁽²⁰⁾, el reservorio más importante es el hombre y el mosquito hembra del género *Anopheles*⁽²¹⁾, *P. falciparum*, es la especie de malaria que más afecta al ser humano con una transmisión del 60% a nivel mundial, este causa la presentación más grave de la enfermedad debido a sus efectos microvasculares y puede provocar la muerte si no se trata oportunamente; *P. vivax*, es la segunda especie de malaria que más afecta al ser humano con una transmisión del 40 %; *P. ovale*, su morfología y periodicidad hace que este *Plasmodium* se confunda fácilmente con *P. vivax*; *P. knowlesi*, se confunde con *P. falciparum* debido a sus manifestaciones clínicas y complicaciones⁽²²⁾; *P. malariae*, la infección por este *Plasmodium* no es común, sin embargo se ha evidenciado que está presente en zonas endémica como África subsahariana y el Sureste del Pacífico⁽²³⁾.

Según el reporte de la OMS del 2017 se estimó que el total de muertes a nivel mundial fue de 445.000⁽²⁴⁾, siendo la región de África la más afectada, con el 90% de los casos de paludismo y muertes en todo el mundo ⁽⁶⁾, tal y como se evidencia en la Figura 1. La malaria en Colombia es una enfermedad endémica en gran parte del territorio nacional, alrededor de 12 millones de personas habitan en zonas de alto riesgo. El BES notificó hasta la fecha (semana epidemiológica 34 de 2018) 340.283 casos de malaria, de los cuales 39.657 son de malaria no complicada y 626 son de malaria complicada con predominancia de infección por *P. falciparum* con 19.864 casos, seguido por *P. vivax* con 19.589 casos y por último *P. falciparum* y *P. vivax* (infección *mixta*) con 830 casos ⁽²⁾. A continuación se muestra un mapa global de las áreas en riesgo de contraer malaria.

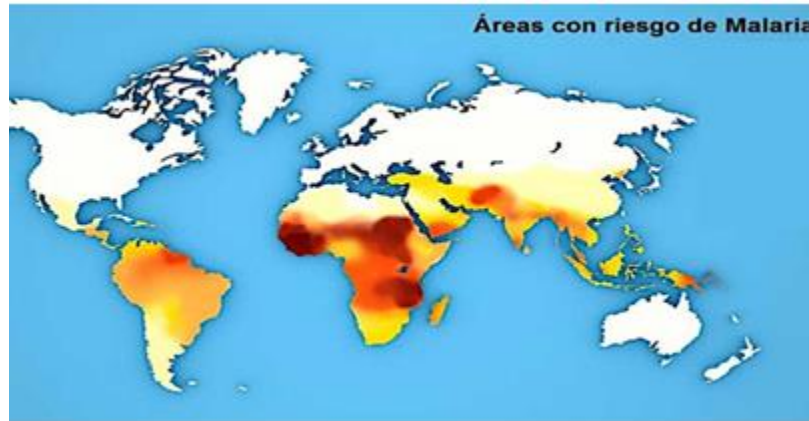


Figura 1. Número de casos reportados de Malaria a nivel mundial (OMS). Países con casos autóctonos ⁽²⁵⁾.

3.2.2. Ciclo biológico

El ciclo de vida del parásito de la malaria incluye dos huéspedes (el mosquito hembra del género *Anopheles* y el hombre) ⁽²¹⁾. Este inicia cuando el mosquito hembra infectado con malaria inocula esporozoitos alojados en sus glándulas salivales, estos por vía hemática llegan al hígado e infectan las células hepáticas donde se multiplican asexualmente (esquizogonia pre-eritrocitaria) liberando esquizontes tisulares los cuales vuelven a la sangre ^(21,23). Sin embargo *P. vivax* y *P. ovale* tiene un estadio latente denominado hipnozoito, el cual persiste en el hígado y es el causante de recaídas luego de volver al torrente sanguíneo. Dentro de los eritrocitos los merozoitos se multiplican de manera asexual (esquizogonia eritrocítica) y se observan en una forma de anillo llamada trofozoito, estos al diferenciarse se convierten en esquizontes, que contienen merozoitos los cuales se liberan; haciendo que estos vuelven a invadir otros eritrocitos y así repetir esta fase del ciclo. Sin embargo en algunos casos estos merozoitos en vez de continuar con el ciclo toman una ruta diferente y se diferencian en gametocitos (macro y micro gametocitos), los cuales son ingeridos por el mosquito hembra ⁽²³⁾. Al fusionarse los macro y micro gametocitos da lugar al ooquinetto, el cual adquiere una cubierta quística formando el ooquiste en la pared del intestino y por división sexual (esporogonia) forma una gran cantidad de esporozoitos ^(21,23), como se muestra en la Figura 2.

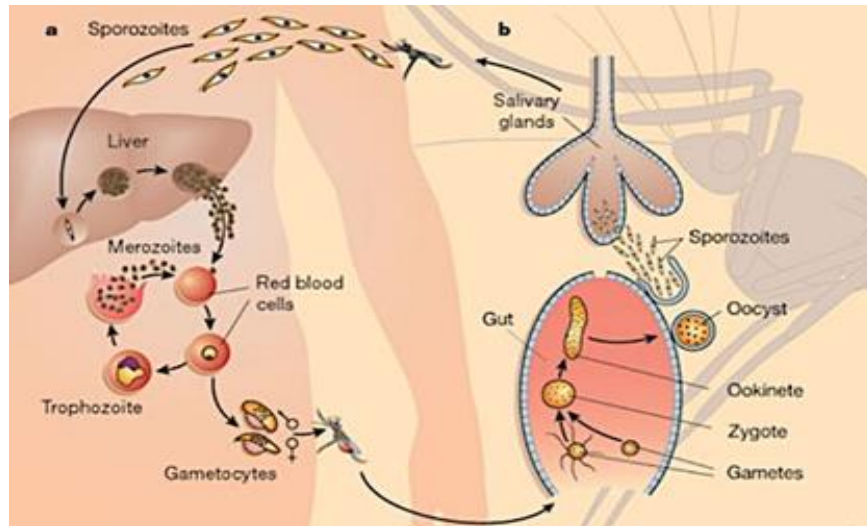


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* ⁽²⁵⁾

3.2.3. Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales son cambios estructurales o funcionales que se efectúan en las proteínas, los cuales son parte esencial de la regulación de su actividad ⁽²⁴⁾. Su caracterización es de gran relevancia, ya que de esta manera se logra comprender los mecanismos celulares ⁽²⁷⁾. Estas están conformadas por más de 200 reacciones, cuya función consiste en la adición covalente de un grupo modificante provocando así alteraciones químicas o la pérdida de péptidos que hacen parte de la estructura de la proteína ⁽²⁸⁾. Existen muchas modificaciones postraduccionales las cuales regulan la correcta funcionalidad de las proteínas, también la actividad en la cual estén involucradas y su correcta localización celular ⁽²⁶⁾. Las modificaciones postraduccionales más importantes son:

- La fosforilación que consiste en la adición de un grupo fosfato a los residuos serina, tirosina y treonina ⁽²⁷⁾.
- La ubiquitinación donde las proteínas sufren modificaciones mediante la unión covalente de corticosteroides y la adición de pequeñas fracciones, la proteína modificadora es la ubiquitina ⁽²⁷⁾.

- La acetilación donde los grupos acetilo de la acetil coenzima A (Acetil CoA) se transfieren a los aminoácidos de los residuos de lisina dando como resultado la neutralización de la carga, lo que provoca la alteración de las propiedades de las proteínas^(27,29).
- La metilación por otro lado, es la conjugación del grupo metilo con los residuos de lisina y arginina en las histonas, lo cual provoca la alteración de la estructura de la cromatina y la acumulación de las proteínas no histonas la cromatina, además regula la activación de la p53⁽²⁷⁾.
- La glicosilación involucrado en la maduración del correcto plegamiento de proteínas y localización de las mismas⁽²⁸⁾ es importante señalar que las proteínas pueden ser dianas de más de una modificación o pueden ser modificadas en más de un residuo⁽²⁷⁾.

Para expresar una proteína recombinante es necesario elegir el huésped en el cual se expresara la proteína y su respectivo vector de expresión. Para ello existen diferentes sistemas de expresión como lo son las bacterias, las levaduras, hongos filamentosos, cultivos de células eucariotas, animales etc., cada uno de ellos tiene características específicas, ventajas y desventajas⁽³⁰⁾. Los sistemas de expresión procariotas presentan limitaciones para expresar proteínas completamente funcionales debido a que no realizan en las proteínas la mayoría de modificaciones postraduccionales que realizan las células eucariotas. Aunque las bacterias son los sistemas de expresión más utilizados debido a la facilidad en su manipulación, bajo costo y sencillez, la *Escherichia coli* como célula hospedadora no realiza la N- glicosilación ni la o- glicosilación⁽³⁰⁾, en cambio los sistemas de células eucariotas (levaduras, cultivos celulares u organismos transgénicos) permiten la introducción de diferentes modificaciones postraduccionales a las proteínas recombinantes⁽³⁰⁾, no obstante son menos utilizadas debido a su costo elevado y su dificultad en el manejo⁽³⁰⁾.

3.2.4. Principales proteínas de *Plasmodium*

Las proteínas expresadas por un genoma son de gran importancia, para lograr entender a los diferentes organismos⁽³¹⁾. Según Cuesta en 2012⁽³¹⁾, con apoyo de una electroforesis bidimensional, se logró identificar algunas de las proteínas pertenecientes a este parásito, entre ellas se encuentran: la proteína de unión al calcio, la disulfuro isomerasa, la peroxinodisina, la enolasa, la espectrina cadena alfa y diferentes proteínas de choque térmico⁽³¹⁾.

3.2.4.1 Proteínas de choque térmico de *Plasmodium*

Las proteínas de choque térmico o en inglés Heat Shock Proteins (HSPs) son proteínas altamente conservadas que se encuentran en todos los compartimentos subcelulares, estas proteínas participan en un gran número de funciones tales como: la síntesis de HSPs en respuesta al estrés físico y químico, el transporte intracelular, el plegamiento de polipéptidos nacientes, asimismo cumplen funciones de acompañamiento, es decir actúan como chaperonas moleculares⁽³¹⁾, facilitan el plegamiento de las proteínas, participan en el mantenimiento de estructuras celulares y posiblemente pueden cumplir funciones de otras proteínas cuando otras células están expuestas a cambios homeostáticos; por ejemplo los causados por la temperatura extrema, anoxia, hipoxia, metales pesados o drogas⁽³¹⁾. Las HSPs también pueden cumplir funciones como chaperonas moleculares debido a su función fisiológica y protectora en la célula; estas proteínas por lo general se clasifican por su masa molecular, la mayoría de ellas pertenecen a los grupos: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90⁽³¹⁾. Los HSPs de mayor masa molecular como HSP110 y HSP170 están regulados por la glucosa⁽³²⁾.

3.2.4.2 HSP70

Las HSP70 son una de las principales familias de choque térmico, las cuales se inducen en respuesta al estrés, tienen una masa molecular de 70kDa, estas se

encuentran en citoplasma y núcleo⁽³³⁾, poseen dos dominios; el dominio N-terminal de 45kDa y un dominio de unión al péptido de 25kDa en el extremo C-terminal, éstas se van a unir al sustrato polipéptido, tal y como se evidencia en la Figura 3⁽³⁴⁾.

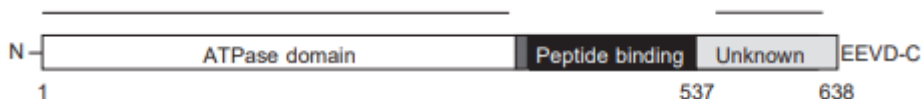


Figura 3. Dominios de la proteína HSP70⁽³⁴⁾

Una vez unida la HSP70 al polipéptido es permitido que se repliegue, para poderse liberar por la acción del ATPasa, ya que la unión al ATP induce a un cambio conformacional que afecta al dominio de unión al péptido lo que trae como consecuencia un estado de baja afinidad al sustrato, lo que conduce a la posterior liberación del sustrato⁽³⁴⁾. Las HSP70s cumplen funciones importantes en la célula, como el replegamiento de proteínas nacientes, el ensamblaje o montaje de complejos multiproteicos, la translocación de proteínas, la degradación de las proteínas, la traducción de señales y la replicación de priones⁽³⁵⁾.

Plasmodium falciparum produce HSP70 que podrían desempeñar funciones de protección durante el ciclo de vida del parásito, se cree que la producción de chaperonas (HSPs) es una estrategia de supervivencia contra la temperatura y los cambios fisiológicos de las células afectadas debido a que durante la infección por malaria la persona infectada puede llegar a tener un temperatura corporal de hasta 41°C, lo que le confiere mayor adhesión del parásito a los vasos sanguíneos⁽³⁵⁾. Se han identificado proteínas similares de HSP70 en *P. falciparum* como lo son: la forma sistólica PfHsp70-1, la PfHsp70-x, la PfHsp70-2, el cual es un homólogo de ER Hsp70, la PfHsp70-3, homologa de Hsp70 mitocondrial, la PfHsp70-z y la PfHsp70-y⁽³⁵⁾.

- **HSP70-2**

La HSP70-2 es un homólogo de la proteína regulada por la glucosa (Grp78) denominada proteína de unión a inmunoglobulina (Bip), esta proteína tiene una masa molecular de 73kDa⁽³⁴⁾. La HSP70-2 posee una secuencia N-terminal y una posible señal de retención C-terminal (SDEL) que se diferencia con la Grp78 porque esta contiene una señal de retención C-terminal característica (KDEL)⁽³⁴⁾. Las Hsp70-2 participan en el plegamiento de las proteínas, la homeostasis proteica y la supervivencia celular^(6, 35,36); estas funciones las puede cumplir gracias al reconocimiento de un motivo de cinco residuos en aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por regiones enriquecidas^(5, 6,35). La HSP-2 se puede encontrar en el núcleo o en el citosol de la célula amortiguando la toxicidad de proteínas mal desnaturalizadas y mal plegadas, además, se considera una proteína altamente conservada debido a su amplia distribución en diferentes organismos⁽³⁵⁾.

La HSP70-2 se divide en seis miembros, los cuales se clasifican debido a su actividad o localización específica⁽⁶⁾. Gracias a la evolución de esta proteína se han generado chaperonas o co-chaperonas, las cuales ayudan a cumplir funciones específicas de la célula, así como ampliar el espectro de actividad de la misma⁽²⁸⁾; las co-chaperonas más representativas de esta proteína son la HSP40, la cual tiene como función regular las actividades y ampliar el alcance de las funciones de la HSP70⁽³⁷⁾. Esta co-chaperona posee un dominio J, el cual tiene como función estimular la actividad de ATPasa de la Hsp70, “uniéndose a los sustratos HSP70 o se encuentran cerca de ubicaciones celulares donde aparecen sustratos como el túnel de salida ribosómico o poro de translocación”⁽⁵⁾.

3.3. Proteína hipotética de función desconocida PFL1395c.

La gran mayoría de las proteínas que conforman a *P. falciparum* no han sido caracterizadas experimentalmente, por tal motivo no ha sido sencillo explicar las interacciones de las mismas dentro del parásito; sin embargo, según Lacount⁽³⁸⁾. “El 82 % de las interacciones de estas proteínas incluyen al menos una proteína hipotética y el 33 % incluye dos proteínas hipotéticas”⁽³⁸⁾.

La PFL1395c es una proteína hipotética de función desconocida, la cual es conservada en los parásitos del género *Plasmodium*, el gen que codifica la proteína se localiza en el cromosoma 12, este presenta 4 dominios: el dominio ASF1, el cual se encuentra involucrado en las rutas dependientes e independientes de la replicación además de tener actividad de chaperona histona⁽³⁹⁾. Su estructura tridimensional consiste en una inmunoglobulina de tipo beta compacta; el dominio DUF47, al cual se le desconoce su función; un dominio J cuya función principal consiste en potenciar la actividad ATPasa de la HSP70 ⁽³⁹⁾. Esta región está conformada por un motivo tripéptido que contiene histidina (H), prolina (P) y ácido aspártico (D) (HPD), además presenta una estructura tetra-helicoidal con hélices I, II, III y IV ⁽⁷⁾ y finalmente el dominio WD40 encontrado en varias proteínas eucariotas donde puede desempeñar funciones tales como: regular la traducción de señales, el procesamiento pre-ARNm y el ensamblaje del citoesqueleto. Esta proteína presenta un di péptido de guanina-histidina (GH) conformado por 11-24 residuos ubicados en su extremo-N terminal y un di péptido compuesto por triptófano y ácido aspártico (WD) en su extremo C-terminal, su estructura es similar a una hélice con varias cuchillas donde cada una tiene una lámina anti paralela B de cuatro hileras, su principal función consiste en servir como plataforma a la cual las proteínas se puedan unir de manera estable o reversible ⁽³⁹⁾.

3.4. Rutas de exportación de proteínas

Las proteínas que serán exportadas a la célula huésped se integran al retículo endoplasmático (RE) del parásito, seguidamente pasan por el sistema secretor del parásito donde atraviesa la membrana plasmática (MP) con la finalidad de llegar al citosol de la célula huésped y allí dejar las proteínas ⁽⁶⁾.

3.4.1 Ruta clásica o del Retículo endoplasmático (RE).

El retículo endoplasmático (RE) es un compartimento que comprende una red de túbulos y sacos los cuales se encuentran rodeados por una membrana que inicia en la membrana nuclear a través del citoplasma ⁽⁴⁰⁾. Los túbulos del RE se encuentran interconectados formando una lámina continua que encierra un espacio intermembrana único llamado lumen; la membrana del RE separa el citoplasma del lumen y media la transferencia de moléculas entre ambos compartimientos ⁽⁴⁰⁾. Es un organelo de vital importancia en la vía encargada de la síntesis de proteínas y lípidos cuyo destino se encuentra dentro y fuera de la célula ⁽⁴⁰⁾. El RE tiene unos subdominios los cuales incluyen la envoltura nuclear (EN), RE rugoso (REr) y el RE de transición (REt), como se evidencia en la Figura 4⁽⁴⁰⁾.

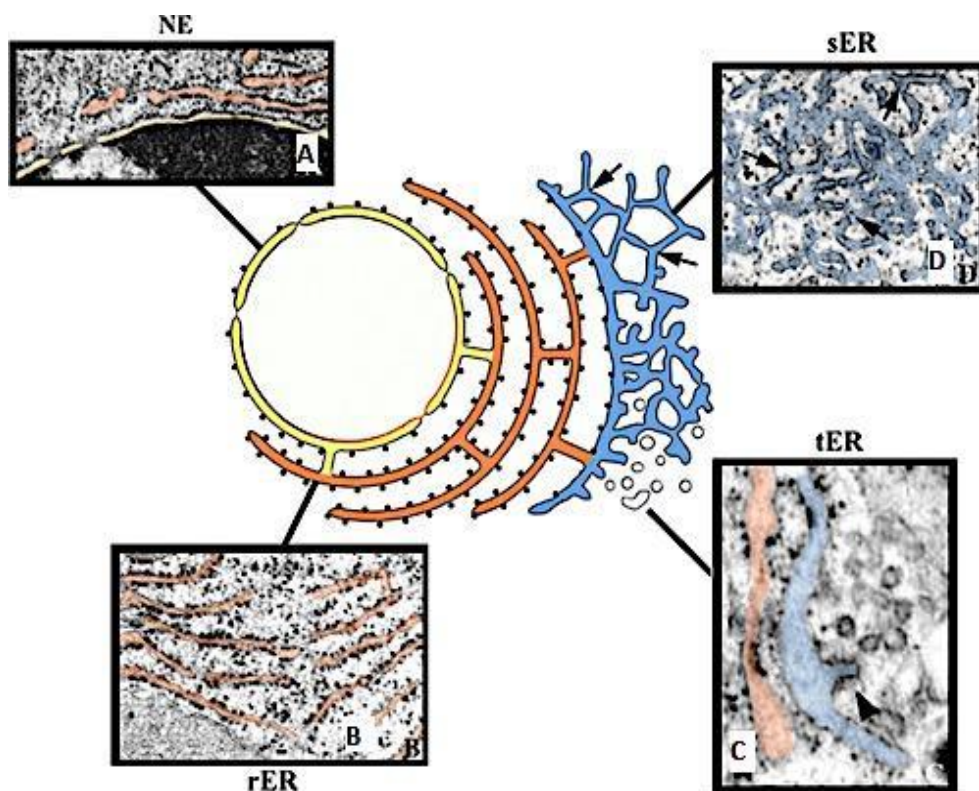


Figura 4. Compartimentos del retículo endoplasmático (RE). El RE está compuesto por subdominios continuos: **A.** La envoltura nuclear (EN) **B.** El RE rugoso (REr) continuo al EN **C.** El RE de transición (REt) se compone de un subdominio REr y un subdominio (REs) **D.** En células esteroideas y hepatocitos, el REt se observa como una red de túbulos interconectados ⁽⁴⁰⁾.

El primer dominio de ellos forma un caparazón que rodea el núcleo, este presenta una forma aplanada estrechamente aplicada a la cromatina nuclear la cual está provista de poros nucleares y partículas ribosomales, El (REt) se compone de dos dominios de membrana continuos, un dominio rugoso (REr), el cual presenta ribosomas unidos a la membrana cuya función se relaciona con su alta capacidad de síntesis, translocación y plegamiento de proteínas, y un dominio liso (REs), el cual consta de yemas desprovistas de ribosomas asociados⁽²⁷⁾. Las vesículas y túbulos que se observan en el REt y representan un compartimiento intermedio denominado RE-Golgi (ERGIC) y se observan agrupaciones vesículo-tubulares (VTC). Estos túbulos continuos con el REr proporcionan mayor capacidad de almacenamiento de calcio, síntesis de lípidos y esteroides⁽⁴⁰⁾.

3.5. Vectores de clonación.

Los vectores de clonación son moléculas de ADN circular extra cromosómico que se replican independientemente del ADN nuclear, estos permiten transportar un fragmento ADN de interés, por lo general un gen, el cual se introduce en la célula huésped para su posterior expresión⁽⁴¹⁾. Estos se diseñan con el fin de permitir la recombinación del ADN en un sitio de restricción del vector⁽⁴¹⁾; este debe presentar varias características: I) debe poder replicarse independientemente junto con el segmento de ADN que transporta, II) debe contener sitios de corte para las enzimas de restricción, donde se insertarán los segmentos de ADN, III) debe contener algún marcador de selección como por ejemplo genes de resistencia a antibióticos o genes de enzimas⁽⁴²⁾, para la identificación de la célula huésped que transporta el vector⁽⁴³⁾.

Los vectores se clasifican en: plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales y fagémidos⁽⁴¹⁾.

Los fagémidos son vectores que combinan las características de un fago y un plásmido, por lo tanto cuenta con dos orígenes de replicación: el fago y el plásmido^(41,44); se usa principalmente para la transformación de cepas de *E.coli*; estas son cultivadas e infectadas con un fago cooperador, el cual contiene un origen de

replicación y unas proteínas estructurales para generar un fago completo, a este proceso se le denomina “rescate de fago” ya que el fagémido no contiene los genes estructurales para la expresión de un fago⁽⁴⁴⁾.

3.5.1. Vector de clonación y expresión pGEX.

Son vectores de clonación y expresión (producción efectiva de la proteína) que se expresan como proteínas de fusión que luego son purificadas mediante cromatografía de afinidad, tienen glutatión S transferasa (GST) que es una proteína de 26kDa que no interfiere con el estímulo antigénico, su efectividad está dada por la eficiencia del promotor Lac, el cual es altamente inducible con IPTG⁽⁴⁶⁾. Estos contienen un sitio de clonación de múltiple expandido (MSC), el cual contiene seis sitios de restricción, tal cual se muestra en la Figura 5.

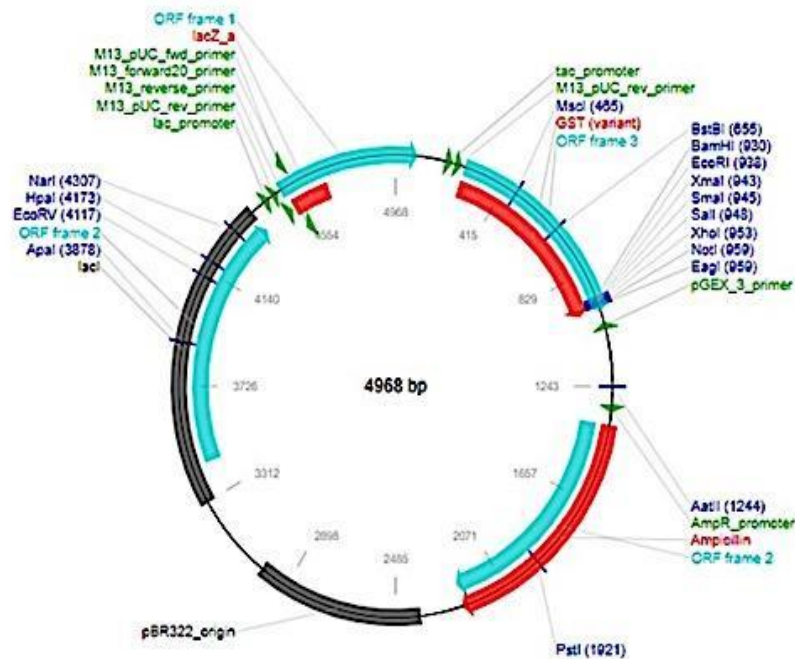


Figura 5. Vector de expresión y clonación pGEX 4T-3. Características: ori, amp_ Lac, alelo promueve la sobreexpresión del represor, promotor Tag (inducible por IPTG), GST; Gen que codifica la glutatión S transferasa⁽⁴⁷⁾.

Este MSC facilita la clonación unidireccional de insertos de ADNc obtenidos de bibliotecas usando vectores lambda, los principales pGEX son pGEX-6P-1, pGEX6P-

2 y pGEX6P-3, los cuales utilizan una secuencia de reconocimiento para la escisión específica, el pGEX4T-1, pGEX4T-2 y pGEX4T-3 que derivan del pGEX-2T que contiene un sitio de reconocimiento de trombina⁽⁴⁶⁾.

Este vector de clonación y expresión debe tener los siguientes elementos: un promotor y tres codones de detección: un codón de inicio, un codón de terminación y una secuencia de terminación de la transcripción ⁽⁴⁶⁾.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño metodológico

4.1.1 Universo, Población, Muestra.

Universo: Proteínas del género *Plasmodium*

Población: Proteínas de *Plasmodium falciparum*

Muestra: Fragmento de la proteína hipotética PFL1395c de función desconocida de *Plasmodium falciparum*

Tipo de estudio: Experimental

4.1.2 Técnicas y procedimientos

4.1.2.1 Descongelación de las células *E. coli* XL1 Blue con el vector pGEX 4-T3

Previamente el grupo de investigación Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, obtuvo células *E. coli* XL1-Blue transformadas, las cuales contenían el plásmido de clonación y expresión pGEX4T-3. Estas células se guardaron en viales de 1.5 ml y posteriormente se llevaron a congelación a -80°C.

4.1.2.2 Reactivación de células *E. coli* XL1-Blue transformadas con el vector pGEX4T-3.

Se descongelo un vial de 1.5 mL, el cual estaba guardado a -80°C, que contenía células *E. coli* XL1-Blue transformadas con el vector pGEX 4T-3, se tomaron 10 µL de esta muestra y se re suspendieron en 10 mL de medio líquido Luria Bertani (LB), seguidamente se incubaron a 37°C durante 16 horas en un shaker a 200 rpm, para después alicuotar en viales de 1.5 mL y llevar a -80 °C; para ello se prepararon stocks de glicerol al 50 % en medio LB con ampicilina (LB/amp). Luego del mismo eppendorf se tomaron 30 µL para el aislamiento de las células *E. coli* XL1- Blue en medio LB; 20 µL de esta muestra se inocularon en 2 cajas agar LB/amp (10 µL en cada caja) y 10

μL de esta muestra en una caja de agar LB sin ampicilina. Estos medios se incubaron a 37 °C durante 16 horas en el shaker a 200 rpm; al finalizar el periodo de incubación se tomaron 12 colonias bien aisladas y cada una de ellas se re suspendió en un falcón de 50 mL, el cual contenía 10 mL de medio LB/amp, continuamente se realizó un control en un Falcón de 50 mL, el cual tenía 10 mL de LB sin ampicilina, estas muestras se incubaron a 37°C en el shaker durante 16 horas.

4.1.2.3 Purificación de ADN plasmídico

Las 12 muestras obtenidas anteriormente con 10 mL de LB/amp las cuales contenían las células *E. coli* XL1-Blue con el vector pGEX 4T-3, se centrifugaron durante dos minutos a 6800 g, luego se descartó el sobrenadante por inversión y se re suspendió el pellet en 250 μL en una solución de re suspensión con RNAsas, preparadas previamente. Este contenido total de la suspensión celular se transfirió a tubos de micro centrífuga, seguidamente se adicionó 250 μL de solución de lisis mezclando por inversión 6 veces, luego se adicionaron 350 μL de *buffer* de neutralización mezclando por inversión 6 veces, se centrifugó durante 5 minutos a 13000 g y se transfirió el sobrenadante de cada muestra a la columna Gene JET, se utilizó el Kit comercial Gene JET PCR purification Kit # K0701 de *Thermo Scientific* y se siguieron las indicaciones del proveedor. Posteriormente se centrifugó la columna por un minuto a 13000 g, seguidamente se realizaron dos lavados cada uno con 500 μL de *buffer* de lavado, cada lavado se centrifugó a 13000 g por un minuto y se descartó el eluido al finalizar la centrifugación, posteriormente se realizó una centrifugación a 13000 g durante un minuto, esta vez sin adicionar el *buffer*. Luego la columna se transfirió a un eppendorf vacío estéril y se adicionaron 250 μL de agua tipo 1 (en este caso se utilizó agua tipo I para enviar a secuenciar), se centrifugó a 13000 g por dos minutos con el fin de eluir el ADN de la columna al tubo eppendorf vacío.

4.1.2.4 Cuantificación de ADN plasmídico

La cuantificación de ADN se realizó en el equipo *NanoDrop 2000c*, en donde se realizaron las respectivas lecturas de las muestras a una densidad óptica de 260/280 y las diluciones de las mismas, para ello se utilizó 2 µL de cada muestra en cada lectura.

4.1.2.5 Amplificación por PCR del ADN plasmídico obtenido.

Para la amplificación de ADN se utilizaron las muestras (1, 3, 5, 6, 7 y 11), las cuales dieron una relación 260/280 menor a 2 durante la cuantificación de ADN. Los primers utilizados fueron P₁ (forward) y P₂ (reverse), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1; estos fueron diseñados por el profesor Claudio Jaime Gómez Alegría del Departamento de Farmacia (Facultad de Ciencias) y se prepararon a través de un servicio externo Invitrogen en el año 2016, los cuales amplifican una región de aproximadamente 403 pb de la región C-terminal de la proteína hipotética de función desconocida PFL1395c. Las secuencias subrayadas en la tabla 1 corresponden a los sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* (GGATCC) y *EcoRI* (GAATTC).

Primer	Secuencia	Amplimero esperado
P ₁ (forward)	5" CGT <u>GGATCC</u> ATTATCGATGATACAGAAC 3"	403 pb
P ₂ (reverse)	3" CCC <u>GAATTC</u> TGCTGTTAATATATCAGATG 5"	

Tabla 1. Primers P₁ y P₂

Para la reacción se utilizó un volumen final de 25 µL, para ello se usó 16.8 µL de agua tipo I, 1 µL DNTPs 5mM (*Thermo Scientific*), 1 µL del primer P₁ 10 mM, 1 µL del primer P₂ 10 mM, 1.5 µL de MgCl₂ 1.5 mM y 2.5 µL 50 mM de *buffer* 10X de *Thermo Scientific*, se adiciono 1.2 µL de las muestras de ADN (1, 3, 5, 6, 7, 11) cada una con un concentración de ácidos nucleicos de: 337, 442, 468, 403, 390 y 346 ng/µl

respectivamente, para un volumen final de 25 μL ; finalmente se le adiciono 0,2 μL de la Taq DNA polimerasa de *Thermo Scientific*. La reacción se realizó en el termociclador C1000 utilizando el siguiente perfil térmico: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante cinco (5) minutos; 30 ciclos de 94°C por un (1) minuto, 60°C por un (1) minuto y 72° C por un (1) minuto; y un ciclo final de extensión a 72°C durante cinco (5) minutos

4.1.2.6 Visualización de los amplímeros obtenidos por PCR.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen Grand island, NY, US) a 80 voltios durante 45 minutos en una cámara de electroforesis BIORAD. Durante el montaje se utilizó un marcador de peso molecular 1Kb de *Thermo scientific* y *buffer* TAE 1% (Tris, ácido acético, EDTA).

4.1.2.7 Secuenciación del ADN purificado extraído

El ADN obtenido de las muestras (1, 3, 5, 6, 7 y 11) se extrajo y se purifico de acuerdo con las especificaciones del proveedor *Thermo Scientific* antes descritas. Se utilizó el servicio interno de la Universidad Nacional de Colombia (SsiGMol en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá). Para este procedimiento se enviaron 2 alícuotas de cada muestra seleccionada, siendo una de estas alícuotas para secuenciación con primer directo o sentido y la otra para primer reverso o anti sentido, cada muestra contenía 10 μL de ADN plasmídico y 1.2 μL de cada uno de los primers (P_1 10 mM y P_2 10 mM).La concentración de ADN plasmídico enviada al SsiGMol fue mayor a 35 ng/ μL .

- **Análisis Bioinformático**

El ADN plasmídico se envió a secuenciar al SsiGMol en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Las secuencias puras con primer directo y primer reverso de las muestras 1,3, 5, 6, 7 y 11, se analizaron usando el

programa Chromas; donde la secuencia con primer reverso se cambió a ADNc para su posterior alineamiento. Luego se hizo un alineamiento múltiple mediante la plataforma del *The European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) ⁽⁴⁷⁾ y la herramienta Clustal Omega ⁽⁴⁸⁾. Para realizar el alineamiento de la secuencia con el fin de compararla con la secuencia referente, proteína PFL1395c de función desconocida ⁽³⁹⁾ (Anexo 1), por último las secuencias obtenidas se ingresaron al programa *CLC sequence Viewer 8.0* con el fin de ubicar los primers utilizados durante la inserción del ADN (403 pb) (previamente efectuado por el grupo de investigación de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá) en el vector pGEX4T-3⁽⁴⁹⁾

4.1.2.8 Preparación de células competentes *E. coli* BL21 (DE3)

Para la preparación de las células competentes se recuperaron células *E. coli* BL21 (DE3) a partir de un vial de 1.5 mL, estas células se incubaron a 37 °C en medio LB sin ampicilina durante 16 horas para su aislamiento, al finalizar el periodo de incubación se re suspendieron dos colonias aisladas, cada una de ellas en un tubo falcón de 15 mL con 10 mL de LB, uno sin ampicilina (control positivo) y otro con medio LB/amp (control negativo), estos se incubaron a 37°C por un tiempo máximo de 16 horas en un shaker a 210 rpm. Posteriormente se colocó 0,5 mL de dicho cultivo (LB sin ampicilina) en dos frascos schott de 500 mL con 50 mL, un frasco control y uno experimental, luego se midió la densidad óptica (DO_{595nm}) de los dos medios (control y experimental) en el espectrofotómetro Turner durante tiempos determinados, teniendo en cuenta que la DO óptima debe encontrarse en un crecimiento exponencial a una DO: 0.6.

Para finalizar se colocaron las células en tubos falcons de 50 mL durante 20 minutos y se centrifugaron en la centrífuga Sorvall ST 16R a 5000g (6755 RPM) durante cinco minutos a 4°C, enseguida se decantó el sobrenadante y se re suspendió el pellet con CaCl₂ 0.1M hasta completar a 25 mL; se dejó incubar 45 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se re suspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M,

posteriormente se adicionó 1.5 mL de glicerol estéril a las células *E. coli* BL21 (DE3) y finalmente estas se alícuotaron en viales de 1.5 mL, cada uno de ellos con 100 μ L de estas células, por último se guardaron en congelación a -80 °C hasta su próximo uso.

4.1.2.9. Transformación de células *E. coli* BL21 (DE3)

Para la transformación de las células competentes se tomaron 5 viales previamente preparados de células competentes *E. coli* BL21 (DE3), a cada vial se le adiciono 2 μ L de cada una de las muestras de ADN previamente seleccionadas (1, 5, 6, 396-2 (muestra donada por la Dra. Gladys Thalía Cortés, la cual contiene células con el vector pGEX4T-3 proveniente de experimentos anteriores) y el vector pGEX4T-3); seguidamente cada mezcla (células competentes con el ADN respectivo) se dejó en hielo durante 35 minutos para permitir la incorporación del ADN en las células; luego se realizó un choque térmico a 42 °C en el baño serológico durante un minuto y 20 segundos con el fin de sellar la membrana, hacerla más permeable al ADN incorporado y generar poros en la misma; luego las células competentes se colocaron en hielo por cinco minutos y finalmente se agregó 1 mL del medio SOC sin ampicilina a cada mezcla, se llevaron 2 horas al shaker a 140 rpm a una temperatura de 37 °C.

Por último se sembraron 50 μ L de cada muestra en medio LB/amp y se aislaron las colonias con asa de *Digrafsky*, luego se incubaron a 37°C durante 16 horas en el shaker. Finalmente se tomó una de cada una de las muestras aisladas y se re suspendió en medio LB/amp, luego se incubó durante 16 horas en el shaker a una temperatura de 37°C, para posteriormente alícuotar y guardar a -80 °C.

4.1.2.10 Expresión del fragmento de la proteína hipotética PFL1395c en células *E. coli* BL21 (DE3)

Se inculó una colonia de las células previamente transformadas *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el plásmido pGEX4T-3 (clon 1) en un falcón de 15 mL con 5 mL de medio LB/amp, se incubó a 37 °C en el shaker a 200 rpm por 16 horas, al finalizar este

periodo se colocaron en refrigeración a 4 °C. Seguidamente se tomaron dos frascos schott de 500 mL (control y experimental) y a cada uno se le inocularon 500 µL de las células transformadas suspendidas en el medio LB/amp, luego se midió la DO (_{595 nm}) de los dos medios (control y experimental) en el espectrofotómetro Turner, teniendo en cuenta que la DO del cultivo no sobrepasase un rango de 0.7- 1.0.

Al obtener la DO óptima se prosiguió a tomar 250 µL del schott experimental en 12 viales de 1.5 mL. A los viales pares (2, 4, 6, 8, 10 y 12) se les indujo la expresión proteica con 25 µL de IPTG 10mM, mientras que a los viales impares (1, 3, 5, 7, 9, y 11) no se les estimuló con IPTG, todos los viales se incubaron a una temperatura de 37°C en un shaker a 200 rpm durante periodos de tiempo determinados, tiempo 0, hora 1, 2, 3, 4 y al pasar la noche.

Todas las muestras al terminar su incubación, se pasaron a hielo por 10 minutos, Posteriormente se recogieron dos tipos de muestras de acuerdo a lo sugerido por los autores Wu W. en el 2004⁽⁵¹⁾ y Midgley en el 1992⁽⁵²⁾

A las primeras de ellas se les hizo lisis y a las segundas se les procesó directamente con *buffer* muestra para electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida, luego se centrifugaron durante cinco minutos a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante, seguidamente se adicionó a cada vial 50 µL de *buffer* lisis, se mezcló ocasionalmente durante 5 minutos y finalmente se adicionó 50 µL de *buffer* muestra 2X, cada muestra se guardó a -20 °C.

4.1.2.11 Visualización de del fragmento expresado por medio de electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (método de Laemmli)

Para el análisis de la expresión del fragmento de 403 aminoácidos (aa) de la proteína de función desconocida PFL1395c se preparó y ajustó un protocolo de electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida, para esto se preparó un gel separador al 15 % y un gel concentrador al 5 %; se usó un marcador de peso molecular de bajo rango *Thermo Fisher* con masas moleculares de (218, 112, 83.3, 47.0, 32.2, 25.3, 15.7 kDa)

y la corrida se realizó en cámara vertical de BIORAD con *buffer* de corrida 1X, a 120 voltios durante 150 minutos. (El método fue adaptado a las condiciones del laboratorio de Microbiología/Inmunología).

4.1.2.12. Inmunodetección del fragmento expresado

Para este procedimiento se inició cortando cuatro membranas de nitrocelulosa de 2 x 3 cm, se procedió a servir en cada membrana 1 μ L del antígeno de *P. falciparum* (HSP70-2 o P~~f~~68kDa) y 1 μ L del solubilizado total obtenido al realizar la expresión del fragmento, estas se colocaron con una dilución 1:2. Seguidamente las muestras se dejaron bloquear durante 18 horas a 4°C con 10 mL de *buffer* de bloqueo (leche descremada al 5%+ PBS + Tween 20 al 0.1 %), al finalizar ese tiempo se prosiguió a lavar tres veces las membranas con PBS + Tween 20 al 0.1 % , se dejó agitar durante cinco minutos a 400 rpm, al finalizar los lavados se continuó agregando a cada membrana AcM7, el cual reconoce el péptido de la proteína de función desconocida PFL1395c, localizado en su región C-terminal, este anticuerpo se colocó en una dilución 1:2 en la membrana 1 y 2 y 1:10 en las membranas 3 y 4, luego este se dejó en agitación constante durante dos horas a 200 rpm, al finalizar este tiempo se realizaron tres lavados teniendo en cuenta las características de los lavados anteriores; posterior a eso se dejó incubar durante dos horas el anticuerpo anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina a 200 rpm (anticuerpo secundario) y finalmente se adicionó el sustrato combinado NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3'indolyphosphate p-toluidine salt) durante 20 minutos, y la reacción se detuvo con abundante agua de chorro .

5. RESULTADOS

5.1. Recuperación de células *E. coli* XL1-Blue en medio LB/amp.

Las células *E. coli* XL1-Blue descongeladas fueron cultivadas en tres cajas con agar LB, con (2 cajas) y (1 caja) sin ampilicina respectivamente, como se observa en la figura 6. Estas cajas se incubaron durante 16 horas a una temperatura de 37°C, evidenciando crecimiento solo las cajas a las cuales se les había adicionado ampilicina, esto confirmó que las células recuperadas correspondían a las *E. coli* XL1-Blue con el vector pGEX4T-3, el cual le confiere resistencia a la ampilicina y le permite crecer en el medio LB/amp.

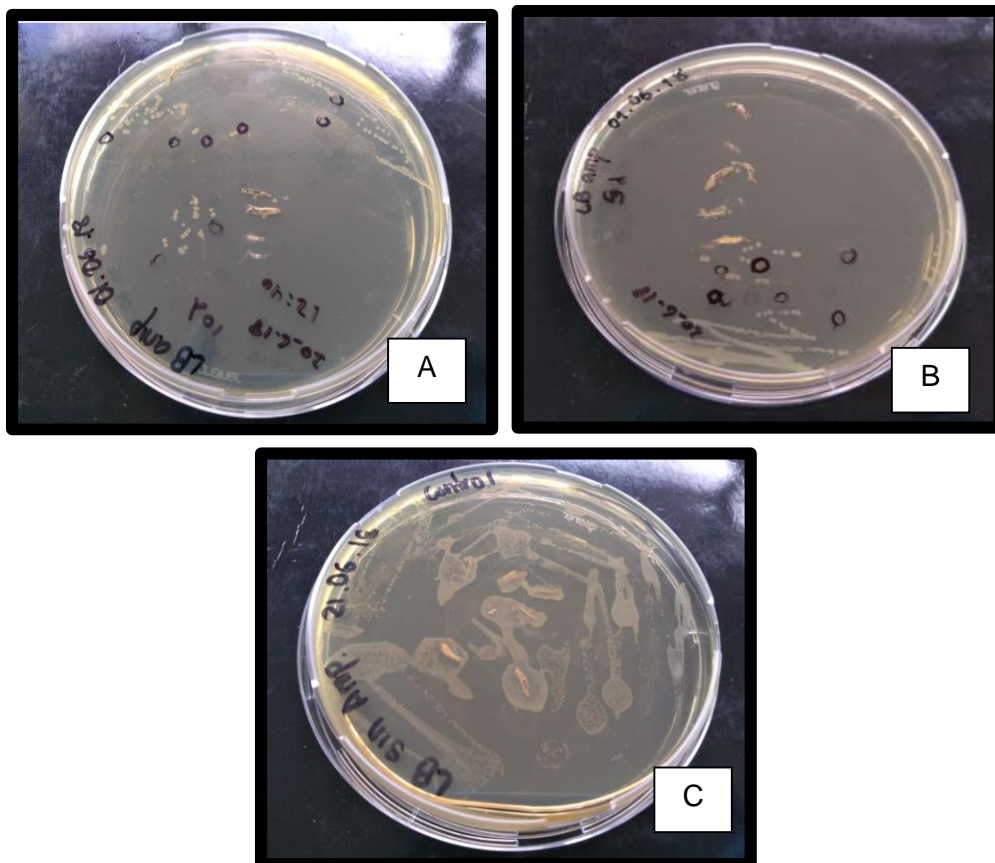


Figura 6. Recuperación de células XL1-Blue en medio LB/amp. **A.** Medio LB/amp, se observa crecimiento representativo de las *E. coli* XL1-Blue **B.** Medio LB/amp en la parte inferior de la caja se observan colonias de *E. coli* XL1-Blue **C.** Medio LB sin ampilicina con *E. coli* XL1-Blue, se evidencia crecimiento

5.2. Cuantificación de ADN plasmídico.

La **tabla 2**. Muestra la cuantificación del ADN plasmídico de las muestras 1, 3, 4, 6, 7, 8, 11 y 12 extraídas de las células *E.coli* XL1-Blue, las cuales arrojaron una concentración de ácidos nucleídos que van desde 337 ng/μL hasta 1.046 ng/μl; todas las muestras mostraron una relación (A260/280) menor a 2, esto garantiza la pureza del ADN, ya que se considera un ADN de pureza óptima si el valor de la absorbancia oscila entre 1.8-2.0, por el contrario, si el valor es mayor a 2.1 puede ser debido a la presencia de ARN en la muestra y si el valor es menor a 1.6 indica la posible contaminación de la muestra con proteínas o compuestos aromáticos. Las muestras 2, 5, 9, 10 se descartaron por no cumplir la pureza necesaria, ya que la absorbancia obtenida por todas las muestras fue mayor a 2,3.

Muestra	260/280	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μl)
1	1,9	337
3	1,89	442
4	1,97	468
6	1,92	403
7	1,96	390
8	1,93	1.046
11	1,97	346
12	1,96	468

Tabla 2. Cuantificación de ADN: número de muestras de 1-12 (fila 1), relación 260/280 del ADN (fila 2), concentración de ácidos nucleicos (fila 3), en el equipo *NanoDrop 2000c*

5.3. Visualización de los amplímeros en electroforesis en geles de agarosa

La amplificación del ADN fue evaluado en geles de agarosa al 1%, los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura 7, donde se observan 6 bandas de

aproximadamente 360 Kb en la parte inferior del gel, las muestras fueron numeradas (1 hasta 7, numeración que corresponden a las muestras 1, 3, 5, 7, 9 y 11).

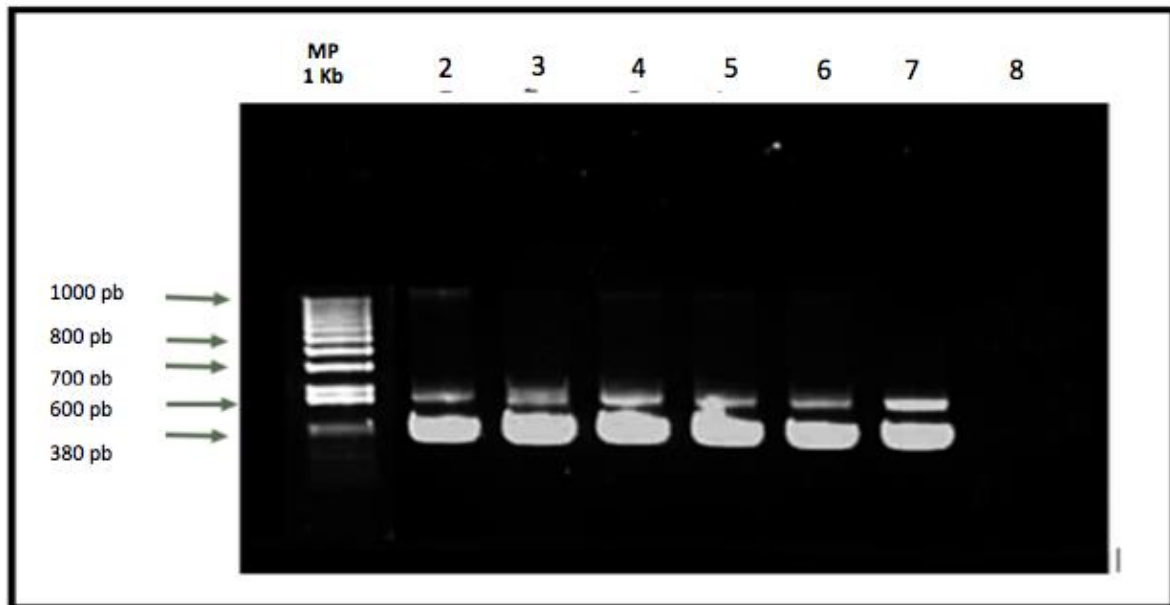


Figura 7. Amplificación de ADN plasmídico subclonado en el vector pGEX4T-3. Se puede observar el marcador de peso molecular (*de 1 Kb plus Invitrogen*) en primer lugar, seguido de las muestras 1, 2 y 3, las cuales tienen una concentración en cada pozo de 0,5 μ L de ADN. En estas se evidencian bandas tenues; seguido de las muestras 4, 5 y 6, muestras que tienen una concentración en cada pozo de 1,0 μ L de ADN. Donde se muestran bandas gruesas, finalmente en el pozo 7 sin muestra de ADN.

5.4. Análisis de la secuencia de ADN plasmídico

Después de realizar la depuración de las secuencias en ambos sentidos (directa e inversa) se descartaron las muestras 2, 3 y 4, principalmente porque al analizar los electroferogramas de las secuencias (directa o inversa) esperadas no se encontraban. Se prosiguió a continuar con las muestras 5 y 6, muestras que al ser analizadas en el Blast, mostraron una homología del 100% para la proteína hipotética de *Plasmodium falciparum* 3D7 WD repeat-containing protein putative (PF3D7_1228800) o mejor conocida como PFL1395c, como se muestra en la Figura 8.

A.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12 sequence	588	588	100%	2e-166	100%	CP017002.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12 complete sequence	588	588	100%	2e-166	100%	LN999947.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 WD repeat-containing protein, putative (PF3D7_1228800), partial mRNA	588	588	100%	2e-166	100%	XM_001350649.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G1 genome assembly, chromosome: 12	582	582	100%	9e-165	99%	LT963425.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium reichenowi genome assembly, chromosome: 12	514	514	97%	3e-144	96%	LT969575.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium reichenowi hypothetical protein, partial mRNA	508	508	97%	2e-142	96%	XM_012908702.2
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G3 genome assembly, chromosome: 12	438	438	97%	2e-121	92%	LT969561.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. DRC-Itaito genome assembly, chromosome: 12	309	309	79%	2e-82	89%	LT969449.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium gaboni genome assembly, chromosome: 12	309	309	79%	2e-82	89%	LT969435.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium gaboni hypothetical protein, partial mRNA	309	309	81%	2e-82	88%	XM_018786863.1

B.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12 sequence	584	584	100%	2e-165	100%	CP017002.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12 complete sequence	584	584	100%	2e-165	100%	LN999947.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 WD repeat-containing protein, putative (PF3D7_1228800), partial mRNA	584	584	100%	2e-165	100%	XM_001350649.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G1 genome assembly, chromosome: 12	579	579	100%	1e-163	99%	LT963425.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium reichenowi genome assembly, chromosome: 12	510	510	97%	4e-143	96%	LT969575.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium reichenowi hypothetical protein, partial mRNA	505	505	97%	2e-141	96%	XM_012908702.2
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G3 genome assembly, chromosome: 12	435	435	97%	3e-120	92%	LT969561.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. DRC-Itaito genome assembly, chromosome: 12	309	309	80%	2e-82	89%	LT969449.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium gaboni genome assembly, chromosome: 12	309	309	80%	2e-82	89%	LT969435.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium gaboni hypothetical protein, partial mRNA	309	309	82%	2e-82	88%	XM_018786863.1

Figura 8. Análisis de búsqueda de homologías del inserto de 431 nucleótidos mediante BLAST. **A, B** Blast de las muestras 5 y 6 respectivamente, donde se evidencia que en la posición tres con una homología del 100 % se encuentra la proteína hipotética de *Plasmodium falciparum* 3D7 WD repeat-containing protein putative (PF3D7_1228800)

5.5. Preparación de células competentes *E. coli* BL21 (DE3)

La tabla 3. Muestra las 5 absorbancias obtenidas del cultivo control y el experimental durante intervalos de tiempo determinados. La primera lectura se realizó al cabo de una hora y media de incubación a 37 °C a 210 rpm en el shaker, una segunda medición se determinó a los 20 minutos a partir de la primera lectura, la tercera a los 10 minutos de la segunda lectura, la cuarta se midió a los 10 minutos a partir de la tercera lectura y finalmente la última lectura se realizó a los 5 minutos de la última lectura obtenida.

λ 595.0	ABS
BLANCO	0.000
1 + 30	0.277
1 + 50	0.338
2	0.424
2 + 10	0.513
2 + 15	0.607

Tabla 3. Lecturas de las absorbancias obtenidas durante la incubación de las células competentes *E.coli* BL21 (DE3).

5.6. Transformación de células *E. coli* BL21 (DE3)

En la figura 9, muestra el crecimiento de las células transformadas *E. coli* BL21 (DE3) en medio LB después de ser incubadas por 16 horas, en las cuales se observan 5 medios LB: cuatro de LB/amp y 1 medio LB sin ampicilina con las muestras 1, 5, 6,396(2) y el vector sin inserto de ADN en medio LB con y sin ampicilina respectivamente. En todos los medios se observa crecimiento de las células transformadas *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pGEX 4T-3.

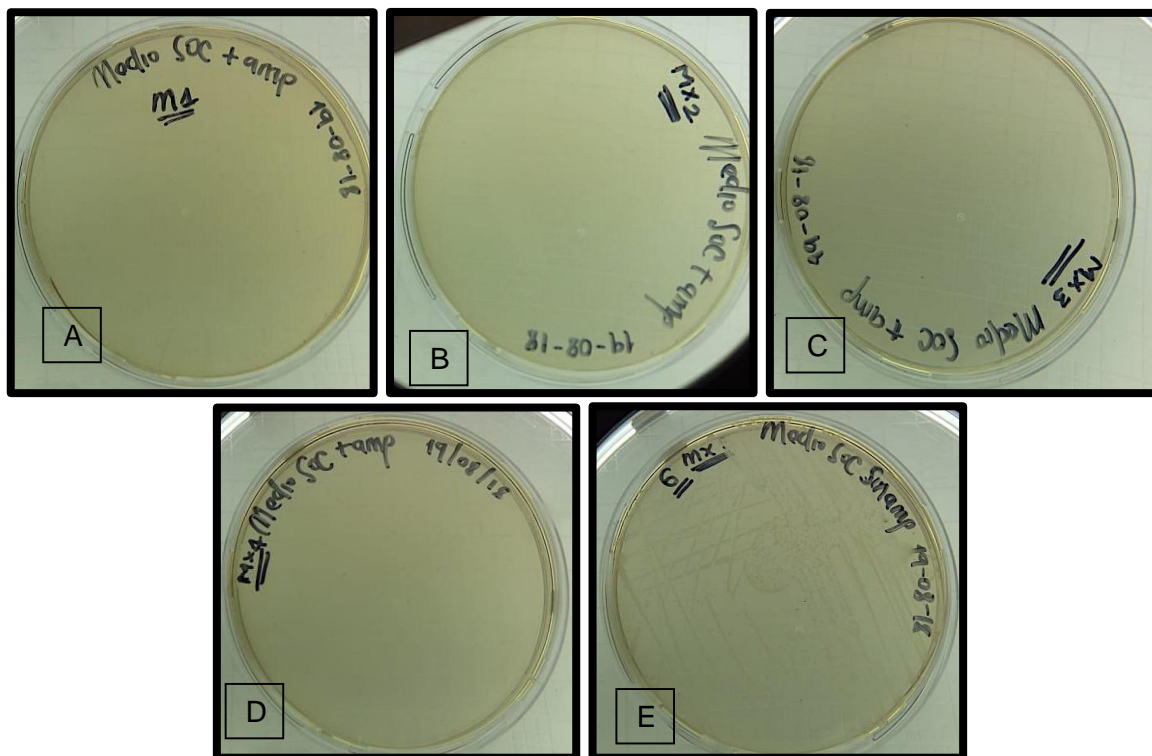


Figura 9. Aislamiento de las células transformadas en medio SOC sin ampicilina y SOC con ampicilina **A y B**. Crecimiento de células transformadas con las muestras 5 y 6 en medio SOC con ampicilina **C**. Células transformadas con la muestra pGEX 396(2) donada por la Dra. Gladys Thalía Cortes cultivada en medio SOC con ampicilina **D**. vector de clonación y expresión pGEX sin ADN insertado cultivado en medio SOC con ampicilina **E**. Células transformadas con el vector pGEX sin ADN insertado cultivado en medio SOC sin ampicilina

5.7. Análisis de la expresión de la proteína PFL1395c

Para el análisis de la expresión de la proteína PFL1395c se realizó una electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida como se observa en la Figura 10. En la imagen se observa una banda de aproximadamente 14 kDa en la parte inferior del gel, la cual podría corresponder al peso esperado de la proteína PFL1395c expresada en las células competentes *E. coli* BL21 (DE3) antes descritas.

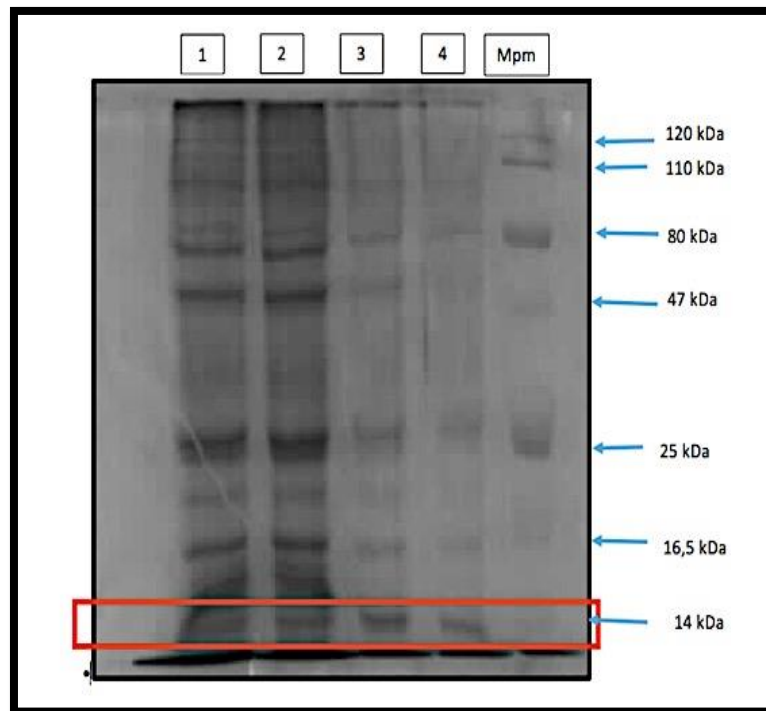


Figura 10. Electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos (SDS-PAGE) del antígeno solubilizado en Tritón X-100 de la proteína de *P. falciparum* HSP70 (HSP70-2 o la proteína Pf68 kDa). En los carriles 1, 2, 3 y 4 se dispuso 4, 6, 8 y 10 μ L del solubilizado en Tritón X-100 respectivamente, y por último se colocó el marcador de peso molecular

5.7. Inmunodetección de la proteína obtenida

Para comprobar el reconocimiento de la proteína posiblemente expresada en Tritón X 100 por el AcM7, se realizó un inmunoblot (Dot blot), utilizando como control positivo la proteína Pf68 kDa (HSP70-2) como se evidencia en la Figura 11.

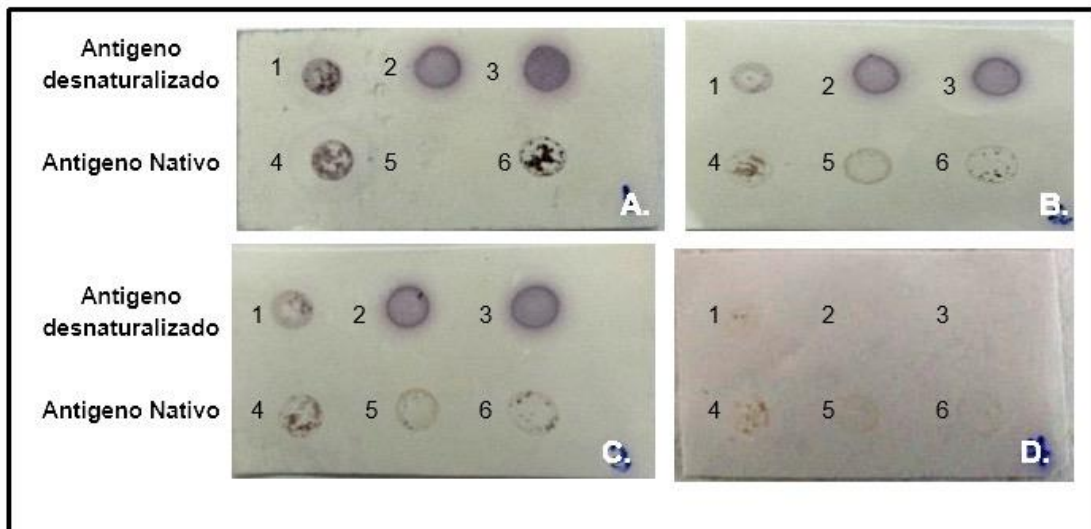


Figura 11. Inmunoblot. En la imagen **A, B, C y D**, se observa en la línea superior de la membrana el antígeno desnaturalizado y en la parte inferior el antígeno nativo. En las membranas **A y B** se usaron diluciones 1:2 del AcM 7; en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6 se colocó el control positivo (HSP70-2) y en la posición 1 y 2 de la membrana B, la proteína expresada PFL1395c; en la **C** se usó una dilución 1:10 del AcM 7; **D** es el control negativo, al cual no se le adicionó anticuerpo secundario, en ambas membranas se colocó el control positivo (HSP70-2) en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6 y en las posiciones 1 y 2 la proteína expresada PFL1395c.

En la parte superior de la membrana se encuentra el antígeno desnaturalizado y en la inferior el antígeno nativo. En la imagen A, B y C el anticuerpo reconoció la proteína *Pf68kDa* hasta la muestra 4 de todas las membranas, con excepción de las membranas 3 y 4, evidenciándose un color púrpura; en la imagen D no se observa color púrpura en la membrana, ya que a esta no se le adiciono anticuerpo secundario durante el ensayo.

6. DISCUSIÓN

Plasmodium falciparum es un parásito intracelular obligado de gran incidencia a nivel mundial que causa millones de muertes en todo el mundo ^(53,55). De ahí que se plantee la importancia del estudio de este parásito y en especial de su proteómica; permitiendo esclarecer la patogenia del parásito en el eritrocito infectado ⁽⁵⁴⁾ y continuar con el avance en el conocimiento de la biología del mismo. Aunque han sido muchos los esfuerzos por avanzar en su estudio, muchas de sus proteínas aún siguen sin ser caracterizadas, ni estudiadas, como es el caso de la proteína de función desconocida, PFL1395c. Esta situación ha sido un gran obstáculo para el manejo de la enfermedad y un mejor tratamiento, en los cuales pueda involucrarse el estudio de nuevos marcadores blanco de medicamentos y el desarrollo de vacunas efectivas ⁽⁵⁴⁾.

P. falciparum es un parásito complejo, durante su ciclo intraeritrocitario exporta cientos de proteínas al citosol, muchas de ellas implicadas en la supervivencia y la virulencia del parásito ^(54,55,56), como es el caso de PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) y la PFL1395c, proteínas de membrana que participan en la virulencia del parásito, por ejemplo la PfEMP1 participa en el secuestro de los eritrocitos, es decir está involucrada en la adhesión de los glóbulos rojos infectados al endotelio capilar de diferentes órganos ⁽⁵⁶⁾; Cho en el 2000 describió la *scale-free network of P. falciparum protein-protein interaction* (PPI), una red de escalas realizada a partir de información recolectada del PlasmoDB, en la cual se seleccionaron grupos funcionales de proteínas que pudieran interactuar con las rutas externas y por ende estar relacionadas con la respuesta inmune del hospedero, durante este estudio se menciona a la PFL1395c como una proteína localizada en la membrana y se postuló como posible marcador diagnóstico de la enfermedad ⁽⁵⁷⁾.

La PFL1395c es una proteína hipotética de función desconocida de aproximadamente 22.8 mega bases ⁽⁵⁸⁾ posiblemente asociada a las estructuras membranales, esta no ha sido estudiada, ni caracterizada con anterioridad; y es muy poco lo que se conoce de ella, de manera que cualquier resultado aportará en el avance de su conocimiento y de la biología del parásito ⁽⁵⁸⁾. Durante este trabajo se estandarizó un método de expresión para un fragmento ubicado en la región C- terminal de la proteína hipotética

de función desconocida, PFL1395c usando el vector de clonación y expresión el pGEX4T-3, en el cual se insertó una secuencia de aproximadamente 403 pb, que codifican para un fragmento de la región C-terminal de la proteína de función desconocida PFL1395c, esto se verificó mediante la realización del Blastx del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), el cual mostró una homología del 100% en las muestras 5 y 6 para la proteína *WD repeat - containing protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]* o también llamada PFL1395c, debido a esto se garantiza que la secuencia insertada en las células *E. coli* BL21 (DE3) realmente codifica para un fragmento de la proteína PFL1395c y la cual posiblemente es reconocida por el AcM7.

Cortés en el 2003 ⁽¹⁰⁾ identificó las proteínas (68 kDa, 44/22 kDa, 45 kDa) gracias al uso de anticuerpos monoclonales, además sugirió el posible reconocimiento de la proteína PFL1395c por el AcM7 y la posible existencia de un epítipo en común entre la proteína PFL1395c y la HSP70-2 (*en proceso de publicación*) ^(5,31); el AcM7 utilizado en este estudio es uno de los más avanzados en su caracterización por parte del grupo de investigación, Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y su uso en el estudio de la malaria es cada día más importante, no solo por ser una herramienta eficaz para la detección de proteínas antigénicas, si no también por ser una instrumento que servirá para la investigación y el avance del conocimiento acerca de la patogenia y biología de este parásito⁽¹⁰⁾. Cabe destacar que los AcMcs son herramientas muy útiles, debido a que son cada vez más solicitados en el mercado para el tratamiento, diagnóstico y estudio de gran variedad de enfermedades, en especial oncológicas y hematológicas ⁽⁵⁸⁾. La mayoría de los anticuerpos en venta son de tipo IgG, en especial IgG1 (79%) y menos del 70% tienen una cadena ligera kappa ⁽⁵⁹⁾.

Para verificar el reconocimiento de la proteína expresada se realizó un inmunoblot (Dot blot) para el cual se utilizó el AcM7. Este anticuerpo monoclonal reconoció la proteína Pf68 kDa (HSP70-2) y no detectó el péptido localizado en la región C-terminal de la proteína hipotética de función desconocida PFL1395c esperado al expresar la secuencia en las células *E. coli* BL21 (DE3), es importante señalar que las

células transformadas se guardaron en congelación para desarrollar experimentos que permitan avanzar con el estudio de la proteína y del parásito.

Cabe destacar que estos son los primeros ensayos que se realizan para poder expresar esta proteína en células *E.coli* BL21 (DE3), por lo tanto cualquier información aquí contenida aportará en el avance del conocimiento de esta proteína y sobre su posible papel durante la patogenia del parásito. De igual manera, todo resultado obtenido en este trabajo servirá de base a nuevas investigaciones sobre la sobre el estudio y/o caracterización de la proteína de función desconocida PFL1395c.

6. CONCLUSIONES

- La secuencia de la proteína expresada tiene una homología del 100 % con la secuencia que codifica para la proteína *WD repeat- containig protein, putative [Plasmodium falciparum 3D7]*.
- Se estandarizó un método de expresión para un fragmento de aproximadamente 201 pb localizado en la región C-terminal de la proteína de función desconocida PFL1395c, a través de células transformadas *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido de expresión y clonación pGEX 4T-3.
- Se evidenció el reconocimiento de la proteína HSP70 por el AcM7.

Referencias bibliográficas

- (1) Ricardo Durlach, Viviana E. Rodríguez, Cecilia Ezcurra, Cristina Freuler. Paludismo por plasmodium falciparum adquirido en África subsahariana. *Medicina (Buenos Aires)*. 2009; 69(1):163-166. [Consultado 2016 jun 30]. Disponible en: <https://doaj.org/article/8ad0012ce60041e78a13a6622f622a6e>
- (2) INS. Boletín Epidemiológico Semanal 2018 [internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2034.pdf>.
- (3) INS. Comportamiento de la notificación de malaria, Colombia a periodo VI de 2018. [internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/>
- (4) Spillman NJ, Beck JR, Goldberg DE. Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: Mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry*. 2015; 84(1):813-841. [Consultado 2018 nov 30]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621510>.
- (5) Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences*. 2013; 38(10):507. [Consultado 2019 ene 22]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012426>.
- (6) Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013; 34(6):1181-1188. [Consultado 2019 ene 22]. Available in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563090>.
- (7) Chetana Ajit Tamadaddi, Chandan Sahi. J domain independent functions of J proteins. *Cell Stress and Chaperones*. 2016; 21(4):563-570. [Consultado 2019 ene 25]. Available in: <https://www.jstor.org/stable/44136733>.

- (8) OPS. Actualización Epidemiológica Aumento de malaria en las Américas. [internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Available in: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2018-9582&alias=43437-30-enero-2018-malaria-actualizacion-epidemiologica-437&Itemid=270&lang=es
- (9) Jalal S. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44(5):1410. [Consultado 2019 mar 27]. Available in: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- (10) Cortés GT, Winograd E, Wiser MF. Characterization of proteins localized to a subcellular compartment associated with an alternate secretory pathway of the malaria parasite. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2003; 129(2):127-135. [Consultado 2018 oct 17]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685103000975>.
- (11) Winograd E, Clavijo CA, Bustamante LY, Jaramillo M. Release of merozoites from plasmodium falciparum-infected erythrocytes could be mediated by a non-explosive event. *Parasitol Res*. 1999; 85(8):621-624. [Consultado 2018 oct 17]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431724>.
- (12) Cortés Gladys, Caldas Maria, Rahirant, Sonia. Merozoite release from *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes involves the transfer of DiIc16 from infected cell membrane to maurer's clefts. *Springer*. 2011; 109(1):941-947. [Consultado 2018 oct 17]. Available in: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160561/pdf/436_2011_Article_2314.pdf.

- (13) Martínez SL, Clavijo CA, Winograd E. Identification of peripheral membrane proteins associated with the tubo-vesicular network of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 1998; 91(2):273-280. [Consultado 2018 oct 31]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685197002065>.
- (14) Cortés GT, Winograd E, Wiser MF. Characterization of proteins localized to a subcellular compartment associated with an alternate secretory pathway of the malaria parasite. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2003; 129(2):127-135. [Consultado 2018 sep. 20]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685103000975>.
- (15) Cortés, G., Wiser, M., Gómez, D. and Gómez, C. Revista Identificación preliminar del antígeno Pf68kDa de *Plasmodium falciparum* reconocido por el anticuerpo monoclonal AcM7 [póster]. Colombia; 2014.
- (16) Cortés, G. Identification of a unique *Plasmodium* protein and its possible role in modifying the host erythrocyte. [Poster]. Colombia; 2016.
- (17) Mark F. Wiser, H. Norbert Lanners, Richard A. Bafford, Jenny M. Favaloro. A novel alternate secretory pathway for the export of plasmodium proteins into the host erythrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(17):9108-9113. [Consultado 2018 sep. 20]. Available in: <https://www.jstor.org/stable/42565>.
- (18) Wiser MF, Lanners HN, Bafford RA. Export of plasmodium proteins via a novel secretory pathway. *Parasitology Today*. 1999; 15(5):194-198. [Consultado 2018 sep. 20]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899014404>.
- (19) Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including plasmodium knowlesi. *Mediterranean journal of hematology*

and infectious diseases. 2012; 4(1): [Consultado 2018 jul 20]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550559>.

- (20) Prats Guillem. Protozoosis sistémicas. Microbiología y parasitología medicas España: Médica panamericana S.A.; 2013. p. 363-366.
- (21) Botero David, Restrepo Marcos. Capítulo 6 - Malaria (paludismo). Parasitosis humanas Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas; 2012. p. 215-270.
- (22) CDC. Malaria. CDC. Center for disease control and prevention [internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Available in: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>.
- (23) Organización Mundial de la Salud. Paludismo. [Internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Available in: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
- (24) Path Statement On the World Health Organization's World Malaria Report. World Malaria Report 2017. [Internet]. [Consultado 2018 jun 30]. Available in: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=6404CCBA847825AE31C4ABD9AD172C81?sequence=1>
- (25) Botero David, Restrepo Marcos. Capítulo 6 - Malaria (paludismo). Parasitosis humanas. Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas; 2012. p. 215-270
- (26) Martínez-Ruiz A, Gay M, Martínez-Acedo P, Carrascal M. Sesión de modificaciones postraduccionales.2010. [internet]. [Consultado 2018 sep 30]. Consultado en: <http://hdl.handle.net/10396/10164>.
- (27) Garzón B. *Efectos biológicos y caracterización de dianas de la prostaglandina*

a1: *Interacciones con proteínas de filamentos intermedios*. Madrid: McGraw-Hill España; 2011. [Internet]. [Consultado 2018 sep 30]. Consultado en: [http://ebookcentral.proquest.com/lib/\[SITE_ID](http://ebookcentral.proquest.com/lib/[SITE_ID)

- (28) Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2010; 17(6):666-672. [Internet]. [Consultado 2019 ene 2]. Available in: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1842>.
- (29) Drago ME, Sainz T. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. 2006. [internet]. [Consultado 2019 ene 2]. Available in: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937106.pdf>
- (30) Cuesta Y, Segura C. Métodos proteómicos aplicados al estudio de la malaria: *Plasmodium falciparum* Proteomics Methods Applied to Malaria: *Plasmodium falciparum*. *Acta Biológica Colombiana* 2012; 17(3):463-484. [Internet]. [Consultado 2019 ene 2]. Available in: <https://doaj.org/article/9465a617ab854eeca2377c678d35908f>.
- (31) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Jonson a, Lewis J, Raff M, et al. Introducción a la biología celular. 2a ed. España: Panamericana; 2006.
- (32) Kumar Nirbhay, Koski Gary, Harada Masakadu, Aikawa Masamichi, Zheng Hong. Induction and localization of Plasmodium falciparum stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991; 48(1991):47-58. [Internet]. [Consultado 2019 ene 25]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779989>
- (33) Nollen EAA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing `heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* 2002 Jul 15, 115(14):2809. [Internet]. [Consultado 2019 ene 25]. Available in: <http://jcs.biologists.org/cgi/content/abstract/115/14/2809>.

- (34) Shonhai A, Boshoff A, Blatch GL. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. *Protein Science* 2007 Sep; 16(9):1803-1818. [Internet]. [Consultado 2019 ene 25]. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1110/ps.072918107>.
- (35) Mayer M, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2005 Mar; 62(6):670-684. [Internet]. [Consultado 2019 mar 25]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770419>.
- (36) Deepak Sharma, Daniel Masison. Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions. *Protein & Peptide Letters* 2009 Jun; 16(6):571-581. [Internet]. [Consultado 2019 mar 25]. Available in: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=09298665&volume=16&issue=6&spage=571>.
- (37) Fields S, Schoenfeld LW, Chettier R, Phansalkar A, Sahasrabudhe S, Vignali M, et al. A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2005 Nov 3, 438(7064):103-107. [Internet]. [Consultado 2019 mar 25]. Available in: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04104>
- (38) NCBI. PFL1395c conserved *Plasmodium* protein [*Plasmodium falciparum* 3D7]. 2018; [internet]. [Consultado 2018 nov 25] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/811331>
- (39) Lavoie C, Paiement J. Topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. *Histochem Cell Biol* 2008 Feb; 129(2):117-128. [Internet]. [Consultado 2018 nov 25] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172663>.

- (40) Gómez, Marisa; Echenique, Viviana. Capítulo 3 Herramientas básicas de ingeniería genética. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Edición 2.p.43-60
- (41) Cultek SLT. Tecnología del dna recombinante [internet]. [consultado 2017 jun 25]. Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/DNA-recombinante/Tecnica%20DNA%20recombinante.pdf>
- (42) Taghian DG, Nickoloff JA. Subcloning strategies and protocols. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1996; 58:221. [Internet]. [Consultado 2018 nov 25] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713868>.
- (43) Sanabria V, Landa A. Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. RevisTa de los esTudianTes de medicina de la universidad indusTrial de SanTander 2008 Dec 1,20:15-30. [Internet]. [Consultado 2018 nov 25] Disponible en: <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/1988>.
- (44) Instruction Manual. pBluescript II Phagemid Vectors. [Internet]. [consultado 2017 jun 25]. Available in: <http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/212205.pdf>
- (45) Harper S, Speicher DW. Expression and purification of GST fusion proteins. Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan . 2008 May; Chapter 6: Unit 6.6. [Internet]. [consultado 2017 jun 25]. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491301>.
- (46) Addgene. Plasmid: pGEX-4T3. [Internet]. [consultado 2017 jun 25]. Available at: <https://www.addgene.org/vector-database/2878/>.
- (47) Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. Nucleic Acids Research, 43(W1), W580-W584. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>

- (48) Sievers, F., et al. Fast, Scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. 2011. *Molecular Systems Biology* 7, 539.
- (49) Quiagen Aarhus, Silkeborgvej 2, Prismet, D.-800 A. (2017). CLC Sequence Viewer 8.0.0, 1-2.
- (50) Midgley CA, Fisher CJ, Bartek J, Vojtesek B, Lane D and Barnes DM 1992. Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science* 101, 183-189 . [Internet]. [consultado 2017 jun 25]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1569122>
- (51) Knudson A, Pedraza R, Pérez Mazorra MA, Cortés LJ, et al. Perfil clínico y parasitológico de la malaria por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* no complicada en Córdoba, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2015; 63(4):595-607. [consultado 2018 jun 25]. Disponible en: <https://doaj.org/article/fab48a933ebb4b4da5fd304b18c14c80>
- (52) Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* 2011 Jan 13,117(2):381-392. [consultado 2018 mar 10]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852127>.
- (53) Becerra F. Fenómenos de citoadherencia asociados a paludismo *falciparum* [Trabajo fin de grado]. Madrid: Universidad Complutense De Madrid; 2015
- (54) Vásquez AM, Tobón A. Pathogenic mechanisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud* 2012.1:106. [consultado 2018 mayo 15]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235819>.

- (55) Cho SJ, Lee J, Lee HJ, Jo H, Sinniah M, Kim H, et al. A Novel Malaria Pf/Pv Ab Rapid Diagnostic Test Using a Differential Diagnostic Marker Identified by Network Biology. *International journal of biological sciences* 2016; 12(7):824-835. [consultado 2018 mayo 15]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27313496>
- (56) Fung E, Pain A, Ralph SA, McFadden GI, Venter JC, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002 Oct 3, 419(6906):498-511g. [Internet]. [consultado 2018 mayo 15]. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01097>
- (57) Hafeez U, Gan HK, Scott AM. Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 2018 Aug; 41:114-121. [Internet]. [consultado 2018 mayo 15]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147148921830017>
- (58) Grilo AL, Mantalaris A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends in Biotechnology* 2018 Jun 23, [internet]. [consultado 2018 mayo 15]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779918301495>.

Anexos

Anexo 1. Alineamiento de las muestras

Clon5RVc	TTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAA	360
Clon6RVc	-----CAGATATGACCATGATTACGCCAAGCTGGAATTAACCCTCACTAA	46
Clon6FW	-----	0
PFL1395c(Contro11)	-----	0
pGEX_396(contro12)	-----	0
Clon5RVc	AGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATT	420
Clon6RVc	AGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATT	106
Clon6FW	-----	0
PFL1395c(Contro11)	-----ATT	3
pGEX_396(contro12)	-----ATT	3
Clon5RVc	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTGCGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	480
Clon6RVc	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTGCGAAGAAAAGGAGAAAAGAAAAAATAAAGGT	166
Clon6FW	-----AATAAAGGT	9
PFL1395c(Contro11)	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTGCGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	63
pGEX_396(contro12)	ATCGATGATACAGAACATTTTAATAATGTGCGAAGAAAAGGAAAAAGAAAAAATAAAGGT	63

Clon5RVc	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTTAAGGAA	540
Clon6RVc	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTTAAGGAA	226
Clon6FW	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTTAAGGAA	69
PFL1395c(Contro11)	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTTAAGGAA	123
pGEX_396(contro12)	TCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTTAAGGAA	123

Clon5RVc	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	600
Clon6RVc	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	286
Clon6FW	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	129
PFL1395c(Contro11)	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	183
pGEX_396(contro12)	GATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAAT	183

Clon5RVc	CAGATTTTCATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	660
Clon6RVc	CAGATTTTCATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	346
Clon6FW	CAGATTTTCATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	189
PFL1395c(Contro11)	CAGATTTTCATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	243
pGEX_396(contro12)	CAGATTTTCATATAATGAATATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAA	243

Clon5RVc	TTAATAAGAACAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACgCAA	720
Clon6RVc	TTAATAAGAACAAGTCGTACCAGCAACATTGT-----	379
Clon6FW	TTAATAAGAACAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	249
PFL1395c(Contro11)	TTAATAAGAACAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	303
pGEX_396(contro12)	TTAATAAGAACAATTCGTTACCAGCAACATTGTCTTCATCCTTTTTAACAGGAACACAA	303
	***** * * *	

Clon5RVc	TCCAACCTCTTAATAAAATCAAATGATCACAAGGA-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	TCCAACCTCTTAATAAAATCAAATGATCACAAGGATTTTTTTAGTTCATCATATTCATCA	309
PFL1395c(Contro11)	TCCAACCTCTTAATAAAATCAAATGATCACAAGGATTTTTTTAGTTCATCATATTCATCA	363
pGEX_396(control2)	TCCAACCTCTTAATAAAATCAAATGATCACAAGGATTTTTTTAGTTCATCATATTCATCA	363
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	TCAAACGATATTACATCTGATATATTAACAGCACCCCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAAT	369
PFL1395c(Contro11)	TCAAACGATATTACATCTGATATATTAACAGCAC-----	398
pGEX_396(control2)	TCAAACGATATTACATCTGATATATTAACAGCA-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	TCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG	429
PFL1395c(Contro11)	-----	398
pGEX_396(control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	GAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGG	489
PFL1395c(Contro11)	-----	398
pGEX_396(control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGC	549
PFL1395c(Contro11)	-----	398
pGEX_396(control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	GAATGGCAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATC	609
PFL1395c(Contro11)	-----	398
pGEX_396(control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	AGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAG	669
PFL1395c(Contro11)	-----	398
pGEX_396(control2)	-----	396

Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	ACCGAGATAGGGTTGAGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTG	729
PFL1395c (Control1)	-----	398
pGEX_396 (control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	GACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGCGATGGCCACTACGTGAACCATC	789
PFL1395c (Control1)	-----	398
pGEX_396 (control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	ACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGG	849
PFL1395c (Control1)	-----	398
pGEX_396 (control2)	-----	396
Clon5RVc	-----	755
Clon6RVc	-----	379
Clon6FW	AGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAA	878
PFL1395c (Control1)	-----	398
pGEX_396 (control2)	-----	396

Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas a partir de los clones pGEX PFL396-2 (clon 5 y clon 6). Las secuencias control son un fragmento de PFL1395C y clon encontrado preliminar pGEX PFL1395c (clon 396-2)

Anexo 2. Fragmento de lectura abierta (ORF). Clon 6

>Clon 6.

```
AATAAAGGTTTCCTATTTTATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAA
ATAATGAAACACTTAAGGAAGATGATAATATATATAATATACATTTAGA
AGATCATAATAAAATAGAAGATATATATAATCAGATTTTCATATAATGAA
TATGAACCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCTAAATTAATAA
GAACAAATTCGTTACCAGCAACAT
```

```

ORF1 (201 nt) Display ORF as... Unmark
ORF1 CDS translation
1 ATGAAGAATTATAATGTTTCAAAAAAATTAATAATGAAACACTT
  M K N Y N V S K K L N N E T L
46 AAGGAAGATGATAATATATATAATATACATTTAGAAGATCATAAT
  K E D D N I Y N I H L E D H N
91 AAAATAGAAGATATATATAATCAGATTTTCATATAATGAATATGAA
  K I E D I Y N Q I S Y N E Y E
136 CCAAATAATCTAAAACCATCACGCATACGTCCTAAATTAATAAGA
  P N N L K P S R I R P K L I R
181 ACAAATTCGTTACCAGCAACA
  T N S L P A T *

```

Figura 13. Muestra del Clon 6, marco de lectura abierta de 201 pb ORF, con el código de protozoos. Se observa una secuencia de 201 pb codificantes para los 67 aa de los plásmidos pGEX PFL396-2. Cabe destacar que esta muestra se escogió debido a la homología que se evidencia en su secuencia directa e inversa.

Anexo 3. BLAST Clon 6

WD repeat-containing protein, putative [*Plasmodium falciparum* 3D7]
 Sequence ID: [XP_001350685.1](#) Length: 3209 Number of Matches: 1

Range 1: 2788 to 2854 [GenPept](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
135 bits(340)	1e-37()	Compositional matrix adjust.	67/67(100%)	67/67(100%)	0/67(0%)	
Query 1	MKNYNVSKKLNNETLKEDDNIYNIHLEDHNKIEDIYNQISYNEYEPNNLKPSRIRPKLIR				60	
Sbjct 2788	MKNYNVSKKLNNETLKEDDNIYNIHLEDHNKIEDIYNQISYNEYEPNNLKPSRIRPKLIR				2847	
Query 61	TNSLPAT	67				
Sbjct 2848	TNSLPAT	2854				

Figura 14. Análisis de la búsqueda de la homología del inserto de 201 nucleótidos en el BLAST. Dichos insertos se encuentran ubicados entre los nucleótidos 60 a 2847 bps de la proteína hipotética conservada de 9630 nucleótidos la WD repeat-containing protein, putative [*Plasmodium falciparum* 3D7], del mismo modo se determina una homología del 100 %.