

**Evaluación de la unión de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* a células hospederas.**



**Trabajo de grado.**

**Juan Sebastián Abril Loaiza.**

**Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Bogotá, Septiembre de 2021**

**Evaluación de la unión de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* a células hospederas.**

**Juan Sebastián Abril Loaiza.**

**Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Asesora Externa**

Gabriela Arévalo Pinzón. M.Sc. Ph.D.

**Asesora interna.**

Ruth Mérida Sánchez Mora. M.Sc. Ph.D.

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Bogotá, Septiembre de 2021.**

**Evaluación de la unión de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* a células hospederas.**

**APROBADA:**

---

**JURADOS:**

---

---

**ASESORES:**

**Asesora Interna:** Ruth Mélida Sánchez Mora M. Sc. Ph.D.

**Asesora Externa:** Gabriela Arévalo Pinzón M.Sc. Ph.D.

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.**

**Bogotá, Septiembre de 2021**

*“Para mis papás, Juan José, Saúl Fernando, Martha Soledad y desde el cielo, Carolina.*

*A mis hermanas Karen Yojana, Wendy Tatiana, Sandra Paola y Martha Cristina.*

*Juan Manuel y Alma, gracias por el amor incondicional”*

## **Agradecimientos**

Primeramente a mi familia, por ser la fuente de amor más grande que puede existir. En especial a mi papá Juan José, por ser el mejor ejemplo de amor y fuerza que pude recibir en la vida, definitivamente nada de esto hubiera sido posible sin su dedicación en mi vida, gracias por ser el significado del amor que más me ha marcado en la vida.

A mi mamá Carolina, quien desde el cielo me motiva a superarme y quien estoy seguro que está detrás de cada logro en mi vida, sin duda mi ángel de la guarda.

A mis papás Saúl Fernando y Martha Soledad, por guiarme por el camino del bien, la exigencia y el amor incondicional desde el momento en que la vida nos cruzó en el camino.

Gracias a mis hermanas Karen Yojana, Martha Cristina, Sandra Paola y Wendy Tatiana, por su apoyo incondicional y cada palabra que me animó y levantó cuándo creía que no era posible llegar hasta aquí.

Juan Manuel y Alma, gracias por motivarme día a día a superarme con la convicción de construir un futuro mejor para nosotros, sin duda alguna se merecen cada uno de mis triunfos, porque también han sido luchados por ustedes.

Profesora Gabriela Arévalo Pinzón, gracias infinitas por tus enseñanzas, sabiduría, acogimiento y cariño. Gracias por la oportunidad de creer en mí y en mi trabajo, por marcar el inicio de mi vida profesional con las mejores expectativas de conocer, aprender y ser ejemplo a seguir algún día para alguien, así como lo eres para mí.

A los investigadores Jeimmy Castañeda , Adriana Santamaría y Fredy Pulido infinitas gracias por reflejar su conocimiento en cada respuesta generada hacía mis dudas, gracias por la dedicación, la disposición y la actitud de enseñanza que prestaron hacía mí.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, gracias por haberme dado la oportunidad de tomar sus aulas y disponer de los mejores profesores que superaron mis expectativas desde cualquier punto de vista, definitivamente no pude haber escogido un mejor lugar para materializar las ilusiones de escoger el camino del aprendizaje en mi vida.

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, gracias por ser la mejor escuela de investigación que pude haber conocido en el inicio de mi carrera, gracias por permitirme el uso de sus insumos, instalaciones y personal perfectamente capacitado para sentirme como en casa y disfrutar de mi proceso de aprendizaje.

Finalmente, a mis amigos de carrera y próximamente colegas, de quienes me llevo diferentes experiencias para poder poner en práctica en mi vida. También gracias a los que iniciaron este proceso conmigo, pero que el destino les tenía preparado algo mucho mejor en sus vidas, en especial a Luisa.

## Tabla de contenido

Pág.

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
3.1 Antecedentes.....	3
3.2 Malaria.....	7
3.3 Epidemiología de la malaria.....	7
3.4 Presentación clínica.....	9
3.5 Ciclo de vida y etiología.....	10
3.6 <i>Plasmodium vivax</i> .....	12
3.7 Proceso de invasión a los reticulocitos.....	13
3.8 Proceso de invasión a los hepatocitos.....	14
<b>4. Diseño metodológico.....</b>	<b>15</b>
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	16
4.3 Tipo de investigación.....	16
4.4 Enfoque de estudio.....	16
4.5 Materiales y métodos.....	16
4.5.1 Preparación del vector.....	17
4.5.2 Transformación bacteriana.....	18
4.5.3 Expresión de la proteína PvSPATR.....	18
4.5.4 Tratamiento de la proteína recombinante.....	19
4.5.5 Purificación de PvSPATR por cromatografía de afinidad.....	20
4.5.6 Diálisis de PvSPATR.....	21
4.5.7 SDS-PAGE.....	21
4.5.8 Western-blot.....	21
4.5.9 Tinción azul de Coomasie.....	22
4.5.10 Dot Blot.....	22
4.5.11 Cuantificación de PvSPATR recombinante.....	22
4.5.12 Citometría de flujo con células HepG2.....	23
4.5.13 Radiomarcaje de PvSPATR recombinante.....	23
4.5.14 Ensayo de unión con PvSPATR radiomarcada a células HepG2.....	23
4.5.15 Obtención y purificación de reticulocitos.....	24
4.5.16 Citometría de flujo con reticulocitos.....	25

<b>5. Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b> Obtención de células <i>E. coli</i> transformadas por el vector Pet24- <i>PvSPATR</i> .....	25
<b>5.2</b> Expresión de la proteína <i>PvSPATR</i> .....	26
<b>5.3</b> Obtención de <i>PvSPATR</i> purificada.....	26
<b>5.4</b> Unión total de la proteína <i>PvSPATR</i> a células HepG2 por citometría de flujo.....	27
<b>5.5</b> Unión de la proteína <i>PvSPATR</i> radiomarcada a células HepG2.....	30
<b>5.6</b> Obtención y purificación de reticulocitos,}.....	31
<b>5.7</b> Unión total de <i>PvSPATR</i> a reticulocitos por citometría de flujo.....	32
<b>6. Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>38</b>

<b>Índice de figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Distribución de casos de malaria en África Subsahariana.....	9
<b>Figura 2.</b> Casos acumulados en Colombia en la tercera semana epidemiológica del 2021 INS.....	9
<b>Figura 3.</b> Número de casos de malaria coinfección con Sars-Cov2 tercera semana epidemiológica.....	10
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i> .....	13
<b>Figura 5.</b> Estadios visibles en <i>P. vivax</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Estructura y conformación del merozoito de <i>P. vivax</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Intervención de los HSPGs presentes en la superficie de las células de Kupffer.....	16
<b>Figura 8.</b> Metodología y actividades paso a paso que se realizaron para el cumplimiento de los objetivos.....	18
<b>Figura 9.</b> Plásmido utilizado para la transformación bacteriana de células <i>E. coli</i> BL21-DE3.....	19
<b>Figura 10.</b> Proceso de expresión de la proteína recombinante PvSPATR.....	20
<b>Figura 11.</b> Tratamiento denaturante PvSPATR recombinante.....	21
<b>Figura 12.</b> Proceso de obtención y purificación de reticulocitos.....	25
<b>Figura 13.</b> Colonias recombinantes de la proteína PvSPATR en agar Luria Bertani.....	26
<b>Figura 14.</b> Expresión de la proteína PvSPATR.....	27
<b>Figura 15.</b> Transferencia Western-blot y tinción azul de Coomassie de la purificación de la proteína PvSPATR.....	28
<b>Figura 16.</b> Unión total de la proteína PvSPATR a células HepG2 por citometría de flujo.....	29
<b>Figura 17.</b> Unión de la proteína PvSPATR a células HepG2 mediante Radiomarcación.....	30
<b>Figura 18.</b> Reticulocitos purificados teñidos con coloración supravital.....	31
<b>Figura 19.</b> Selección de células y unión total de la proteína PvSPATR a reticulocitos.....	33

## 1. Resumen

La malaria en Colombia representa una enfermedad importante a nivel nacional debido a que nuestro país presenta las condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de esta enfermedad. Particularmente la especie *Plasmodium vivax* es una de las más prevalentes en nuestro territorio lo que refleja entonces, la necesidad de implementar estudios sobre la biología básica de este parásito que involucren la búsqueda de blancos terapéuticos de acción. Durante el complejo ciclo de invasión de *Plasmodium*, se ha observado que el parásito expresa distintos antígenos para interactuar con la célula hospedera, entre estas, la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR). Esta proteína se reconoce como una proteína multietapa ya que en especies diferentes a *Plasmodium vivax* se ha evidenciado la presencia de esta en estadio sexual y asexual, además de tener capacidad para inducir una respuesta de anticuerpos. Sin embargo, en *P. vivax* no se ha establecido si esta proteína puede estar participando en eventos de adhesión a la célula hospedera (hepatocitos y reticulocitos), lo que supone un gran reto para la investigación de esta proteína y su importancia en el proceso de invasión.

En este trabajo se evaluó la unión de la proteína SPATR a células hepáticas y reticulocitos humanos. Para cumplir con el objetivo se utilizó plásmido que contenía la secuencia de nucleótidos del gen *spatr* para transformar bacterias *E. coli* y obtener en estas células la proteína PvSPATR recombinante. La proteína fue purificada mediante procesos cromatográficos y fue incubada con células hospederas. Los resultados mostraron que, a pesar de la importancia de esta proteína en otras especies parasitarias, la proteína PvSPATR no interactúa directamente con reticulocitos y hepatocitos humanos. Esto sugiere que SPATR en *P. vivax* puede estar cumpliendo otras funciones durante el proceso de invasión del parásito que no involucran interacciones del tipo receptor-ligando o puede estar mediando interacciones macromoleculares con la membrana de la célula hospedera indirectamente. Esta investigación muestra que si bien, los parásitos de la malaria que infectan al humano comparten varias proteínas durante su ciclo de invasión, cada una de ellas puede estar cumpliendo distintas funciones como es el caso de la proteína PvSPATR.

**Palabras clave:** eritrocítica, malaria, *Plasmodium vivax*, pre-eritrocítica, receptor-ligando.

## **Abstract.**

Malaria in Colombia represents an important disease at the national level because our country presents the climatic, geographical and epidemiological conditions suitable for the transmission of this disease. Particularly the *Plasmodium vivax* species is one of the most prevalent in our territory, which then reflects the need to implement studies on the basic biology of this parasite that involve the search for therapeutic targets of action. During the complex invasion cycle of *Plasmodium*, it has been observed that the parasite expresses different antigens to interact with the host cell, including the secreted protein with altered thrombospondin repeat domain (SPATR). This protein is recognized as a multistage protein since in species other than *Plasmodium vivax*, its presence in sexual and asexual stages has been evidenced, in addition to having the capacity to induce an antibody response. However, in *P. vivax* it has not been established whether this protein may be participating in events of adhesion to the host cell (hepatocytes and reticulocytes), which represents a great challenge for the investigation of this protein and its importance in the process of invasion.

In this work, the binding of the SPATR protein to liver cells and human reticulocytes was evaluated. To meet the objective, a plasmid containing the nucleotide sequence of the *spatr* gene was used to transform *E. coli* bacteria and obtain the recombinant *PvSPATR* protein in these cells. The protein was purified by chromatographic processes and incubated with host cells. The results show that, despite the importance of this protein in other parasitic species, the *PvSPATR* protein does not interact directly with human reticulocytes and hepatocytes. This suggests that SPATR in *P. vivax* may be fulfilling other functions during the parasite invasion process that do not involve receptor-ligand interactions or may be indirectly mediating macromolecular interactions with the host cell membrane. This research shows that although the malaria parasites that infect humans share several proteins during their invasion cycle, each of them may be fulfilling different functions, such as the *PvSPATR* protein.

**Keywords:** *erythrocytic, malaria, Plasmodium vivax, pre-erythrocytic, receptor-ligand.*

## 2.Introducción.

La malaria es una infección parasitaria transmitida por cinco especies del género *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P.knowlesi*) que causan enfermedad en el humano. La transmisión de esta enfermedad ocurre gracias a la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*, que inocula en el humano el estadio infeccioso (esporozoito) de cualquiera de estas especies de *Plasmodium*.

Se estima que anualmente hay alrededor de 230 millones de casos confirmados de paludismo en el mundo, causantes de aproximadamente 400.000 muertes reportadas.<sup>1</sup> A la infección causada por *Plasmodium vivax* se le atribuyen el 70% de los casos clínicos presentados en el área de las Américas, haciendo prioritario su estudio en Colombia, en donde de los 29,755 casos confirmados para el periodo VI de 2021 a *Plasmodium vivax* se le atribuye un índice parasitario de 1,78 casos por cada 1.000 habitantes.<sup>2</sup>

Entre las características clínicas más comunes en las personas que padecen esta infección se encuentran escalofríos, fiebre y sudor entre diez a quince días posteriores a la exposición de la picadura del mosquito.<sup>1</sup> En los casos en donde se presenta la malaria complicada se pueden presentar afectaciones como malaria grave, afectación respiratoria y malaria cerebral, además de presentarse afectación multiorgánica en personas inmunocomprometidas.

Entre las características más llamativas en el estudio de *Plasmodium vivax*, se cuenta con que tiene la capacidad de reactivarse post tratamiento gracias a su estadio hipnozoito que puede durar inactivo de 6 a 12 meses y al activarse logra reanudar su ciclo de esquizonte hepático. Además de su preferencia para desarrollar su estadio merozoito en las células sanguíneas inmaduras o reticulocitos, aumentando su tamaño y deformabilidad,<sup>3</sup>lo que a su vez dificulta su estudio debido a la inexistencia de un cultivo continuo de reticulocitos.<sup>20</sup>.

El ciclo de vida del parásito en el ser humano inicia con la picadura del mosquito hematófago *Anopheles*, el cual inocula el primer estadio infeccioso denominado esporozoito. Esta forma parasitaria migra hasta el tejido hepático donde invadirá su primera célula blanco denominada hepatocito. Allí los esporozoitos maduran a merozoitos que serán liberados al torrente sanguíneo para invadir la segunda célula blanco: los eritrocitos dentro de su huésped, iniciando por la invasión a hepatocitos por parte de los esporozoitos, en donde maduran a esquizontes y puede llegar a formarse una fase latente o hipnozoito. Estos esquizontes liberan cientos de merozoitos que logran invadir los glóbulos rojos logrando la reproducción asexual.

Las formas parasitarias denominadas esporozoito y merozoito expresan un alto número de proteínas claves para el proceso de invasión de células hepáticas y eritrocitos respectivamente. Dentro de estas proteínas se ha descrito la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR, del inglés) esta proteína ha sido descrita en distintas especies de *Plasmodium* como *P. falciparum* y *P. yoelli* en donde es expresada en diferentes formas parasitarias como en la membrana del esporozoito y en las roptrias siendo esencial para el proceso de invasión eritroide.<sup>14,16</sup> Por tal motivo, este proyecto está enfocado en la producción y caracterización de la unión de la proteína SPATR de *Plasmodium vivax* a hepatocitos y reticulocitos, describiendo así, un posible blanco terapéutico para esta infección.

Los dominios de repetición de trombospondina actúan en los procesos biológicos de unión, movilidad y proliferación parasitaria, la función de SPATR en *Plasmodium vivax* no se ha documentado por ahora, en comparación como la función ya conocida en especies como *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium berghei*, en donde se les conoce que está presente en la superficie de los esporozoitos y en las roptrias de los esquizontes.<sup>14,16</sup> Además es esencial para el proceso de invasión eritroide de *Plasmodium berghei*, que a pesar de no ser causante de infección humana, si es importante en la investigación de infección a roedores

Gracias a esto, es que nace la necesidad de ampliar la información de la función de la proteína SPATR en el proceso de infección de *Plasmodium vivax* a la célula diana, para así poder describir y caracterizar esa unión y establecer su importancia en el proceso de invasión celular. Esto debido a que ya se reconoce esta proteína como un antígeno potencialmente específico en otras especies causantes de infección humana y primate (*P. knowlesi*)<sup>14</sup> y en otras especies no generadoras de infección humana.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación servirán para ampliar el conocimiento de una de las especies más incidentes y mortales en la infección malárica como lo es *Plasmodium vivax*, para así ofrecer nuevas estrategias en el control de esta especie parasitaria que afecta con la vida y la salud pública a nivel mundial, a su vez influir en la investigación científica de este. Fortaleciendo así, las investigaciones que puedan estar enfocadas en la prevención de la infección malárica, ya que la elucidación y caracterización de nuevas interacciones de *P. vivax* será de gran utilidad para la búsqueda de nuevos métodos de control contra esta especie parasitaria. Todo esto, gracias a los avances moleculares ya conocidos sobre esta especie parasitaria y a los logros que posiblemente se aporten en este trabajo realizado de la mano de La Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.

Esta investigación es importante para la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en especial para la facultad de ciencias de la salud y el programa de Bacteriología y Laboratorio clínico, debido a que es el reflejo de los esfuerzos de sus estudiantes y docentes en el proceso de formación profesional.

### **3.Marco teórico.**

#### **3.1Antecedentes.**

La importancia de la investigación de especies de alta incidencia causantes de malaria, como es el caso de *Plasmodium vivax*, se debe a sus altas tasas de prevalencia y mortalidad a nivel mundial, en especial en las Américas, en donde representa aproximadamente el 75 % de casos de infección de malaria.<sup>1</sup> En Colombia, los casos reportados como positivos para la infección palúdica pertenecen en su mayoría a la presencia de *Plasmodium vivax* en las personas infectadas. Se presume que alrededor del 52% de casos totales confirmados pertenecen a esta especie, excepto en la región Pacífica Colombiana, en donde prevalece la infección por *Plasmodium falciparum*.<sup>2</sup> En referencia a las infecciones de malaria complicada, actualmente se considera que *Plasmodium vivax* está aumentando su prevalencia en estos casos.

A pesar de los avances en investigaciones sobre la biología, la proteómica y la genómica de *Plasmodium vivax*, aún existen impedimentos en la investigación como la dificultad de obtener un cultivo *in vitro* estandarizado para el crecimiento de esta especie, esto debido a su preferencia exclusiva en estadio merozoito por llevar a cabo la infección de eritrocitos inmaduros o reticulocitos. La especificidad y tropismo de los merozoitos de *P. vivax* hacia los reticulocitos es realmente alta, estas células se encuentran presentes en aproximadamente un 2% del total de los eritrocitos circulantes y por esto difícilmente se ve más del 3% de eritrocitos infectados.<sup>3</sup>

Otra de las grandes dificultades que se le suman al control de la enfermedad por *P. vivax* se debe a los cambios climáticos generados antropogénicamente, ya que esto ha favorecido la adaptación de algunas especies de *Anopheles sp* en algunos países europeos en donde se daba por erradicada la malaria autóctona.<sup>5</sup>

La evolución genómica de *Plasmodium vivax* se basa en tres puntos, estos son el genoma mitocondrial, nuclear y otro proveniente del apicoplasto. El genoma nuclear proviene de 14 cromosomas presentes, es rico en Guanina y Citocina, lo que supone que estas regiones ricas en estos aminoácidos están presentes en el ADN parasitario y tras la absorción por parte del

hospedero, estimula el receptor tipo toll TLR9 activando la respuesta inflamatoria inmune.<sup>6,7</sup> Se considera que *P. vivax* cuenta con aproximadamente 5400 genes, de los cuales a pesar de las diferencias genéticas entre distintas especies, se encuentra gran número de genes ortólogos con estas, en especial con *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* y *P. falciparum*, con quienes cuenta posiciones genómicas iguales sin punto de rotura y además cuenta con un alto grado de conservación en los cromosomas.

La información documentada sobre la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) en *Plasmodium vivax* es nula, pero se conoce que hace parte del grupo de proteínas de repetición de homología estructural de trombospondina o TSR (*Thrombospondin type-1 repeat*) ,junto con la CSP (*circumsporozoite protein*) y TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*), que están presentes en el proceso de invasión. El dominio TSR está presente en varias proteínas de superficie, y las proteínas codificantes para este dominio mencionadas anteriormente están involucradas en la movilidad, unión e invasión a células huésped. En *Plasmodium falciparum*, se conoce que la proteína SPATR, es importante en el proceso de la invasión a los hepatocitos y a los eritrocitos, ya que esta se expresa en la superficie de los esporozoitos y en los micronemas de los merozoitos. Se asume que gracias a su dominio de repetición de trombospondina alterado, este es crucial para procesos biológicos de invasión, especialmente en los procesos de unión celular a través de los glicoconjugados generados para formar dicha unión específica. Estos procesos de unión han confirmados con ensayos como la inmunofluorescencia indirecta .<sup>8</sup>

Las proteínas documentadas como influyentes en la unión realizada por *Plasmodium vivax* son pocas, en comparación a las investigadas para *Plasmodium falciparum*, al que se le conocen aproximadamente 50 proteínas dedicadas a la unión a la célula diana, mientras que las documentadas como necesarias para la unión a reticulocitos por *Plasmodium vivax* son alrededor de 23<sup>11</sup>. Entre las que se encuentran las proteínas presentes en las roptrias y el antígeno de superficie de unión la reticulocitos (RBSA)<sup>12</sup>. Pero la función de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) en *Plasmodium vivax* no ha sido investigada aún. La primera información reportada sobre esta proteína, fue identificada en *Plasmodium yoelli*, en donde se sugirió que tiene acción en la motilidad de los esporozoitos y la invasión en células hepáticas.<sup>14</sup> También se reconoce que los dominios de repetición de trombospondina alterados participan en procesos de unión, proliferación y en las acciones de la proteasa extracelular.

La proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR), Es una proteína descrita en especies diferentes a *Plasmodium vivax*, se reconoce que pertenece a la familia de proteínas que contiene un dominio TSR, y se ha demostrado que las proteínas que contienen este dominio están involucradas en la movilidad de los esporozoitos.<sup>17</sup> Se conoce que en especies como *Plasmodium falciparum* está presente en la superficie de los esporozoitos participando en la unión a células hepáticas y además se asume que está presente en la fase de merozoito ya que se ha encontrado presente en la membrana de los glóbulos rojos infectados por *Plasmodium falciparum*.<sup>40</sup>

La información arrojada sobre la proteína SPATR en *P. vivax* es nula, por lo que información de esta en otras especies es valiosa para entender su importancia en el proceso infeccioso. Esta información aumenta su relevancia si dichas especies poseen alto parentesco filogenético con *P. vivax*, como es el caso de *P. knowlesi*, especie con la cual se cumple esta regla, tanto así que en las pruebas de identificación cómo la reacción en cadena de la polimerasa, la mayoría de primers con una baja estandarización, reaccionan de manera cruzada para estas, es por esto que el diseño de primers para la identificación de estas es un gran reto para reducir el margen de error en la identificación por este método molecular.<sup>14</sup> Debido a este alto número de características en común, es que cualquier información arrojada sobre especies similares puede ayudar al avance del conocimiento de SPATR en *Plasmodium vivax*.

Teniendo en cuenta lo anterior, el estudio de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) en especies como *Plasmodium knowlesi* lo arroja Mahajan et. al, en el que establece a raíz de una investigación, que las cinco especies de *Plasmodium sp* causantes de enfermedad en humanos, tienen una similitud en esta proteína, la cual es que conservan el mismo número y la misma posición de los residuos de cisteína dentro de esta y documenta que es capaz de desencadenar respuesta inmunológica.<sup>14</sup>

En *Plasmodium berghei*, que también cumple con las características de alta similitud con *Plasmodium vivax*, la proteína SPATR no es necesaria para la invasión a las células hepáticas, pero sí tiene papel fundamental en la invasión eritrocítica.<sup>16</sup> Esto se determinó, gracias a que se logró identificar que los merozoitos deficientes en la proteína SPATR a través de mutaciones dirigidas, no logran establecer infección en los eritrocitos. Al contrario pasa en especies como *Plasmodium falciparum*, en donde a través de una creación de anticuerpos anti PfSPATR, se logró establecer que se logra realizar la invasión extraeritrocitaria en células hepáticas, pero

lastimosamente no se ha logrado describir de manera exacta el mecanismo en el que esa contribuye a la invasión.<sup>16</sup>

El conocimiento estructural de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR), se conoce gracias a *Chattopadhyay et al.* en un trabajo sobre *Plasmodium vivax* en donde evidencia que esta tiene un peso de 30 kDa aproximadamente y además está altamente expresada en diferentes etapas del ciclo de vida parasitario, como en los merozoitos, gametocitos y esporozoitos, lo que indicaría que tiene funciones en la motilidad, la unión y la invasión celular.

Gracias a estas investigaciones, de donde se ha podido recoger valiosa información de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) en diferentes especies de *Plasmodium sp.*, se pueden obtener datos valiosos para fundamentar la investigación y así, evaluar la unión y caracterización de esta a sus células hospedadas en el proceso de infección por *Plasmodium vivax*. Logrando así, ampliar la información biológica de esta especie, esperando complementar las posibles investigaciones en donde sea necesario conocer la función de la proteína SPATR con el fin de controlar la infección por esta especie.

### **3.2 Malaria.**

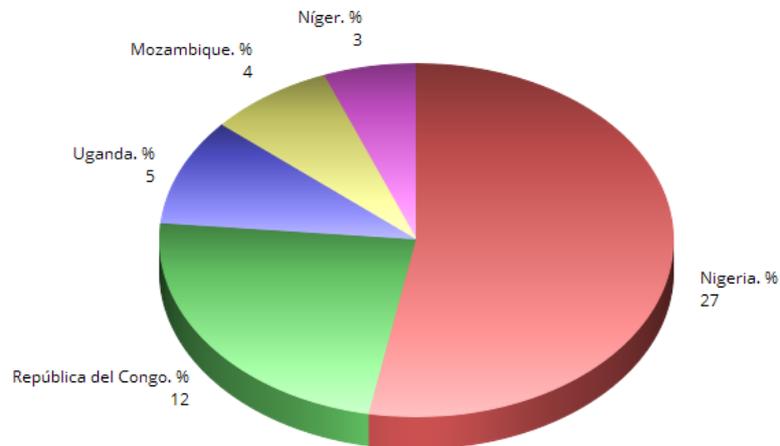
La malaria o paludismo es una infección parasitaria transmitida vectorialmente que ha afectado durante cientos de años la vida humana alrededor del mundo, siendo reconocida como una de las patologías infecciosas que más comprometen la salud y la vida de quienes la padecen.<sup>31</sup> El control y manejo de esta infección se basa en acciones de cotidianidad como el uso de toldillos e insecticidas para la prevención de la picadura del mosquito infectivo.<sup>33</sup>

Para el tratamiento de la enfermedad se ha demostrado la efectividad de la artemisina, la cloroquina y la primaquina, siendo estos los antipalúdicos que mejor arrojan resultados post exposición a la enfermedad y al tratamiento, reduciendo así, el número de muertes a causa de esta infección.<sup>34</sup> Pero es necesario trabajar en la investigación de la medida preventiva definitiva de esta, para reducir el número de muertes en los casos de la presentación clínica complicada, que podría aumentar en los próximos años si esta no se controla.

### **3.3 Epidemiología de la malaria.**

La malaria es considerada como una enfermedad de amplia distribución geográfica a nivel

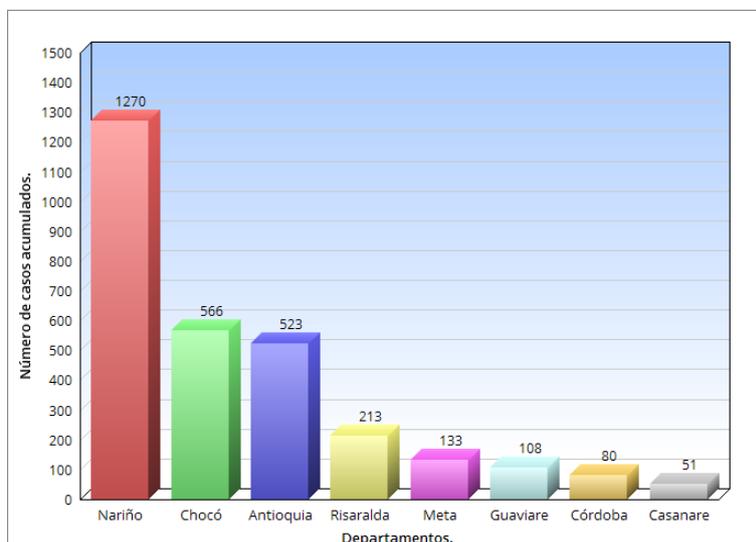
mundial en la presentación de sus casos, siendo el continente africano el más afectado con aproximadamente el 90% de los 229 millones de casos reportados en el último año<sup>1</sup>, entre los países más afectados en esta región se encuentran Nigeria y la República del Congo.



**Figura 1: Distribución de casos de malaria en África Subsahariana:** se estima que en esta región se presentaron aproximadamente 215 millones de casos según el último informe de la OMS.<sup>1</sup> Los datos analizados por esta, arrojan que Nigeria es el país africano con mayor presencia de enfermedad palúdica entre sus habitantes.

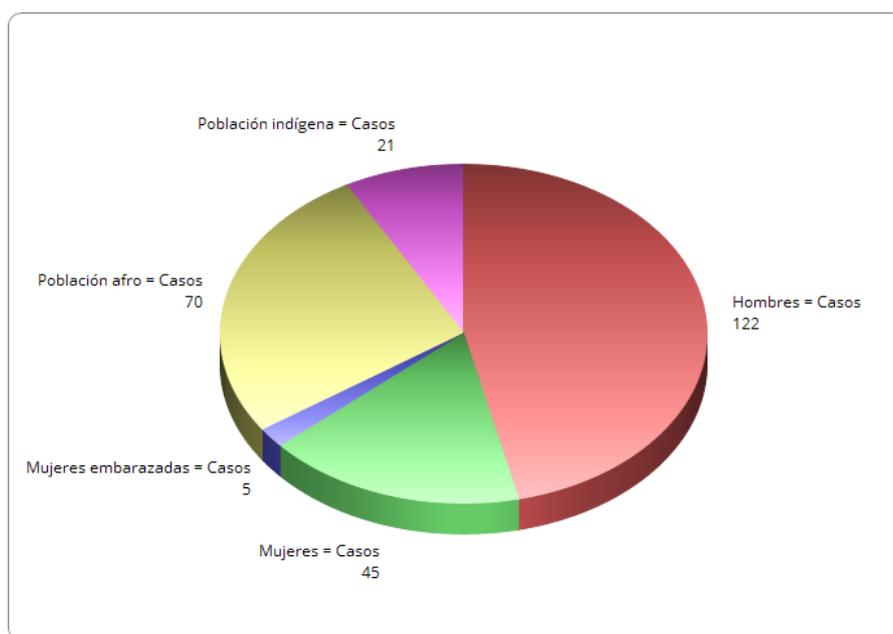
En el caso de la región de las Américas, alrededor del 86% de casos de infección por *Plasmodium sp* se centra en Colombia, Venezuela y Brasil, siendo este último el más afectado por el extenso terreno amazónico, propicio para la supervivencia de esta enfermedad.<sup>1,2</sup>

En el caso de Colombia, para la última semana epidemiológica del 2021 reportada por el Instituto Nacional de Salud, se presentaron 14.795 casos, de los cuales 299 indicaron para malaria complicada. Los departamentos del país que van al frente del brote epidemiológico son Nariño, Chocó y Antioquia presentando la mayor cantidad de casos acumulados.<sup>2</sup>



**Figura 2: Casos acumulados en Colombia en la tercera semana epidemiológica del 2021 INS.** Se evidencian los departamentos en donde más se presentan casos acumulados de malaria, liderados por Nariño, Chocó y Antioquia.

Debido a la contingencia nacional a causa de la pandemia por el Covid-19, es importante asociar los casos de malaria que se complican a causa de este patógeno. El número de casos de coinfección de estas para la tercera semana epidemiológica del 2021 es de 167 casos, de los cuales 9 han sido complicados. En este caso, la malaria por *P. vivax* prevalece ya que se presentaron 87 casos, mientras que la causada por *P. falciparum* afectó a 77 personas.



**Figura 3: Número de casos de malaria coinfección con Sars-Cov2 tercera semana epidemiológica.** Los porcentajes fueron basados en el total de casos (167). Hombres: 73.1%, Mujeres: 26.9%, Mujeres embarazadas: 2.9% Población afrocolombiana: 41.9% Población indígena: 12.6%.

### 3.4 Presentación clínica.

Entre los síntomas característicos e iniciales de la infección no complicada a causa de cualquiera de las especies de *Plasmodium*, se encuentran la fiebre, los escalofríos y la cefalea acompañada de vómito y diarrea.<sup>35</sup> Esta fase sintomática suele aparecer normalmente entre los 20 a 30 días de la exposición a la picadura infectiva.<sup>36</sup>

Durante los primeros días de infección, los síntomas no suelen ser específicos a la enfermedad malarica, estos inician como fiebre, sudoración, escalofríos y demás síntomas que pueden

presentarse en casos de fiebre amarilla o enfermedad de chagas, es aquí, donde el dato clave en el diagnóstico de la malaria es la declaración de confirmar haber estado en una zona endémica.<sup>34</sup> En la presentación clínica complicada se pueden encontrar datos de laboratorio como la trombocitopenia y leucopenia, esta enfermedad crónica puede desencadenar anemia, desnutrición y disposición a coinfecciones.<sup>32,35</sup>

### **3.5 Ciclo de vida y etiología.**

El ciclo de vida de los parásitos del género *Plasmodium sp*, es complejo e involucra diferentes estadios en el mosquito y el humano. En este último comienza con la inoculación de esporozoítos móviles durante la picadura del mosquito, formas invasivas que viajan por el torrente sanguíneo al hígado, donde comienza el desarrollo asexual tisular; luego de 10 a 12 días ocurre la ruptura de hepatocitos infectados, liberándose miles de merozoítos que invaden los glóbulos rojos para dar continuidad al ciclo asexual sanguíneo.<sup>19</sup> Es ahí donde *Plasmodium vivax* es especial, ya que en este momento del ciclo, es donde quedan reposados estos merozoitos pasando a ser hipnozoitos inactivos,<sup>20</sup> que suelen activarse de seis a doce meses después del tratamiento. En el ciclo eritrocitario, el parásito crece, se replica y libera merozoitos a la sangre para invadir nuevas células cada 48 horas. Estas formas sexuales en circulación son absorbidas por los mosquitos, pasando por el intestino medio llegando hasta las glándulas salivales convirtiéndose nuevamente en esporozoitos infectantes, y el ciclo se repite<sup>21,22</sup>.

El mecanismo patogénico más descrito es el de la hemólisis de los eritrocitos parasitados, a su vez la liberación de más parásitos con compuestos como la hemozoina, que es conocida como pigmento malárico.<sup>22</sup> Esta es el resultado de la toxicidad celular del grupo hemo digerido, por lo que realiza una cristalización de este ya que lo necesita para sobrevivir, es por esto que las condiciones como la anemia son incompatibles con la supervivencia de *Plasmodium sp*.

Como *Plasmodium vivax* en su estadio merozoito tiene afinidad por las células eritroides inmaduras, esta característica es importante ya que puede tener una influencia en la patología y además necesitar requerimientos metabólicos distintos para la invasión intracelular, como una concentración más alta de carbono intracelular.<sup>29</sup> Es importante tener en cuenta los casos en los que se adquiere una resistencia a la infección por *Plasmodium vivax*, como es el caso de las personas que no poseen el antígeno Duffy en la superficie de los reticulocitos, el cual es un receptor que pertenece a la proteína G, que es necesario para que *P. vivax* establezca la infección a través de la unión con las quimiocinas.<sup>25</sup> Es por esto que en el África, en donde la presencia de personas negativas para el antígeno del grupo sanguíneo Duffy son mayoría, hay

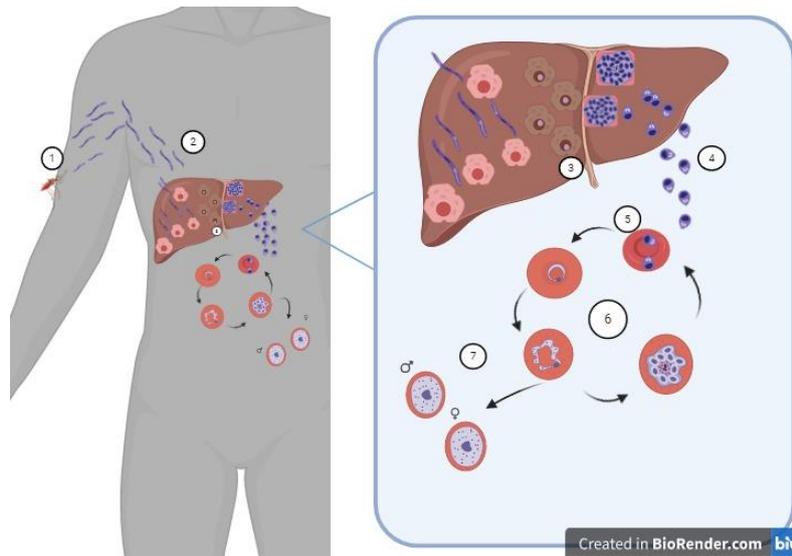
una baja prevalencia en la infección malárica por *Plasmodium vivax* a pesar de que sea uno de los continentes más afectados por este tipo de infección parasitaria<sup>26</sup>.

Otro de los genes de unión a las células diana, en especial a los reticulocitos utilizado por *Plasmodium vivax*, son los genes de unión a los reticulocitos (receptor de antígeno Duffy para quimiocinas) *PvDBP*<sup>28</sup>, que han sido identificados también en otras especies como *Plasmodium falciparum*. Se ha demostrado que estas proteínas se transcriben en el estadio esquizonte y se forman en la punta apical del merozoito para así interactuar en la invasión a reticulocitos.,

Entre las proteínas de unión pertenecientes al grupo de proteínas con dominio TSR de los esporozoitos, se encuentran TRAP, SC y SPECT2,<sup>41</sup> de las que se documenta su potencial para generar una respuesta inmune, para el movimiento y la interacción celular. Es importante comprender la interacción de estas ya que SPATR también ha sido mencionada entre las pertenecientes a este grupo.

Las proteínas de unión a los reticulocitos que expresan los merozoitos de *Plasmodium vivax* se encuentran catalogadas como la familia de las *PvRBP*, en donde se reconoce que a mayoría de ellas se expresa en la parte apical del merozoito, lo que le facilita su unión a la superficie del reticulocito. la más descrita de las pertenecientes a esta familia es la *PvRBP1*, la cual se ha caracterizado por presentar una unión exclusiva a este célula eritroide.

Para comprender el proceso de invasión eritroide de *Plasmodium vivax* es importante tener en cuenta que décadas de estudio han permitido establecer el receptor celular más importante en la interacción huésped-parásito de *Plasmodium vivax*, el cual es conocido como DARC (Receptor antígeno Duffy) que reconoce la proteína de unión de *PvDBP* de *Plasmodium vivax*. El bloqueo de este receptor ha sido uno de los candidatos más fuertes a vacuna preventiva de la malaria, con la dificultad de que también se encuentra presente en normocitos, lo que disminuiría su especificad.<sup>42</sup>

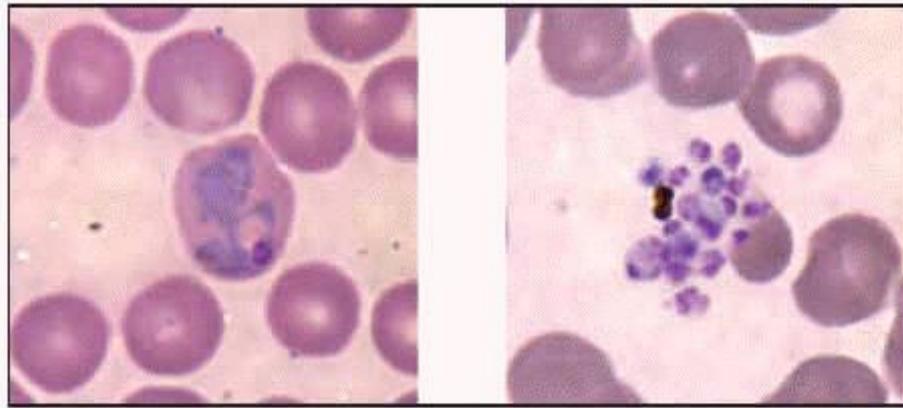


**Figura 4: Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*.** El mosquito inocula los esporozoitos (1) y estos migran por el torrente sanguíneo hasta llegar a los hepatocitos (2) donde se forman esquizontes hepáticos y además se generan las formas latentes o hipnozoitos (3). Los esquizontes hepáticos liberan la segunda forma del parásito (merozoitos) (4) los cuales invaden a los eritrocitos (5) y se multiplican en ellos pasando por distintas etapas de maduración: anillo, trofozoito y esquizonte (6) algunos de los merozoitos que invaden a glóbulos rojos se diferencian a gametocitos (7), para que posterior a una picadura de un mosquito *Anopheles*, se vuelva a repetir el ciclo.

**Fuente:** Creación Propia. Abril J.S. 2020

### 3.6 *Plasmodium vivax*.

De las especies de *Plasmodium* causantes de malaria, *Plasmodium vivax* está catalogada como la segunda más importante respecto a los casos confirmados de malaria complicada en el mundo,<sup>37</sup> además de predominar en la región de las Américas, siendo el causante del 75% de los casos totales reportados.<sup>45</sup> Es una especie particular ya que es conocida por causar parasitemias muy bajas, significando las infecciones asintomáticas, lo que supondría que los casos confirmados mundialmente estarían afectados por la falta de reportes de casos clínicos.<sup>38</sup> La malaria causada por *Plasmodium vivax* es conocida como la malaria terciaria, esto debido a su ciclo febril que aparece aproximadamente cada 48 horas, lo cual es un síntoma característico de esta infección.



**Figura 5: Estadios visibles en *P. vivax*.** Se observa el trofozoito ameboide (izquierda) y el estadio merozoito haciendo ruptura y liberación de merozoitos (derecha), mediante la coloración de Wright<sup>43</sup>

Entre las características biológicas más importantes de *Plasmodium vivax* se encuentran dos. La primera es su tropismo por la invasión de células eritroides inmaduras o reticulocitos, es por esto que puede explicarse la baja parasitemia en personas infectadas, debido a que estas células no abundan en gran cantidad en sangre periférica. La ruptura de estas células eritroides jóvenes parasitadas desencadenan cuadros clínicos como la anemia secundaria a la infección palúdica por *P. vivax*. La segunda característica es la formación de fases latentes hepáticas o hipnozoitos, producto de la maduración de los esporozoitos, estos son causantes de las recaídas en personas que han superado la infección con el tratamiento.<sup>44</sup>

Esta especie es un gran reto para la erradicación de la malaria, debido a que los medicamentos para tratarla que son capaces de evitar las recaídas por presencia de hipnozoitos (primaquina y tafenoquina) no son aptos para mujeres embarazadas, niños o personas con deficiencia de Glucosa-6-fosfato.<sup>39</sup>

### **3.7 Proceso de invasión a los reticulocitos.**

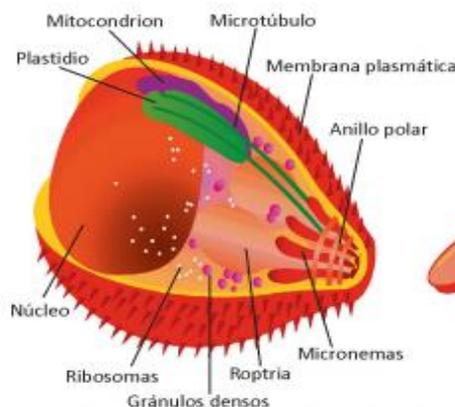
En el proceso de invasión a los reticulocitos juega un papel importante una familia de proteínas invasivas, las RBP (Proteínas de unión a reticulocitos), además requiere una glicoproteína presente en las células a invadir pertenecientes al grupo sanguíneo Duffy. El proceso de infección y remodelación de los reticulocitos infectados por *Plasmodium vivax* dura aproximadamente 24 horas desde su contacto.<sup>29</sup>

*Plasmodium vivax* es la única de las especies que está estrechamente relacionada con la invasión a los reticulocitos, la baja concentración de estas células circulantes (1-2% aproximadamente) hace que los merozoitos libres deban reconocer con precisión estas células.

Los actores principales en el proceso de invasión eritrocitaria son aquellos que provienen de los merozoitos, estos se reconocen como roptrias, micronemas y orgánulos especializados. Los ligandos encargados de este proceso de invasión se secretan de los organelos ya mencionados anteriormente y son encargados de formar uniones estrechas en el proceso de ligación.<sup>3</sup>

A pesar de la poca información de este proceso invasivo, esto debido a múltiples factores como la incapacidad de obtener un cultivo *in vitro* continuo de este tipo de células, se reconocen don proteínas que juegan un papel importante en el proceso de invasión, la proteína AMA1 presente en la superficie del merozoito y la proteína RON4 presente en las roptrias que se fijan a la célula huésped en el proceso.<sup>3</sup>

Después de su entrada, este merozoito crece y se replica dentro de estas células, generando así entre 15 a 30 merozoitos que se rompen fuera de la célula roja infectada para continuar el proceso en otras células a su alrededor. Culminado este ciclo, da como resultado la aparición de sintomatología clínica en quienes padecen la infección.<sup>28,42</sup>



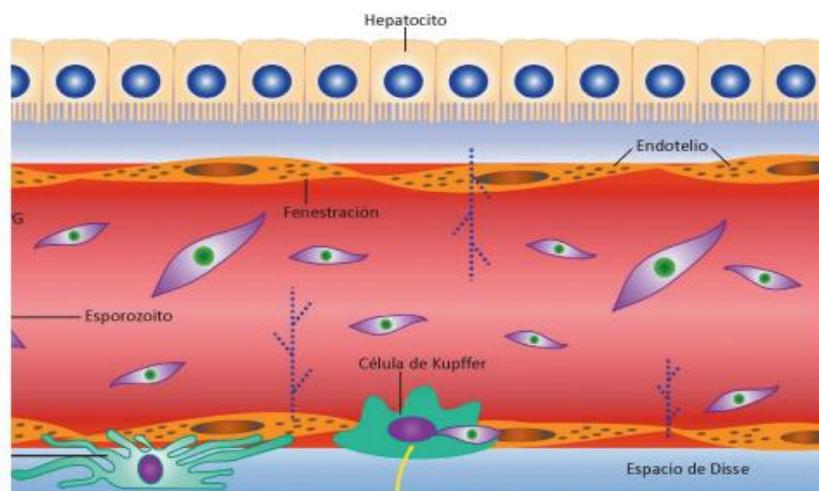
**Figura 6. Estructura y conformación del merozoito de *P. vivax*.** A la estructura encargada de la invasión eritrocitaria se le identifica partes como la roptria, los micronemas y los gránulos densos.<sup>51</sup>

### 3.8 Proceso de invasión a los hepatocitos.

Para que los esporozoitos logren llegar a los hepatocitos después de ser inoculados por los mosquitos *Anopheles*, deben iniciar su camino desde la piel deslizándose por las células presentes en esta y atravesándolas para entrar en circulación sanguínea. Estos migran hasta llegar a los hepatocitos a través de células de Kupffer o células endoteliales que permiten la entrada de los esporozoitos a las células del hígado.<sup>52</sup>

Ingresado al hepatocito, el esporozoito en un periodo de 10 a 12 días genera una membrana o vacuola parasitófora y logra hacer el proceso de diferenciación a esquizonte. Este proceso involucra miles de divisiones mitóticas que dan lugar a miles de merozoitos empacados en merozomas que salen a circulación libre al torrente sanguíneo. Es en este proceso de diferenciación, en donde se forma el estadio latente o hipnozoito que tras su activación, liberan merozoitos en el sistema vascular provocando una recaída post tratamiento.<sup>53</sup>

El parásito desde que está presente en las glándulas salivales expresa proteínas que utilizará como ligandos a la unión de su célula diana, en este caso para los hepatocitos, expresa las proteínas PvCSP y PvTRAP. Se conoce que hay un tropismo marcado por entre el esporozoito y el hepatocito que está cubierto por proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), los cuales están presentes en la matriz extracelular de los hepatocitos de manera abundante y que estos a su vez, tienen interacción con la proteína SCP, que también reconoce los HSPGs de las células de Kupffer. Lo que sugiere que este tipo de células presenta actividad fagocítica actuando como un transportador de los esporozoitos.<sup>51</sup>



**Figura 7: Intervención de los HSPGs presentes en la superficie de las células de Kupffer.** Estos intervienen en el proceso de migración de los esporozoitos por medio de extravasación celular por donde el parásito atraviesa el parénquima de la célula hepática.<sup>51</sup>

#### 4. Diseño metodológico.

##### 4.1 Objetivo general.

Evaluar la actividad de unión de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* a los hepatocitos y reticulocitos humanos.

## **4.2 Objetivos específicos.**

- Obtención y purificación de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* en un sistema de expresión heterólogo.
- Evaluar la actividad de unión específica de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* a hepatocitos y reticulocitos

## **4.3 Tipo de investigación.**

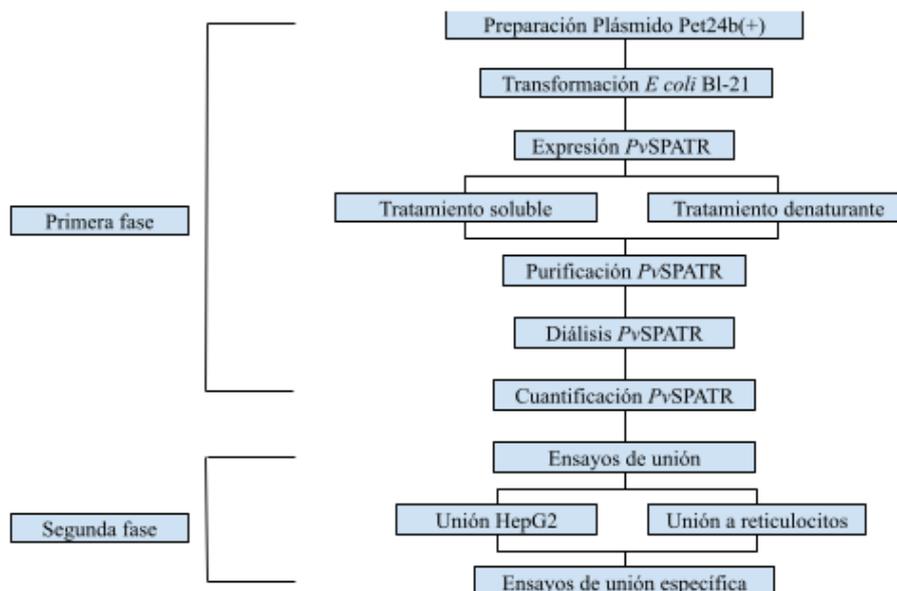
Investigación explicativa, cuasi experimental, ya que esperamos describir una interacción parásito-celular no descrita anteriormente.

## **4.4 Enfoque del estudio.**

Este estudio tendrá un enfoque cuantitativo.

## **4.5 Materiales y métodos.**

Para desarrollar cada uno de los objetivos, el proyecto fue dividido en dos fases de trabajo experimental; la primera fase consistió en la producción y purificación de la proteína PvSPATR en un sistema de expresión heterólogo y purificación por cromatografía de afinidad. La segunda fase consistió en realizar ensayos de unión para determinar si la proteína interactuaba con la superficie de células hepáticas y reticulocitos humanos.

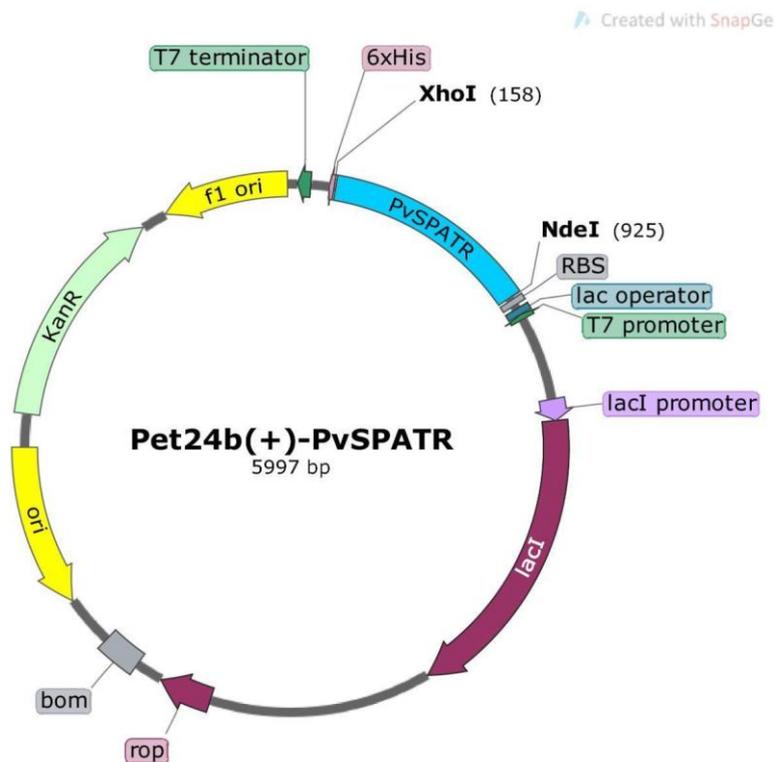


**Figura 8:** Metodología y actividades paso a paso que se realizaron para el cumplimiento de los objetivos.

#### 4.5.1 Preparación del vector Pet24-PvSPATR.

Para la expresión de la proteína PvSPATR en un sistema de expresión heterólogo se utilizó el plásmido denominado Pet24-PvSPATR. Este plásmido fue construido por la empresa GenScript y la secuencia de nucleótidos que codifica para el gen *pvspatr* (sin la secuencia que codifica el péptido señal) fue optimizada para expresión en *Escherichia coli*. El gen fue clonado en marco con una secuencia que codifica para una etiqueta de seis histidinas que se expresará hacia el extremo amino-terminal (Figura 9). Este plásmido contiene además un casete de resistencia a kanamicina y el promotor T7.

El plásmido fue disuelto en 20µl de agua libre de RNAsas/DNAsas y se disolvió completamente a 42°C durante 10 minutos.



**Figura 9: Plásmido utilizado para la transformación bacteriana de células *E. coli* BL21-DE3.** Vector pet24b(+) con el gen que codifica para la proteína PvSPATR y el gen de resistencia a la kanamicina, junto con el promotor T7 y la cola de 6 histidinas para el extremo N-terminal de la proteína.

#### 4.5.2 Transformación bacteriana.

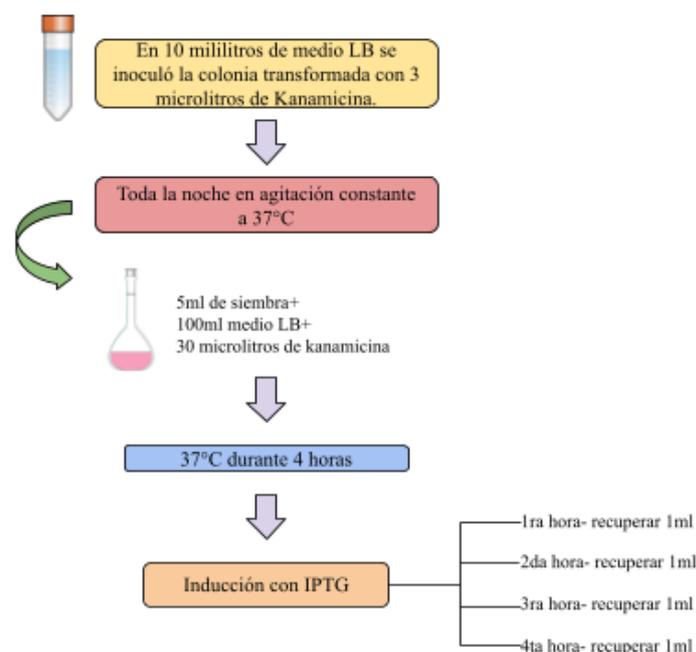
Para obtener bacterias recombinantes, se mezclaron 100µl de células *E. coli* (BL21-DE3) con 100µl de KCM y 4µl del vector. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4°C y luego se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos en baño serológico, y posteriormente se dejó a 4°C durante 5 minutos. Seguido se adicionaron 250µl de medio SOC (D-glucosa 360 mM, Cloruro de Potasio 2,5 mM, Cloruro de Magnesio 10 mM, Triptona 200 mM y Extracto de levadura 500 mM) y se incubaron durante 90 minutos a 37°C en agitación constante. Completado el tiempo de incubación, se sembró por método de plaqueo en agar LB (Cloruro de sodio 85mM, extracto de levadura 500mM, peptona de caseína 100 mM) con 30µg/mL de kanamicina. Esta siembra de plaqueo se dejó crecer durante 24 horas a 37°C.

#### 4.5.3 Expresión de la proteína PvSPATR.

A partir de las colonias que crecieron en el agar LB con kanamicina, se seleccionaron dos colonias denominadas pet24-PvSPATR-16 y pet24-PvSPATR-17 para inocular

independientemente en 10 mililitros de medio LB (Cloruro de sodio 85mM, extracto de levadura 500 mM, peptona de caseína 100 mM) suplementado con kanamicina e incubado a 37°C y en agitación constante durante toda la noche.

Al día siguiente, se utilizaron 5 ml de cultivo para escalar a 100 mililitros en medio LB estéril suplementado con kanamicina. Esta nueva siembra se dejó en agitación constante a 37°C durante cuatro horas hasta alcanzar fase logarítmica de crecimiento bacteriano. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota y se marcó como cultivo no inducido, posteriormente se indujo la expresión de la proteína con la adición de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM y se tomaron alícuotas cada hora durante cuatro horas para monitorear la expresión de PvSPATR post-inducción.

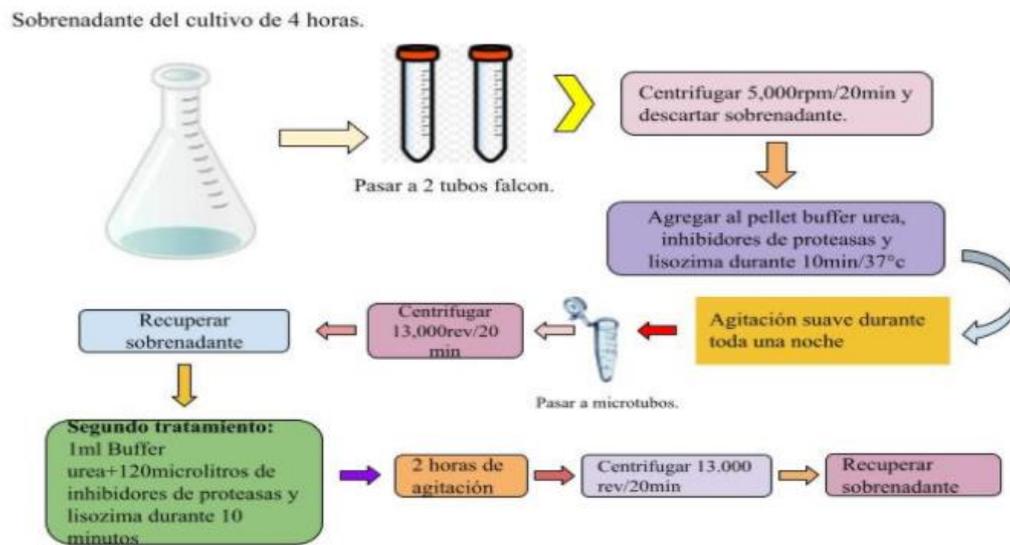


**Figura 10: Proceso de expresión de la proteína recombinante PvSPATR.** Para la producción de la proteína recombinante PvSPATR se realizó el proceso de expresión en medio LB con kanamicina. Pasada la noche se realizó la escala a 100 mL de medio LB estéril y se indujo con IPTG; durante las 4 horas posteriores a la inducción se recogió 1 mL para monitorear y escoger la mejor horas de expresión de la proteína por parte de las células *E. coli* transformadas. Todos los procesos de incubación a 37°C se manejaron en agitación constante y con la boquilla de las fiolas ligeramente descubiertas para permitir el flujo de oxígeno necesario para el crecimiento bacteriano.

#### 4.5.4 Tratamiento de la proteína recombinante.

El cultivo post inducción de tres horas, se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos, el pellet bacteriano fue dividido en dos partes. El primero fue tratado con buffer urea (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM,

Tris 10mM, Urea 6M, Imidazol 25mM) inhibidores de proteasas y lisozima 100mM y se incubó durante 10 minutos a 37°C, luego de esto se conservó en agitación constante durante toda la noche a 4°C. El segundo pellet fue tratado con buffer A que contiene Tris 50mM, NaCl 300mM e Imidazol 25mM. Pasada la noche, se centrifugó y recuperó el sobrenadante para tratar de nuevo pellet resultante de la misma manera.



**Figura 11: Tratamiento denaturante PvSPATR recombinante.** Este se realizó con buffer urea y su proceso tardó alrededor de dos días para el primer tratamiento, para el segundo tratamiento tardó aproximadamente 4 horas después de agregar el buffer con inhibidoras de proteasas y lisozima. Los pellet tratados se deshicieron con vórtex para ayudar a romper la membrana de las células *E. coli* junto con la lisozima; los tiempos de agitación fueron a velocidad media en el helicóptero de agitación y se manejó una temperatura. Los sobrenadantes obtenidos fueron congelados para posteriormente ser corridos en geles de poliacrilamida 12%, ya que en estos se encontraba la proteína tratada.

#### 4.5.5 Purificación de PvSPATR por cromatografía de afinidad.

Para el lavado de la resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) se utilizó buffer urea, se mezcló y se centrifugó 4.000rev/5 minutos, el procedimiento se realizó seis veces hasta igualar el pH de la resina de níquel al del buffer urea. A la resina limpia y equilibrada se le agregó los sobrenadantes que contienen la proteína y se dejó en agitación suave y 4°C durante toda la noche.

Para la purificación, se pasó la mezcla de resina y proteína por medio de la columna para asegurar la retención de la proteína PvSPATR en la resina, este paso se repitió diez veces, el lavado de los restos de no interés se realizó con buffer urea 6M.

Se bajó la molaridad de la urea de 6M a 1M empezando de mayor a menor concentración de buffer, posterior a esto se le agregó diferentes gradientes de Imidazol (50mM, 80mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM y 500mM) para la liberación de la proteína de la resina de níquel, estos diferentes gradientes se recogieron y almacenaron en 4°C, para posteriormente ser corridos en un gel de poliacrilamida.

#### **4.5.6 Diálisis de PvSPATR.**

La diálisis de la proteína recombinante se realizó con un Amicón de 30kDa previamente lavado con agua destilada filtrada y agua libre RNAsas/DNAsas, estos lavados se realizaron 3 veces a 5,000g durante 20 minutos a 15°C.

Las muestras concentradas fueron centrifugadas entre dos y cinco minutos a 1.000 g, se utilizaron 15 ml de PBS 1X filtrado + Glicerol para el lavado en el filtro del amicón. Los eluidos fueron recogidos en microtubos al igual que la proteína dializada retenida en el filtro, para posteriormente ser conservadas a 4°C.

#### **4.5.7 SDS-PAGE:**

La proteína recombinante PvSPATR se separó mediante un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 12% preparado con agua destilada, Tris HCl 1.5 M, SDS al 10%, acrilamida/bis al 30%, APS al 10% y TEMED.

La proteína PvSPATR fue tratada con buffer Laemmli (Tris HCl 60 mM, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 5% y Beta-mercaptoetanol al 5%), este tratamiento fue complementado suspendiéndolo 5 minutos en agua a punto de ebullición. Posteriormente, la proteína tratada fue corrida en una cámara de electroforesis con un voltaje de 80v en la fase de concentración y de 120V en la fase de separación con buffer de corrido.

#### **4.5.8 Western blot.**

Para la transferencia se utilizó una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada durante 10 minutos con metanol absoluto. El montaje de la transferencia de la proteína PvSPATR se realizó de la siguiente manera: tres cortes de papel Whatman, la membrana activada de PVDF, gel de corrido de poliacrilamida y nuevamente tres

cortes de papel Whatman humedecidos con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina y metanol 20%) La transferencia en la cámara se corrió durante 4 horas a 10v.

El lavado se realizó con PBS-Tween (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM y Tween 0.5%) durante cinco minutos repitiendo tres veces este proceso y la solución bloqueo de sitios libres se realizó con PBS-Tween y leche descremada al 5%, utilizándose durante una hora. Se utilizó el anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa (1:4500) durante una hora y se lavó tres veces con con PBS-Tween para posteriormente revelar la membrana con el reactivo de peroxidasa de la casa Vector Laboratories ®.

#### **4.5.9 Tinción con Azul de Coomasie.**

Posterior al corrido en SDS-PAGE, los geles de poliacrilamida en concentración del 12% fueron teñidos en azul de Coomassie (Metanol 15mL, ácido acético 3mL, agua desionizada 12mL y Coomassie 0.015g a 0.05%) durante 20 minutos.

El proceso de desteñido se realizó con solución decolorante compuesta de 5mL de ácido acético y 15mL de metanol durante una hora hasta visualizar estas para un posterior secado del gel al vacío y vapor.

#### **4.5.10 Dot Blot.**

Para evidenciar la presencia de la proteína *PvSPATR* se realizó el dot blot de la siguiente manera. Se utilizó membrana de nitrocelulosa, al cual se le sembraron 10µl de las muestras y se incubó durante 15 minutos en cámara húmeda a 37°C. El bloqueo de la membrana se realizó con PBS-Tween y leche descremada durante una hora en agitación constante. Los tres lavados se realizaron con PBS-Tween. Posteriormente se le agregaron las anti-histidinas que tienen como función unirse a la cola de seis histidinas de la región N-terminal de la proteína *PvSPATR*. Para la revelación de la membrana se utilizó el kit de Peroxidasa de la casa Laboratorios vector.

#### **4.5.11 Cuantificación de *PvSPATR***

La cuantificación de la proteína *PvSPATR* se realizó utilizando el reactivo de Bradford. Brevemente, se hizo una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) utilizando como blanco buffer PBS. El rango de la curva estuvo entre 0 ug/mL hasta 25µg/mL y cada concentración fue montada por duplicado. Se sembraron distintas cantidades de la proteína

*PvSPATR* y se adicionaron 150µl de reactivo de Bradford a cada pozo y incubó durante 15 minutos. La coloración de cada pozo fue leída a 520nm en un lector de microplacas.

#### **4.5.12 Citometría de flujo con células HepG2**

El proceso de preparación celular para los ensayos de unión fue el siguiente:  $2 \times 10^6$  células HepG2 fueron incubadas con diferentes cantidades de la proteína recombinante *PvSPATR* (25µg y 50µg) durante 4 horas a 37°C. Luego del periodo de incubación, la proteína no unida fue separada mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron con 200µl de 0,5% de BSA en PBS. Posteriormente, se adicionaron 5µl de anticuerpo anti-histidinas acopladas a APC y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido fue retirado mediante centrifugación. Finalmente, las células fueron diluidas en un volumen final de un mililitro y se adicionaron 5µl de yoduro de propidio (viabilidad celular). Las células fueron pasadas por el citómetro FACS Canto II. Se leyeron cerca de 30.000 eventos. Como controles se utilizaron células HepG2 incubadas solo con el anticuerpo anti-histidinas acopladas a APC. Para estos ensayos se utilizaron cuatro lotes de proteínas diferentes.

#### **4.5.13 Radiomarcaje de *PvSPATR* recombinante.**

La radiomarcación de la proteína recombinante se realizó utilizando  $I^{125}$  radioactivo, y perlas de yodación (Iodobeads). Para la marcación se incubaron de 4µl de  $I^{125}$  junto con dos perlas y 90µl de HBS, seguido este tiempo, se le agregó a la mezcla 15µg de la proteína *PvSPATR* recombinante y nuevamente se dejó en incubación a temperatura ambiente durante doce minutos. La proteína *PvSPATR* radiomarcada se purificó mediante cromatografía por exclusión de tamaño utilizando una columna de Sephadex® G-10. Las fracciones recogidas se leyeron en un contador gamma, y aquellas eluciones que emitía señal fueron seleccionadas para el ensayo de unión.

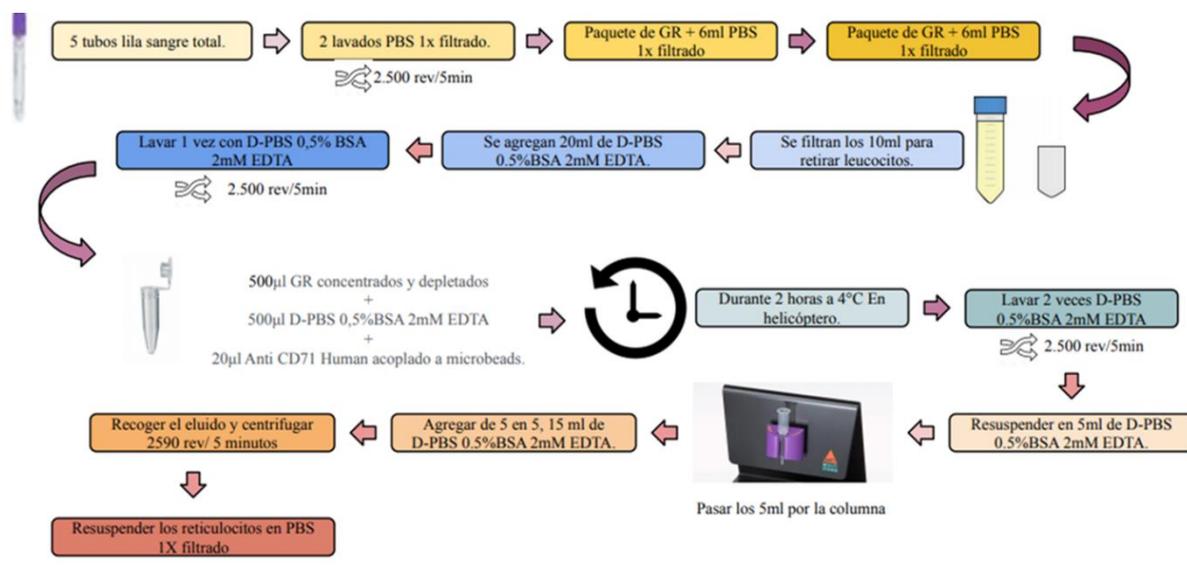
#### **4.5.14 Ensayo de unión con *PvSPATR* radiomarcada a células HepG2.**

Para evaluar la unión específica de la proteína *PvSPATR* a las células HepG2 se incubaron durante dos horas dos millones de células HepG2 con diferentes concentraciones de proteína recombinante radiomarcada en presencia o ausencia de proteína no marcada, en un volumen final de reacción de 120µl con HBS.

Pasadas las dos horas, la mezcla fue depositada en puntas selladas con dibutil-dioctilftalato (relación 4:6) y se centrifugaron durante siete minutos a 7.000 rpm. Seguido de esto, las puntas fueron cortadas y se depositó solo el pellet en tubos para contador gamma y se midió la radioactividad de la proteína marcada.

#### 4.5.15 Obtención y purificación de reticulocitos.

Se obtuvo por punción venosa 5 mililitros de sangre total para realizar la obtención y purificación de reticulocitos. La sangre total fue lavada dos veces con PBS 1x filtrado y se eliminó el sobrenadante. Cuatro mililitros de paquete de glóbulos rojos fueron disueltos en 6mL de D-PBS 0,5% BSA 2mM EDTA. Para eliminar los glóbulos blancos, los 10mL de suspensión fueron filtrados a través de un filtro PureCell™. Los glóbulos rojos depletados se lavaron con D-PBS 0,5% BSA 2mM EDTA. Posteriormente se tomaron 500µL de glóbulos rojos concentrados depletados y se mezclaron con 50 µL D-PBS y 10µL de anticuerpo anti-CD71 humano acoplado a microperlas. Esta mezcla se dejó en agitación constante durante 2 horas a 4°C. La suspensión fue centrifugada a 2500 rpm durante 5min y se resuspendió en un volumen final de 5ml de D-PBS. Los reticulocitos presentes en la muestra fueron purificados utilizando una columna LS. Esta columna junto a un imán retiene el anticuerpo anti-CD71 acoplados a las microperlas. Diferentes lavados con D-PBS fueron necesarios para eliminar los eritrocitos maduros. Después de varios lavados, el imán fue retirado y los reticulocitos fueron recuperados en un tubo eppendorf.



**Figura 12: Proceso de obtención y purificación de reticulocitos.** El largo proceso para la obtención de los reticulocitos, se realizó en un solo día debido a la rápida maduración de estas células sanguíneas, al momento de la obtención se dejaron en incubación con la proteína *PvSPATR* para realizar la citometría de flujo al día siguiente. Los procesos de centrifugación fueron realizados de la manera más cuidadosa posible para evitar la hemólisis de las células. Al final del procedimiento las columnas de purificación fueron lavadas con agua desionizada y metanol absoluto.

#### **4.5.16. Citometría de flujo con reticulocitos.**

El proceso de preparación celular para los ensayos de unión fue el siguiente: los reticulocitos humanos fueron incubados durante toda la noche a 4°C en agitación constante con diferentes cantidades de la proteína recombinante *PvSPATR* ( 25µg y 50µg). Al día siguiente para el ensayo de unión y con el fin de eliminar la proteína no unida, se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos y se lavó 2 veces con 200µL de PBS-BSA 0.5%. Posteriormente se adicionaron 5µl de anticuerpos anti CD-71-APC-H7 y 5µl de anti his-APC y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos fueron retirados mediante centrifugación. Finalmente, los reticulocitos fueron diluidos en un volumen final de un mililitro y se adicionaron 5µl de calceína (viabilidad celular).

Las células fueron pasadas por el citómetro FACS Canto II. Se leyeron cerca de 10.000 eventos. Como controles se utilizaron reticulocitos purificados incubados sólo con el anticuerpo anti-CD71-APC-H7. Para estos ensayos se utilizaron cuatro lotes de proteínas diferentes.

## **5. Resultados.**

### **5.1 Obtención de células de *E. coli* transformadas con el vector *Pet24-PvSPATR*.**

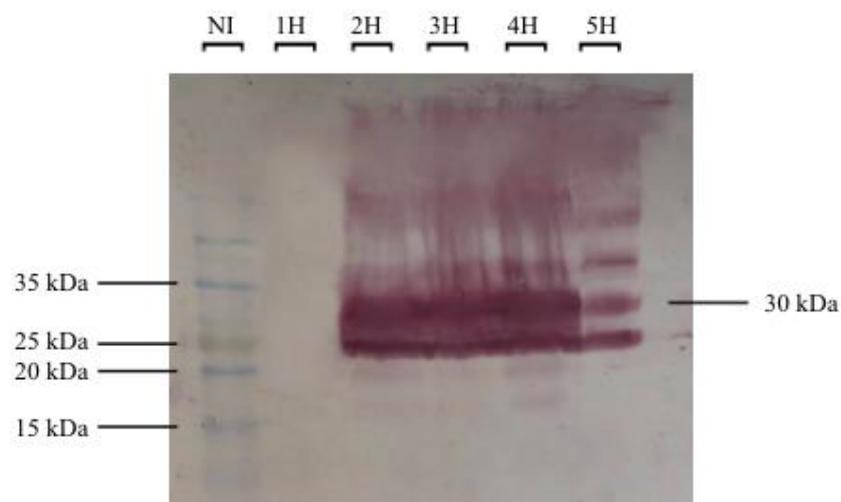
Al utilizar el plásmido ***Pet24-PvSPATR*** para transformar bacterias *E. coli* BL21-DE3, se observó crecimiento bacteriano con colonias pequeñas y puntiformes sobre cajas de agar LB con kanamicina (Figura 13). Se seleccionaron cinco colonias, que fueron sembradas en agar LB para posteriormente conservar los clones a -70°C.



**Figura 13: Colonias recombinantes de la proteína PvSPATR en agar Luria Bertani.** Se observan colonias medianas, viscosas y blancas al reverso de la caja de Petri.

## 5.2 Expresión de la proteína PvSPATR

Una expresión piloto a baja escala fue realizada con uno de los clones recombinantes de PvSPATR. Se monitorizó la expresión de la proteína recombinante antes (no inducido) y después de inducción (horas 1-2-3 y 4). Como se observa en la figura 14, desde la primera hora post-inducción se observó una gran cantidad de proteína recombinante del peso molecular esperado (30 kDa). Sin embargo, una disminución en la cantidad de proteína fue observada a las 4 horas post inducción, por lo que se seleccionó 3horas como el tiempo necesario para la producción de la proteína recombinante PvSPATR. A partir de estos resultados, se escaló la producción de la proteína a 100 o 200mL obteniendo resultados satisfactorios a las 3h post-inducción.

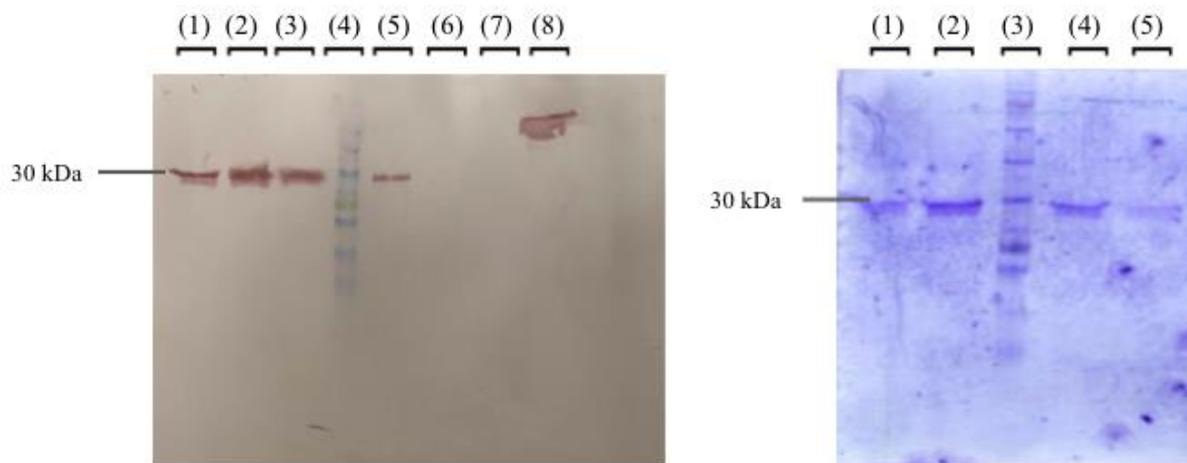


**Figura 14: Expresión de la proteína PvSPATR** El corrido de los volúmenes recogidos pre y post inducción de las células con IPTG se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% y se reveló mediante un Western blot. (1) patrón de peso molecular. (2) No inducido; (3) 1h post inducción (4) 2h post inducción (5) 3h post inducción (6) 4h post inducción.

## 5.3 Obtención de PvSPATR purificada.

Para solubilizar y extraer la proteína recombinante de las bacterias, se utilizó un buffer denaturante que contenía altas concentraciones de un agente caotrópico (urea) o un buffer de extracción soluble. Solo se consiguió la extracción de la proteína con buffer denaturante. A partir de estos resultados, la extracción de la proteína se hizo con el buffer denaturante. Para el

proceso de purificación se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad. Las fracciones eluidas con gradientes de imidazol fueron corridas y transferidas a una membrana de PVDF. Como se muestra en la figura 15, se encontró una banda de aproximadamente 30kDa en las fracciones de 50mM a 250mM que corresponde a la proteína *PvSPATR* recombinante. Para evaluar la pureza, estas fracciones fueron reveladas con azul de comassie, donde se encontró una única banda del peso molecular esperado. Las fracciones fueron unidas, dializadas y cuantificadas para los ensayos de unión.

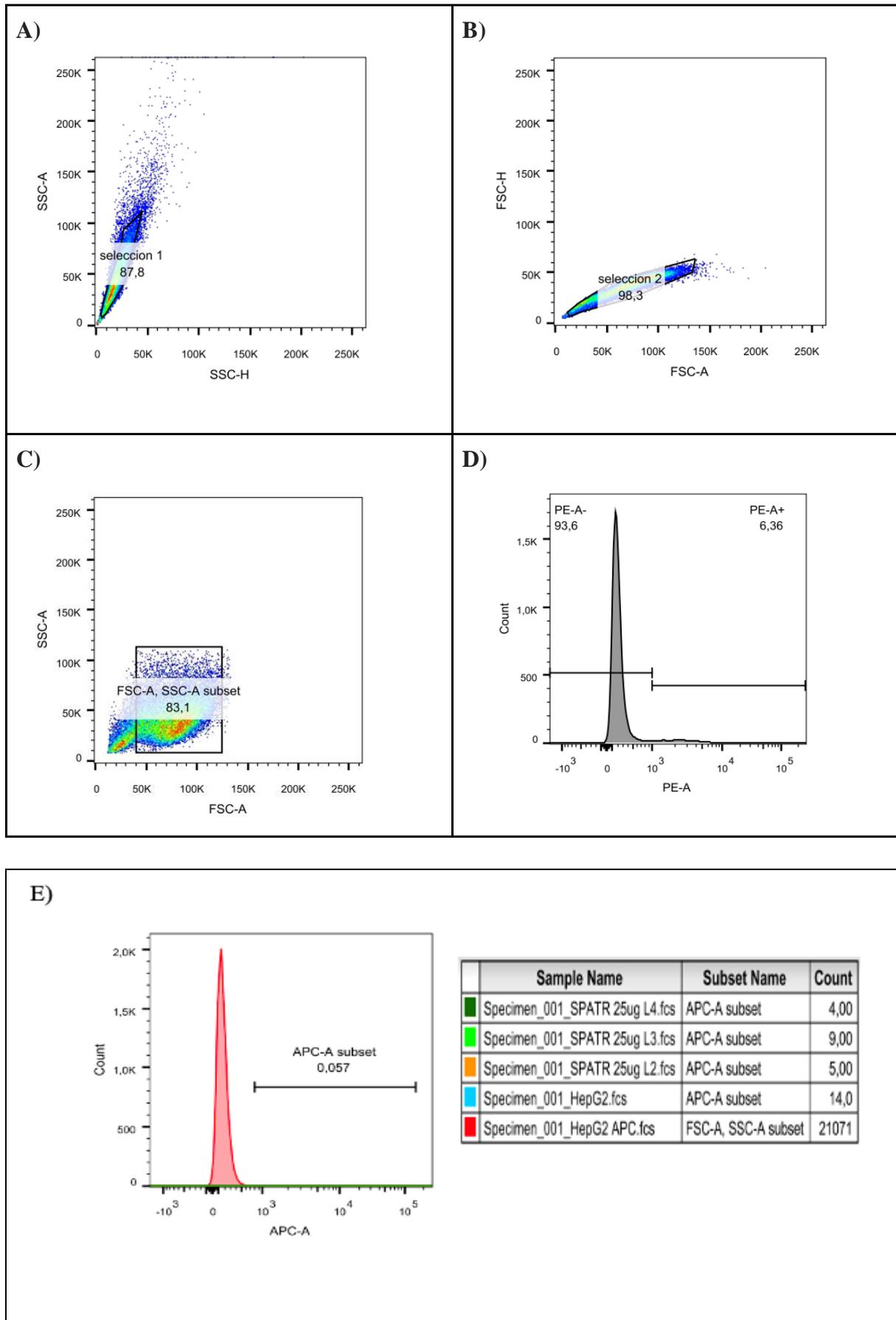


**Figura 15: Transferencia Western-blot y tinción azul de Coomassie de la purificación de la proteína *PvSPATR*.** La purificación de la proteína *PvSPATR* se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% y se reveló mediante un Western blot y una tinción de azul de Coomassie. (1)*PvSPATR* 50mM Imidazol (2) *PvSPATR* 80mM Imidazol (3) *vSPATR* 100mM Imidazol (4) Patrón de peso molecular (5) *PvSPATR* 250mM Imidazol (6) *PvSPATR* 500mM Imidazol (7) *PvSPATR* 500mM Imidazol (8) Control positivo (*PvTRAP*)

#### 5.4 Unión total de la proteína *PvSPATR* a células HepG2 por citometría de flujo.

La interacción entre la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado SPATR (*PvSPATR*) y la línea celular HepG2 se evaluó por medio de citometría de flujo. Para el análisis de esta unión se seleccionó la población mediante la discriminación de dupletas celulares tanto por complejidad (SSC-A/SSC-H) (Figura 16A) como por tamaño (FSC-H/FSC-A) (Figura 16B), y se seleccionó la población final teniendo en cuenta estas características (SSC-A/FSC-A) (Figura 16C). Sobre la población seleccionada se evaluó la viabilidad celular (Figura 16D), la cual arrojó porcentaje de viabilidad cerca del 93%. Sobre las células vivas se determinó el porcentaje de unión de la proteína recombinante *PvSPATR*. Ninguno de los lotes de proteína *PvSPATR* ensayados se unió a las células HepG2

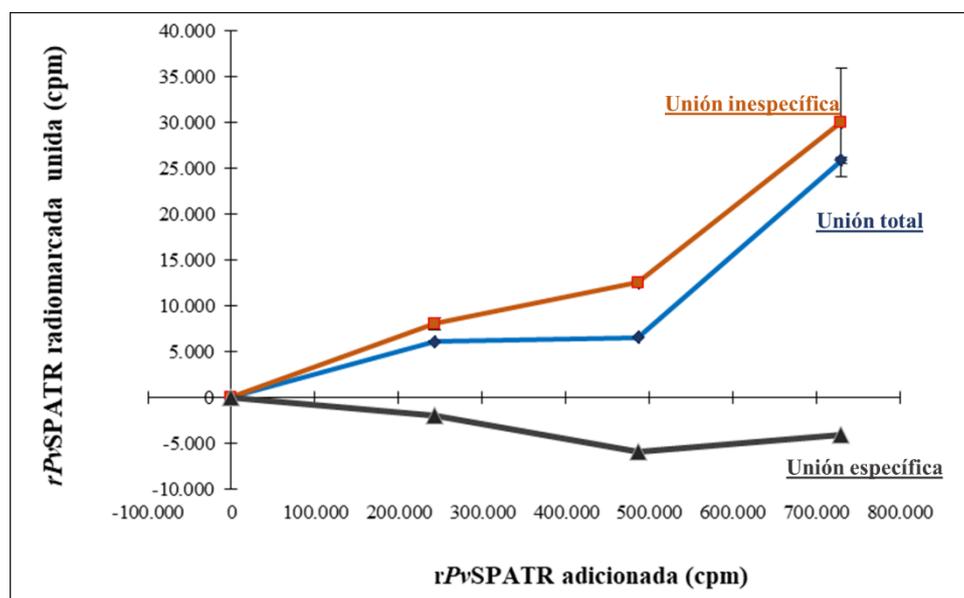
(Figura16E).



**Figura 16: Unión total de la proteína PvSPATR a células HepG2 por citometría de flujo.**  
**A)** Eliminación de dupletas de células HepG2 teniendo en cuenta el parámetro de complejidad **B)** Discriminación celular por el parámetro de tamaño celular **C)** Selección de la población a estudio teniendo en cuenta los parámetros tamaño/complejidad **D)** Porcentaje de de células vivas y células muertas de la población escogida para realizar el análisis de unión del lote 1 de la proteína PvSPATR **E)** Porcentaje de unión de los diferentes lotes de la proteína PvSPATR gracias a la detección del anticuerpo anti-histidinas acoplado a APC

### 5.5 Unión de la proteína PvSPATR radiomarcada a células HepG2.

La unión de la proteína PvSPATR fue evaluada mediante radiomarcación. Este ensayo consistió en incubar la proteína PvSPATR radiomarcada en diferentes concentraciones con células hepáticas. Esta unión fue considerada como la unión total, interpretada como la capacidad de la proteína de unirse a receptores específicos e inespecíficos. Se encontró que la proteína se une a la célula y esta unión incrementa a medida que aumenta su concentración (Figura 17). A la máxima concentración ensayada (4,68 µg/ml) la proteína presentó una unión total de 3,5%. Por otra parte, se determinó la unión inespecífica incubando la proteína radiomarcada en presencia de una alta concentración de proteína no radiomarcada. Como se observa en la figura 17, la unión inespecífica fue de alrededor del 4,0%. Al calcular la unión específica (unión total-unión inespecífica) de SPATR a hepatocitos humanos se encontró que SPATR no se une específicamente a la célula hospedera (Figura 17).



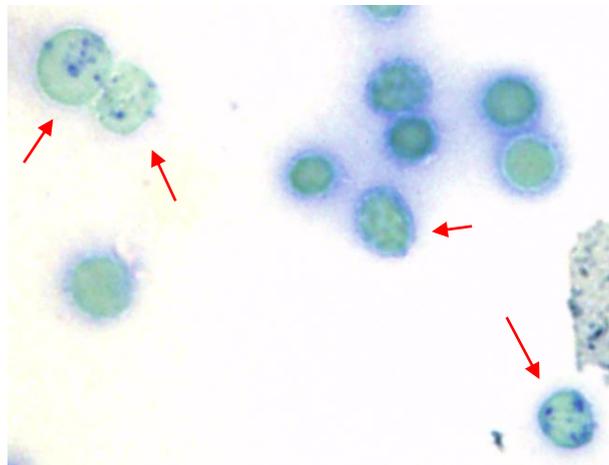
**Figura 17: Unión de la proteína PvSPATR a células HepG2 mediante radiomarcación.** La proteína PvSPATR fue radiomarcada e incubada en ausencia (unión total) o presencia

(inespecífica) de proteína *PvSPATR* no radiomarcada. A partir de los datos de la unión total e inespecífica se calculó la unión específica.

### 5.6 Obtención y purificación de reticulocitos.

Realizado el proceso de purificación de las células sanguíneas, se mezclaron 200µl de reticulocitos suspendidos en PBS con 100µl de suero fetal bovino estéril, esto para realizar el extendido en lámina con coloración supravital y poder observar las células por microscopía electrónica.

Siendo el proceso de obtención y purificación exitoso, se lograron observar reticulocitos humanos en gran cantidad mediante microscopía. Se observaron características específicas de estas células como sus gránulos de RNA característicos de su inmadurez, lo que permitió dar viabilidad al ensayo de unión de la proteína *PvSPATR* en estadio sanguíneo.

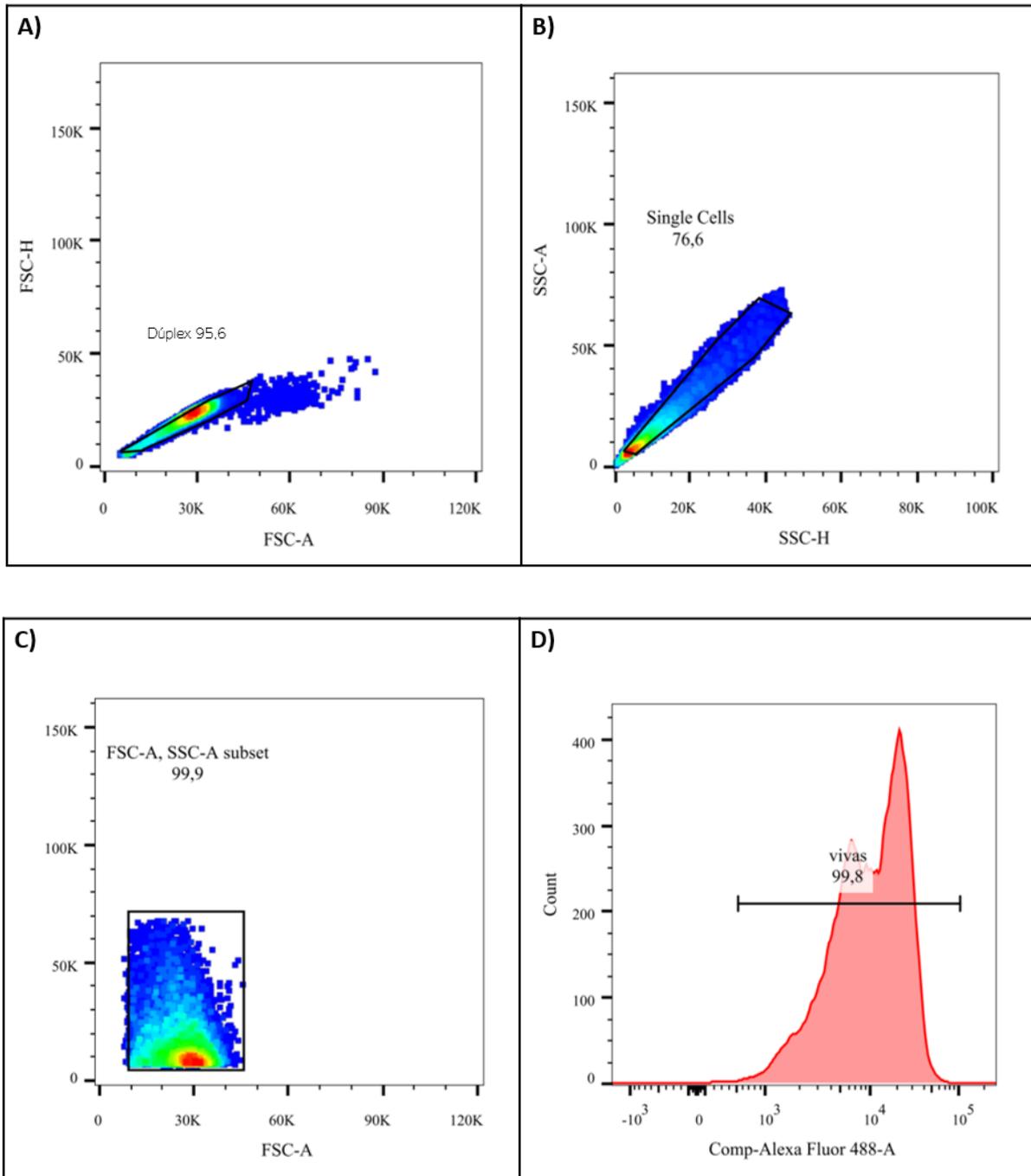


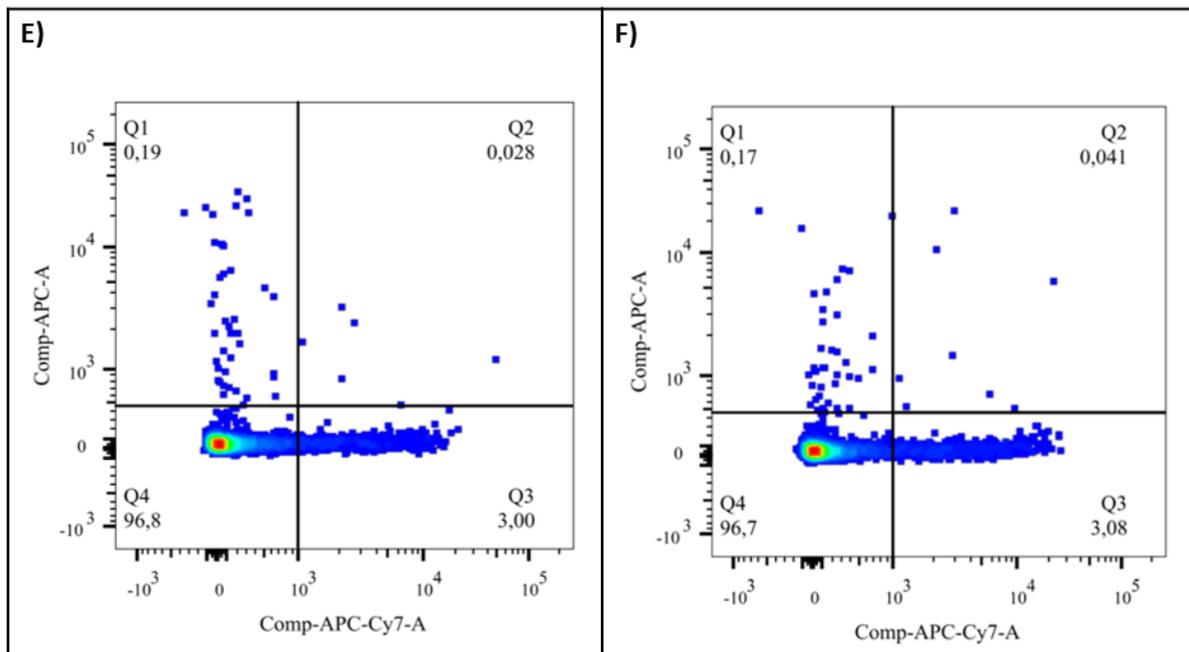
**Figura 18: Reticulocitos purificados teñidos con coloración supravital.** Las flechas rojas indican las células inmaduras de la línea roja observadas mediante microscopía electrónica posterior al proceso de obtención y purificación. Para poder realizar el extendido de los reticulocitos se mezcló 1mL de suspensión celular con 100 µL de suero fetal bovino para suplir la necesidad del plasma presente en la sangre total.

### 5.7 Unión total de la proteína *PvSPATR* a reticulocitos por citometría de flujo.

El comportamiento de unión entre la proteína recombinante *PvSPATR* y los reticulocitos humanos, se realizó por medio de citometría de flujo. Para el análisis de este resultado se discriminaron células por formación de dupletas (FSC-H-FSC-A y SSC-A-SSC-H) (Figura 19A-B) seguido de un gate de complejidad versus granulosidad (SSC-A, FSC-A) (Figura 19C)

y por tamaño y complejidad (Figura 19C). Sobre la población escogida y analizada, se seleccionó el porcentaje de células vivas (Figura 19D). La viabilidad de estas células vivas osciló entre el 99,8%. Sobre estas células se determinó si la proteína rPvSPATR (APC) se unía a la membrana de reticulocitos CD71+ (APC-Cy7). Como se muestra en la figura 19, solo se observó una unión a este tipo celular que osciló entre 0,028 y 0,041 (dotplot Q2). Tampoco se observó unión a células CD71- (eritrocitos maduros) (dotplot Q1).





**Figura 19: Selección de células y unión total de la proteína PvSPATR a reticulocitos. A y B** eliminación de células agrupadas en dupletas. **C.** Selección de población celular a estudio por características tamaño/complejidad. **D.** Porcentaje de células vivas y muertas con calceína como marcador de viabilidad para los reticulocitos. **E, F.** Dot plot que muestra la población de células positivas para APC (anti-histidinas) versus reticulocitos CD71+ (APC-Cy7). Q1 unión de la proteína a eritrocitos maduros; Q2 población doble positiva; Q3: reticulocitos CD71+ y Q4 población doble negativa.

## 6. Discusión:

La malaria ha sido considerada durante cientos de años como una enfermedad que atenta contra la estabilidad de la salud pública a nivel mundial<sup>1</sup>. En el caso de la malaria a causa de *Plasmodium vivax*, esta es considerada por la OMS como la que prevalente en la región de las américas, representando el 75% de los casos totales diagnosticados por especie en el mundo para el año 2020.<sup>45</sup> Es por esto, que es relevante la necesidad de seguir aportando a las investigaciones que han permitido conocer más a fondo la interacción de este parásito con el humano; investigaciones que han apuntado hacía la disminución de casos reportados por esta especie en nuestra región.<sup>1</sup>. A la dificultad de erradicación de este tipo de paludismo, se le suman las inequidades sociales presentes en la mayoría de poblaciones en donde esta especie prevalece. Factores como la deficiencia de los sistemas de salud y la dificultad de acceder a un tratamiento ideal aumentan el riesgo de morir, debido a que su tratamiento a elección es la primaquina, medicamento el cual tiene un tiempo de administración de 14 días; lo que permite

el fácil abandono del tratamiento. Aumentando así, los casos de malaria complicada y permitiendo el ascenso en número de muertes a causa de esta.<sup>46</sup>

Dicho esto, se ha establecido que la especie parasitaria palúdica que más dificulta su investigación es *Plasmodium vivax*, en comparación a las otras 4 especies desencadenantes de la enfermedad. Las características más importantes en el proceso biológico de *Plasmodium vivax* en el humano son la formación de hipnozoitos hepáticos o fase latente en el hígado humano, que suelen reactivarse 2 meses después de que el afectado ha sido expuesto al tratamiento con primaquina.<sup>20,44</sup> La segunda característica más importante en el proceso invasivo de *P. vivax* se describe en su fase eritrocitaria, esto debido a su preferencia al invadir reticulocitos o células eritroides inmaduras. Dificultando esto, la investigación de la especie debido a que no existe un cultivo *in vitro* continuo desarrollado para este tipo de células, lo que no ha permitido avanzar grandes pasos en ensayos como los de inhibición a la unión celular en fase eritrocítica,<sup>3,20</sup> solo siendo posible las investigaciones con estas células mediante un proceso de obtención y purificación de larga duración y complejidad como el utilizado para realizar este trabajo.

Sin importar las complicaciones que tenga investigar sobre la biología de *Plasmodium vivax*, es importante acudir a alternativas científicas que permitan consolidar bases para reconocer un blanco de inhibición futuro. Técnicas como la producción de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos han sido de gran ayuda para este y cientos de trabajos de investigación sobre las especies de *Plasmodium*, pues este sistema puede realizarse en huéspedes de expresión como células procariotas y eucariotas, en este caso la *Escherichia coli* como microorganismo procariota, permitió la expresión de la proteína recombinante PvSPATR de una manera exitosa, lo que acredita investigaciones consultadas que exponen como el sistema de proteínas recombinantes ha revolucionado la biología molecular con la bioquímica como coadyuvante principal.<sup>47</sup> Establecido esto, para obtener en este trabajo la expresión de la proteína recombinante en este sistema, fue necesaria la creación e incorporación del plásmido Pet24-PvSPATR que contenía la secuencia de 220 aminoácidos codificantes para la proteína PvSPATR exceptuando el péptido señal (Figura 9).

El proceso de obtención de la proteína recombinante PvSPATR fue exitoso gracias a la transformación de células permisivas BL21-DE3 con el vector Pet24-PvSPATR de la manera ya descrita a lo largo del trabajo. Fue necesario monitorear el proceso post-inducción con IPTG<sup>48</sup> para evitar el impacto negativo en el rendimiento de la expresión de la proteína. Gracias

a este monitoreo se determinó que la tercera hora inducida bastó para obtener un crecimiento de las células de *E. coli* de manera prudente, ya que este tiempo bastó para obtener la expresión de la proteína de manera eficaz. El monitoreo de temperatura durante el proceso de crecimiento bacteriano fue fundamental debido a que este fue proporcional al aumento de temperatura, estableciendo que la temperatura rango fue de 35 a 40°C con una óptima de 37°C, lo que aseguró la calidad del trabajo ribosómico y celular procariota, y a su vez la obtención adecuada de la proteína PvSPATR recombinante.<sup>49</sup>

De los procesos más críticos en la elaboración de este trabajo, estuvo la purificación de la proteína recombinante con el fin de separar y descartar otras sustancias y moléculas producidas naturalmente por las células *E. coli* en el proceso de expresión de la proteína PvSPATR. En esta purificación por cromatografía de afinidad se utilizó como fase sólida una resina de níquel, haciendo aprovechamiento de la de la etiqueta de 6 histidinas presentes en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Debido a que la etiqueta de histidinas presenta una gran afinidad con el níquel presente en la resina, permitió la exclusión de otras proteínas que no presentan afinidad por la falta de esta etiqueta, lo que nos aseguró la correcta purificación de la proteína PvSPATR.

El proceso de diálisis de la proteína PvSPATR fue un proceso clave y cuidadoso en donde la centrifugación fue controlada para evitar la pérdida de la proteína en los eluidos de PBS 1X y la precipitación de la proteína por exceso y revoluciones de centrifugación. Se logró obtener la proteína sin residuos del buffer utilizado en el proceso de extracción y purificación. Todo esto con el fin de evitar interferencias en los procedimientos siguientes como hemólisis de las células sanguíneas inmaduras.

Después de cada proceso que incluía la manipulación de la proteína recombinante PvSPATR con el fin de obtenerla en condiciones óptimas para los ensayos de unión celular, fue necesario realizar un corrido de SDS-PAGE, con transferencias en Western Blot (Figura 14) y tinción de azul de Coomassie (Figura 15). En donde se confirmó la obtención de la proteína PvSPATR por el conocimiento de su peso molecular, el cual generaba banda de corrido en aproximadamente 31KDa. Lo que concuerda con investigaciones analizadas en donde se hizo inmuno caracterización de esta proteína en otra especie,<sup>14</sup> Además de conocerse su peso previamente en el vector Pet24-PvSPATR.

Para determinar si la proteína PvSPATR es necesaria para el proceso de invasión eritrocitario, fue necesario la obtención y purificación de reticulocitos humanos, los cuales fueron obtenidos

de sangre total previo consentimiento informado, de una persona que se encontraba en la fase infértil de su periodo menstrual. De la sangre total obtenida, se realizó un conteo manual de reticulocitos mediante una coloración supravital, la cual arrojó un 2,8% de estas células presentes en sangre total. Este largo proceso de obtención fue necesario realizarlo en un solo día y con extremo cuidado, debido a la rápida maduración eritrocitaria, evitando así, la pérdida de reticulocitos para el ensayo de unión.<sup>28</sup>

La evaluación de la unión de la proteína recombinante PvSPATR a reticulocitos y células HepG2, se realizó mediante citometría de flujo. Para ambos casos se encontraron porcentajes de unión total muy bajos. Lo que determinó que la proteína PvSPATR no interacciona en procesos de adhesión por parte de los merozoitos a los reticulocitos, ni de los esporozoitos a los hepatocitos. Sin embargo, estos resultados establecen la necesidad de ampliar investigaciones científicas que involucren a PvSPATR con el fin de considerarla como candidata vacuna, ya que no se descarta que pueda estar involucrada en el proceso de invasión con funciones diferentes a las de adhesión.

La importancia de la obtención de la proteína recombinante PvSPATR radica en que es esencial para describir la importancia de esta en el proceso de adhesión celular, teniendo en cuenta que esta contiene un dominio TSR I, que ayuda a establecer la diafonía molecular huésped-parásito.<sup>15</sup> En el caso de la descripción de la unión a los hepatocitos, nace la incógnita de su función debido a publicaciones científicas que afirman la importancia de esta en el proceso invasivo que realiza *Plasmodium falciparum*, la cual es crucial para que se establezca infección hepática, ya que está presente en la superficie de los esporozoitos como en los micronemas de los merozoitos<sup>8</sup>, La interacción de esta proteína presente en los esporozoitos de *Plasmodium falciparum* es de tipo específica con los hepatocitos humanos y al lograr ser inhibida mediante anticuerpos anti-PfSPATR, lo que la logró identificar como un posible blanco terapéutico<sup>17</sup>. Es por esto que los resultados arrojados en este estudio sobre la unión de PvSPATR a hepatocitos, cobran relevancia, ya que en este trabajo se descartó la posibilidad de que esta proteína sea necesaria para la adhesión a los hepatocitos por parte de los esporozoitos de *Plasmodium vivax*, pero no se descartó que tenga función en otros procesos de invasión. Lo que marca una gran diferencia entre especies y bloquearía la posibilidad de poder considerarse como blanco terapéutico que abarque la protección contra ambas o más especies al tiempo.

En el caso de la importancia de la adhesión a los reticulocitos humanos, la proteína PvSPATR genera un gran incógnita respecto a su participación en el proceso de invasión. Es por ello, que

en este trabajo se realizó la obtención y purificación de reticulocitos humanos como se describe en el trabajo (Figura 12). Estos resultados arrojaron que la proteína PvSPATR no es necesaria para la adhesión celular en reticulocitos humanos, sumándole así, grandes expectativas a investigaciones futuras sobre la biología de *Plasmodium vivax* y su proceso de invasión celular, ya que logramos descartar la que se creía como un blanco objetivo para la adhesión eritroide, esto debido a que se ha documentado que la proteína SPATR es esencial en el proceso asexual de invasión eritroide en *Plasmodium berghei*, mediante mutaciones dirigidas que hicieron merozoitos deficientes en esta proteína.<sup>16</sup>

La importancia de la proteína PvSPATR en el proceso de adhesión celular tanto a reticulocitos como a células HepG2 (hepatocitos) fue descartada en este trabajo. Lo que permite ampliar la necesidad de conocer la función específica de esta proteína en el proceso de invasión y si es capaz de generar respuesta inmunogénica en los sistemas a los que *Plasmodium vivax* invade y expresa. Los resultados de este trabajo amplían las expectativas con miras hacia la investigación de la función de esta y otras proteínas que puedan resultar como blanco terapéutico para frenar la infección por *Plasmodium vivax*, no solo en la fase de unión sino de cualquier otro momento del ciclo de vida de este parásito.

## 7. Conclusiones.

- Se logró de manera eficaz y exitosa la expresión y obtención de la proteína recombinante con dominio de repetición de trombospondina alterado SPATR de *Plasmodium vivax* en un sistema de expresión heterólogo de *Escherichia coli*.
- Se determinó que PvSPATR no es necesaria para el proceso adhesión durante el estadio de esporozoito y merozoito de *Plasmodium vivax* a sus respectivas células hospederas.

## Referencias:

1. Organización Mundial de la Salud, Sección paludismo. Informe mundial 2020 sobre el paludismo. 2020. [Internet] [Citado 14 Octubre 2020] Disponible en: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-sp.pdf?sfvrsn=a6de03a5\\_11](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/malaria/world-malaria-reports/world-malaria-report-2020-briefing-kit-sp.pdf?sfvrsn=a6de03a5_11)
2. Ferro C, Informe del evento de malaria en Colombia, Periodo epidemiológico VI Colombia 2021. Grupo enfermedades transmisibles, 2021 [Internet] [Citado 23 de

Mayo 2021] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA%20PE%20VI%202021.pdf>

3. Kanjee U, Rangel G, Clarck M, Duraisingh M. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. *Curr Opin Microbiol* 2019 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688184/>
4. Johns F, Bass C. The cultivation of malaria plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 2016 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2124976/>
5. Hertig E. Distribution of Anopheles vectors and potential malaria transmission stability in Europe and the Mediterranean area under future climate change. *Parasites & Vectors*. 2019 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325871/>
6. Saliba K, Luque R, Obaldia N, Nuñez M, Dutary S, Lim C, et al. Insights into an Optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 *In vitro* culture: The *Aotus* Primate model. 2016 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963040/>
7. Bourgard C, Albrecht L, Kayano A, Sunnerhagen P, Costa F. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5809496/#B41>
8. Mongui A, Angel D, Moreno D, Gonzalez S, Almonacid H, Vanegas M, et al. Identification and characterization of the *Plasmodium vivax* thrombospondin-related apical merozoite protein. *Malaria Journal*. 2010. [Internet][Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3020679/>
9. Aparicio F. Fenómenos de citoadherencia asociados al paludismo falciparum. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia. 2015. [Internet] [Citado 14 Octubre 2020] Disponible en:

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/FEDERICO%20MIGUEL%20BECERRA%20APARICIO.pdf>

10. Luque R, Adams J, Kocken C, Pasini E. From marginal to essential: the golden thread between nutrient sensing, medium composition and *Plasmodium vivax* maturation in vitro culture. *Malaria Journal*. 2019. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6785855/>
11. Bèrmudez M, Pèrez D, Arèvalo G, Curtidor H, Patarroyo M. *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. *Malaria Journal*. 2018. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102941/#CR53>
12. Brockelman C, Laovanitch R, Kaewkes S. Supportive effects of magnesium chloride on viability of *Plasmodium vivax* in vitro. *J Sci Soc Thailand*. 1984; [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <http://www.scienceasia.org/1984.10.n2/109.php>
13. Zunping L, Sullivan S, Carlton J. The biology of *Plasmodium vivax* explored through genomics. *Ann N Y Acad Sci*. 2015.[Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405435/>
14. Palaeya V, Lau Y, Mahmud R, Chen Y, Fong M. Cloning, expression, and immunocharacterization of surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain (SPATR) from *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-182>
15. Mahajan B, Jani D, Chattopadhyay R, Nagarkatti R, Zheng H, Majam V, et al. Identification, Cloning, Expression, and Characterization of the Gene for *Plasmodium knowlesi* Surface Protein Containing an Altered Thrombospondin Repeat Domain. *Infect Immun*.2005. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231135/>
16. Gupta R, Mishra A, Choudhary H, Narwal S, Nayak B, Srivastava P. et. al. Secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) is essential for asexual blood stages but not required for hepatocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular microbiology*. 2019. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mmi.14432>
17. Chattopadhyay R, Rathore D, Fujioka H, Kumar S, de la Vega P, Haynes D. et al PfSPATR, a *Plasmodium falciparum* Protein Containing an Altered Thrombospondin

- Type I Repeat Domain Is Expressed at Several Stages of the Parasite Life Cycle and Is the Target of Inhibitory Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. 2019. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.jbc.org/content/278/28/25977.long>
18. Patarroyo ME, Franky J, Gómez M, Arévalo G, Patarroyo MA. Hotspots in *Plasmodium* and RBC Receptor-Ligand Interactions: Key Pieces for Inhibiting Malarial Parasite Invasion. *Int J Mol Sci*. 2020. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7370042/>
  19. Crosnier C, Bustamante L, Barthlodson S, Bei A, Theron M, Uchikawa M. et al. BASIGIN is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2011 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245779/>
  20. Markus M. Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. Epub. 2018. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29564998/>
  21. Howick V, Russell A, Andrews T, Heaton H, Reid A, Natarajan K. et al. The Malaria Cell Atlas: Single parasite transcriptomes across the complete *Plasmodium* life cycle. *Science*. 2019.[Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7056351/>
  22. Ansari HR, Templeton TJ, Subudhi AK, Ramaprasad A, Tang J, Lu F, et al. Genome-scale comparison of expanded gene families in *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* with *Plasmodium malariae* and with other *Plasmodium* species. *International Journal of Parasitology* 2016. 46 1-2016 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27392654>
  23. Kumar H and Tolia N. Getting in: The structural biology of malaria invasion, *PLoS Pathog*. 2019 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6728024/>
  24. Kumar H, Tolia N. Getting in: The structural biology of malaria invasion. *Plos pathogens*. 2019.[Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007943>
  25. XD Fang , DC Kaslow , JH Adams , LH Miller. Clonación del receptor Duffy de *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1849231/>

26. Langhorne J, Duffy P. Expanding the antimalarial toolkit: Targeting host–parasite interactions. *J Exp Med*. 2016 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4749928/#bib2>
27. 1.Ministerio de Justicia. Ley 100 de 1993. Dairio oficial- página 1-1993 [Internet] [Citado 14 Octubre 2020] Disponible en:<http://www.suinjuriscol.gov.co/viewDocument.asp?ruta=Leyes/1635955>
28. Hietanen J, Chim A, Chiramanewong T, Gruszczyk J, Roobsoong W, Tham W. et al Gene Models, Expression Repertoire, and Immune Response of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins. *Infect Immun*. 2016. [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4771344/>
29. Srivastava A, Creek D, Evans K, Souza D, Schofield L, Müller S. et al. Host Reticulocytes Provide Metabolic Reservoirs That Can Be Exploited by Malaria Parasites. *PLoS Pathog*. 2015 [Internet] [Cited 14 October 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4456406/>
30. Spencer M, Gomez A, Collovini A. Mecanismos de invasion del esporozoíto y merozoíto de Plasmodium. *Revista bionatura*. 2016. [Internet] [Citado 14 Octubre 2020] Disponible en: <https://www.revistabionatura.com/files/Mecanismos-de-invasion-del-esporozoito-y-merozoito.pdf>.
31. Lynne S, García MS. Malaria. *Revista Elsevier*. 2010. [Internet] [Citado 10 Enero 2021] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272271209001188?via%3Dihub>
32. Danny A. Milner Jr. Malaria Pathogenesis. *Advance May*. 2017 [Internet] [Cited 19 April 2021] Available in: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/8/1/a025569.long>
33. Lover A, Baird J, Gosling R. Malaria Elimination: Time to Target All Species The *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018. [Internet] [Cited 19 April 2021] Available in: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/99/1/article-p17.xml>
34. Muñoz J, Marcos G, Ramírez G, Salas J, Treviño B, Perez J.L. et. al. Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: Recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health (SEMTSI). *Elsevier*. 2015. [Internet] [Cited 19 April 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X14000196?via%3Dihub>

35. Iborra M, García E, Carrilero B, Segovia M. Malaria diagnosis and treatment: analysis of a cohort of hospitalised patients at a tertiary level hospital (1998-2010). *Rev Esp Quimioter*. 2013. [Internet] [Cited 19 April 2021] Available in: <https://seq.es/seq/0214-3429/26/1/iborra.pdf>
36. Santa P, Vázquez MC, Latorre E, Mairal P, et al. First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro Surveill*. 2010;15(41):19684. [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20961517/>
37. Markus M. Biological concepts in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. Cambridge University Press. 2018. [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20961517/>
38. Howes R, Battle K, Mendis K, Smith D, Cibulskis R, Baird J. *et al*. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol 95. 2016 [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: [https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/95/6\\_Suppl/article-p15.xml](https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/95/6_Suppl/article-p15.xml)
39. Flannery E, Markus M, Vaughan M. *Plasmodium vivax*. *Trends in parasitology*. 2019. [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(19\)30081-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492219300819%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(19)30081-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492219300819%3Fshowall%3Dtrue)
40. Curtidor H, García J, Vanegas M, Puentes F, Forero M, Patarroyo M. Identification of peptides with high red blood cell and hepatocyte binding activity in the *Plasmodium falciparum* multi-stage invasion proteins: PfSPATR and MCP-. Elsevier. 2008 [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908408002514>
41. Gant S, Clavijo P, Bai X, Esko J, Sinnis P. Cell Adhesion to a Motif Shared by the Malaria Circumsporozoite Protein and Thrombospondin Is Mediated by Its Glycosaminoglycan-binding Region and Not by CSVTCG\*. *Journal Biological Chemistry*. 1997. [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)38944-0/fulltext?keytype2=tf\\_ipsecsha&ijkey=3d6583af49adac59ba8e5f69942a200172d836f3](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)38944-0/fulltext?keytype2=tf_ipsecsha&ijkey=3d6583af49adac59ba8e5f69942a200172d836f3)
42. Chan Li, Dietrich M, Nguitragool W, Tham W. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cellular Microbiology*. 2019

- [Internet][Cited 02 apr 2020]. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.13110>
43. Pereira A, Pérez M. Epidemiología y tratamiento del paludismo. Elsevier 2002. [Internet][Citado 02 Abril 2021]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-epidemiologia-tratamiento-del-paludismo-13033516>
  44. Adams H, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. CSH perspectives. 2017 [Internet][Citado 02 Abril 2021]. Disponible en: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/7/9/a025585.long>.
  45. OMS. Paludismo. 2020 [Internet][Citado 02 Abril 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
  46. OMS. Control y eliminación del paludismo por *Plasmodium vivax* Informe técnico. 2020 [Internet][Citado 02 Abril 2021]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204494/9789243509242\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204494/9789243509242_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  47. Jia Baolei, Jeon Che. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.160196>
  48. Wandrey G, Bier C, Binder D, Hoffman K, Jaeger K, Pietruszka J, *et al* Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4842301/>
  49. Farewell A, Neidhardt F. Effect of Temperature on In Vivo Protein Synthetic Capacity in *Escherichia coli*. [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107486/>
  50. Kaur J, Reinhardt D. Immobilized Metal Affinity Chromatography Co-Purifies TGF- $\beta$ 1 with Histidine-Tagged Recombinant Extracellular Proteins [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485342/>
  51. Spencer L, Gómez A, Collivini E. Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium*. Revista Bionatura. [Internet] ][Citado 22 Agosto 2021]. Disponible en: <http://revistabionatura.com/files/Mecanismos-de-invasion-del-esporozoito-y-merozoito.pdf>
  52. Bourgard C, Albrecht L, Kayano A, Sunnerhagen P, Costa F, *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. 2018.

Frontiers in. [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5809496/>

53. Vaughan A, Kappe S. Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology. 2017. Cold Spring Harb Perspect Med. [Internet] ][Cited 22 August 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453383/>