

**Producción de b́acmidos recombinantes del ectodominio de la protéina del
circumsporozoito (EcCSP) y de la regi3n II de la protéina de Uni3n al Duffy (DBP-RII)
de *Plasmodium vivax*.**

María Camila Beltrán Pérez
Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínic

Proyecto de grado



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínic
Bogotá, noviembre 2021

**Producción de b́acmidos recombinantes del ectodominio de la protéina del
circumsporozoito (CSP) y de la regi3n II de la protéina de Uni3n al Duffy (DBP) de
Plasmodium vivax.**

María Camila Beltrán Pérez
Estudiante
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínic

Asesora externa
Gabriela Arévalo Pinz3n., M.Sc. Ph.D.

Asesora interna
Ruth M3lida S3nchez., M.Sc. Ph.D.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínic
Bogotá, noviembre 2021

**Producción de b́acmidos recombinantes del ectodominio de la protéina del
circumsporozoito (CSP) y de la regi3n II de la protéina de Uni3n al Duffy (DBP) de
Plasmodium vivax.**

APROBADA:

JURADOS:

ASESORES:

Asesor interno: Dra. Ruth M3lida S3nchez Mora M.Sc, Ph.D

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Asesor externo: Dra. Gabriela Ar3valo Pinz3n M.Sc, Ph.D

Fundaci3n Instituto de Inmunoloǵa de Colombia

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacterioloǵa y Laboratorio cĺnico

Trabajo de grado

Bogot3, septiembre 2021

Para mamá

Agradecimientos

Dios, tu amor no tiene fin, gracias por brindarme la sabiduría para concluir este trabajo, tus bendiciones son infinitas y es por ti que hoy esta meta se cumple.

Mamá, te amo hasta el infinito.

Familia, ustedes han sido mi fuerza y motor por todos mis años de vida, gracias por darme sus bendiciones todos los días y por guiarme siempre por el camino del bien, sin ustedes definitivamente yo no estaría aquí, mil y mil gracias por el amor que ustedes me dan.

Dra. Gabriela Arévalo Pinzón, gracias por tu dedicación, paciencia y amor, por la oportunidad de poder haber hecho este proyecto contigo y así ser cada día una mejor profesional, tu acompañamiento fue fundamental para mí y es un honor haber compartido mis últimos dos años de carrera profesional de tu mano en nuestro proyecto.

A las doctoras Ruth Mélida Sánchez, Jeimmy Castañeda, Adriana Santamaría y al doctor Fredy Pulido, gracias por estar siempre dispuestos a resolver mis dudas y guiarme en mi camino profesional.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, agradezco por su financiación y por brindarme todos los insumos para realizar mi trabajo de grado, de igual forma agradezco a todos los funcionarios del Instituto que siempre me acompañaron en mi proceso de aprendizaje.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, agradezco por haberme abierto las puertas hace 5 años, recibí sin lugar a duda la mejor formación profesional y es gracias a toda la comunidad que hoy estoy aquí triunfando.

Por último, gracias a todos mis amigos, que siempre estuvieron apoyándome y dándome todo el amor y las fuerzas para nunca renunciar a mis sueños.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes	2
2.2 Malaria	6
2.3 Etiología y ciclo de vida	7
2.4 Patogenia	8
2.5 Cuadro clínico.....	8
2.6 <i>Plasmodium vivax</i>	9
2.7 Proteína de unión al Duffy.....	10
2.8 Proteína del circumsporozoito	11
2.9 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	12
2.9.1 Sistema de expresión de Baculovirus	12
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. DISEÑO METODOLÓGICO	16
4.1 Técnicas y procedimientos.....	16
4.1.1 Diseño de cebadores.....	17
4.1.2 PCR para amplificación de genes.....	18
4.1.3 Tratamiento enzimático y ligación.....	18
4.1.4 Transformación en bacterias <i>E. coli</i> JM109	19
4.1.5 Análisis y selección de colonias recombinantes.....	20
4.1.6 Purificación de los plásmidos y verificación mediante tratamiento enzimático.....	20
4.1.7 Análisis de secuencias plasmídicas	21
4.1.8 Transformación en bacterias <i>E.coli</i> DH10Bac.....	21
4.1.9 Análisis y selección de colonias recombinantes.....	22
4.1.10 Purificación de los b́acmidos recombinantes y cuantificación de DNA.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Obtención de los genes que codifican para <i>EcPvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i> por PCR	25
5.2 Los fragmentos ǵenicos que codifican <i>EcPvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i> fueron clonados exitosamente en el vector pFASTBacHT-C	26
5.3 PCRs de colonia de <i>E. coli</i> JM109 para <i>EcPvCSP</i> y la regi3n II de <i>PvDBP</i>	27

5.4 Extracción de plásmido recombinante, tratamiento enzimático del plásmido con EcPvCSP y PvDBP-RII.	29
5.5 Secuencias del EcPvCSP y de PvDBP-RII presentan varios cambios respecto a la cepa de referencia Sal-1	31
5.6 Transformación de plásmidos recombinantes en <i>E. coli</i> DH10Bac	34
5.7 PCRs de colonia de <i>E. coli</i> DH10Bac con el EcPvCSP y PvDBP-RII.	34
5.8 Obtención y cuantificación de bécmidos recombinantes.....	36
6. Discusión	37
7. Conclusiones	44

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de la malaria.....	7
Figura 2. Estadios eritrocitarios de <i>Plasmodium vivax</i>	10
Figura 3. Ciclo de vida de los <i>Baculovirus</i>	13
Figura 4. Diagrama de Bacto-Bac® System.....	15
Figura 5. Metodología para la obtención de báculo recombinantes del <i>EcPvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i>	17
Figura 6. Representación esquemática de <i>PvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i>	7
Figura 7. Amplificación de los genes que codifican para <i>EcPvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i>	8
Figura 8. Plásmido <i>pFastBacHT-C-EcPvCSP</i> y <i>pFastBacHT-C-PvDBP-RII</i>	9
Figura 9. Transformación en células <i>E. coli</i> JM109 con los productos de la ligación.....	9
Figura 10. PCRs de colonia <i>E. coli</i> JM109- <i>EcPvCSP</i> y <i>E. coli</i> JM109- <i>PvDBP-RII</i>	10
Figura 11. Purificación del plásmido <i>pfastBacHT-C-EcPvCSP</i> y del plásmido <i>pfastBacHT-C- PvDBP-RII</i>	11
Figura 12. Tratamientos enzimáticos a <i>pFastBacHT-C- EcPvCSP</i> y <i>pFastBacHT-C-PvDBP-RII</i>	13
Figura 13. Electroferogramas de plásmidos recombinantes secuenciados de <i>pFastBacHT-C- EcPvCSP</i> y <i>pFastBacHT-C-PvDBPRII</i>	14
Figura 14. Análisis de secuencias de nucleótidos con <i>EcPvCSP</i> de la cepa <i>PvVCG-1</i> respecto a <i>PvSal-1</i>	15
Figura 15. Análisis de secuencias de nucleótidos con <i>PvDBP-RII</i> de la cepa <i>PvVCG-1</i> respecto a <i>PvSal-1</i>	16
Figura 16. Transformación en <i>E. coli</i> DH10Bac.....	17
Figura 17. PCRs de colonia de báculo del <i>EcPvCSP</i> y de <i>PvDBP-RII</i> en DH10Bac.....	18
Figura 18. Báculos recombinantes <i>bMON14272-PvDBP-RII</i> y <i>bMON14272-EcPvCSP</i>	19

Índice de tablas

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de <i>PvDBP-RII</i> y <i>EcPvCSP</i>	18
Tabla 2. Condiciones de amplificación de <i>EcPvCSP</i> y <i>PvDBP-RII</i>	18
Tabla 3. Cebadores utilizados para PCR, confirmación de colonias recombinantes <i>E. coli</i> JM109.....	20
Tabla 4. Condiciones para PCR, confirmación de colonias recombinantes <i>E. coli</i> JM109....	21
Tabla 5. Primers utilizados para PCR de colonias recombinantes en <i>E. coli</i> DH10Bac.....	23
Tabla 6. Condiciones para PCR de colonias recombinantes en <i>E. coli</i> DH10Bac.....	23
Tabla 7. Cambios no sinónimos generados entre el <i>EcPvCSP</i> de la cepa VCG-1 y el <i>EcPvCSP</i> de la cepa Sal-1.....	34
Tabla 8. Cambios no sinónimos generados entre <i>PvDBP-RII</i> de la cepa VCG-1 y de <i>PvDBP-RII</i> de la cepa Sal-1.....	35

Producción de b́acmidos recombinantes del ectodominio de la protéina del circumsporozoito (CSP) y de la regi3n II de la protéina de Uni3n al Duffy (DBP) de *Plasmodium vivax*.

Resumen

Plasmodium vivax es una de las especies ḿas ampliamente distribuidas a nivel mundial, pero desafortunadamente no se ha podido investigar a profundidad los mecanismos de invasi3n debido a la incapacidad de realizar un cultivo continuo *in vitro*. Por lo tanto, es necesario encontrar diferentes alternativas para estudiar las interacciones del parásito con las c3lulas hospederas. Dentro de las estrategias abordadas por distintos investigadores, se encuentra la evaluaci3n de las interacciones receptor-ligando mediante el uso de protéinas recombinantes derivadas de *P. vivax* y c3lulas hospederas. A partir de estos experimentos se han elucidado algunas interacciones claves en el proceso de invasi3n de *P. vivax*. Teniendo en cuenta que esta es una estrategia adecuada para medir las interacciones entre el pat3geno y la c3lula hospedera, es necesario la producci3n de los controles de interacci3n positivos que puedan usarse para validar las nuevas interacciones de *P. vivax*. Motivo por el cual, este trabajo se enfoc3 en la producci3n de b́acmidos recombinantes que contienen la regi3n que codifica para el ectodominio de la protéina circumsporozoito (CSP) y de la regi3n II de la protéina de uni3n a Duffy (DBP). Para esto, se amplificaron las dos regiones de cada protéina y se clonaron en el vector PfastBac-HTC obteniendo pĺasmidos recombinantes llamados pFastBacHT-C-EcPvCSP y pFastBacHT-C-PvDBP-RII, que se utilizaron para transformar c3lulas DH10Bac que contenían el DNA viral generando b́acmidos recombinantes bMON14272-PvDBP-RII y bMON14272-EcPvCSP con una concentraci3n para de 158,9 ng/ μ l y 430 ng/ μ l respectivamente, los cuales fueron aislados y serán utilizados en posteriores estudios para transfectar c3lulas *Sf9*, encargadas de la producci3n de las part́iculas virales y de la producci3n de las protéinas recombinantes. Estas protéinas serán utilizadas como controles para evaluar interacciones protéina-protéina de diferentes ant́igenos de *P. vivax* en busca de m3todos de control contra esta especie parasitaria.

Palabras clave: Baculovirus, malaria, hospedero-pat3geno, Plasmodium vivax, protéinas, recombinantes.

**Producción de báculos recombinantes del ectodominio de la proteína del
circumsporozoito (CSP) y de la región II de la proteína de Unión al Duffy (DBP) de
Plasmodium vivax.**

Abstract

Plasmodium vivax is one of the most widely distributed species worldwide, but unfortunately it has not been possible to investigate in depth the mechanisms of invasion due to the inability to carry out a continuous culture in vitro. Therefore, it is necessary to find different alternatives to study the interactions of the parasite with host cells. Among the strategies addressed by different researchers is the evaluation of receptor-ligand interactions through the use of recombinant proteins derived from *P. vivax* and host cells. From these experiments some key interactions in the invasion process of *P. vivax* have been elucidated. Taking into account that this is a suitable strategy to measure the interactions between the pathogen and the host cell, it is necessary to produce positive interaction controls that can be used to validate the new interactions of *P. vivax*. This is why this work focused on the production of recombinant bacmids that contain the region that codes for the ectodomain of the circumsporozoite protein (CSP) and the region II of the Duffy-binding protein (DBP). For this, the two regions of each protein were amplified and cloned in the PfastBac-HTC vector obtaining recombinant plasmids called pFastBacHT-C-EcPvCSP and pFastBacHT-C-PvDBP-RII, which were used to transform DH10Bac cells that contained the viral DNA, generating recombinant bacmids bMON14272-PvDBP-RII and bMON14272-EcPvCSP with a concentration of 158.9 ng / μ l and 430 ng / μ l respectively, which were isolated and will be used in subsequent studies to transfect *Sf9* cells, responsible for the production of viral particles and the production of recombinant proteins. These proteins will be used as controls to evaluate protein-protein interactions of different *P. vivax* antigens in search of control methods against this parasitic species.

Keywords: Baculovirus, malaria, host-pathogen, Plasmodium vivax, proteins, recombinants

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* y es un problema de salud pública en zonas endémicas como África, Asia y países de América Latina. Según la Organización Mundial de la Salud (1), en el año 2019 se reportaron 229 millones de casos de malaria en el mundo, con un número aproximado de 409 mil defunciones, donde los menores de 5 años representan el 67%. Según el informe de Malaria del año 2020, en Colombia se presentaron 76.958 casos, de los cuales 1.142 fueron por malaria complicada. El índice parasitario anual para *Plasmodium vivax* fue de 4.8 casos por cada 1.000 habitantes (2).

Aunque se ha trabajado muy fuerte para que la malaria pueda erradicarse en el mundo, se han observado cambios significativos en el genoma de especies de *Plasmodium*, como *P. vivax* (3), lo cual genera limitaciones para su pronta eliminación. Es probable que los desafíos para controlar y eliminar la malaria por *P. vivax* estén relacionados con los siguientes aspectos de la biología de *P. vivax* (3): su capacidad permanecer latente en forma de hipnozoito en el hígado (4), su alto potencial de transmisión causado por la producción temprana y continua de gametocitos, alta infectividad para los mosquitos y ciclo de desarrollo más corto en el hospedador vector en comparación con otras especies de *Plasmodium* (5). Sin embargo, la limitación más importante para conocer acerca de éste parásito es la carencia de un cultivo continuo *in vitro* (6) que permita avanzar en el conocimiento de las proteínas claves para el proceso de invasión del parásito a la célula hospedera retrasando de esta forma el avance biológico y el desarrollo de nuevos métodos de control contra esta especie.

El cultivo celular de *Plasmodium falciparum* se estandarizó en los años 70's (7) y ha sido un instrumento esencial para entender el ciclo de vida del parásito y reconocer muchas de las proteínas involucradas en la invasión de eritrocitos, algunas de las cuales han sido probadas como componentes de vacunas a nivel clínico (8) y aunque se han intentado estandarizar protocolos de cultivo para *P. vivax*, no se ha tenido gran éxito. Si bien, se ha intentado realizar el cultivo con diferentes factores como medios de cultivo, parásitos y reticulocitos, no ha sido posible llevarlo a cabo (6) y hasta la fecha, solo ha sido posible mantener un cultivo *in vitro* durante un período de hasta 26 meses, con una parasitemia inferior al <0,1% (9) que podría deberse a que los merozoitos pierden su capacidad para volver a invadir nuevas células huésped (10).

Actualmente se conocen de más de 50 proteínas importantes en el proceso de invasión de *Plasmodium falciparum*, a diferencia de *P. vivax* donde solo se han descrito 23 (6), dos de las cuales han sido investigadas ya que son cruciales para el proceso de invasión del parásito, la proteína de Unión al Duffy (DBP) que se une al antígeno Duffy sobre la superficie de los reticulocitos, crucial en la invasión de reticulocitos (11) y la proteína del Circumsporozoito (CSP) importante en la invasión de hepatocitos ya que se sugiere que interactúan con los glicosaminoglicanos presentes en su membrana cuando el parásito está en estadio de esporozoito (12).

Estudiar e investigar nuevas interacciones, es entonces un nuevo reto que debe estar acompañado de controles positivos de interacción que permitan validar los ensayos en ambos estadios parasitarios (pre-eritrocítico y eritrocítico). En este caso se seleccionó el ectodominio de la proteína circumsporozoito (EcPvCSP) que interactúa con el heparán sulfato dispuesto sobre la membrana de los hepatocitos y la región II de la proteína de unión a Duffy (PvDPB-RII) con el receptor Duffy sobre la superficie del reticulocito. Por tanto, este proyecto estará enfocado en producir báculos recombinantes en sistema Bac to Bac de *Baculovirus*. Para este fin, se ha seguido un largo y controlado proceso molecular donde se ha obtenido el ADN viral recombinante que será usado para transfectar células Sf9 para la producción de partículas víricas y proteína recombinante.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

La malaria es una de las enfermedades más importantes en países como África, Asia y América Central y del Sur. Según la OMS, se estima que en el año 2018 hubo 228 millones de casos de malaria en todo el mundo con 405.000 muertes. El grupo más afectado por esta enfermedad son los niños menores de 5 años, que representan un gran porcentaje de los casos de las muertes por esta enfermedad. *P. vivax* es el parásito predominante en la Región de las Américas, representando el 75% de los casos de malaria (13). Esta distribución se puede explicar por el hecho de que *P. vivax* puede sobrevivir en regiones climáticamente desfavorables y puede permanecer inactivo en forma de hipnozoito en el hígado de su huésped humano durante muchos años (14).

Con el fin de encontrar formas de disminuir el número de casos de malaria en América, se han estudiado diferentes mecanismos moleculares que *P. vivax* utiliza para facilitar su acceso a las células sanguíneas y hepáticas del ser humano. Dos proteínas han sido estudiadas para encontrar interacciones parásito-huésped, *PvDBP* que facilita la infección del parásito en el estadio de merozoito a los glóbulos rojos y *PvCSP* que es determinante para la infección de las células hepáticas en el estadio de esporozoito.

La proteína de unión al Duffy de *P. vivax* es la proteína mejor estudiada en *P. vivax* en los últimos años debido a que es un ligando del parásito que interactúa con el antígeno Duffy para así poder ingresar a la célula. Las poblaciones africanas que carecen de expresión de eritrocitos DARC son resistentes a la infección por merozoitos por *P. vivax* (15). Esto sugiere que la interacción DBP-DARC es fundamental para la invasión de reticulocitos por parte de *P. vivax*. DBP se expresó en varios fragmentos sobre la superficie de células COS-7, las cuales se incubaron con una muestra de sangre de humanos adultos. Como resultado, se encontró que los eritrocitos Duffy positivo eran capaces de unirse sólo a las células COS-7 que expresaban la región II de la proteína DBP (DBP-RII), considerándose como el dominio de unión de la molécula (16). Sin embargo, se han reportado algunos casos de transmisión de *P. vivax* a individuos negativos al antígeno Duffy, lo que sugiere que algunos mecanismos alternativos de invasión podrían estar presentes en algunas cepas, y esto podría presagiar la escalada de malaria por *P. vivax* a África (17). Mendes et al. informaron que los individuos negativos para Duffy de la costa oeste de África estaban infectados con diferentes cepas de *P. vivax*, y concluyeron que el parásito evolucionó rápidamente y usó otros receptores diferentes a Duffy para invadir los reticulocitos (18).

En el 2010 se investigó en el CDC de Atlanta, la unión de DBP de *Plasmodium vivax* a las células sanguíneas de *Aotus nancymae*, un mono que habita en Brasil, Perú y algunas partes de Colombia. A partir de la implementación de anticuerpos monoclonales en donde se inhibió la proteína DBP, se encontró que dependían de esta proteína para su unión (19). Más aún, científicos del Departamento de Microbiología Molecular de la Universidad de Washington demostraron que la dimerización es fundamental en el proceso de invasión y está impulsado por la unión del receptor que conduce a la formación de un complejo compuesto por dos *PvDBP* y dos DARC (20).

En el 2014 en Brasil se estudió DBP como un objetivo clave para una vacuna de *Plasmodium vivax*, aislando esta proteína y utilizándose para generar memoria inmunológica, ya que se cree que tiene acceso a los anticuerpos séricos (11). El Grupo de Investigación en Biología Molecular e Inmunología de la Malaria en Brasil, en el año 2018 proporcionaron evidencia de que los polimorfismos DARC modulan la susceptibilidad a *P. vivax* e influyen en la respuesta inmune humoral adquirida de forma natural a los antígenos sanguíneos de la malaria, lo que puede interferir con la eficacia de una futura vacuna contra la malaria (21).

Hasta hace unos pocos años se ha descrito que el parásito ha empezado a utilizar otros ligandos para unirse a los receptores eritrocitarios, en junio del 2019 el Departamento de Ciencias Biológicas de EEUU y el Instituto de Enfermedades Endémicas en Sudán investigaron acerca de pacientes con Malaria por *P. vivax* que eran Fy (ab-) particularmente en el sitio del río Nilo en el noreste de Sudán (22). En noviembre del 2019, en la Universidad Médica de China se identificó una diferenciación genética de bajo nivel, lo que sugiere un amplio flujo de genes de las poblaciones de *P. vivax* en la Subregión del gran Mekong. Estos resultados pueden ayudar a comprender la evolución de las poblaciones de *P. vivax* en el curso de la eliminación regional de la malaria y guiar el diseño de la vacuna basada en PvDBP-RII (23).

La Unidad de Epidemiología Molecular de la Malaria en Camboya, Roesch et al. describieron que la amplificación del gen que codifica la proteína de unión a Duffy permite a *P. vivax* evadir la inmunidad humoral anti-DBP del huésped ya que la amplificación del gen PvDBP conduce a niveles incrementados de ARNm y protege a *P. vivax* in vitro contra los anticuerpos monoclonales humanos inhibidores de la invasión dirigidos a un dominio de unión conservado de DBP (24).

PvDBP es un objetivo principal de la respuesta inmunitaria protectora y un candidato a vacuna prometedora para la malaria por *P. vivax* (25). Los anticuerpos de conejo y humanos que bloquean la interacción DBP-DARC neutralizan *P. vivax*, lo que sugiere que una vacuna basada en DBP reduciría la infección (26). Sin embargo, el diseño exitoso de una vacuna basada en DBP-RII puede estar limitado por respuestas inmunes específicas de cepa debido a la naturaleza polimórfica de DBP (27) y la presencia de epítomos inmunodominantes pero no protectores dentro de ella (28). Además, la vacunación humana con DBP-II, provoca anticuerpos que bloquean la unión in vitro de cuatro alelos de DBP a DARC, lo que sugiere

que pueden existir epítomos ampliamente neutralizantes de anticuerpos humanos dentro de PvDBP-RII (29).

CSP es un antígeno inmunodominante que se expresa abundantemente en la superficie de los esporozoitos de todas las especies de *Plasmodium* estudiadas hasta la fecha (30). En el 2001 el Instituto de Inmunología del Valle, junto con la Universidad del Valle, lograron identificar dos variantes de CSP (VK210 y VK247) en muestras de sangre de individuos colombianos con el fin de comprender la compleja relación entre parásitos, vectores y la respuesta inmune humana (31). Se ha demostrado que el fenotipo prevalente del parásito *P. vivax* en los sitios de estudio de Colombia es VK247 (59,7%), mientras que VK210 representa un tercio de los casos 32,8%; el 7,5% restante corresponde a infección mixta (31). Según el artículo, *Antigenic Diversity of the Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein in Parasite Isolates of Western Colombia*, el Centro de Desarrollo de Vacunas y Medicamentos contra la Malaria en Cali, identificó gran cantidad de diversidad antigénica de la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium vivax* en parásitos aislados del oeste de Colombia (Chocó, Valle del Cauca, Guapi, Tumaco y Puerto Asís), pero también sugiere que se requieren estudios detallados sobre el polimorfismo de este antígeno y la identificación de epítomos relevantes reconocidos por individuos de las mismas áreas endémicas para avanzar en la evaluación de CSP como un componente potencial de una vacuna eficaz contra la malaria (32).

Por otro lado, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed, realizó una proteína recombinante del circumsporozoito de *Plasmodium vivax* que tenía la capacidad de inducir anticuerpos biológicamente funcionales que reconoce los esporozoitos VK210 y VK247 utilizando *Escherichia coli* para generarlas, esta investigación sugiere fuertemente que la CSP recombinante es biológicamente activa y altamente inmunogénica en las principales cepas del complejo de histocompatibilidad y aumenta la posibilidad de que en humanos esta vacuna pueda inducir respuestas inmunitarias protectoras (33).

Años más tarde, en el Laboratorio de Inmunofisiología de Brasil analizaron polimorfismos en CSP de *P. vivax* que se veían influenciadas por la carga de parásitos y equilibrio de citocinas (32). Sus estudios indicaron que la variante VK247 está asociada con cargas parasitarias significativamente más altas y un perfil de citocinas proinflamatorias en comparación con la variante VK210. En conclusión, este estudio demuestra que los polimorfismos de PvCSP tienen efectos sistémicos en la respuesta inmune del huésped, y la investigación de la

inmunogenicidad de las proteínas del parásito puede proporcionar evidencias para una mejor comprensión de esta infección (32).

En el año 2019 se describieron y compararon la distribución de estos genotipos (VK247 y VK210) en mosquitos anofelinos de cuatro estados de la Amazonía brasileña y determinaron que el genotipo *P. vivax* VK210 se encontró ampliamente distribuido en esta zona, también manifestaron que este predominio puede estar relacionado con su diversidad genética. Estudios previos mostraron que *P. vivax* VK247 tiene un solo subtipo, mientras que *P. vivax* VK210 se clasificó en seis subtipos diferentes en México y Nicaragua y siete en China, lo que sugiere que diferentes polimorfismos pueden aumentar esta variante de adaptabilidad a diferentes áreas geográficas (34). Lo cual es relevante para el conocimiento de los principales transmisores de los parásitos de la malaria en diferentes sitios endémicos que se distinguen por factores geográficos, socioeconómicos y culturales (35).

En Colombia, por ejemplo, VK247 fue más prevalente en ciertas regiones debido a un aumento en el número de esporozoitos en *A. albimanus* en comparación con mosquitos infectados con el genotipo VK210, lo que sugiere que diferentes vectores pueden portar diferentes infecciones (31). Una hipótesis que refuerza este hallazgo es que el genotipo VK210 podría ser más inmunogénico que VK247, lo que puede inducir la respuesta inmune frente a VK210 y, en consecuencia, limitar la producción de esporozoitos VK210 y desencadenar la selección favorable de esporozoitos VK247, lo que puede resultar en una mayor frecuencia de este genotipo en algunas especies de mosquitos (31).

2.2 Malaria

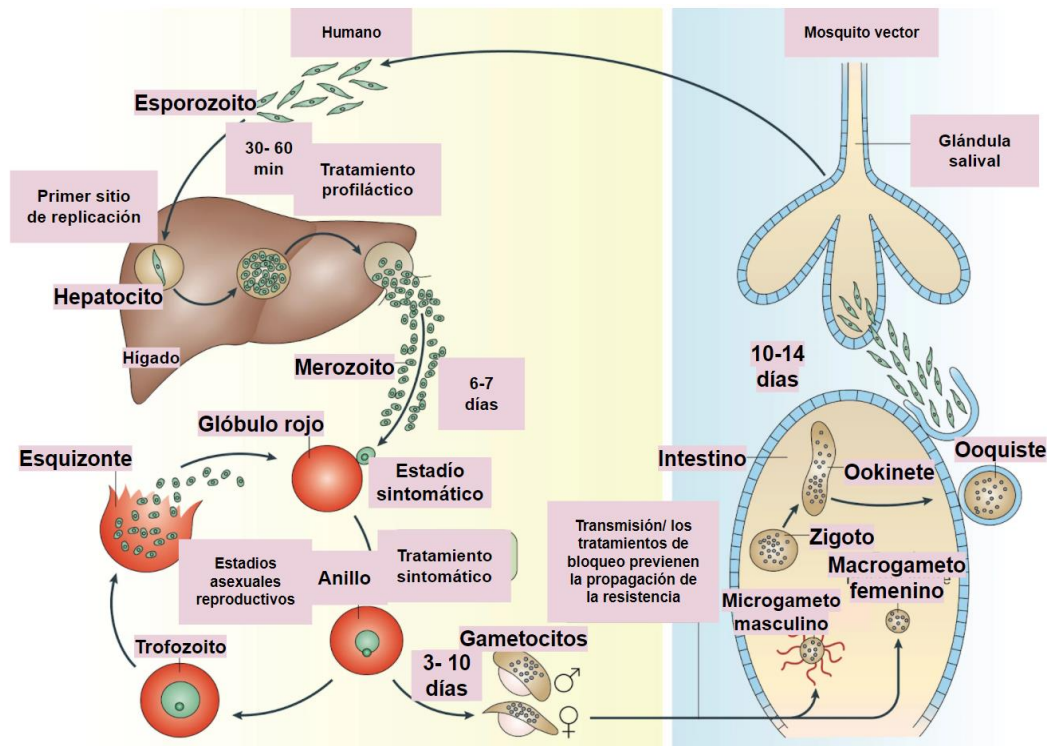
La malaria es una infección parasitaria que ha tenido un profundo efecto en la vida humana durante miles de años y sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más graves y potencialmente mortales (36), se maneja mediante una combinación de enfoques de control de vectores como la fumigación con insecticida y el uso de mosquiteros tratados con insecticida y medicamentos tanto para el tratamiento como para la prevención (37). El uso generalizado de terapias combinadas a base de artemisinina ha contribuido a una disminución sustancial del número de muertes relacionadas por malaria; sin embargo, la aparición de farmacorresistencia amenaza con revertir este progreso (37). De hecho, si la prevalencia de la malaria continúa en su curso de permanente aumento, la tasa de mortalidad puede duplicarse en los próximos años. Las estadísticas precisas se desconocen porque muchos casos ocurren en áreas rurales, donde

las personas no tienen acceso a hospitales o a recursos para garantizar cuidados de salud. Como consecuencia, la mayoría de los casos permanecen indocumentados (36).

2.3 Etiología y ciclo de vida

La enfermedad es causada por patógenos protozoarios del género *Plasmodium* para los cuales los humanos son los exclusivos huéspedes mamíferos. La malaria se transmite por la picadura de un mosquito hembra infectada por *Plasmodium*, del género *Anopheles* (37).

Los esporozoitos del parásito entran al individuo a través de la saliva del mosquito y migran al hígado por el torrente sanguíneo, donde se multiplican rápidamente dentro de los hepatocitos y se transforman en merozoitos que entran en el torrente sanguíneo (38). Allí infectan los eritrocitos y siguen multiplicándose, dando lugar a los trofozoítos, y finalmente a un número variable de merozoitos según la especie de *Plasmodium*, que provoca la ruptura del eritrocito (39). Algunos merozoitos se transforman en unas células circulares relativamente grandes que son gametocitos femeninos y masculinos y dejan de multiplicarse, aunque, por ejemplo, en *P. falciparum* son más grandes que el propio eritrocito, lo que ocasiona su ruptura (40).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 1. Ciclo de vida de la malaria

El ciclo inicia cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* infectado con el parásito pica al ser humano, los esporozoitos son inyectados y migran por el torrente sanguíneo al hepatocito, reproduciéndose en él y pasando a su estadio de merozoito, estos migran al torrente sanguíneo e infectan el glóbulo rojo o reticulocito transformándose en anillos seguido de trofozoitos y finalmente esquizonte, donde lisa el eritrocito. Una parte de los trofozoitos pueden diferenciarse a las formas sexuales del parásito denominados gametocitos. Un mosquito no infectado pica al ser humano e ingiere estos gametocitos, los cuales pasan por estadios de macrogametocito, microgametocito ookinete y ooquiste hasta convertirse en esporozoitos de nuevo y ubicarse en las glándulas salivales del mosquito hembra. Tomado de: Phillips MA, et al, *Malaria* (37).

2.4 Patogenia

El parásito evita el sistema inmunitario al permanecer intracelularmente en los hepatocitos y eritrocitos por enzimas existentes en la membrana celular eritrocitaria, aunque muchos eritrocitos parasitados se eliminan en el bazo. Para evitarlo, el parásito produce ciertas proteínas que se expresan en la superficie del eritrocito y causan su adherencia al endotelio vascular. Dichas proteínas son además altamente variables, y por lo tanto el sistema inmunitario no puede reconocerlas de forma efectiva, ya que cuando elabora un número de anticuerpos suficientes (al cabo de dos semanas o más), estos serán inútiles porque el antígeno ha cambiado (41).

El mecanismo patogénico predominante es la hemólisis de glóbulos rojos infectados con *Plasmodium* es liberar parásitos y endotoxina contra la malaria (un complejo de ADN de hemozoina y parásito), que desencadena el receptor Toll-like 9 (TLR9), un sensor de nucleótidos receptor involucrado en la respuesta inmune del huésped contra patógenos (42). Además, la membrana de los glóbulos rojos infectados se endurece y esta pérdida de forma contribuye a la obstrucción de los capilares, lo que tiene consecuencias potencialmente mortales en la malaria grave cuando se ven afectados los órganos vitales (43).

2.5 Cuadro clínico

La infección causada por cualquiera de las especies de *Plasmodium* en humanos puede desencadenar un cuadro febril acompañado de una variedad importante de síntomas, los cuales no son exclusivos de la malaria (43). En ocasiones, las infecciones pueden cursar de forma asintomática, generar enfermedad con muy poca sintomatología, con un cuadro clínico complicado o llegar a convertirse en una enfermedad mortal (44). Cuando la infección desencadena enfermedad sintomática, los principales síntomas de la malaria son fiebre, escalofrío y sudoración, acompañados o no de cefalea, emesis, diarrea, malestar general, mialgias, decaimiento, entre otros. La fiebre puede tener una periodicidad cíclica o presentar

un patrón irregular. Las manifestaciones clínicas se presentan habitualmente después de un periodo de incubación que puede ir entre 7-30 días posteriores a la picadura (44).

2.6 *Plasmodium vivax*

P. vivax es la segunda especie más importante de los parásitos del género *Plasmodium*, lo que pone en riesgo de infección a alrededor del 35% de la población mundial (45). Aunque las infecciones rara vez son mortales, las enfermedades clínicas pueden ser debilitantes e imponen importantes repercusiones sanitarias y económicas en las poblaciones afectadas (3). El impacto económico y la gravedad de la enfermedad por *P. vivax* se han subestimado (46), además, se sabe que la malaria *vivax* incapacita a personas de todas las edades, lo que resulta en episodios febriles repetidos, anemia grave, dificultad respiratoria y, a veces, malos resultados en el embarazo (3). Por eso mismo, se cree que es necesaria una comprensión más profunda de la epidemiología única de este parásito para lograr esfuerzos efectivos de control y eliminación de la malaria (45).

Las características biológicas y epidemiológicas imponen desafíos importantes en cuanto a la búsqueda de tratamiento y su estudio biológico (5). Esas características, como se ha mencionado, son la capacidad de tener estadio de hipnozoito en el hepatocito (4) y su alto potencial de transmisión causado por la producción alta y temprana de gametocitos, alta infectividad en mosquitos y su ciclo de desarrollo corto en el vector (5).

Según el artículo ‘‘*Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites*’’ (47) una de las limitaciones más grandes de *P. vivax* es su alto polimorfismo en diferentes proteínas que son cruciales en el momento de la invasión del esporozoito y el merozoito a las diferentes células del huésped. Así que, una herramienta importante para poder elaborar estrategias para disminuir la prevalencia de la enfermedad es estudiar esos polimorfismos (48).

Se cree que la capacidad de *P. vivax* para permanecer en circulación es posible debido al aumento de la plasticidad de los reticulocitos infectados que se observa a medida que se desarrollan los parásitos (3), lo que contrasta con el aumento de rigidez que se produce en los eritrocitos infectados por *P. falciparum* (49). La rigidez de los glóbulos rojos infectados por *P. falciparum* está relacionada con la citoadherencia y el secuestro, pero las proteínas del botón PfEMP1 que son el mediador clave de la variante antigénica están ausentes en *P. vivax* (3).

Por otro lado, la formación de hipnozoitos de *P. vivax* es una característica representativa en esta especie, estos hipnozoitos aunque probablemente son metabólicamente activos, no se dividen y permanecen inactivos durante semanas o meses, antes de reactivarse (3) y claramente, generar enfermedad de nuevo. Desafortunadamente, ha sido complicado obtener información de los mecanismos de reactivación del parásito en el estadio de hipnozoito pero, es cada vez más claro que las recaídas de tales hipnozoitos emergentes pueden contribuir hasta en un 80% de todas las infecciones por *P. vivax* en estadio sanguíneo (50). Todo esto se dificulta, más aún cuando no hay técnicas de diagnóstico que encuentren parásitos en el estadio de hipnozoito. Encontrar los portadores de hipnozoitos indetectables son una fuente potencial importante de infección por *P. vivax*, si no se trata adecuadamente, puede causar nuevas infecciones en estadio sanguíneo meses después de la infección primaria (3).

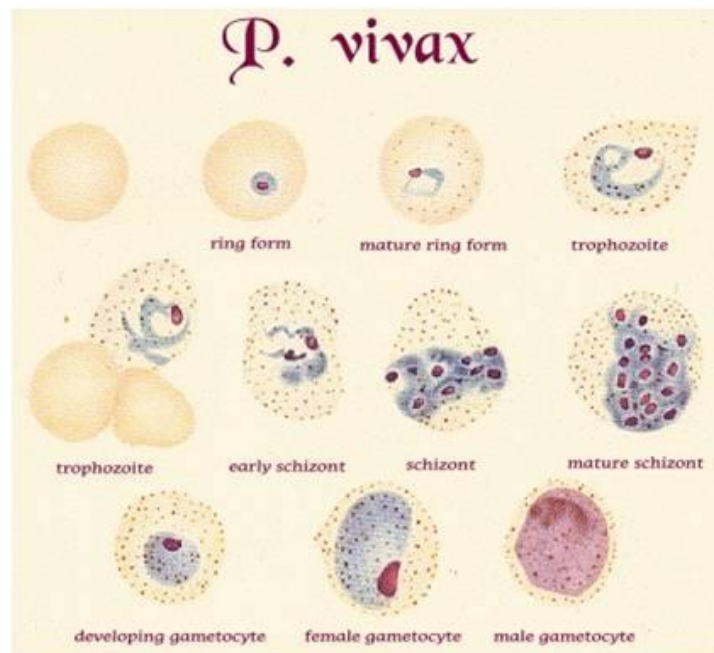


Figura 2. Estadios eritrocitarios de Plasmodium vivax.

Se observan los estadios de *Plasmodium vivax* en el reticulocito los cuales son: anillo, anillo maduro, trofozoito, esquizonte joven, esquizonte, esquizonte maduro, gametocito femenino y gametocito masculino. Tomado de: Scoop it, *Plasmodium spp* (51).

2.7 Proteína de unión al Duffy

La proteína de unión Duffy de *P. vivax* (*PvDBP*) es una proteína de 140 kDa secretada por micronemas, un orgánulo del parásito en el extremo apical del merozoito que invade los eritrocitos (52), está compuesta por 330 aminoácidos y contiene 12 cisteínas que se conservan entre diferentes dominios. Estos módulos ricos en cisteína reconocen diversos receptores de la superficie de la célula huésped durante la patogénesis (53). El dominio DBL se determinó

mediante cristalografía de rayos X y se caracterizó como un módulo monomérico totalmente helicoidal que contiene 12 hélices repartidas en tres subdominios distintos (SD1-SD3) que están estabilizados por puentes disulfuro intra-SD (53) y los residuos esenciales e invariantes necesarios para el reconocimiento de DARC en reticulocitos humanos se identificaron dentro de una región en SD2 (53). El objetivo de desarrollar PvDBP como una vacuna dirigida contra el estadio sanguíneo asexual de *P. vivax* es provocar una respuesta de anticuerpos que inhiba la adhesión del parásito a los reticulocitos humanos DARC positivos y, por lo tanto, anule la invasión de merozoitos (11).

Como se sugiere que la invasión de reticulocitos humanos por *P. vivax* requiere la interacción entre DARC y PvDBP, la interrupción total o parcial del acceso al antígeno Duffy reduce la capacidad del parásito de invadir nuevas células y puede limitar la parasitemia por *P. vivax*. Sin embargo, un informe reciente ha descrito la transmisión de *P. vivax* a una población negativa de Duffy en Kenia, lo que insinúa que *P. vivax* podría tener vías de invasión alternativas, aunque todavía no se han identificado otros medios de invasión (54). La dependencia de *P. vivax* de la interacción con el antígeno Duffy para el paso crucial de la formación de la unión durante la invasión brinda una oportunidad única para el desarrollo de una estrategia de intervención efectiva contra la infección por *P. vivax* (55). El análisis de PvDBP mostró que esta región contiene una secuencia altamente polimórfica y podría interferir con su uso en el desarrollo de vacunas. Por lo tanto, comprender la naturaleza y el origen de este polimorfismo presente en este antígeno entre *P. vivax* es una característica clave para el desarrollo de vacunas.

2.8 Proteína del circumsporozoito

La proteína del circumsporozoito (CSP) tiene aproximadamente 400 aminoácidos y se encuentra en todos los parásitos de la malaria, es la principal proteína de la superficie celular del esporozoito *Plasmodium* (56). Esta proteína juega muchos papeles, incluida la invasión de las glándulas salivales en los mosquitos, la maduración de esporozoitos y la invasión de hepatocitos en humanos (57). Tiene tres dominios distintos: un dominio repetitivo central con un número variable de repeticiones en tándem y dominios altamente conservados en los extremos amino y carboxilo. Informes anteriores clasificaron esta secuencia en tres tipos según la composición de aminoácidos de las repeticiones: variante o VK247, común o VK210, y *P. vivax* – like (31).

Ruth S. Nussenzweig y Victor Nussenzweig fueron quienes encontraron por primera vez la proteína del Circumsporozoito en la superficie de los esporozoitos de *Plasmodium berghei* y posteriormente, fue identificada en otras especies de *Plasmodium* y se considera una proteína importante para la creación de vacunas antipalúdicas, ya que podrían evitar la invasión del parásito a la célula hepática. Varios investigadores han desarrollado varios anticuerpos monoclonales contra CSP de diversas especies de *Plasmodium*, y se ha demostrado que la mayoría de ellos reconocen el dominio de repetición inmunodominante de CSP (58) que podrían inactivar la acción del parásito in vivo e in vitro. De hecho, también se han producido anticuerpos monoclonales en modelos del vector y en mamíferos como ratones. Los anticuerpos contra la CSP ahora se consideran una herramienta no solo para proteger a los humanos de la infección por malaria, sino también para bloquear la transmisión de la malaria (59).

2.9 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Los Sistemas de expresión de proteínas están diseñados para obtener cantidades de proteínas con características homólogas a las nativas para llevar a cabo estudios estructurales, funcionales, de localización o interacción entre proteínas (60). La producción de proteínas recombinantes es una de las aportaciones más importantes de la biotecnología moderna (61). Es un proceso que incluye la construcción de un vector, transfección de las células con dicho vector, traducción a proteína de dichos genes utilizando una célula huésped y por último, realizar un lisado celular para obtener la proteína de interés (60).

En el presente trabajo se utilizará el Sistema de expresión de proteínas por medio de *Baculovirus* “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System” desarrollado por Invitrogen (62).

2.9.1 Sistema de expresión de Baculovirus

Los *Baculovirus* son virus patógenos de insectos ampliamente empleados a nivel mundial como bioinsecticidas para el control de diferentes plagas de importancia agrícola y más recientemente como vectores de expresión de proteínas y vectores para terapia génica. Una de sus características principales es su alta especificidad de hospedero que incluye un rango muy estrecho de especies de insectos, que a menudo pertenecen a la misma familia (63).

Los virus de la familia *Baculoviridae* poseen genomas circulares de ADN de doble cadena que varían en tamaño de 88 a 200 pb y codifican hasta 180 genes (64). Estos van encerrados en una

cubierta protectora de proteína, denominada cápside protéica que tiene la forma de un bastón (65). Su genoma se encuentra empacado en viriones con forma de bastón y ocluidos dentro de una matriz proteica conocida como cuerpo de inclusión (CI), que los protege de las condiciones ambientales (64), lo que permite que los viriones sigan siendo infecciosos por mucho tiempo. Las regiones no codificantes del genoma constituyen menos del 10% de éste y contienen regiones promotoras de los genes, regiones no traducidas, regiones homólogas que son ricas en secuencias repetidas y genes con ORFs repetidos (65).

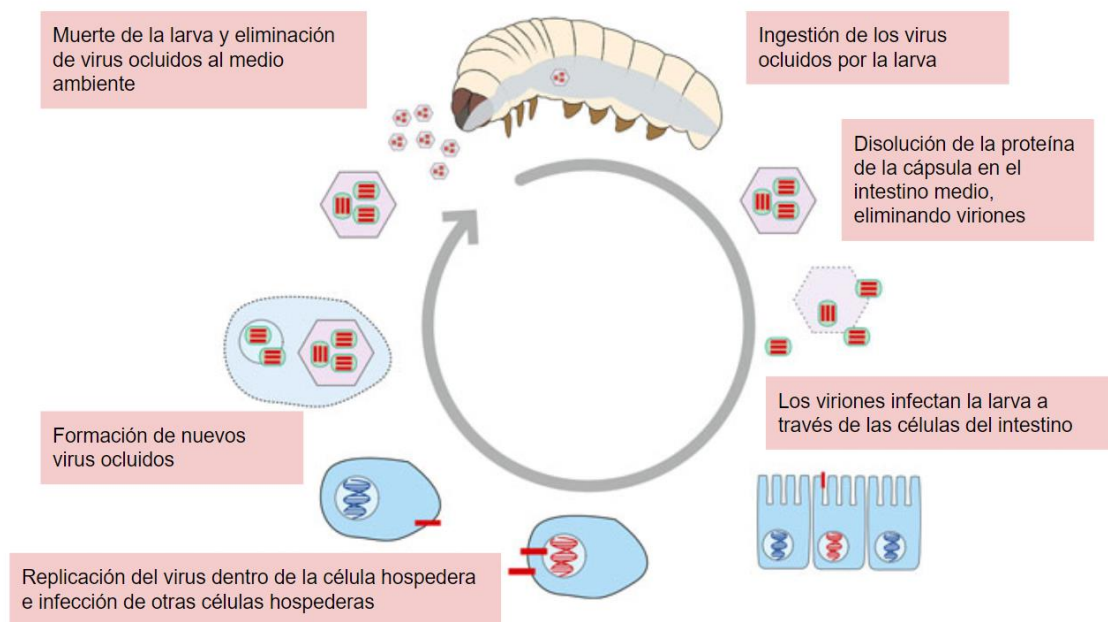


Figura 3. Ciclo de vida de los *Baculovirus*.

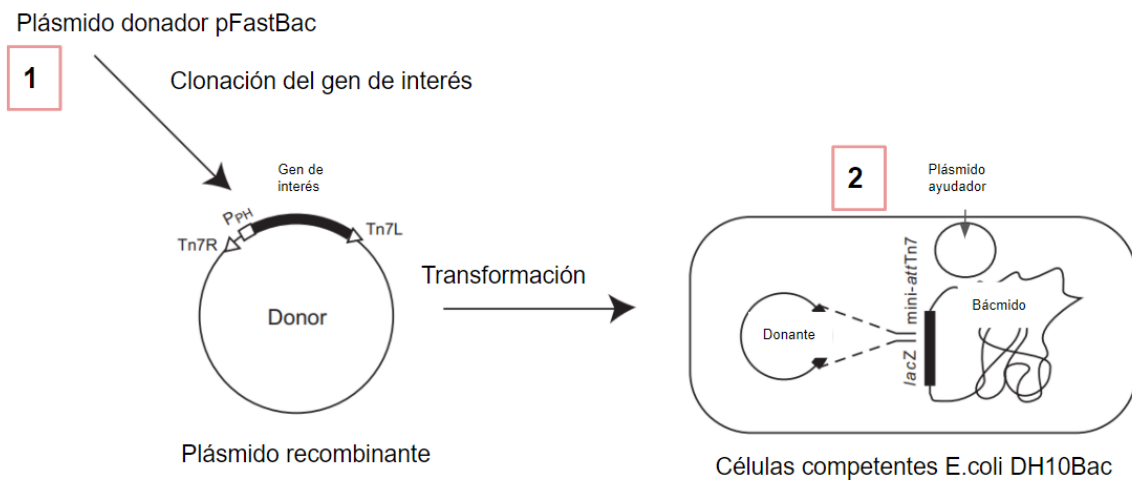
El virus debe ser ingerido por las larvas de insectos. Una vez en el intestino medio del huésped, la cápsula de proteína de los *Baculovirus* se disuelve y liberan viriones, que infectan las células del intestino medio del insecto. Las células del intestino medio infectadas comienzan a producir viriones que se liberan e infectan más células huésped. Debido a la alta infección de numerosas células huésped, unos días después, las larvas mueren y millones de nuevos virus se liberan al medio ambiente. Tomado de: Soluciones ecológicas, procampo (66).

El sistema de expresión basado en *Baculovirus*, conocido como BEVS (*Baculovirus* Expression Vector System), fue desarrollado en los años 80 y desde entonces ha permitido la expresión de gran diversidad de proteínas recombinantes en cultivos celulares de insectos, de una manera más rápida y económica que empleando otros sistemas de expresión (67). Dos miembros prototipo del género *Alphabaculovirus* se utilizan ampliamente en el BEVS como vectores para producir proteínas heterólogas en células de insectos o larvas de gusanos de seda: a saber, *Autographa californica* multiple nucleopolihedrovirus (AcMNPV) y, en menor medida, *Bombyx mori* nucleopoliedrovirus (BmNPV) (68). Cualquiera de los dos puede expresar genes extraños bajo el control de promotores muy tardíos muy expresados, incluidos

los promotores de polihedrina (polh) y polipéptido fibroso de 10 kDa (p10) (68). Las líneas celulares de insectos lepidópteros que se utilizan para propagar el *Baculovirus* recombinante son provenientes de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 y Sf21) y *Trichoplusia ni* (Tn5, comercialmente conocido como High Five™), las cuales crecen de manera óptima a 27 ° C y no requieren CO2 (68).

Hoy en día existen cientos de proteínas producidas mediante esta tecnología, y muchas son proteínas humanas que han sido aprobadas para su uso clínico con fines terapéuticos, como por ejemplo las vacunas (67). Pero las proteínas recombinantes tienen otras muchas aplicaciones, ya que también son ampliamente usadas en investigación como controles en experimentos de laboratorio, para mapear y secuenciar genes, o para producir sondas y anticuerpos (67).

Los sistemas de *Baculovirus* tradicionales requieren la purificación y amplificación de un sobrenadante viral de bajo título inicial. En contraste, el sistema de expresión de *Baculovirus* Bac-to-Bac, el cual se usó en este proyecto es más rápido y fácil porque la tecnología se basa en la generación de *Baculovirus* recombinante por transposición específica del sitio en *E. coli* en lugar de la recombinación homóloga en células de insecto, lo que a menudo resulta en títulos bajos (62).



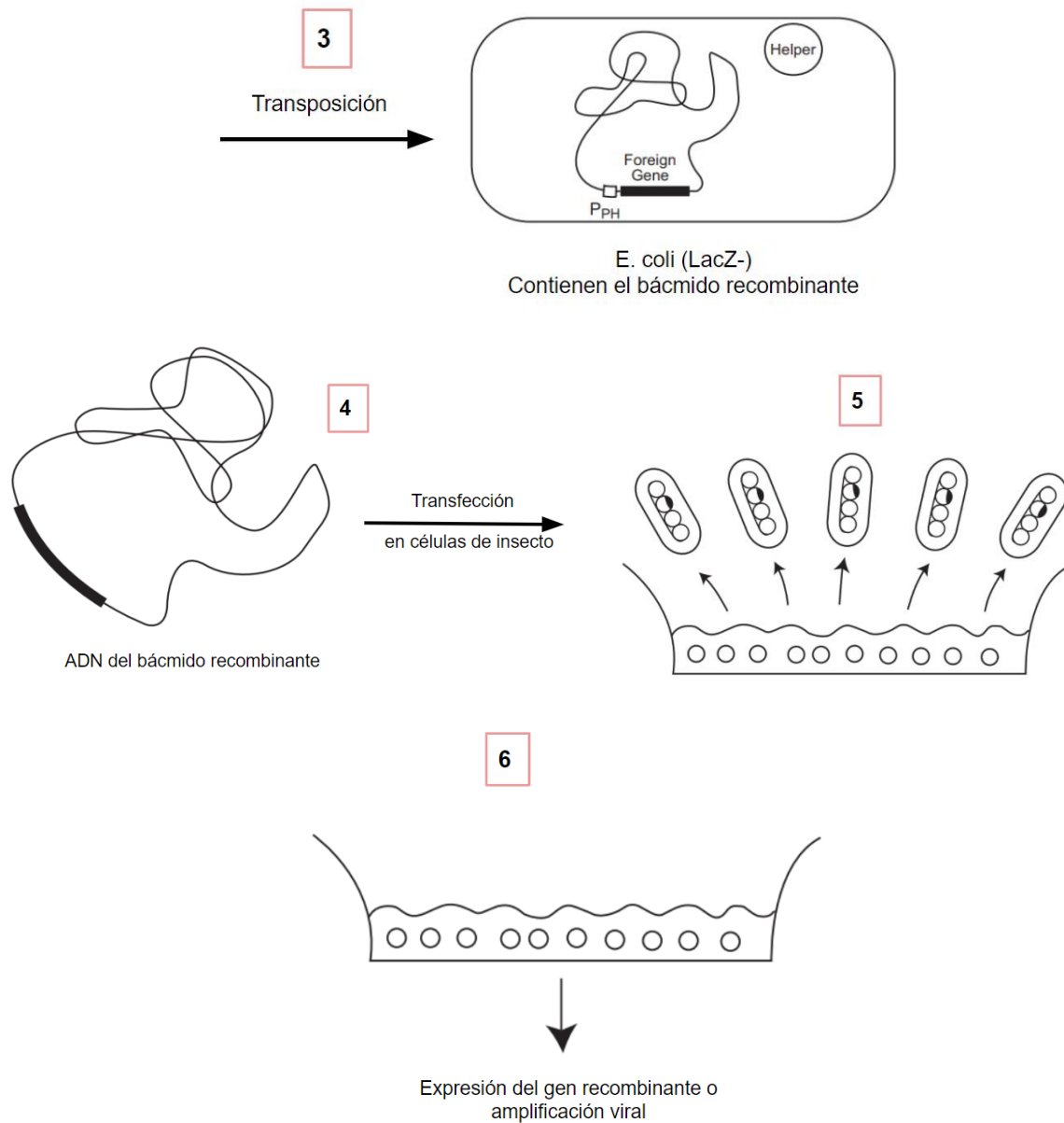


Figura 4. Diagrama de Bacto-Bac® System.

1. Los genes de interés se incorporan al plásmido donante por medio de enzimas de restricción. 2. Se realiza una transformación en células *E. coli DH10Bac*. 3. Los genes que codifican para las proteínas de interés se incorporan al genoma del *Baculovirus* que se encuentra en el citoplasma de las *E. coli DH10Bac*. 4. Se realiza la extracción de ADN del báculo recombinante. 5. El báculo recombinante es transfectado en células de insecto. 6. Obtención de proteínas recombinantes. Tomado de: Bac to bac Expression System (62).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Producir b́acmidos recombinantes que contengan los principales ant́igenos del estadio pre-eritrocito (CSP) y eritroćitico (DBP-RII) de *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos espećficos

- Obtener a partir de DNA genómico las regiones que contienen el ectodominio de *PvCSP* (*EcPvCSP*) y la regi3n II de *PvDBP* (*PvDBP-RII*).
- Diseñar y construir plásmidos donadores recombinantes que expresen los genes que codifican para *EcPvCSP* y de *PvDBP-RII*.
- Analizar las secuencias consenso de *EcPvCSP* y de *PvDBP-RII* de la cepa VCG-1 con la cepa de referencia Sal-1 de *P. vivax*.

4. DISEÑO METODOL3GICO

4.1 Técnicas y procedimientos

Para el desarrollo de la fase 1 del proyecto, a partir de ADN genómico de la cepa VCG-1 de *Plasmodium vivax* se realizó una PCR amplificando las regiones de inter3s desde el nucle3tido 66 al 1062 de la protéina del Circumsporozóito y de los nucle3tido 591 al 1572 de la protéina de Uni3n al Duffy, por medio de cebadores dise±ados anteriormente. Se realiz3 un tratamiento enzimático con enzimas de restricci3n para integrar los genes de inter3s al plásmido pFastBacHT-C. El producto de la ligaci3n fue transformado en bacterias *E. coli* JM109 correspondiente a la fase 2. Estas c3lulas fueron clonadas y seleccionadas, se realiz3 una PCR de colonia para verificar los genes de inter3s en las bacterias. Las colonias recombinantes fueron cultivadas para realizar una extracci3n de ADN plasmídico. El ADN fue enviado a secuenciar para posteriormente analizarlo con la cepa de referencia Sal-1 e identificar cambios presentados en el genoma. Para la fase 3, se realiz3 una transformaci3n en c3lulas *E. coli* DH10Bac, se clonaron y se realiz3 una selecci3n de las colonias recombinantes por PCR, se cultivaron las c3lulas y extrajo el b́acmido recombinante como explica la Figura 5.

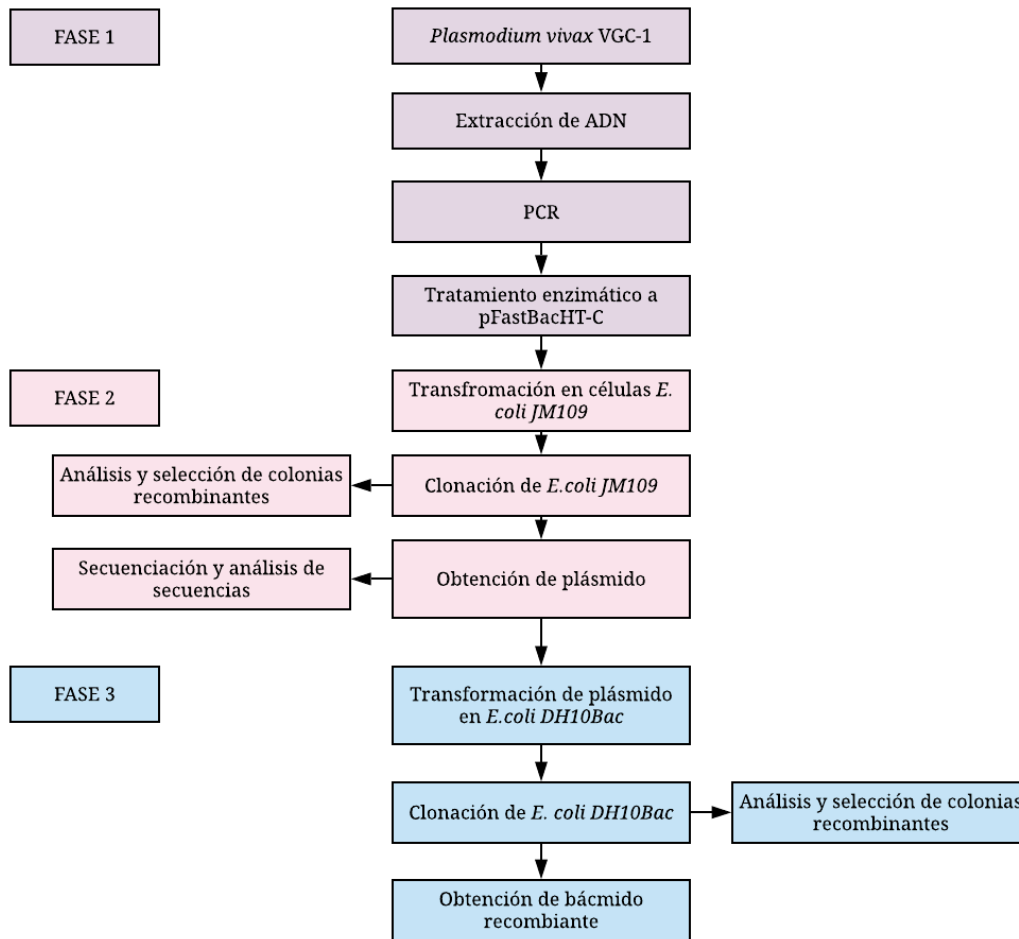


Figura 5. Metodología para la obtención de báculo recombinantes del EcPvCSP y PvDBP-RII. El proyecto se divide en tres fases: Fase 1: producción de plásmido recombinante. Fase 2: producción de báculo recombinante. Fuente: Creación propia

4.1.1 Diseño de cebadores

Partiendo de la base de datos Plasmo DB se tomó la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican para PvDBP-RII (PVX_110810) y EcPvCSP (PVX_119355) de la cepa PvSal-1 y se utilizaron como plantilla para diseñar dos pares de cebadores (tabla 1).

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de PvDBP-RII y EcPvCSP.

PvDBP-RII-Forward	5'-CGG GATCC CTACG ATCTCTAGTGCTATTATAAA-3
PvDBP-RII-Reverse	5'-GC TCTAGA TG TCCACATTTGTCACA ACTTC-3'
PvCSP-Forward	5'-CG GGATCC CT

	GGGCACAATGTAGATCTGTC-3'
<i>PvCSP-Reverse</i>	5'-GC TCTAGA T ACACTTATCCATTGTACAAACAT-3'

En negrilla se muestran los sitios de restricción para las enzimas BamHI en los cebadores directos y XbaI para los cebadores reversos. Estos sitios de restricción fueron usados para clonar los productos en el plásmido pFastBac-HTC tratado con las mismas enzimas de restricción.

4.1.2 PCR para amplificación de genes

A partir del ADN de la cepa *PvVCG-1* (Vivax Colombia Guaviare-1) se amplificaron las regiones que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* mediante PCR con sus respectivos cebadores y las condiciones de reacción mostradas en la tabla 2. Para la amplificación de *EcPvCSP* se utilizó 0.5 µl de la enzima polimerasa de alta fidelidad Kodak y para la amplificación de *PvDBP-RII* se utilizó 0.5 µl de la enzima polimerasa de alta fidelidad HiFi.

Tabla 2. Condiciones de amplificación de *EcPvCSP*

	<i>EcPvCSP</i>	<i>PvDBP-RII</i>
Desnaturalización inicial	95°C x 3 minutos	98°C x 30 segundos
Desnaturalización	95°C x 30 segundos	98°C x 10 segundos
Anillamiento	54°C x 30 minutos	54°C x 30 minutos
Extensión	72°C x 2 minutos	72°C x 30 segundos
Extensión final	72°C x 5 minutos	72°C x 10 minutos

Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión para visualizar el material genético amplificado y se purificó por medio del Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron los productos purificados que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP-RII*.

4.1.3 Tratamiento enzimático y ligación

La incorporación de los genes de *PvDBP-RII* y *EcPvCSP* se realizó mediante enzimas de restricción. Para *PvDBP-RII* y *EcPvCSP* se utilizaron 8µl de ADN, 1.5µl de enzima BamHI,

2µl de la enzima XbaI y 1.5 µl de Buffer y se llevó al termociclador por 20 minutos a 65°C. El mismo tratamiento enzimático fue realizado al vector pFastBac-HTC.

El vector pFastBac-HTC y los productos de PCR tratados enzimáticamente fueron purificados y utilizados para llevar a cabo la reacción de ligación. Para esto se utilizó la enzima T4 ligasa durante 16 horas a 16°C.

El plásmido pFastBac-HTC está compuesto de 4858 nucleótidos y contiene diferentes elementos entre estos: el promotor del gen de la poliedrina que permite la expresión eficiente y de alto nivel de la proteína recombinante en células de insecto, una cola de 6 histidinas que permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, un sitio de reconocimiento del virus del grabado del tabaco que permite la eliminación de la etiqueta N-terminal de la proteína recombinante usando proteasas, un sitio múltiple de clonaje que permite la clonación mediada por enzimas de restricción del gen de interés, una secuencia señal de poliadenilación del virus SV40 que permite una terminación eficiente de la transcripción y poliadenilación del ARNm, elementos Mini Tn7 que permiten sitios específicos transposición del gen de interés en el genoma del *Baculovirus*, un origen de replicación del fago F1 que permite la replicación y empaquetamiento de ADN monocatenario en partículas virales, un ori pUC que permite la replicación y el mantenimiento de gran cantidad de copias de plásmido en *E. coli* y por último genes de resistencia para la gentamicina y la ampicilina (62).

4.1.4 Transformación en bacterias *E. coli* JM109

Se tomaron 4µl de la reacción de ligación y 50µl de tampón KCM para realizar la transformación de 50µl células *E. coli* JM109. Se dejó a 4°C por 20 minutos y se incubaron en baño serológico a 42°C por 45 segundos, después se pusieron 5 minutos en refrigeración para agregarles 250µl de Medio SOC y se incubó por 1 hora y media en agitación a 37°C. Pasado este tiempo, las bacterias fueron plaqueadas sobre agar Luria Bertani con ampicilina (100µg/ml). Las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C.

El tampón KCM hace que las células bacterianas diana sean competentes para absorber fragmentos desnudos de ADN extraño (69). El medio SOC es un medio rico en nutrientes para la preparación y transformación de células competentes. La transformación requiere la

perforación de la bacteria para permitir la introducción de ADN extraño dentro de la célula. Para sobrevivir a este proceso, las células competentes necesitan un medio rico isotónico (70).

4.1.5 Análisis y selección de colonias recombinantes

A partir de las colonias pequeñas puntiformes que crecieron en el agar Luria Bertani con antibiótico de selección, se llevaron a cabo PCRs de colonia utilizando los cebadores mencionados en tabla 3 y las condiciones de amplificación mencionadas en la tabla 4. Para las PCRs de *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* se añadió 0.5 µl de enzima polimerasa BioTaq de Boline.

Tabla 3. Cebadores utilizados para PCR, confirmación de colonias recombinantes *E. coli* JM109.

<i>PvDBP-RII-Forward</i>	5'-ACGATCTCTAGTGCTATTATAAA-3
<i>PvDBP-RII-Reverse</i>	5'-TCCACATTTGTCACAACCTTC-3'
<i>EcPvCSP-Forward</i>	5'-GGGCACAATGTAGATCTGTC-3'
<i>EcPvCSP-Reverse</i>	5'ACACTTATCCATTGTACAAACAT-3'

Tabla 4. Condiciones para PCR, confirmación de colonias recombinantes *E. coli* JM109.

Desnaturalización inicial	95°C x 10 minutos
Desnaturalización	95°C x 1 minuto
Anillamiento	60°C x 1 minuto
Extensión	72°C x 3 minutos
Extensión final	72°C x 10 minutos

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para visualizar los resultados de la PCR de colonia. Se realizó la selección de las colonias y gliceroles con 200µl de glicerol y 800µl de las células *E. coli* JM109.

4.1.6 Purificación de los plásmidos y verificación mediante tratamiento enzimático.

A partir de los resultados de la PCR de colonia, se seleccionaron cuatro colonias por cada una de las regiones amplificadas. Cada una de las colonias seleccionadas fue crecida en 10mL de medio Luria Bertani. El ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit Zyppy Plasmid

Miniprep Kit, Zymo Research de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó un buffer de lisis y un buffer de neutralización, por medio de centrifugación se obtuvo un sobrenadante con el plásmido, se realizaron lavados con Buffer de lavado y por último se eluyó obteniendo el plásmido purificado y se almacenó a -4°C para posteriores ensayos.

Para evaluar la correcta orientación de cada una de las regiones clonadas se hizo una restricción enzimática de los plásmidos recombinantes purificados. Para los plásmidos recombinantes con *EcPvCSP*, se utilizaron $6\mu\text{l}$ de plásmido, $1.5\mu\text{l}$ de enzima de restricción BsrGI y $1.5\mu\text{l}$ de Buffer 3.1 y se incubó a 37°C toda la noche. Para los plásmidos que contienen *PvDBP-RII* se realizó el mismo procedimiento, pero con $1\mu\text{l}$ de la enzima de restricción KpnI y $1\mu\text{l}$ de Buffer 3.1. Para visualizar el tratamiento enzimático del plásmido con *PvDBP-RII* se puso un control negativo (plásmido sin tratamiento) para las colonias seleccionadas.

4.1.7 Análisis de secuencias plasmídicas

Los plásmidos purificados que contenían *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* fueron enviados a secuenciar a MacroGen-Korea y los electroferogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa CLC DNA Workbench. A partir de los análisis, se seleccionó un plásmido para *PvDBP-RII* denominado (pFastBacHT-C-*PvDBP-RII*) y otro plásmido para *EcPvCSP* (pFastBacHT-C-*EcPvCSP*).

Mediante un alineamiento múltiple en el programa Clustal Omega se compararon las diferencias entre las secuencias de nucleótidos y de proteínas de *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* derivados de la cepa de referencia *PvSal-1* y la obtenida en este trabajo proveniente de la cepa VCG-1 de origen colombiano.

4.1.8 Transformación en bacterias *E.coli* DH10Bac

Los plásmidos pFastBacHT-C-*PvDBP-RII* y pFastBacHT-C-*EcPvCSP* fueron usados para transformar bacterias competentes *Escherichia coli* DH10Bac.

Brevemente, se tomaron $100\mu\text{l}$ de células DH10Bac y se mezclaron con $3\mu\text{l}$ de cada uno de los plásmidos recombinantes. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a bajas temperaturas y se hizo un choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido de incubación por 2 minutos en refrigeración. Posteriormente, se adicionaron $300\mu\text{l}$ de medio SOC y se incubó por 4 horas en agitación constante a 37°C . Luego de la incubación, se tomaron $100\mu\text{l}$ de la transformación y

se plaquearon sobre agar Luria Bertani que contenía gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml), kanamicina (50µg/ml), IPTG (40µg/ml), Xgal (100µg/ml). Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C.

Las células *E. coli* DH10Bac tienen en su citoplasma el genoma de *Baculovirus* (bácmido) llamado bMON14272, que a su vez posee un replicón mini-F con un número bajo de copias, un gen de resistencia a la kanamicina, un segmento de ADN que codifica el péptido LacZα de un vector de clonación basado en pUC el cual tiene un sitio de unión para el transposón bacteriano (miniattTn7). El bácmido puede complementar una delección LacZ para formar colonias azules (LacZ +) en presencia de sustrato cromogénico Xgal y el inductor IPTG. El bácmido recombinante se genera mediante la transposición de un elemento miniTn7 desde el plásmido donante PfastBac-HT-C al sitio de unión miniTn7 en el bácmido, las enzimas de transposición son proporcionadas por un plásmido ayudador que tienen las *E. coli* DH10Bac en su citoplasma. Este plásmido ayudador (pMON7124) codifica para la transposasa y de igual manera confiere resistencia a la tetraciclina (62).

4.1.9 Análisis y selección de colonias recombinantes

Se seleccionaron colonias recombinantes de color blanco (donde ocurrió la recombinación) y se confirmó su color haciendo un repique sobre agar Luria Bertani que contenía gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml), kanamicina (50µg/ml), IPTG (40µg/ml), Xgal (100µg/ml) y se dejaron en crecimiento por 24 horas. Aquellas colonias completamente blancas fueron seleccionadas para un proceso de amplificación con 0.5 µl de la enzima BioTaq polimerasa, usando los cebadores mencionados en la tabla 5 y siguiendo las condiciones de amplificación de la tabla 6.

Tabla 5. Primers utilizados para PCR de colonias recombinantes en *E. coli* DH10Bac.

Primer	Secuencia
pUC/M13 Forward	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse	5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'

Tabla 6. Condiciones para PCR de colonias recombinantes en *E. coli* DH10Bac.

Desnaturalización inicial	93°C x 3 minutos
Desnaturalización	94°C x 45 segundos
Anillamiento	55°C x 45 segundos
Extensión	72°C x 5 minutos
Extensión final	72°C x 7 minutos

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para visualizar la amplificación de PCR y así elegir las colonias que cumplieran con el peso molecular esperado para cada gen. Las colonias seleccionadas se cultivaron en 100 ml de agar Luria Bertani con gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml), kanamicina (50µg/ml) en agitación por 12 horas, para posteriormente, extraer el bÁcrido recombinante.

4.1.10 Purificación de los bÁcridos recombinantes y cuantificación de DNA

A partir de la PCR de colonia se seleccionó un bÁcrido recombinante para *Pv*DBP-RII denominado bMON14272-*Pv*DBP-RII y uno para *EcPv*CSP denominado bMON14272-*EcPv*CSP. La purificación de los bÁcridos recombinante se llevó a cabo con el Kit PureLink, HiPure Plasmid Midiprep de Invitrogen según recomendaciones del fabricante. Brevemente, 100mL de medio Luria Bertani que contiene gentamicina (7µg/ml), tetraciclina (10µg/ml), kanamicina (50µg/ml) fueron inoculadas con cada una de las colonias de *Escherichia coli* DH10Bac recombinantes y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación.

Una columna HiPure Midi fue equilibrada con 10 ml de buffer de equilibración. El cultivo fue centrifugado a 4.000 g por 10 minutos, posteriormente se agregó 4 ml de buffer de resuspensión hasta que el cultivo estuviese homogéneo. Se agregó 4 ml de buffer de lisis y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó 4 ml de buffer de precipitación, el lisado fue centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue añadido en la columna y permitió que la solución descendiera por gravedad.

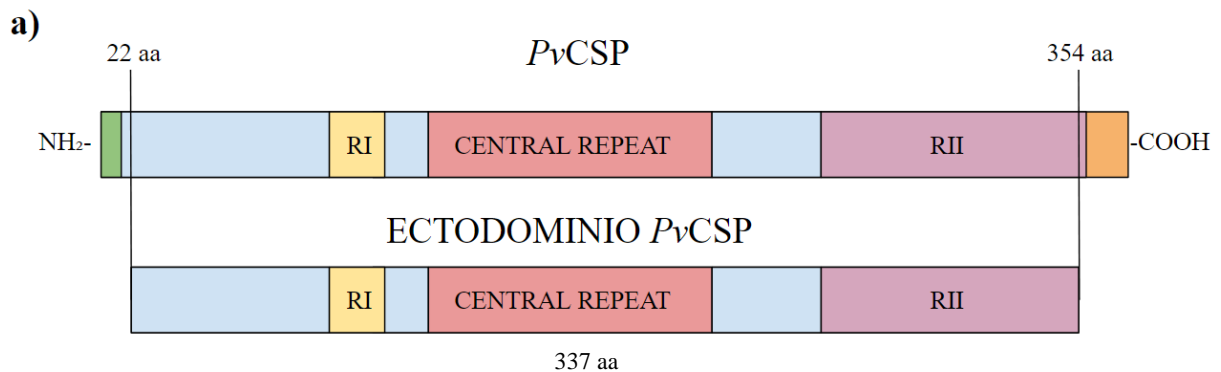
Se agregó 10 ml de buffer de lavado a la columna dos veces y se descartó el sobrenadante. Se procedió a adicionar 5 ml de buffer de elución a la columna, la elución contenía el ADN

purificado. Para precipitar el DNA se agregó 3.5 ml de isopropanol y fue centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y agregó 3 ml de etanol al pellet, se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Por último se dejó secar el pellet por 10 minutos y se resuspendió en 100µl de buffer TE. El ADN fue almacenado a -20°C.

Los báculos recombinantes bMON14272-*PvDBP*-RII y bMON14272-*EcPvCSP* se cuantificaron a una longitud de onda de λ 260 en el espectrofotómetro MultiscanGo. La pureza de los báculos se determinó calculando la relación de la absorbancia de 260/280.

5. RESULTADOS

La proteína *PvCSP* está compuesta por 378 aminoácidos y contiene un péptido señal hacia el extremo amino terminal, un ectodominio, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática. El ectodominio está compuesto de tres regiones: región I (extremo amino terminal), región central de repetición (VK210-(GDRA(A/D)GQPA) o VK247 (ANGA(G/D)(N/D)QPG) y una región carboxiterminal que contiene la región II (32). Para este proyecto se amplificó únicamente el ectodominio de la proteína *PvCSP* que comprende desde el aminoácido 22 al 354 (Figura 6a).



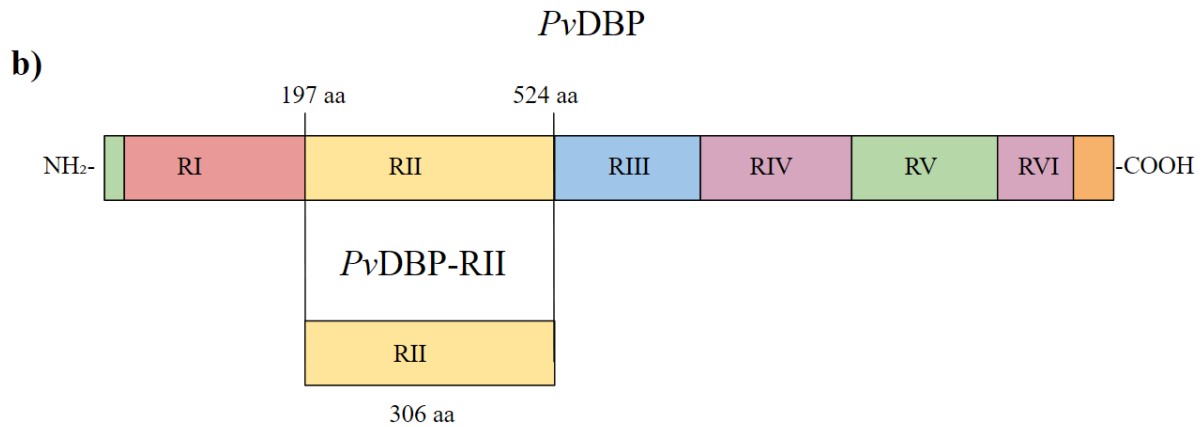


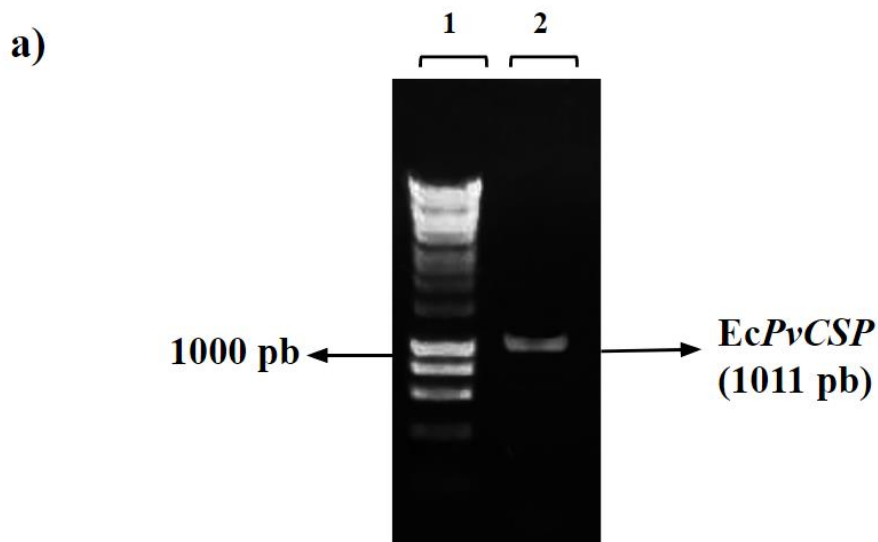
Figura 6. Representación esquemática de *PvCSP* y *PvDBP*-RII

a) Se observa el esquema de *PvCSP* y de *EcPvCSP*, donde se obtiene una proteína de 337 aminoácidos.
 b) Se observa el esquema de *PvDBP* con sus regiones y la región II de interés donde se obtiene una proteína de 306 aminoácidos. Fuente: Creación propia

Por su parte, la proteína *PvDBP* está compuesta por 1071 aminoácidos presenta en su estructura primaria un péptido señal hacia el extremo amino terminal, seguido de seis regiones (RI a RVI) y un dominio transmembranal hacia el extremo carboxiterminal (71). Para este proyecto se amplificó la región II (residuos 197 a 524), la cual ha sido extensamente estudiada y presenta interacción con el antígeno Duffy (Figura 6b).

5.1 Obtención de los genes que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP*-RII por PCR

Se amplificaron las regiones que codifican para *EcPvCSP* y para *PvDBP*-RII obteniendo productos de aproximadamente 1.011pb para el fragmento génico que codifica para *EcPvCSP* (Figura 7a) y de aproximadamente 918pb para *PvDBP*-RII (Figura 7b)



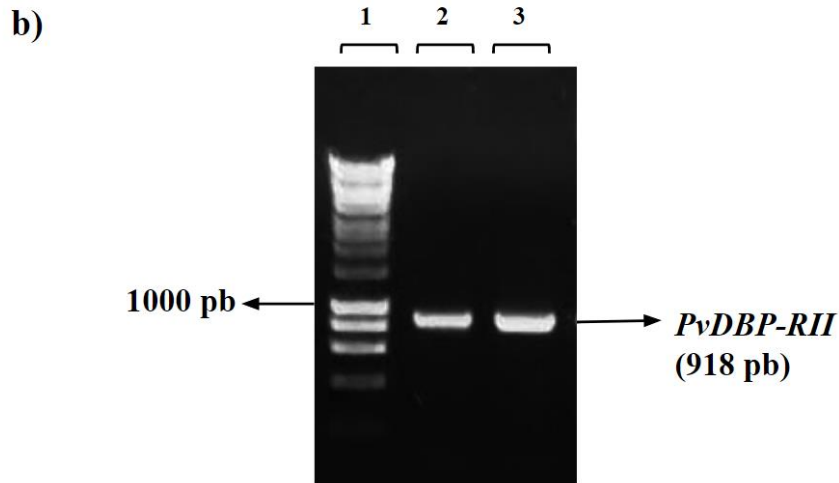


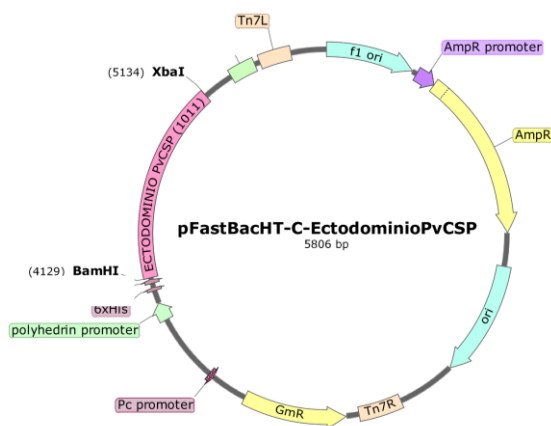
Figura 7. Amplificación de los genes que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP-RII*.

Se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular donde se evidencia el fragmento de interés. a) Amplificación de *EcPvCSP*. En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular Hyperladder II, en el carril 2 se encuentra la región amplificada de *EcPvCSP* con un peso molecular de 1011 pb. b) Amplificación de *PvDBP-RII*. En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hyperladder II, en el carril 2 y 3 se encuentra *PvDBP-RII* amplificada con un peso molecular de 918 pb.

5.2 Los fragmentos génicos que codifican *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* fueron clonados exitosamente en el vector pFASTBacHT-C

Una vez los productos que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* fueron purificados, se trataron con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* para ser insertados en el sitio múltiple de clonaje del vector pFastBacHT-C en marco con una etiqueta de histidinas al extremo amino terminal. En la Figura 8 se muestran los plásmidos completos que se construyeron mediante el proceso de ligación, utilizando la enzima T4 ligasa.

a)



b)

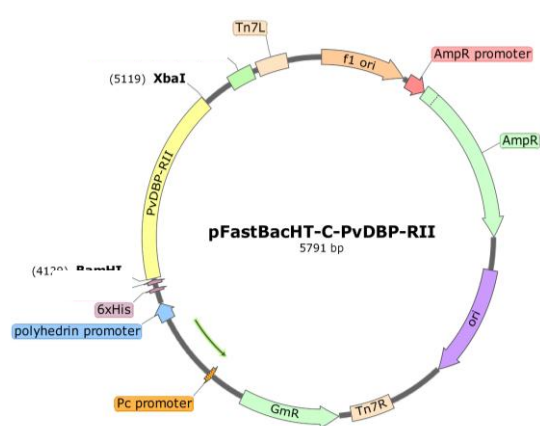


Figura 8. Plásmido pFastBacHT-C-EcPvCSP y pFastBacHT-C-PvDBP-RII.

Se visualiza el plásmido pFastBacHT-C a) con los genes que codifican para EcPvCSP, formando un plásmido de 5806 pb y b) con los genes que codifican PvDBP-RII, formando un plásmido de 5791 pb. El plásmido pFastBacHT-C se compone de los elementos mencionados en el punto 3.5.4. Ori: Origen de replicación. Tn7L/R: Elementos de transposición. AmpR promotor: Gen promotor de resistencia a la ampicilina. AmpR: Gen de resistencia a la ampicilina. GmR: Gen de resistencia a la gentamicina. 6xHis: Tag de 6 histidinas. Polyherin promotor: Promotor de la polihedrina. Fuente: Creación propia

La ligación fue usada para transformar bacterias *E. coli* JM109 mediante plaqueo sobre cajas de agar LB con ampicilina. Para ambos constructos (Figura 8) se obtuvieron colonias pequeñas, brillantes y puntiformes sobre las cajas de agar Luria Bertani con ampicilina (Figura 9a y 9b).

a)

b)

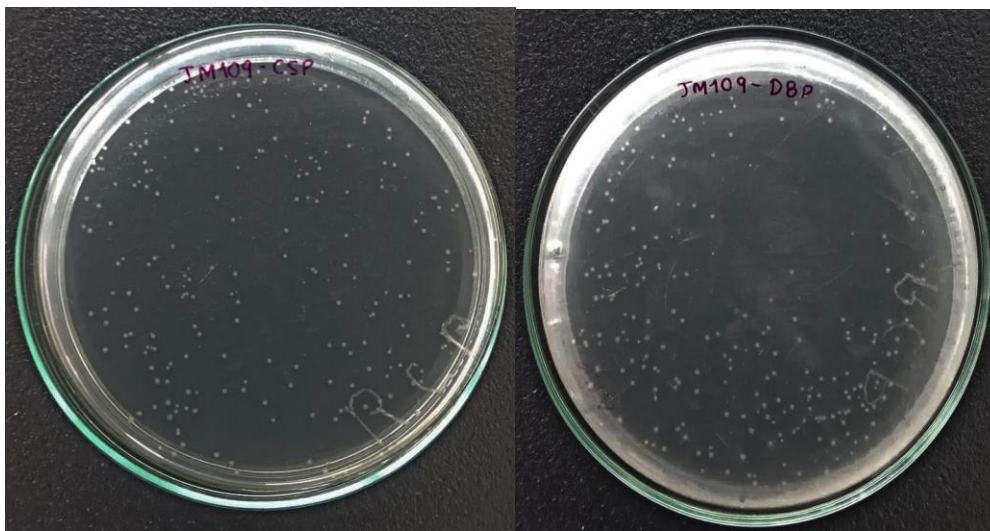


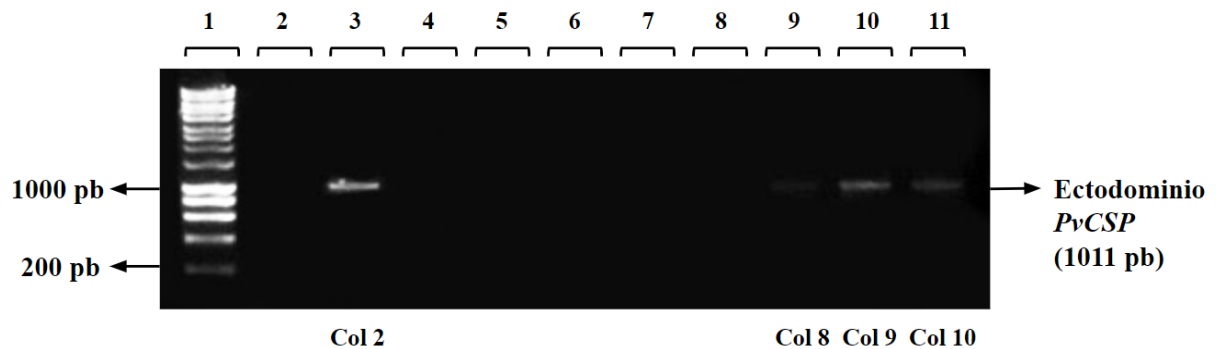
Figura 9. Transformación en células *E. coli* JM109 con los productos de la ligación

Se visualizan colonias pequeñas obtenidas de la transformación de bacterias con la ligación de a) constructos que contienen el plásmido pFastBacHT-C-EcPvCSP y b) constructos que contienen el plásmido pFastBacHT-C-PvDBP-RII en *E. coli* JM109. Fuente: Creación propia

5.3 PCRs de colonia de *E. coli* JM109 para EcPvCSP y la región II de PvDBP

Para verificar la presencia del plásmido recombinante en las células *E. coli* JM109 se realizó PCR a las colonias. Para EcPvCSP se obtuvo una banda con un peso aproximado de 1000pb (Figura 10a) en las colonias 2, 8, 9, y 10. Para PvDBP-RII se obtuvo una banda con un peso aproximado de 900 pb (Figura 10b) en las colonias 1, 3, 4, 5, 6 y 7.

a)



b)

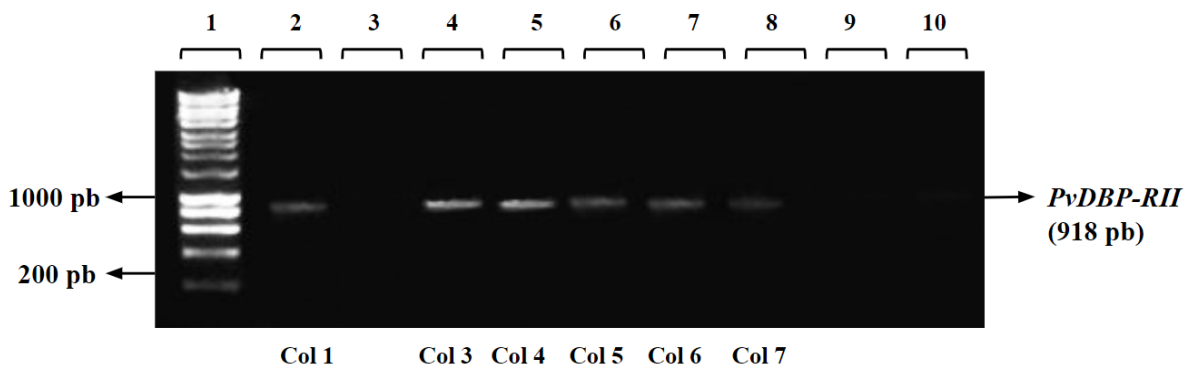


Figura 10. PCRs de colonia *E. coli* JM109-EcPvCSP y *E. coli* JM109- PvDBP-RII

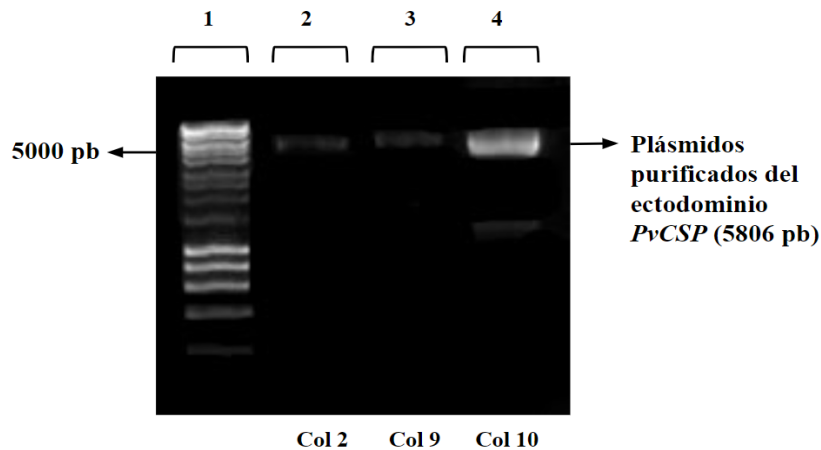
Se evidencian las colonias transformadas de *E. coli* JM109 en el plásmido pFastBacHT-C en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como Buffer de corrido. Se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular donde se evidencian los fragmentos de interés. a) PCR de colonia *E. coli* JM109- EcPvCSP: En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II, en los carriles 3, 9, 10 y 11 se puede observar amplificación de los genes de interés de EcPvCSP en el plásmido (1011 pb), se seleccionan las colonias 2, 9 y 10. b) PCR de colonia *E. coli* JM109-PvDBP-RII: En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II, en los carriles 2, 4, 5, 6, 7 y 8 se puede observar amplificación de los genes de interés del PvDBP-RII en el plásmido (918 pb), se seleccionan las colonias 3 y 4. Se utilizó agua como control negativo.

Las colonias 2, 9 y 10 de *E. coli* JM109-EcPvCSP y las colonias 3 y 4 de *E. coli* JM109-PvDBP-RII se cultivaron en medio Luria Bertani 100 ml con ampicilina (100µg/ml) en agitación a 37°C toda la noche, para posteriormente hacer gliceroles y extraer el plásmido recombinante.

5.4 Extracción de plásmido recombinante, tratamiento enzimático del plásmido con *EcPvCSP* y *PvDBP-RII*.

A partir de los resultados obtenidos de la PCR de colonia se extrajeron los plásmidos de las colonias 2, 9 y 10 para *EcPvCSP* y las colonias 3 y 4 para *PvDBP-RII*. Su correcta purificación fue visualizada mediante geles de agarosa como se muestra en la figura 11.

a)



b)

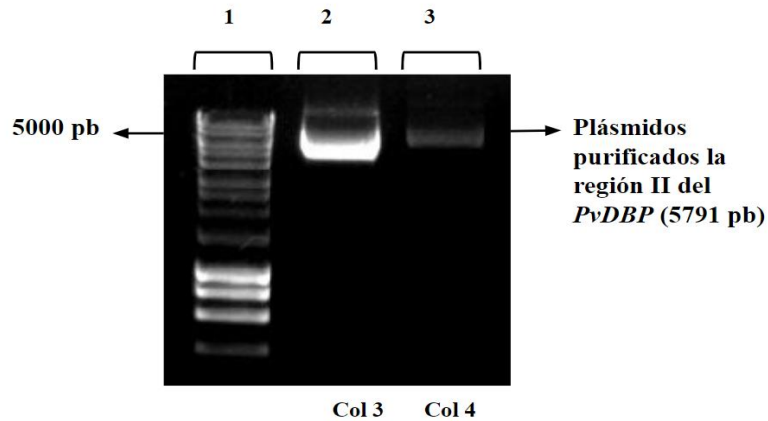


Figura 11. Purificación del plásmido pfastBacHT-C-*EcPvCSP* y del plásmido pfastBacHT-C-*PvDBP-RII*.

Se evidencia los plásmidos purificados en electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como Buffer de corrido. Se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular donde se observan los fragmentos de interés. a) Plásmido purificado que contiene el ectodominio de *PvCSP*. (1) patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II. (2) plásmido purificado colonia 2. (3) plásmido purificado de la colonia 9 y (4) plásmido purificado de la colonia 10. b) Plásmido purificado que contiene a *PvDBP-RII*. (1) Patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II. (2) plásmido purificado de colonia 3. (3) plásmido purificado de la colonia 4.

Después de obtener el plásmido purificado se realizó un tratamiento enzimático para verificar la correcta orientación de los fragmentos génicos que codifican para *EcPvCSP* y *PvDBP-RII*

dentro del plásmido pFastBacHT-C (Figura 8). Cuando los plásmidos pFastBacHT-C-EcPvCSP fueron tratados con la enzima BsrGI se encontraron dos bandas en las colonias 2 y 10 de aproximadamente 5.000pb y 1.709pb, que corresponden a los productos esperados (Figura 12a). Para la colonia 9 solo aprecia una única banda de 5000pb. Por su parte, cuando los plásmidos pFastBacHT-C-PvDBP de las colonias 3 y 4 fueron tratados con la enzima de restricción KpnI, se generaron dos bandas esperadas de aproximadamente 5.000pb y 317pb (Figura 12).

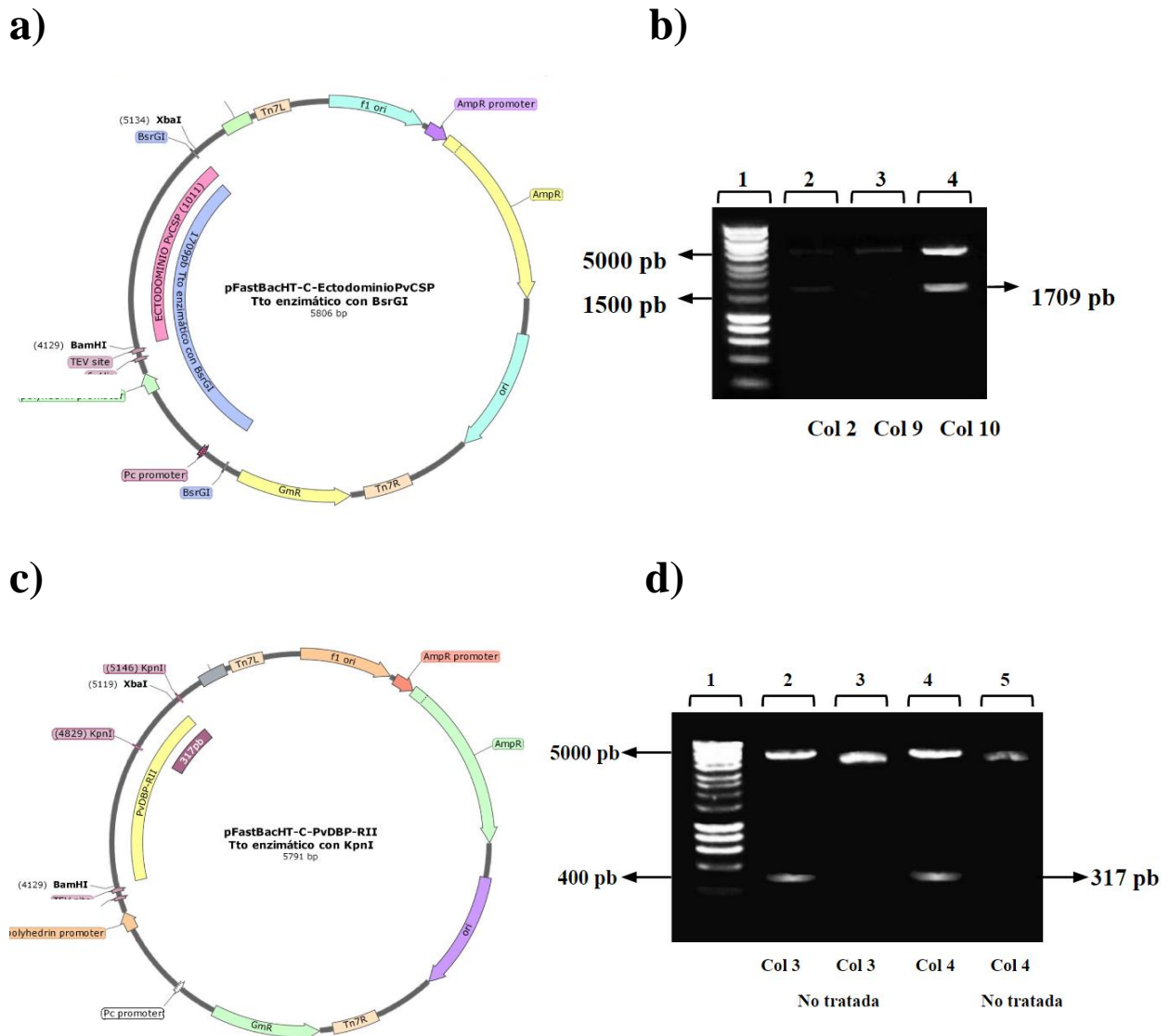


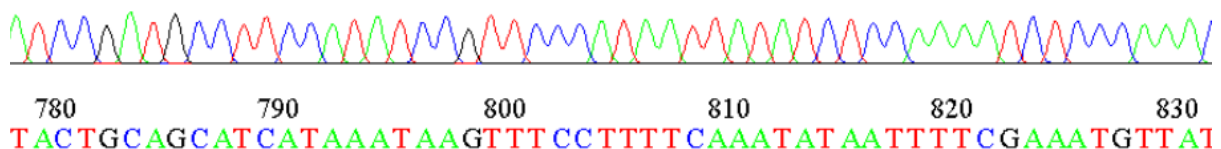
Figura 12. Tratamientos enzimáticos a pFastBacHT-C- EcPvCSP y pFastBacHT-C-PvDBP-R11.
a) Visualización del tratamiento enzimático a pFastBacHT-C-EcPvCSP con la enzima BsrGI que corta en el vector en la posición 3410 pb y 5115 pb obteniendo un producto de 1709 pb como señala la flecha azul en la imagen. En rosa se evidencia la posición de EcPvCSP en el plásmido. b) Se observa el tratamiento enzimático realizado al pFastBacHT-C-EcPvCSP con la enzima de restricción BsrGI que corta en el nucleótido 1727, en el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II. En el carril 2 se observa el tratamiento enzimático realizado a la colonia 2, en el carril 3 se observa el tratamiento enzimático realizado a la colonia 9, en el carril 4 de observa el tratamiento enzimático

realizado a la colonia 10. c) Tratamiento enzimático a pFastBacHT-C- *PvDBP-RII* con la enzima *KpnI* que corta en el vector en la posición 4829 pb y 5145 pb obteniendo un producto de 317 pb como señala la flecha morada en la imagen. d) Se observa el tratamiento enzimático realizado al pFastBacHT-C con *PvDBP-RII* con la enzima de restricción *KpnI* que corta en el nucleótido 318, en el carril 2 se observa el tratamiento enzimático realizado a la colonia 3, en el carril 3 se observa la colonia 3 sin tratamiento enzimático, en el carril 4 de observa el tratamiento enzimático de la colonia 4 y en el carril 5 se observa la colonia sin tratamiento enzimático. Ori: Origen de replicación. Tn7L/R: Elementos de transposición. AmpR promoter: Gen promotor de resistencia a la ampicilina. AmpR: Gen de resistencia a la ampicilina. GmR: Gen de resistencia a la gentamicina. 6xHis: Tag de 6 histidinas. Polyherin promotor: Promotor de la polihedrina. Fuente: Creación propia

5.5 Secuencias del *EcPvCSP* y de *PvDBP-RII* presentan varios cambios respecto a la cepa de referencia Sal-1

La secuencia de los fragmentos del *EcPvCSP* y de *PvDBP-RII* de los plásmidos recombinantes de las colonias 2, 9 y 10 así como los plásmidos 3 y 4 fueron obtenidos mediante secuenciación por Sanger y analizados en el programa CLC DNA Workbench. En general, los electroferogramas obtenidos de todas las colonias mostraron picos muy bien definidos. La figura 13 muestra un fragmento de la secuenciación del plásmido 2 (*EcPvCSP*) y del plásmido 3 (*PvDBP-RII*). El análisis de las secuencias consistió inicialmente en un análisis comparativo de cada plásmido respecto a la cepa de referencia Sal-1. Allí mediante la visualización de los electroferogramas se determinó si los cambios observados entre nuestros constructos (derivado de la cepa VCG-1) y la cepa Sal-1 coincidían con los picos del electroferograma. Una vez analizado cada plásmido se seleccionó para el *EcPvCSP* el plásmido 10 y se denominó *PvCSP-VCG-1*. Por su parte para *PvDBP-RII* se seleccionó el plásmido 3 y se denominó *PvDBP-RII-VCG-1*.

a)



b)

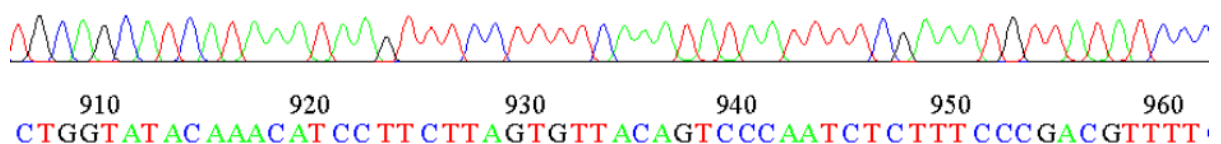


Figura 13. Electroferogramas de plásmidos recombinantes secuenciados de pFastBacHT-C-EcPvCSP y pFastBacHT-C-PvDBPRII

Electroferogramas con picos definidos como resultado de la secuenciación. a) Un fragmento de la secuenciación del plásmido 2 de pFastBacHT-C-EcPvCSP. b) Un fragmento de la secuenciación del plásmido 3 de pFastBacHT-C-PvDBP-RII. En color rojo se encuentran las timinas, azul las citosinas, verde las adeninas y negro las guaninas.

Adicionalmente, se obtuvo una secuencia consenso para el EcPvCSP de la cepa VCG-1 que se comparó con la cepa de referencia Sal-1 obteniendo los siguientes resultados (Figura 14). Un hallazgo significativo es la presencia de una delección en zona central de repetición de la secuencia, en donde la cepa PvCSP-VGC-1 perdió 27 nucleótidos entre las posiciones 550 pb a 578 pb.



Figura 14. Análisis de secuencias de nucleótidos con EcPvCSP de la cepa PvVCG-1 respecto a PvSal-1.

Se observa un fragmento del alineamiento múltiple realizado entre las secuencias con los genes del EcPvCSP cepas PvVCG-1 y PvSal-1. En anaranjado se observan los cambios que se presentaron entre las dos cepas.

Los cambios presentados entre los genes que codifican para el EcPvCSP en ambas cepas se organizan en la siguiente tabla (Tabla 8). Se analizaron los cambios sinónimos y no sinónimos de las secuencias entre las cepas del EcPvCSP de PvSal-1 con el EcPvCSP de PvVCG-1. Los cambios sinónimos sugieren que a pesar de que hubo cambios en la secuencia de nucleótidos, no hubo cambio en el aminoácido de la misma posición, por el contrario, los cambios no sinónimos representan un cambio en la secuencia de nucleótidos que a su vez genera un cambio en la secuencia de aminoácidos. Los cambios sinónimos no se incluyeron en la tabla ya que no representaban un cambio en la secuencia de aminoácidos que pudiesen afectar en un futuro la

creación de la proteína recombinante. De los 23 cambios encontrados en el alineamiento múltiple, 8 cambios representaron un cambio no sinónimo.

Tabla 7. Cambios no sinónimos generados entre el EcPvCSP de la cepa VCG-1 y el EcPvCSP de la cepa Sal-1

Posición de nucleótido	Cambio	Posición de aminoácido	Cambio	Tipo de cambio
420 pb	C→A	143 aa	D→A	No sinónimo
645 pb	C→A	215 aa	D→A	No sinónimo
698 pb	C→A	233 aa	D→A	No sinónimo
814 pb	G→C	271 aa	P→A	No sinónimo
823 pb	G→A	274 aa	P→A	No sinónimo
825 pb	A→G	275 aa	N→D	No sinónimo
828 pb	A→T	276 aa	G→R	No sinónimo
834 pb	C→G	278 aa	G→A	No sinónimo

Tabla 8. Cambios no sinónimos generados entre el EcPvCSP de la cepa VCG-1 y el EcPvCSP de la cepa Sal-1. Columna 1: se evidencia la posición del nucleótido donde se presenta el cambio. Columna 2: el cambio de nucleótido presentado. Columna 3: posición del aminoácido donde se presenta el cambio. Columna 4: cambio de aminoácido presentado. Columna 5: tipo de cambio.

De igual forma, en el alineamiento de PvDBP-RII secuenciado con PvDBP-RII de la cepa Sal-1 se encontraron cambios entre las secuencias, como se representa a continuación (Figura 15).



Figura 15. Análisis de secuencias de nucleótidos con PvDBP-RII de la cepa PvVCG-1 respecto a PvSal-1

Se observa un ejemplo del alineamiento múltiple realizado entre las secuencias con los genes de PvDBP-RII cepas PvVCG-1 y PvSal-1. En azul se observan los cambios que se presentaron entre las dos cepas.

Los cambios presentados entre los genes que codifican para *PvDBP-RII* en ambas cepas se organizan en la siguiente tabla (Tabla 9). Se analizaron los cambios sinónimos y no sinónimos de las secuencias entre las cepas de *PvDBP-RII* de *PvSal-1* con *PvDBP-RII* de *PvVCG-1*. De los 3 cambios encontrados en el alineamiento múltiple, solamente 2 cambios representaron un cambio no sinónimo en los aminoácidos codificantes.

Tabla 8. Cambios no sinónimos generados entre *PvDBP-RII* de la cepa VCG-1 y de *PvDBP-RII* de la cepa Sal-1

Posición de nucleótido	Cambio	Posición de aminoácido	Cambio	Tipo de cambio
513 pb	A→G	171 aa	D→G	No sinónimo
531 pb	G→A	177 aa	R→H	No sinónimo

Tabla 9. Cambios no sinónimos generados entre *PvDBP-RII* de la cepa VCG-1 y de *PvDBP-RII* de la cepa Sal-1. Columna 1: Se evidencia la posición del nucleótido donde se presenta el cambio. Columna 2: El cambio de nucleótido presentado. Columna 3: Posición del aminoácido donde se presenta el cambio. Columna 4: Cambio de aminoácido presentado. Columna 5: tipo de cambio.

5.6 Transformación de plásmidos recombinantes en *E. coli* DH10Bac.

Para realizar la transposición de los genes de interés a partir del plásmido pFastBac-HT-C con el *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* en el genoma del bécrido, se realizó la transformación en las células *E. coli* DH10Bac como se describió en el protocolo. Como resultado de la transformación se obtuvieron colonias blancas pequeñas, brillantes, puntiformes que corresponden a colonias recombinantes. Por otro lado, se observaron colonias azules medianas, brillantes que corresponden a colonias no recombinantes (Figura 16a, 16b).

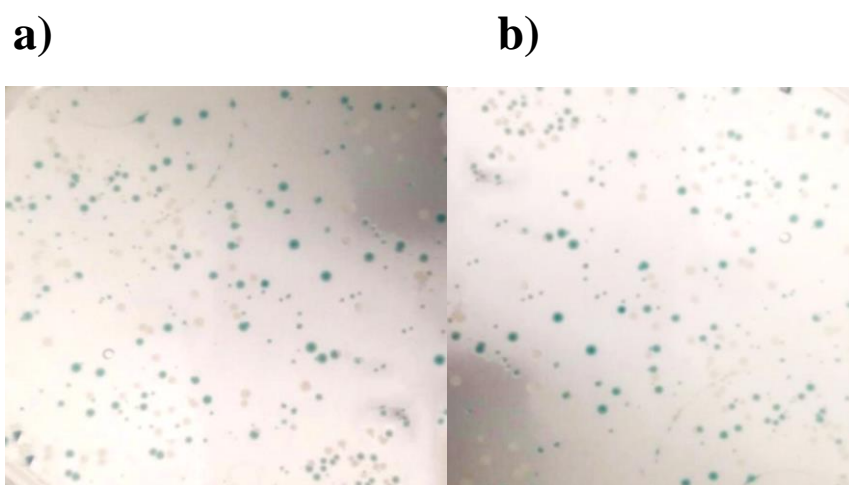


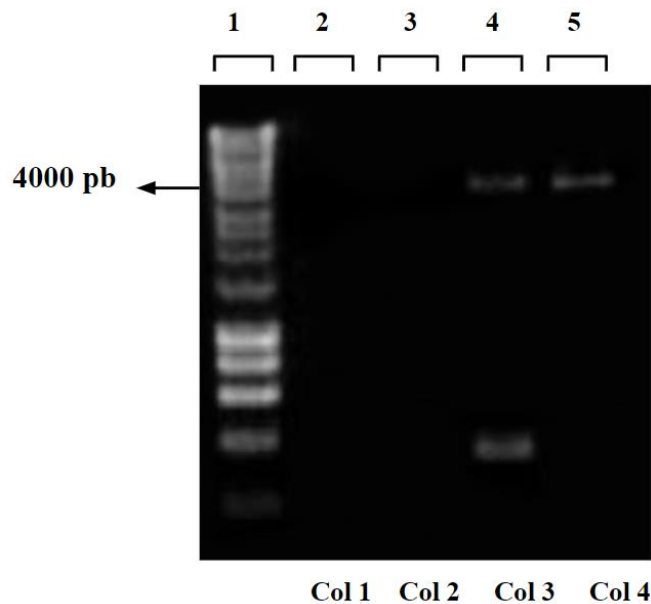
Figura 16. Transformación en *E. coli* DH10Bac.

Se evidencia a) la transformación en *E. coli* DH10Bac del *EcPvCSP* y b) la transformación en *E. coli* DH10Bac de *PvDBP-RII*. Se observa colonias recombinantes (color blanco) y colonias no recombinantes (color azul). Se encuentran en agar Luria Bertani con gentamicina (7 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) y Xgal (100 µg/ml). Fuente: Creación propia

5.7 PCRs de colonia de *E. coli* DH10Bac con el *EcPvCSP* y *PvDBP-RII*.

Se realizó PCRs de colonia para verificar la presencia los genes de interés del *EcPvCSP* y de *PvDBP-RII* en las células *E. coli* DH10Bac como expone el punto 3.5.8. Para las PCRs de colonias de células *E. coli* DH10Bac con el *EcPvCSP* se obtuvo una banda correspondiente a las colonias 3 y 4 con un peso aproximado de 3500pb (Figura 21a) y para las PCRs de colonias células *E. coli* DH10Bac con *PvDBP-RII* se obtuvo una banda en las colonias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 con un peso aproximado de 3500pb (Figura 21b). Este era el peso aproximado esperado ya que el b́acmido transposado con el pĺasmido pFastBacHT-C teńa un peso de 2430 pb, ḿas el tama ́o de los dos insertos, siendo para *EcPvCSP* 1.011 pb y para *PvDBP-RII* 918 pb, generando aś un tama ́o aproximado de 3.441 pb y 3,348 pb respectivamente.

a)



b)

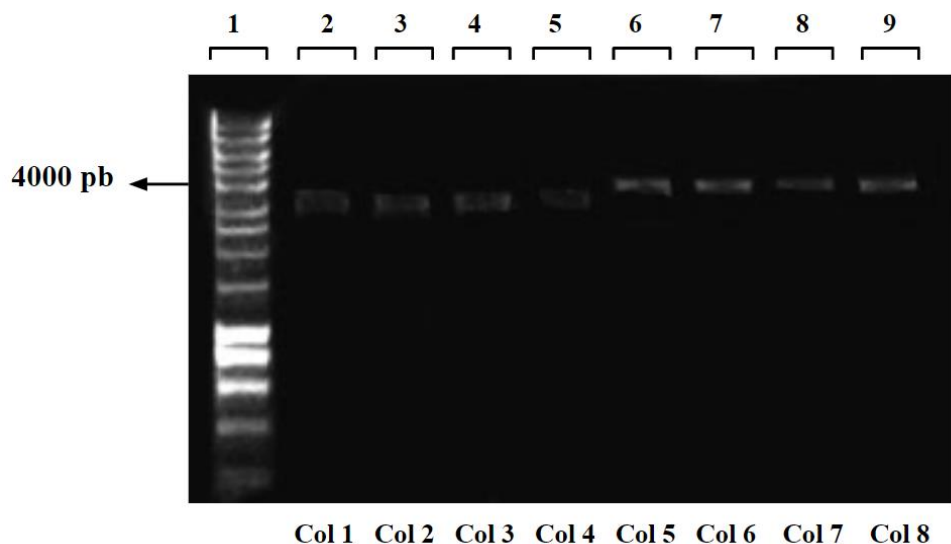


Figura 17. PCRs de colonia de b́acmido del ectodominio de *PvCSP* y de *PvDBP-RII* en DH10Bac.

Se evidencia la PCR de colonias transformadas de las ćelulas DH10Bac en electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como Buffer de corrido. Se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular donde se evidencian los fragmentos de interés. a) PCR de colonias DH10Bac con el *EcPvCSP*: en el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hyperladder I, en el carril 2 y 3 no se evidencia material genético amplificado, en el carril 4 y 5 se evidencia amplificación de los genes de interés. Se selecciona la colonia 4. b) PCR de colonias DH10Bac con *PvDBP-RII*: En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hyperladder I, del carril 2 al 9 se evidencian las regiones amplificadas de *PvDBP-RII*. Se seleccionaron las colonias 6, 7, 8. Se utilizó agua como control negativo.

5.8 Obtención y cuantificación de b́acmidos recombinantes.

Se utilizó el PureLink, HiPure Plasmid Midiprep Kit de Invitrogen by Thermo Fisher Scientific para extraer el b́acmido recombinante con el *EcPvCSP* y *PvDBP-RII* y posteriormente ser cuantificado obteniendo los siguientes resultados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evidenciar el b́acmido recombinante obteniendo para el bMON14272-*EcPvCSP* y bMON14272-*PvDBP-RII*, dos bandas de un peso superior de 10000 pb (Figura 18).

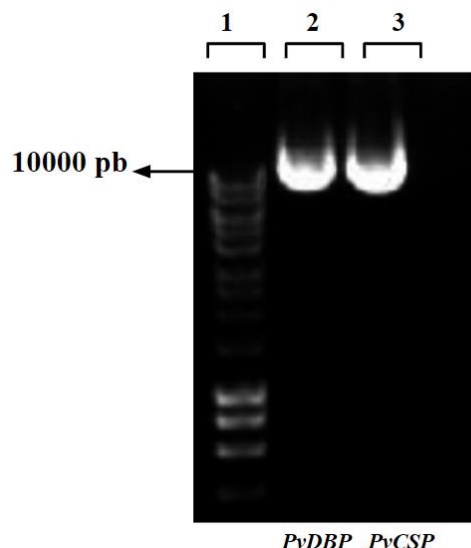


Figura 18. Báculos recombinantes bMON14272-*PvDBP*-RII y bMON14272-*EcPvCSP*

Se evidencian los báculos recombinantes bMON14272-*EcPvCSP* y bMON14272-*PvDBP*-RII en electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando TAE como Buffer de corrido. Se encuentran marcados los tamaños de las bandas de peso molecular donde se evidencian los fragmentos de interés. En el carril 1 se encuentra el patrón de peso molecular (PM) Hypperladder II, en el carril 2 se encuentra el báculo bMON14272-*PvCSP* y en el carril 3 se encuentra al báculo purificado bMON14272-*PvDBP*-RII.

La cuantificación del DNA del bMON14272-*EcPvCSP* y del bMON14272-*PvDBP*-RII se realizó por medio del μ drop y se hizo la lectura en el MultiscanGo a una longitud de onda de λ 260 y λ 280, se determinó su concentración y su pureza. Finalmente, se encontró que el bMON14272-*PvDBP*-RII purificado tiene una concentración de 158,9 ng/ μ l y una pureza de 1.73, mientras que bMON14272-*EcPvCSP* purificado tiene una concentración de 430 ng/ μ l con una pureza de 2.24.

6. Discusión

La malaria es una enfermedad que afecta a la población humana desde la antigüedad. Hoy en día, sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con las tasas de morbilidad y mortalidad más altas (72). Según el Informe Mundial sobre el Paludismo 2020 realizado por la OMS, el número total de fallecimientos disminuyó de 736.000 en el año 2000 a 409.000 en el año 2019 (13). Esta carga de morbilidad y mortalidad es el resultado de más de un siglo de esfuerzos e investigaciones mundiales dirigidos a mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria (73). Aunque en los últimos años se han obtenido buenos resultados y disminución de la prevalencia de la enfermedad, no hay que dejar a un lado que sigue cobrando un gran precio en el mundo (74).

Teniendo en cuenta la emergencia sanitaria generada por el SARS-CoV2 también se ha generado limitantes para continuar con los programas de prevención, detección, y tratamiento contra el paludismo. Aun así, la OMS insistió en garantizar la continuidad de los servicios de lucha contra el paludismo en el contexto de la pandemia de COVID-19 (13). Para el año 2020, se presentaron 477 casos de infección mixta causada por parásitos del género *Plasmodium* y SARS-CoV-2, donde 456 casos fueron malaria no complicada y 21 casos de malaria complicada (75), cabe destacar que 277 casos fueron causados por *P. vivax*.

Como se ha mencionado anteriormente, la especie del género *Plasmodium* que más genera impacto en la población y que no se ha podido estudiar profundamente por su biología es *P. vivax*. Esta especie de parásito presenta características biológicas particulares, como el desarrollo de hipnozoitos en el hígado y la rápida formación de gametocitos (6), lo cual genera limitaciones a la comunidad científica para poder ampliar el conocimiento de este parásito. Otra limitación que ha generado retrasos en su estudio, es la imposibilidad de generar un cultivo continuo *in vitro* que permita un acercamiento en la ejecución de cierto tipo de estudios, como las ciencias ómicas, la inhibición de invasiones y determinar ligandos, epítomos y antígenos de tipo adhesina (76).

Teniendo en cuenta las limitaciones que se han presentado a través del tiempo con *P. vivax* es importante buscar otras alternativas de estudio a nivel experimental, como se propone en este trabajo, por medio de la creación de bácmidos recombinantes basados en dos proteínas del parásito: la proteína de Unión al Duffy que interactúa con los reticulocitos cuando el parásito se encuentra en estadio de merozoíto (77) y la proteína del circumsporozoíto que se sugiere, interactúa con los receptores de sulfato de heparina de los hepatocitos cuando el parásito se encuentra en estadio de esporozoíto (78). Los bácmidos generados a partir de PvDBP-RII y el EcPvCSP serán fundamentales, ya que con ellos se infectarán células Sf9 para la producción de proteínas recombinantes, que serán utilizadas como controles importantes en futuros estudios de interacción hospedero-patógeno con el fin de poder conocer y caracterizar la biología de *P. vivax* y así encontrar nuevas alternativas terapéuticas para una enfermedad que es endémica en Colombia.

La producción de proteínas recombinantes en sistemas microbianos ha revolucionado la bioquímica (79). Las proteínas recombinantes para estas aplicaciones se producen

principalmente utilizando sistemas de huéspedes de expresión procariotas y eucariotas, como células de mamíferos, bacterias, levaduras, células de insectos y plantas transgénicas (73). En el presente trabajo, se seleccionó el sistema de expresión de *Baculovirus* y para esto era necesario la creación de báculos recombinantes donde se encontraran los genes codificantes para PvDBP-RII y el EcPvCSP.

El sistema de expresión de *Baculovirus* ofrece muchas ventajas, incluida la velocidad de fabricación, el diseño flexible del producto, la seguridad y la escalabilidad inherentes. Esta combinación de características y aprobaciones de productos han atraído previamente el interés de investigadores académicos, y más recientemente de líderes de la industria para desarrollar vacunas de próxima generación, vectores para terapia génica y otras proteínas complejas biofarmacéuticas (81). Además de la especificidad y la velocidad, la tecnología recombinante ofrece ventajas con respecto a la pureza y el diseño del producto (81). Con respecto a la pureza, los productos recombinantes están libres de patógenos, muchas sustancias químicas (como formalina y antibióticos) que pueden ser indeseables o alergénicas (82). Para el diseño de productos, las técnicas recombinantes permiten diseñar proteínas con características deseadas, como proteínas que aumentan la inmunogenicidad o incluyen múltiples antígenos y proteínas con dominios eliminados para mejorar los rendimientos y facilitar la purificación (83).

Otro punto importante es la seguridad del sistema de expresión de *Baculovirus*, puesto que tiene incorporadas medidas de seguridad inherentes que son atractivas desde una perspectiva regulatoria (81). Los *Baculovirus* tienen un rango de hospedadores estrecho restringido a insectos específicos y se consideran seguros de usar como plaguicidas biológicos sin impacto negativo en plantas, mamíferos, aves, peces o insectos no objetivo (84). Estos estudios han demostrado que los *Baculovirus* no pueden replicarse en células de mamíferos y no pueden expresar un casete de genes a menos que sea impulsado por un promotor de mamíferos (85). Aunque los estudios demostraron que este virus no podría ingresar o replicarse en líneas celulares humanas y, por lo tanto, es poco probable que represente un riesgo, lo más probable es que sea necesario caracterizar y monitorear nuevas líneas celulares para detectar la presencia de este virus, como ocurre con los Nodavirus, Retrovirus y otros (81).

Por otro lado, este sistema es una tecnología versátil útil para la fabricación de muchos productos; sin embargo, otras plataformas pueden ser más adecuadas para la producción de ciertas proteínas (81). Por ejemplo, las proteínas pequeñas que no requieren modificaciones

postraduccionales se elaboran mejor en *E. coli*, que puede generar rápidamente altos rendimientos a bajo costo (86). Las células de insectos son capaces de muchas modificaciones postraduccionales, pero las proteínas que requieren complejas modificaciones postraduccionales y plegamiento se pueden producir mejor en sistemas de expresión de mamíferos (81). Un ejemplo de esto, es que los patrones de glicosilación producidos por células de insectos y mamíferos están relacionados, y las glicoproteínas producidas en células de insectos a menudo se pliegan correctamente, son biológicamente activas e inmunogénicas (87). Sin embargo, las células de insectos generan N-glicanos menos complejos que las células de mamíferos y esto puede afectar negativamente la función biológica (88). Se han realizado algunos avances para abordar esta limitación, incluida la ingeniería de líneas de células de insectos transgénicas que expresan de manera estable enzimas de glicosilación de mamíferos o la coexpresión de dichas enzimas con el gen de interés en un solo *Baculovirus* (89).

Para la formación de báculos recombinantes se crearon cebadores que amplificaran mediante PCR las regiones de interés de *PvDBP-RII* (Figura 7b) obteniendo un producto de 918 pb y el *EcPvCSP* (Figura 7a) obteniendo un producto de 1011 pb, para posteriormente ser incorporados al pFastBacHT-C por medio de un tratamiento con enzimas de restricción encargadas de cortar el plásmido en un sitio específico y unir los genes de interés como se representa en la Figura 8a para el *EcPvCSP* y en la Figura 8b para *PvDBP-RII*. El plásmido pFastBacHT-C fue elegido como vector debido a tener un fuerte promotor de polihedrina, una proteína de los *Baculovirus* encargada de proteger el genoma del virus, pero que no es necesaria en el cultivo celular ya que el virus es capaz de replicarse sin formar cuerpos de oclusión, es decir virus pol- (90). Otro factor importante del plásmido es una etiqueta 6×His en su N-terminal para la purificación de proteínas de fusión recombinantes usando resina quelante de metales (62). Para el proceso de ligación se utilizó la Ligasa T4, es la más utilizada en procesos de creación de proteínas recombinantes y permite unir fragmentos con extremos romos o cohesivos complementarios (91).

Como vector de clonación se eligieron las células *E. coli* JM109 de Promega, consideradas un huésped útil para la transformación de vectores con altos niveles de eficiencia, crecimiento y ayuda a la estabilidad del plásmido, lo que da como resultado ADN plasmídico de alta calidad (92), otros estudios respaldaron esta elección demostrando buenos resultados en la clonación de plásmidos recombinantes en estas células (93), se obtuvieron colonias blancas, pequeñas y recombinantes (Figura 9a, 9b). Como resultado de la transformación en *E. coli* JM109 se

eligieron colonias recombinantes que fueron confirmadas por PCR identificando los genes de *PvDBP-RII* (Figura 10b) obteniendo material genético en las colonias 2, 9, y 10. Para el *EcPvCSP* (Figura 10a) obteniendo material genético en las colonias 3, 4 y 5. Esas colonias fueron escaladas y posteriormente se realizó una extracción de ADN plasmídico. Con el fin de determinar la orientación de los genes de *PvDBP-RII* y el *EcPvCSP* en el plásmido se realizó un tratamiento con enzimas de restricción que cortaran dentro y fuera de los genes de interés, se realizó un plásmido en el programa SnapGene para visualizar el corte en cada plásmido (Figura 12a y 12c), obteniendo resultados correctos en cuanto a la incorporación de los genes al plásmido (Figura 12b, 12d).

Los plásmidos fueron enviados a secuenciar y como resultado se obtuvieron electroferogramas con picos definidos (Figura 13). En adición, se realizó un análisis de posibles errores en el programa CLC DNA Workbench, a partir de este análisis se realizó un alineamiento múltiple de las diferentes secuencias obtenidas de las colonias (para el *EcPvCSP* las colonias 2, 9 y 10 y para *PvDBP-RII* las colonias 2, 3 y 4) con el fin de generar una secuencia consenso que fue analizada por medio de un alineamiento múltiple con la secuencia constructo de *PvSal-1* (Figura 14, 15). Con este análisis se pudo determinar el porcentaje de homología para cada gen de interés, en cuanto al *EcPvCSP* de la cepa *PvVCG-1* se encontró un total de 23 cambios nucleotídicos, pero de estos, solamente 8 fueron significativos ya que cambiaron el aminoácido codificante (Tabla 8). Además, se pudo identificar la pérdida de un repeat en la secuencia de *PvCSP* de la cepa *PvVCG-1* generando una delección desde el nucleótido 550 pb al 577 pb. Estas delecciones resultan de la recombinación sexual durante la meiosis o de eventos de deslizamiento de la hebra intrahelical durante la replicación del ADN mitótico (94). En cuanto a *PvDBP-RII* se encontraron 3 cambios respecto a la cepa *PvSal-1* donde 2 de estos cambios representaron un cambio en el aminoácido codificante (Tabla 9).

En consideración a los análisis realizados con herramientas bioinformáticas se pudo concluir que la mejor secuencia con el *EcPvCSP* fue la proveniente de la colonia 10, ya que presentó un porcentaje de homología de un 97.8% respecto a la cepa de referencia *PvSal-1*, en cuanto a *PvDBP-RII* se pudo determinar que la secuencia proveniente de la colonia 3 tuvo un porcentaje de homología de 99.2% respecto a la cepa de referencia *PvSal-1* siendo la elegida para continuar el proyecto.

Las células *E. coli* DH10Bac contienen el genoma del *Baculovirus* en su citoplasma, donde fueron incorporados los genes de interés de *PvDBP-RII* y el *EcPvCSP* por medio de una transposición (62). El sistema es bastante específico por el uso de enzimas de transposición, por lo tanto la cantidad de bacterias con éste tipo de recombinación son más bajas que las bacterias no recombinantes lo que indica una baja eficiencia de recombinación, sin embargo aquellas colonias que presentan coloración blanca tienen un alto porcentaje de tener los genes de interés (95). Como se observa en la figura 16, se obtuvieron colonias recombinantes (color blanco) y no recombinantes (color azul) ya que estas últimas presentaban actividad de la β -galactosidasa, indicando la no incorporación de los genes de interés al genoma viral.

Las colonias recombinantes (color blanco) fueron aisladas y se les realizó una PCR de colonia para confirmar la presencia de los genes de interés en el báculo recombinante, obteniendo para *PvDBP-RII* resultados positivos para las colonias desde la 1 a la 8 (Figura 17b), seleccionando la colonia 7 y para el *EcPvCSP* las colonias 4 y 5 (Figura 17a), seleccionando la colonia 4 para continuar el proyecto. Esas colonias fueron clonadas para obtener altos niveles de ADN recombinante, posteriormente se realizó la extracción de báculo, obteniendo finalmente concentraciones de 158,9 ng/ μ l para el bMON14272-*PvDBP-RII* y de 430 ng/ μ l para el bMON14272-*EcPvCSP*.

La proteína *PvCSP* se ha descrito como la proteína de superficie principal de los esporozoitos y tiene un papel crucial en la motilidad de los esporozoitos y la invasión de hepatocitos(96). Se ha informado que la CSP juega un papel vital en la invasión de las glándulas salivales del mosquito, uniendo los esporozoitos a las células hepáticas e inactivando la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula huésped (56). Estructuralmente, *PvCSP* contiene aproximadamente 400 aminoácidos y está organizado en tres dominios: el N-terminal, que contiene el pentapéptido conservado (región I); un dominio central específico de especie altamente repetitivo (región repetitiva) y un dominio C-terminal conservado (región II). *PvCSP* tiene tres variantes alélicas que se diferencian entre sí por los aminoácidos en su región repetitiva (97). Como se explicó anteriormente, se han identificado tres genotipos diferentes (*VK210*, *VK247*, similar a *P. vivax*) para el gen *PvCSP*, según la variación en el número de motivos de repetición de péptidos y secuencias en el dominio de repetición central (98). A partir de esto, y gracias a los análisis de secuencias se pudo encontrar que el báculo recombinante con el *EcPvCSP* producido es variante *VK210*, ya que cuenta con los aminoácidos GDRA(A/D) GQPA en su región repetitiva.

La distribución de estas variantes parece ser universal y las infecciones causadas por las variantes de *PvCSP* parecen estar asociadas con la preferencia y susceptibilidad del vector, la gravedad de los síntomas, los signos clínicos, los patrones de respuesta humoral, la carga parasitaria y el equilibrio de citocinas (99). Es importante tener en cuenta que, los diferentes genotipos se encuentran distribuidos globalmente con sesgos geográficos, donde *VK210* predomina en las regiones endémicas, mientras que *VK247* se reporta en las regiones, con casos de infecciones mixtas (100). Las personas que residen en áreas endémicas de malaria pueden infectarse con genotipos de parásitos genéticamente distintos, que pueden resultar de múltiples picaduras de mosquitos infecciosos o picaduras de mosquitos infectados con múltiples genotipos de parásitos (101).

La invasión de reticulocitos por merozoitos de *P. vivax*, un evento esencial en el ciclo de vida, es un proceso altamente complejo, proceso de varios pasos que depende de una cascada de interacciones moleculares específicas (102). Durante la invasión, la *PvDBP* se secreta a partir de los micronemas y se une a su receptor huésped afín en la superficie del reticulocito, el antígeno/receptor de Duffy para quimiocinas (DARC) (103). La estructura cristalina recientemente determinada del dominio prototípico similar a la unión de Duffy (DBL) indica que los 12 residuos de cisteína conservados forman puentes disulfuro que pueden usarse para dividir el dominio DBL en tres subdominios (53). El subdominio 1 (SD1), el más pequeño, incluye cisteínas 1 a 4, SD2 incluye cisteínas 5 y 6, y SD3, el más grande, comprende cisteínas 7 a 12. SD2 es altamente polimórfico, mientras que los otros subdominios están relativamente conservados (104), sugiriendo que SD2 es un objetivo de la selección inmune (105). Recientemente se ha propuesto que *PvDBP*-RII forma un dímero que es impulsado por el compromiso con su receptor y SD2 contiene los residuos de unión críticos (20).

Es preciso mencionar que, aunque *P. vivax* puede infectar y causar enfermedades en individuos DARC negativos (106) esta situación parece ser rara y ocurrir solo en áreas específicas; hasta ahora, no se ha identificado ningún otro ligando alternativo para la unión de *P. vivax* a los reticulocitos, lo que convierte a la *PvDBP* en una de las dianas de vacuna contra *P. vivax* más prometedora (71). Los anticuerpos anti-DBP de origen natural son frecuentes en personas que viven en regiones donde la malaria es endémica (107), los niños pequeños expuestos a la infección por *P. vivax* generalmente adquieren inmunidad clínica entre los cuatro y cinco años de edad (108). Existe evidencia de que estos anticuerpos anti-DBP pueden bloquear la unión

de DBP-Reticulocito, así como inhibir la invasión del parásito en cultivos *in vitro* a corto plazo (109).

Por último, las proteínas recombinantes ayudan a dilucidar los principios básicos y fundamentales de un organismo. Estas moléculas se pueden utilizar para identificar y localizar la posición de la proteína codificada por un gen específico y para descubrir la función de otros genes en diversas actividades celulares como la señalización celular, el metabolismo, el crecimiento, la replicación y muerte, la transcripción, la traducción y modificación de proteínas (110). En este caso, cuando los bácmidos realizados en este proyecto sean utilizados para transfectar células Sf9 y se produzcan las proteínas recombinantes de PvDBP-RII y del EcPvCSP se realizarán ensayos de unión de la proteína recombinante de PvDBP-RII a reticulocito y la proteína recombinante del EcPvCSP a células HepG-2, si las proteínas se unen a sus células hospederas se pueden continuar ensayos de interacción huesped-patógeno. Estas proteínas serán utilizadas en próximos experimentos como controles positivos para evaluar interacciones entre proteínas de *P. vivax* puesto que se conoce qué receptores interactúan con las células hospederas permitiendo así medir estas interacciones lo cual va a permitir avanzar en los conocimientos de *P. vivax* y estar cada vez más cerca de encontrar enfoques terapéuticos para su erradicación.

6. Conclusiones

- Se amplificó la región génica del ectodominio de PvCSP (1011 pb) y de PvDBP-RII (918 pb).
- Se obtuvo un total de 3 plásmidos recombinantes con el EcPvCSP y 3 plásmidos recombinantes con PvDBP-RII.
- Se produjo una secuencia consenso gracias al análisis de secuencias para el EcPvCSP y PvDBP-RII.
- Se diseñaron y construyeron plásmidos donadores recombinantes que expresan los genes que codifican para el EcPvCSP y de PvDBP-RII.
- Se produjo bácmidos mediante procesos de recombinación que expresan el EcPvCSP y de PvDBP-RII.

7. Bibliografía

1. Fact sheet about Malaria [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
2. MALARIA PE XIII 2020.pdf [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA%20PE%20XIII%202020.pdf>
3. Adams JH, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. Cold Spring Harb Perspect Med. 9 de enero de 2017;7(9):a025585.
4. White NJ, Imwong M. Relapse. Adv Parasitol. 2012;80:113-50.
5. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. Lancet Infect Dis. septiembre de 2009;9(9):555-66.
6. *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel | Malaria Journal | Full Text [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2456-5>
7. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA, Desjardins RE. Culture of human malaria parasites *Plasmodium falciparum*. Nature. 28 de octubre de 1976;263(5580):767-9.
8. Trager W. A new method for intraerythrocytic cultivation of malaria parasites (*Plasmodium coatneyi* and *P. falciparum*). J Protozool. mayo de 1971;18(2):239-42.
9. Roobsoong W, Tharinjaroen CS, Rachaphaew N, Chobson P, Schofield L, Cui L, et al. Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. Malar J. 5 de agosto de 2015;14(1):297.
10. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax* | Blood | American Society of Hematology [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://ashpublications.org/blood/article/118/13/e74/29320/A-reliable-ex-vivo-invasion-assay-of-human>
11. SciELO - Brasil - The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/khygqzPNpyKVfRfgw5TqDhn/?lang=en>
12. Infección hepática por parásitos de la malaria y biología exoeritrocítica [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/7/6/a025486>
13. World-Malaria-Report-2019-briefing-kit-es.pdf [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2019/World-Malaria-Report-2019-briefing-kit-es.pdf>
14. Mercereau-Puijalon O, Ménard D. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: A paradigm revisited. Transfus Clin Biol. 1 de septiembre de 2010;17(3):176-83.

15. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 5 de agosto de 1976;295(6):302-4.
16. Barnwell JW, Galinski MR. *Plasmodium vivax*: a glimpse into the unique and shared biology of the merozoite. *Ann Trop Med Parasitol*. abril de 1995;89(2):113-20.
17. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med*. 1 de agosto de 1994;180(2):497-506.
18. Frontiers | What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates? | Immunology [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00126/full>
19. *Plasmodium vivax* DBP Binding to *Aotus nancymaae* Erythrocytes Is Duffy Antigen Dependent [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-96/issue-1/GE-2281.1/Plasmodium-vivax-DBP-Binding-to-Aotus-nancymaae-Erythrocytes-Is-Duffy/10.1645/GE-2281.1.short>
20. Batchelor JD, Zahm JA, Tolia NH. Dimerization of *Plasmodium vivax* DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. *Nat Struct Mol Biol*. agosto de 2011;18(8):908-14.
21. Kano FS, de Souza AM, de Menezes Torres L, Costa MA, Souza-Silva FA, Sanchez BAM, et al. Susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria associated with DARC (Duffy antigen) polymorphisms is influenced by the time of exposure to malaria. *Sci Rep*. 14 de septiembre de 2018;8:13851.
22. Mendes C, Dias F, Figueiredo J, Mora VG, Cano J, de Sousa B, et al. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis*. junio de 2011;5(6):e1192.
23. Hu Y, Wang L, Mbenda HGN, Soe MT, Yu C, Feng H, et al. Genetic diversity, natural selection and haplotype grouping of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein genes from eastern and western Myanmar borders. *Parasit Vectors*. 20 de noviembre de 2019;12:546.
24. Popovici J, Roesch C, Carias LL, Khim N, Kim S, Vantaux A, et al. Amplification of Duffy binding protein-encoding gene allows *Plasmodium vivax* to evade host anti-DBP humoral immunity. *Nat Commun*. 19 de febrero de 2020;11:953.
25. Singh K, Mukherjee P, Shakri AR, Singh A, Pandey G, Bakshi M, et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. *Npj Vaccines*. 28 de septiembre de 2018;3(1):1-10.
26. Invasión de *Plasmodium vivax* de eritrocitos humanos inhibida por anticuerpos dirigidos contra la proteína de unión Duffy - PubMed [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18092885/>

27. Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun.* septiembre de 2009;77(9):4009-17.
28. Ntumngia FB, Adams JH. Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the Plasmodium vivax Duffy Binding Protein. *Clin Vaccine Immunol CVI.* enero de 2012;19(1):30-6.
29. Payne RO, Silk SE, Elias SC, Milne KH, Rawlinson TA, Llewellyn D, et al. Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *JCI Insight.* 2(12):e93683.
30. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. *Science.* 4 de enero de 1980;207(4426):71-3.
31. González JM, Hurtado S, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Variants of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* julio de 2001;96:709-12.
32. Antigenic Diversity of the Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein in Parasite Isolates of Western Colombia in: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Volume 84 Issue 2_Suppl (2011) [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/84/2_Suppl/article-p51.xml
33. A Novel Chimeric Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein Induces Biologically Functional Antibodies That Recognize both VK210 and VK247 Sporozoites | *Infection and Immunity* [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.01667-06?permanently=true&>
34. Santos E de A, Sucupira IMC, de Oliveira Martins BM, de Paula Souza e Guimarães RJ, Catete CP, de Souza RTL, et al. VK210 and VK247 genotypes of Plasmodium vivax in anopheline mosquitoes from Brazilian Amazon. *Sci Rep.* 28 de junio de 2019;9(1):9391.
35. Costa KM de M, Almeida WAF de, Magalhães IB, Montoya R, Moura MS, Lacerda MVG de. Malária em Cruzeiro do Sul (Amazônia Ocidental brasileira): análise da série histórica de 1998 a 2008. *Rev Panam Salud Pública.* noviembre de 2010;28:353-60.
36. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *The Lancet.* 23 de abril de 2005;365(9469):1487-98.
37. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primer.* 3 de agosto de 2017;3(1):1-24.
38. Mecanismos de patogenia en la malaria por Plasmodium falciparum [Internet]. [citado 2 de septiembre de 2021]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000500012
39. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:195-221.

40. Contreras-Ochoa C, Ramsey JM. Gametocitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. *Salud Pública México*. febrero de 2004;46(1):64-70.
41. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 de febrero de 2007;104(6):1919-24.
42. Hosseini SM, Feng JJ. How Malaria Parasites Reduce the Deformability of Infected Red Blood Cells. *Biophys J*. 3 de julio de 2012;103(1):1-10.
43. Warrell DA, Gilles HM. *Essential Malariology*, 4Ed. CRC Press; 2017. 373 p.
44. Santa-Olalla Peralta P, Vazquez-Torres MC, Latorre-Fandos E, Mairal-Claver P, Cortina-Solano P, Puy-Azón A, et al. First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 14 de octubre de 2010;15(41):19684.
45. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax* in: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Volume 95 Issue 6_Suppl (2016) [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/95/6_Suppl/article-p15.xml
46. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. *Vivax malaria*. *Am J Trop Med Hyg*. diciembre de 2007;77(6 Suppl):79-87.
47. Reticulocyte and Erythrocyte Binding-Like Proteins Function Cooperatively in Invasion of Human Erythrocytes by Malaria Parasites | *Infection and Immunity* [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.01021-10?permanently=true>
48. *Frontiers | Plasmodium vivax Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) Functionally Restricted Regions Are Involved in Specific Host-Pathogen Interactions | Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00119/full>
49. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Infect Dis*. 15 de enero de 2004;189(2):190-4.
50. Strategies for Understanding and Reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Hypnozoite Reservoir in Papua New Guinean Children: A Randomised Placebo-Controlled Trial and Mathematical Model [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001891>
51. *Plasmodium spp.* [Internet]. Scoop.it. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.scoop.it/topic/plasmodium-ssp>

52. Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci*. 1 de agosto de 1992;89(15):7085-9.
53. Singh SK, Hora R, Belrhali H, Chitnis CE, Sharma A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*. febrero de 2006;439(7077):741-4.
54. Ampudia E, Patarroyo MA, Patarroyo ME, Murillo LA. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 1 de junio de 1996;78(1):269-72.
55. Baum J, Thomas AW, Conway DJ. Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics*. abril de 2003;163(4):1327-36.
56. Huang Y-T, Lu X-M, Jin X-B, Zhu J-Y. [Research advances on circumsporozoite protein of *Plasmodium*]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 30 de junio de 2012;30:238-42.
57. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med*. 14 de febrero de 2011;208(2):341-56.
58. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. | *Journal of Experimental Medicine* | Rockefeller University Press [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://rupress.org/jem/article/151/6/1504/48697/Monovalent-fragments-Fab-of-monoclonal-antibodies>
59. Fernández-Arias C, Mashoof S, Huang J, Tsuji M. Circumsporozoite protein as a potential target for antimalarials. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 3 de agosto de 2015;13(8):923-6.
60. Abyntek. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes [Internet]. Abyntek Biopharma. 2018 [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.abynetek.com/sistemas-de-expresion-de-proteinas-recombinantes/>
61. Lara ÁR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Mex Ing Quím*. agosto de 2011;10(2):209-23.
62. *bactobac_man.pdf* [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
63. Valderrama JG, Villamizar L. Baculovirus: Hospederos y especificidad Baculovirus: Hosts and specificity. 2013;(2):13.
64. Rohrmann GF, Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*. National Center for Biotechnology Information (US); 2011.

65. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution - ScienceDirect [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201109000871>
66. SOLUCIONES ECOLÓGICAS CONTRA HELIOTHIS - Procampo productos... [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.procampo.net/blog/-b55.html?hcb=1?hcb=1>
67. Solís MM. Interacción insecto-baculovirus. Aplicaciones en la mejora de baculovirus como vector para la expresión heteróloga de proteínas. :176.
68. Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein Expr Purif.* 1 de agosto de 2013;90(2):104-16.
69. How does KCM bacterial transformation work ? [Internet]. ResearchGate. [citado 2 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/post/How-does-KCM-bacterial-transformation-work>
70. Invitrogen® S.O.C. Medium - Medios para pruebas de sensibilidad Microbiología [Internet]. [citado 2 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-s-o-c-ready-to-use-medium/11528896>
71. de Sousa TN, Kano FS, de Brito CFA, Carvalho LH. The Duffy binding protein as a key target for a Plasmodium vivax vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* agosto de 2014;109(5):608-17.
72. Garrido-Cardenas JA, Cebrián-Carmona J, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. Analysis of Global Research on Malaria and Plasmodium vivax. *Int J Environ Res Public Health.* junio de 2019;16(11):1928.
73. Informe mundial sobre el paludismo 2018 [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/world-malaria-report-2018>
74. Shretta R, Liu J, Cotter C, Cohen J, Dolenz C, Makomva K, et al. Malaria Elimination and Eradication. En: Holmes KK, Bertozzi S, Bloom BR, Jha P, editores. *Major Infectious Diseases* [Internet]. 3rd ed. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017 [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525190/>
75. MALARIA PE XIII 2020.pdf [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/MALARIA%20PE%20XIII%202020.pdf>
76. Acharya P, Pallavi R, Chandran S, Chakravarti H, Middha S, Acharya J, et al. A glimpse into the clinical proteome of human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *Proteomics Clin Appl.* noviembre de 2009;3(11):1314-25.
77. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, et al. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science.* 27 de agosto de 1993;261(5125):1182-4.

78. Ancsin JB, Kisilevsky R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J Biol Chem.* 21 de mayo de 2004;279(21):21824-32.
79. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172.
80. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:420.
81. Felberbaum RS. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J.* mayo de 2015;10(5):702-14.
82. Caubet J-C, Ponvert C. Vaccine allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* agosto de 2014;34(3):597-613, ix.
83. Deschuyteneer M, Elouahabi A, Plainchamp D, Plisnier M, Soete D, Corazza Y, et al. Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine. *Hum Vaccin.* mayo de 2010;6(5):407-19.
84. HU Y. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin.* abril de 2005;26(4):405-16.
85. Boyce FM, Bucher NL. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 de marzo de 1996;93(6):2348-52.
86. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms - PubMed [Internet]. [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19500547/>
87. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology - PubMed [Internet]. [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25246703/>
88. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells [Internet]. [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610534/>
89. Aumiller JJ, Hollister JR, Jarvis DL. A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins. *Glycobiology.* junio de 2003;13(6):497-507.
90. 1512152908.pdf [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/Virologia/1512152908.pdf>
91. Método: ligamiento con T4 ADN ligasa [Internet]. Conogasi. 2018 [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://conogasi.org/articulos/metodo-ligamiento-con-t4-adn-ligasa/>

92. Cepa bacteriana JM109 [Internet]. [citado 18 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/bacterial-strains-and-competent-cells/bacterial-strain-jm109/>
93. Ali SA, Chew YW. FabV/Triclosan Is an Antibiotic-Free and Cost-Effective Selection System for Efficient Maintenance of High and Medium -Copy Number Plasmids in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 9 de junio de 2015;10(6):e0129547.
94. McConkey GA, Waters AP, McCutchan TF. The generation of genetic diversity in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:479-98.
95. Airene KJ. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 1 de septiembre de 2003;31(17):101e-101.
96. Mota MM, Rodriguez A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol*. diciembre de 2004;6(12):1113-8.
97. Soares IF, López-Camacho C, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva Matos A, de Oliveira Baptista B, Totino PRR, et al. Recombinant *Plasmodium vivax* circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon. *Sci Rep*. 20 de agosto de 2020;10(1):14020.
98. Patil A, Orjuela-Sánchez P, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Evolutionary dynamics of the immunodominant repeats of the *Plasmodium vivax* malaria-vaccine candidate circumsporozoite protein (CSP). *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. marzo de 2010;10(2):298-303.
99. Souza-Neiras WC, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA, Couto AARA, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? *Malar J*. 23 de junio de 2010;9:178.
100. Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, Patot S, Billotte N, Menegon M, et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 de octubre de 2004;101(40):14455-60.
101. Pratt-Riccio LR, Baptista B de O, Torres VR, Bianco-Junior C, Perce-Da-Silva D de S, Riccio EKP, et al. Chloroquine and mefloquine resistance profiles are not related to the circumsporozoite protein (CSP) VK210 subtypes in field isolates of *Plasmodium vivax* from Manaus, Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 12 de agosto de 2019;114:e190054.
102. Gaur D, Mayer DCG, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*. diciembre de 2004;34(13-14):1413-29.
103. Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. noviembre de 1989;69(4):340-50.
104. Xainli J, Adams JH, King CL. The erythrocyte binding motif of *plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Mol Biochem Parasitol*. diciembre de 2000;111(2):253-60.

105. Siddiqui AA, Xainli J, Schloegel J, Carias L, Ntumngia F, Shoham M, et al. Fine Specificity of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Binding Engagement of the Duffy Antigen on Human Erythrocytes. *Infect Immun.* agosto de 2012;80(8):2920-8.
106. Menard D, Chan ER, Benedet C, Ratsimbaoa A, Kim S, Chim P, et al. Whole genome sequencing of field isolates reveals a common duplication of the Duffy binding protein gene in Malagasy Plasmodium vivax strains. *PLoS Negl Trop Dis.* noviembre de 2013;7(11):e2489.
107. Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, et al. Epitope-specific humoral immunity to Plasmodium vivax Duffy binding protein. *Infect Immun.* mayo de 2003;71(5):2508-15.
108. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de junio de 2008;105(24):8363-8.
109. Invasión de Plasmodium vivax de eritrocitos humanos inhibida por anticuerpos dirigidos contra la proteína de unión Duffy - PubMed [Internet]. [citado 25 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18092885/>
110. Applications of recombinant proteins [Internet]. CUSABIO. [citado 19 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.cusabio.com/c-20272.html>