



**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA
SPATR DE *Plasmodium vivax* EN EL SISTEMA *Escherichia coli***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, MARZO DEL 2020.



**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA
SPATR DE *Plasmodium vivax* EN EL SISTEMA *Escherichia coli***

**Laura Michell Acosta Muñoz
Lauren Nayarinne Arias García**

Edith del Carmen Hernández Rojas-MSc
Asesora interna

Heidy Daniela Ortiz Suárez-Bsc
Asesora externa

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, MARZO DEL 2020.



**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA
SPATR DE *Plasmodium vivax* EN EL SISTEMA *Escherichia coli***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, MARZO DEL 2020.

DEDICATORIA

A nuestros padres.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por formarnos íntegramente, a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, lugar en el que se hizo posible el desarrollo de este proyecto, al doctor Manuel Elkin Patarroyo Murillo y al jefe del departamento de Biología Molecular e Inmunología, Dr. Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez, por ser pilares de la investigación científica y permitirnos realizar nuestro proyecto.

A nuestras tutoras Edith del Carmen Hernández Rojas y Heidy Daniela Ortiz Suárez por su inmensa guía y colaboración en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN		11	
1.		142.	Eliminado
2.2 Específicos		3	Eliminado
3. ANTECEDENTES		4	
4. MARCO TEÓRICO		6	
4.1 La malaria		6	
4.2 Estado actual de la malaria		7	
4.2.1 En el mundo		7	
4.2.2 En Colombia		8	
4.3 Vectores que transmiten la malaria		8	
4.4 Generalidades y descripción de <i>Plasmodium spp</i>		9	
4.4.1 Morfología y Ciclo de vida		9	
4.4.2 Especies de <i>Plasmodium sp.</i> que causan malaria		11	
4.4.3 <i>Plasmodium falciparum</i>		11	
4.4.4 <i>Plasmodium vivax</i>		11	
4.5 Proteínas descritas en <i>Plasmodium</i> implicadas en el reconocimiento e invasión del hepatocito por el esporozoíto		13	
4.5.1 Proteínas descritas en <i>P. falciparum</i>		13	
4.5.2 Proteínas descritas en <i>P. vivax</i>		13	
4.6 Proteína <i>SPATR</i>		14	
5.	175.1 Tipo de investigación	16	Eliminado
5.2 Enfoque de la investigación		16	
5.3 Población		16	
5.4 Muestra		16	
5.5 Procedimientos		16	
5.5.1 Obtención de la muestra		16	
5.5.2 Identificación del gen <i>spatr</i> de <i>P. vivax</i>		17	
5.5.3 Diseño de cebadores		17	
5.5.4 Amplificación de <i>SPATR</i> por PCR		20	
5.5.5 Purificación de producto de PCR		21	
5.5.6 PCR mix para adición de adeninas		21	
5.5.7 Ligación al vector		22	
5.5.8 Transformación		22	

5.5.9 Obtención de recombinantes	23
5.5.10 PCR confirmación del inserto	23
5.5.11 Transformación en células BL21-AI para expresión de la proteína	24
5.5.12 Obtención de los fragmentos expresados	24
5.5.12.1 Obtención de forma denaturante	24
5.5.12.2 Obtención de los fragmentos de forma nativa	25
5.5.13 Purificación por cromatografía de afinidad	25
5.5.14 Renaturación de las recombinantes	25
5.5.15 SDS PAGE y Western blot	26
5.5.16 Diálisis	26
5.5.17 Cuantificación de proteínas	27
5.5.17.1 Cuantificación por método BCA	27
5.5.17.2 Cuantificación por método Bradford	28
5.5.18 Dicroísmo Circular	28
6. RESULTADOS	30
6.1 Amplificación de los fragmentos de <i>PvSPATR</i>	32
6.2 Purificación	30
6.3 Obtención de recombinantes	31
6.4 Secuencia de los fragmentos obtenidos	32
6.5 Expresión de <i>PvSPATR</i> recombinante	33
6.6 Purificación de proteína	33
6.7 Cuantificación de proteína	34
6.8 Dicroísmo Circular	35
6.8.1 SPATR Fragmento 1 Renaturalizado	35
6.8.2 Fragmento 2 renaturalizado	37
6.8.3 Fragmento 2 nativo	38
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Eliminad

ÍNDICE FIGURAS.

Figura 1. mapa genético de la proteína PvSPATR donde se observa, de color amarillo el intrón , de color verde dos exones uno con un total de 230 pares de bases y otro con 595 pares de bases	15
Figura 2. . Tomado de Identifying Potential <i>Plasmodium vivax</i> Sporozoite Stage Vaccine Candidates: An Analysis of Genetic Diversity and Natural Selection. Ventana deslizante donde se observan las regiones conservadas de la proteína -1 y las variables +1.	17
Figura 3. Análisis del dominio de la TSP1, REPEAT, realizado con el programa interproscan.	18
Figura 4. . Programa Generunner, ubicación espacial de los cebadores directo y reverso donde 1 corresponde a cebador directo para fragmento 1; comenzando en el par de base número 64 y 2 corresponde al cebador reverso para fragmento 1 terminando en el par de base número 396.	19
Figura 5. Programa Generunner, ubicación espacial de los cebadores directo y reverso donde 1 corresponde a cebador directo para fragmento 2; comenzando en el par de base número 396 y 2 corresponde al cebador reverso para fragmento 2 terminando en el par de base número 822	19
Figura 6. mapa de la proteína PvSPATR donde se observa, color azul su dominio de trombospondina, en colores café y verde los dos fragmentos en la cual es dividida. correspondiendo a fragmento 1 como color café y fragmento 2 a color verde.	20
Figura 7. Espectros de dicroísmo definidos para las diferentes estructuras secundarias presentes.	29
Figura 8. Gel de agarosa de la amplificación de los 2 fragmentos de la proteína SPATR donde 1 HyP II corresponde al marcador HyP II, 2 corresponde a fragmento 1 con 333 pdb, 3 corresponde a fragmento 2 con 429 pdb	30
Figura 9. productos purificados de fragmentos 1 y 2 de SPATR donde 1 HyP II corresponde al marcador HyP II, 2 corresponde a fragmento 1 con 333 pdb, 3 corresponde a fragmento 2 con 429 pdb	31
Figura 10. producto de la PCR colonia realizado a PvSPATR donde 1-6 corresponde a colonias de fragmento 1 de PvSPATR clonadas; 7 corresponde a un control negativo, 8 corresponde al marcador HyP II de 1 Kb; 9-14 corresponde a colonias del fragmento 2 de PvSPATR clonadas y 15 Control negativo	31
Figura 11. Secuenciación de una colonia procedente del proceso de clonación del fragmento 1 de la proteína PvSPATR acoplada con la secuencia de la proteína obtenida de plasmDB.	32
Figura 12. . Secuenciación de una colonia procedente del proceso de clonación del fragmento 2 de la proteína PvSPATR acoplada con la secuencia de la proteína obtenida de plasmDB	32
Figura 13. . Western blot de la expresión de PvSPATR Columna 1: Cultivo inducido con L-arabinosa para fragmento 1 12,6 KDa; Columna 2: Cultivo no inducido (control). Columna 3: Cultivo no inducido por duplicado. Columna 4: Cultivo inducido con L-arabinosa para fragmento 2 de 16,9 KDa. El marcador molecular es mostrado a la derecha del gráfico	33
Figura 14. Western blot de la purificación de expresión de PvSPATR para fragmento 1, donde se recuperó la proteína en las dos primeras eluciones de PvSPATR purificado y 3 corresponde al marcador.	34

Figura 15. Western blot de la purificación de expresión de <i>PvSPATR</i> para fragmento 2 donde 1-6 corresponde a los gradientes de elución de <i>PvSPATR</i> purificado y el 7 el marcador.	34
Figura 16. Purificación de expresión nativa de <i>PvSPATR</i> ; 1:fragmento 1; 2: fragmento 2; 3: marcador OP444444	
Figura 17. Gráfica obtenida de cuantificación por método BSA con la respectiva curva de BSA donde se observa en el eje Y el valor de las absorbancias dadas y en el eje X las concentraciones de los diferentes analitos.	35
Figura 18. dicroísmo circular fragmento 1 renaturalizada de <i>PvSPATR</i>	36
Figura 19. deconvolución correspondiente al algoritmo SELCON3, y algoritmo CONTINLL	36
Figura 20. análisis in silico fragmento 1 de <i>PvSPATR</i>	37
Figura 21. dicroísmo circular fragmento 2 renaturalizada de <i>PvSPATR</i>	37
Figura 22. deconvolución fragmento 2 correspondiente al algoritmo SELCON3	37
Figura 23. análisis in silico fragmento 2 de <i>PvSPATR</i>	38
Figura 24. dicroísmo circular fragmento 2 nativo de <i>PvSPATR</i>	

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. . Información de primers previamente diseñados y utilizados en el presente estudio para la amplificación de los dos fragmentos de la proteína SPATR. En la secuencia de los cebadores las letras en minúscula indican una metionina que permite necesaria para que la enzima comience el trabajo.	18
Tabla 2. Información correspondiente a los procedimientos realizados en 35 ciclos de PCR para amplificación de los dos fragmentos de la proteína SPATR.	20
Tabla 3. Temperatura de anillamiento establecida para amplificación replicable correspondiente a dos fragmentos de SPATR	21
Tabla 4. Productos manejados para PCR mix	22
Tabla 5. productos usados para la ligación de los fragmentos 1 y 2 de la proteína PvSPATR	22
Tabla 6 productos usados en el proceso de transformación	23
Tabla 7. Productos usados en el proceso de PCR colonia para la obtención de colonias clonadas.	24
Tabla 8. Curva de albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones de BSA	27
Tabla 9. Cantidad de productos usados para el revelado	27
Tabla 10. Curva de albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones de BSA	28



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA.**

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA
SPATR DE *Plasmodium vivax* EN EL SISTEMA *Escherichia coli***

RESUMEN

La malaria causada por la especie *Plasmodium vivax*, es una enfermedad de alto impacto en salud pública alrededor del mundo, se reporta que el 53% de los casos de malaria por esta especie se concentran en el Sudeste Asiático, el 47% en la India y en países de América latina representa una amenaza permanente, siendo la especie predominante con alrededor del 75% de los casos de paludismo.

P. vivax ha demostrado un interés de investigación debido a su importancia epidemiológica, a pesar de esto los estudios respecto a las interacciones moleculares en el proceso de invasión se han visto retrasados por su difícil propagación *in vitro* debido a la preferencia del parásito por invadir reticulocitos, como consecuencia de lo anterior el conocimiento sobre las moléculas envueltas en el proceso de invasión, es escaso.

En este estudio se expresaron y analizaron estructuralmente dos fragmentos de la proteína *PvSPATR*, el fragmento 1 con un tamaño 333 de pb y el fragmento 2 con un tamaño de 429 pb a través del uso de técnicas moleculares, como PCR y, técnicas inmersas en la obtención de las proteínas recombinantes. Esta proteína ha sido reportada en *P. falciparum* como importante para la unión del esporozoito a los hepatocitos y, como proteína multiestadío, lo que sugiere continuar con ensayos de unión y creación de péptidos específicos que determinen la importancia de este antígeno a nivel funcional *in vitro* y permita así una aproximación de su función *in vivo*.

Palabras clave: Malaria; *Plasmodium sp.*; *Plasmodium vivax*; proteínas recombinantes; *PvSPATR*.

Estudiantes Acosta Muñoz Laura Michell
Arias García Lauren Nayarinne

Docentes **Edith del Carmen Hernández Rojas-MSc**
Asesora interna
Heidy Daniela Ortiz Suárez-Bsc
Asesora externa

Institución FUNDACIÓN INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA DE COLOMBIA

Fecha: **20 marzo del 2020**

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* sp., su vector transmisor es el mosquito hembra *Anopheles*¹, actualmente es una de las problemáticas de salud más relevantes en la población alrededor del mundo. En el 2018 el Instituto Nacional de Salud (INS) en su informe expuso que “de las 450 especies de mosquitos del género *Anopheles* reportadas en el mundo, alrededor de 43 de estas se han encontrado en Colombia”², siendo las especies de *Anopheles albimanus*, *An. nuneztovari* y *An. darlingi* predominantes en el país; además se describe al parásito causante de la enfermedad, denominado *Plasmodium* sp., del que se conocen unas 175 especies en el género, entre esas se encuentran *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, y con menor frecuencia *P. knowlesi*³, conocidas por afectar severamente a los seres humanos generando cefalea, mialgias, anorexia y vómito²; especies como *P. vivax* y *P. ovale* presentan un estadio responsable de recaídas que se mantienen en las células del huésped por un intervalo 3-45 semanas antes de madurar a esquizontes³, conocidos como hipnozoitos siendo parásitos latentes dentro de los hepatocitos intactos que genera recaídas de la infección al continuar luego de un tiempo el proceso de maduración a esquizontes para reactivar la parasitemia asexual en sangre⁴.

Plasmodium vivax generalmente causa malaria benigna no complicada, sin embargo ocasionalmente puede provocar una enfermedad grave con afectación del órgano terminal que pone en peligro la vida, es por ello que cobra importancia de estudio pues desencadena como malaria cerebral⁵.

Es necesario el control de esta parasitosis, ya que durante el año 2018 en Colombia fueron notificados 62141 casos de malaria por parte del INS, predominando la infección por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) con 31134 casos², que impactan principalmente áreas geográficas con población vulnerable, debido a su alto déficit económico, condiciones escasas de salubridad, la estructura de sus viviendas, el clima en que habitan⁶, estas son las principales circunstancias que contribuyen a la permanencia de la enfermedad en estas zonas del país; hoy día los esfuerzos realizados han sido infructuosos en el control de la malaria, sin embargo la identificación de antígenos involucrados en el proceso de invasión del

parásito y en diversas fases de su ciclo biológico, se ha convertido en una estrategia ⁷ prometedora que contribuya al desarrollo de una potencial vacuna que logre mitigar y finalmente controlar la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior y con el propósito de contribuir en el conocimiento de proteínas importantes para *P. vivax*, con el fin de identificar antígenos que permitan bloquear la entrada del parásito, se llevará a cabo la expresión de la proteína PvSPATR en el sistema procariota *Escherichia coli*, siendo esta una proteína con un homólogo en *Plasmodium falciparum*, la cual es una proteína de superficie con un dominio de repetición de trombospondina alterado, importante para la movilidad del parásito, la unión a la célula huésped y su invasión según describieron Morahan y cols ⁸, en el 2009; además es un antígeno multiestadio pues se describió su presencia durante diferentes etapas sanguíneas del parásito, expresándose principalmente en la superficie del esporozoito y logrando su unión a hepatocitos ⁹, lo que lo convierte en una fuente valiosa de estudios.

3. OBJETIVOS

2.1 General

Establecer las condiciones óptimas de clonación y expresión recombinante de fragmentos de la proteína SPATR, en el sistema de expresión procariota *Escherichia coli*.

2.2 Específicos

- Obtener fragmentos del gen que codifica para la proteína SPATR de *Plasmodium vivax*, a partir de ADN complementario.
- Producir los clones de los fragmentos del gen *spatr*, en el sistema *Escherichia coli*.
- Realizar una aproximación de cada uno de los fragmentos obtenidos, tanto en forma nativa como renaturada en el sistema *Escherichia coli*, permitiendo el análisis de sus elementos de estructura secundaria por medio de dicroísmo circular.

4. ANTECEDENTES

Triglia y Cols ¹⁰, realizaron una investigación en la que se determinó el interés sobre *Plasmodium*, notando que “*P. vivax* está restringido al crecimiento, en reticulocitos” ¹⁰ que representan sólo aproximadamente el 1% de los glóbulos rojos totales en circulación. En los procesos de infección por *Plasmodium vivax* se pensaba que generaba una infección igualitaria para todos los tipos de sangre existentes en los seres humanos; es así como Cavasini y Cols ¹¹, generan un análisis de los diferentes tipos de sangre, en el que se pudo evidenciar que dicha hipótesis estaba errada, dado que los polimorfismos del grupo sanguíneo Duffy son importantes en áreas donde predomina *Plasmodium vivax*, debido a que esta molécula actúa como un receptor para este protozoo. Es así como en el 2007 se informó sobre la genotipificación del grupo sanguíneo Duffy en pacientes con malaria por *P. vivax* de cuatro áreas endémicas brasileñas diferentes, que exploraban asociaciones significativas entre las variantes de los grupos sanguíneos y la susceptibilidad o resistencia a la malaria, estudio que concluyó que las personas con el genotipo FYA / FYB tienen una mayor susceptibilidad a la malaria, resultados que a través de un mayor análisis llegaron a concluir relaciones que manejan parásito-huésped en regiones en donde *P. vivax* es endémico ¹¹.

Fang y Cols.¹², determinan en 1991 que la infección por *P. vivax* depende fundamentalmente de la capacidad del parásito para reconocer e invadir los reticulocitos humanos, este proceso de invasión implica una interacción entre la proteína de unión a Duffy (*Pv* DBP, por sus siglas en inglés) en merozoitos y el receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) en la superficie de los eritrocitos.

De acuerdo a los análisis realizados en el 2010 por Westenberger y Cols.¹³, acerca de los estadios sanguíneos y en esporozoitos de *P. vivax* se demostró su producción de formas hepáticas durmientes, denominadas hipnozoitos que con el tiempo y favorecidos por una baja en el sistema inmune pueden dar lugar a una nueva crisis de la enfermedad, según lo describe García y Cols ¹⁴.

Es así como los merozoitos penetran en los eritrocitos formando los trofozoítos, esto produce una división nuclear del trofozoíto tardío en diversos fragmentos, formado así un esquizonte. Terminada la etapa de maduración se genera una ruptura del eritrocito liberando así a los merozoítos en el torrente sanguíneo. Esta fase del parásito invade de nuevo otros eritrocitos y se continúa el ciclo repitiendo el proceso denominado, esquizogonia eritrocítica ¹⁵⁻¹⁶. En diferentes estudios se demuestran que todas las especies de *Plasmodium* sp. se asemejan en su mecanismo de crecimiento, desarrollo, metabolismo e interacciones huésped-parásito, además de la presencia de síntomas a partir de su etapa de merozoíto. Una de las proteínas involucradas en la invasión es secretada y contienen un dominio de repetición de trombospondina Tipo I denominada *PfSPATR*, la cual se ha demostrado que participa en “el estadio de ookinete, la motilidad del esporozoito, en la unión a la célula huésped y la invasión” ¹⁶ además de ello se encontró que la proteína también posee una región rica en cisteínas que podría representar un dominio tipo EGF tipo II, destacando su importancia antigénica debido a que es ortóloga para las especies *P. yoelii* y *P. vivax*.

Identificando su importancia se realizaron procedimientos experimentales, en *PfSPATR* logrando su amplificación y expresión, en esta investigación realizada por Chattopadhyay et al.¹⁷, se logró establecer que la proteína de *PfSPATR* no solo se encuentra en el estadio de ookinete, sino que este se transcribe en todas las etapas del ciclo de vida del parásito, esporozoitos, etapas eritrocíticas asexuales y gametocitos; teniendo gran relevancia en el estadio de esporozoito debido a su posible papel en la invasión de células hepáticas ¹⁷.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 La malaria

La malaria, cuyo transmisor es el mosquito *Anopheles*, tiene más de veinte millones de años de antigüedad, de acuerdo a Poinar y Cols ¹⁸ ; no obstante el concepto de malaria no es una idea reciente, pues fue sugerido por Linnæus, Kircher y Nyander, de acuerdo a King y Cols ¹⁹, sin embargo fue Ross y Cols ²⁰, en su trabajo de transmisión de la malaria, descubrieron que la vía de infección es la picadura de un mosquito, a través de estudios con aves, estas conclusiones se presentaron ante la Asociación Médica Británica en julio de 1898 y Ronald Ross consiguió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus descubrimientos en 1902.

Los procesos infecciosos de esta enfermedad involucran el desarrollo de manifestaciones clínicas de los pacientes, en una investigación alterna realizada ²¹, se presentaron once casos de malaria severa por *Plasmodium vivax* en Bikaner (India occidental), “los pacientes mostraron malaria cerebral, insuficiencia renal, colapso circulatorio, anemia grave, hemoglobinuria, sangrado anormal, síndrome de dificultad respiratoria aguda e ictericia” ²¹ para el reconocimiento de los procesos infecciosos es primordial la caracterización del parásito y el agente causal.

Se determina que la expresión de la enfermedad de dicho parásito en los hospederos (humanos) puede desencadenar un cuadro febril acompañado de una variedad importante de síntomas, 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; Knudson y Cols ²², determinan que las manifestaciones clínicas se presentan habitualmente después de un periodo de incubación, existe una importante diferencia entre *P. vivax* y *P. falciparum*, es su tiempo de infección, mostrando que una es más prolongada que la otra consecutivamente entre 10-21 días y esto interfiere también en los tiempos de infección, con los cuales se había descrito comúnmente que la especie letal era *P. falciparum* ²².

4.2 Estado actual de la malaria

4.2.1 En el mundo

Al referirse a la malaria y la importancia que esta tiene frente a las infecciones parasitarias se podría identificar como una de las más importantes y presentes desde su aparición, si bien se conoce que existen cuatro especies de parásitos causantes de dicha infección, esta se podría clasificar en su prevalencia de porcentaje situando así a *P. falciparum* y *P. vivax* como las más virulentas, según Philippe y Cols ²³.

En cuanto al proceso de erradicación, se podría destacar que para medio siglo atrás la malaria se encontraba completamente ausente o suprimida en muchos lugares del mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay entre 300 y 500 millones de personas infectadas con malaria ²⁴ sin embargo, para el 2002 en diferentes lugares donde se pensaba que su eliminación era definitiva, nuevos casos aparecieron, denominándose, así como enfermedad reemergente. Sin embargo, dicha infección no se podría clasificar completamente con acuñado término debido a que, por falta de presupuesto y/o falta de inversión, esta no ha tenido la importancia de investigación necesaria.

Es importante reconocer que los casos de mortalidad han logrado un mayor porcentaje de muertes en el pasar del año, afirman Piero y Cols.²⁵ “El fracaso actual para controlar la malaria a través del control eficaz de vectores y el tratamiento de la enfermedad, resulta principalmente de la incapacidad de administrar el manejo de casos apropiado a una proporción significativa de pacientes”,²⁵.

Dos décadas atrás se estimaba que más de un tercio de la población mundial se encontraba en áreas endémicas de malaria “mil millones de personas pueden ser portadoras de parásitos en cualquier momento” ²⁶, adicional a esto es importante destacar que la mortalidad relacionada con la malaria es particularmente difícil de medir pues los síntomas de la enfermedad son inespecíficos y la mayoría de las muertes ocurren en el hogar ²⁶.

Para el reporte del año 2018, último informe realizado por la Organización Mundial de la Salud, las cifras se encuentran reportadas en 219 millones de casos de paludismo en 90 países, las muertes se mantuvieron en 435.000 en 2017 ²⁷.

4.2.2 En Colombia

Para el territorio colombiano es importante determinar que, sus zonas endémicas son inestables mostrando patrones variables en diferentes regiones eco-epidemiológicas, es así como Colombia mantiene cifras promedio de 50.000 a 100.000 casos anuales reportados en el ministerio de salud y protección social.²⁷.

Un dato importante por destacar es el predominio de la especie *P. vivax* en el territorio, mostrando porcentajes del 60 - 65% desde 1974, reportando un particular ciclo de infecciones que aparece en promedio cada 4 a 7 años, informa el ministerio de salud, formulando la determinación de cambios climáticos ocurridos en dicha zona geográfica. “En los últimos años el evento malárico ha mantenido una tendencia al descenso, pasando de 171.960 casos en el 2000 a 50.301 casos en el 2017 y en las primeras 48 semanas de 2018 se han notificado 54.545 casos” ²⁷, sin embargo, aún se presenta un número importante de casos y los esfuerzos se deben mantener hasta lograr su erradicación.

4.3 Vectores que transmiten la malaria

La malaria es transmitida por la hembra del género *Anopheles* los cuales cuentan con más de 43 ejemplares en Colombia según Olano y Cols.²⁸, para la identificación y determinación de estos taxonómicamente se observan sus caracteres morfológicos en sus diferentes estadios, relacionados principalmente con la quetotaxia de larvas.

Según Sinka y Cols ²⁹ en su artículo relacionado con los vectores predominantes de la malaria, para el 2012 en el mapa global realizado se destaca la variabilidad espacial en la complejidad de la situación del vector, en África, *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis* y *An. funestus* son codominantes en gran parte del continente, mientras que en la región de Asia y el Pacífico existe una situación muy compleja con coexistencia de especies múltiples y dominio de especies variable, como es el caso de *An. subpictus sl*, *An. aconitus* y *An. annularis* ²⁹.

4.4 Generalidades y descripción de *Plasmodium spp*

Los parásitos de la malaria pertenecen al reino protista, filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida, familia Plasmodiidae y género *Plasmodium*, este parásito se transmite a través de vectores de insectos infectando a huéspedes vertebrados, incluidas varias especies de primates no humanos ³⁰.

Estudios realizados por Liu y Cols ³¹, demostraron que el parásito surgió en los gorilas occidentales (*Gorilla gorilla*) y no en otros primates como chimpancés o bonobos, de acuerdo con Liu W et al., hace 100 millones de años surgieron los ancestros de la malaria que eran parásitos de mosquitos, según el autor hace 25 millones de años ya existía la malaria y las formas que infectan humanos, llegando de gorilas a humanos hace tan solo 10.000 años ³¹.

4.4.1 Morfología y Ciclo de vida

Los parásitos de la malaria forman cuatro etapas de desarrollo en humanos como lo describen Liu y Cols.³¹, (esquizontes hepáticos y luego trofozoítos intraeritrocitarios, esquizontes y gametocitos) y tres etapas de desarrollo en mosquitos (ooquineto, ooquistes y esporozoitos). Los esquizontes hepáticos aparecen como grupos de pequeños cuerpos basófilos (núcleos de merozoítos) ubicados dentro de los hepatocitos del huésped, que miden 40-80 μm de diámetro cuando maduran. Las etapas intraeritrocitarias consisten en pequeños trofozoítos redondeados (formas de anillo) que miden 1-2 μm de diámetro, esquizontes multinucleados amorfos que miden hasta 7-8 μm de longitud, y micro- (σ) y macro- (ρ) gametocitos que varían en longitud de 7-14 μm .³¹, las características morfológicas (tamaño, forma y apariencia) de los estadios sanguíneos son características de cada *Plasmodium spp.* Los microgametocitos tienen un núcleo más grande y difuso (listo para la producción de gametos), mientras que los macrogametocitos tienen citoplasma de tinción más oscura (abundantes ribosomas para la síntesis de proteínas). Liu y Cols³¹, afirman que, en el mosquito, los microgametos largos y delgados (15-25 μm de longitud) producidos por exflagelación fertilizan los macrogametos redondeados para formar ooquinetos móviles (15-20 x 2-5 μm) que migran a través de la pared intestinal para formar ovocitos ovoides (arriba hasta 50 μm de diámetro) en la superficie exterior, los ooquistes producen miles de esporozoitos alargados delgados (~ 15 μm de largo) que finalmente infectan las glándulas salivales³¹.

El estadio de esporozoíto del *Plasmodium* migra y penetra a través de diferentes células en el hospedador vertebrado hasta llegar al hepatocito y formar la vacuola parasitófora³²; la ruptura del hepatocito libera otro estadio del parásito llamado merozoíto, el cual invade a los eritrocitos y también forma una vacuola parasitófora. En esta investigación, Spencer y Cols³² proponen varios mecanismos de invasión como el movimiento de deslizamiento del esporozoíto.

El esporozoíto es el responsable de establecer la enfermedad en su hospedador vertebrado y por lo tanto los procesos de invasión de este es uno de los puntos fundamentales de estudio; los esporozoítos entran en la hemolinfa, en la cavidad del mosquito, hasta invadir las glándulas salivales donde permanecen hasta ser inoculados, con la saliva, en la piel del hospedador mamífero, esta forma móvil (esporozoíto) contiene organelos secretores completamente especializados, tanto estas formas como las no móviles secretan unas proteínas especializadas en su etapa sexual que ocuparan una participación importante en la fertilización, el reconocimiento de la célula hospedadora y en el proceso de movilización ³³.

4.4.2 Especies de *Plasmodium sp.* que causan malaria

Existen alrededor de 175 especies de este protozoo, que se han clasificado en varios subgéneros, los cuales se encuentran en mamíferos, aves y reptiles; en la especie humana se encuentran principalmente cuatro especies como lo son *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, aunque ocasionalmente pueden ser infectados por otras especies de primates no humanos como *Plasmodium simium*, *P. brasilianum*, *P. inui*, entre otras, Liu y Cols ³¹, afirman que en su mayoría se encuentran en áreas tropicales y subtropicales dependiendo de la distribución de sus insectos vectores.

4.4.3 *Plasmodium falciparum*

Es importante resaltar en esta especie de *Plasmodium* que a partir de su estadio de gametocito en la etapa sexual permitió un acercamiento a la descripción de la malaria a finales del siglo XIX ³⁴ esta especie de *Plasmodium* es generalmente la más patógena y causante de muertes, según Ortega y cols ³¹ y la mayormente diagnosticada; común en África, Nueva Guinea y Haití, notándose su participación exponencial a partir de 1984, es la especie con mayores complicaciones y tasa de mortalidad presentando cuadros de anemia y malaria cerebral.

4.4.4 *Plasmodium vivax*

La infección causada por *Plasmodium vivax* amenaza a casi el 40% de la población mundial, lo que da como resultado 132 a 391 millones de infecciones clínicas cada año, Price y cols ³⁵ afirman que “la mayoría de estos casos se originaron en el sudeste de Asia y el Pacífico occidental, aunque un número significativo también ocurrió en África y América del Sur” siendo así que para las últimas dos décadas *Plasmodium vivax* fuese responsable de un 25-40% de los 515 millones de casos anuales de malaria en todo el mundo; aunque a menudo se considera que causa una infección benigna en comparación con las manifestaciones graves que se observan frecuentemente con *P. falciparum* no tratado ³⁶.

Carlton y cols ³⁷, infiere que los individuos con déficit económico se ven más involucrados por las márgenes con las que se encuentran habitando; existe una evidencia creciente de que la carga general, el impacto económico y la gravedad de la enfermedad por *P. vivax* han sido subestimados. Las estrategias de control de la malaria han tenido un éxito limitado y están confundidas por la falta de acceso a diagnósticos confiables, la aparición de aislamientos resistentes a múltiples fármacos, la capacidad del parásito para transmitir temprano en el curso de la enfermedad y la recaída de etapas de hígado latente en diferentes intervalos de tiempo después de la infección inicial.

Anualmente, aún se tenía una cifra muy alta de infección, sin embargo la incidencia de la malaria se redujo drásticamente en algunas partes de África al aumentar el despliegue de medidas contra los mosquitos *Anopheles* y los nuevos tratamientos que contenían artemisinina ³⁸, lo que generó un llamado a la erradicación mundial al finalizar el año 2008; no obstante de acuerdo a la OMS ²⁴, la cifra estimada de muertes por paludismo en 2017 fue de 435.000 alrededor del mundo, afectando principalmente a menores de 5 años de la región Africana, en países como Nigeria, República Democrática del Congo, Mozambique y Uganda.

Es necesario destacar que el parásito en estudio, anteriormente no era muy notable, sin embargo Chai y Cols ³⁹, afirmaba que su extensa diversidad genética encontrada actualmente en las poblaciones de *P. vivax* en las Américas es consistente con las sucesivas olas migratorias y la subsiguiente mezcla entre parásitos de diferentes poblaciones de origen, a este parásito se le otorga según Rodríguez y Cols ⁴⁰, “la supervivencia a cruces oceánicos precolombinos de largo alcance desde el Pacífico occidental a las Américas” ⁴⁰.

4.5 Proteínas descritas en *Plasmodium* implicadas en el reconocimiento e invasión del hepatocito por el esporozoíto

4.5.1 Proteínas descritas en *P. falciparum*

Se han descrito proteínas relacionadas con el proceso de invasión como la proteína de circumsporozoito (CSP) ⁴¹ que se encontraba mayormente en la superficie del parásito ligado a la membrana del esporozoito por medio de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) ⁴² dirigiéndose al tejido en específico a los heparán sulfato (HSPG) en los sinusoides del hígado ⁴³, sin embargo luego se determinó su función dentro de la invasión a hepatocitos, afirmando que no interactúa específicamente con HSPG, sino que se procesa para exponer el dominio de adhesión tipo trombospondina (TSR) una vez que el esporozoito reconoce HSPG por otros medios ⁴³. El dominio de repetición de trombospondina alterado (TSR) ¹⁷ que poseen estas proteínas es fundamental en su estructura, ya que tiene que ver con la movilidad del parásito y la unión e invasión de la célula huésped.

Otra de las proteínas descritas, se localiza en los micronemas y es secretada sobre la superficie del parásito ⁴⁴, se denomina TRAP o proteína anónima relacionada con la trombospondina, la cual participa en procesos de motilidad e invasión a hepatocitos ⁴⁵⁻⁴⁶ y han sido reconocidos receptores para este antígeno en las glándulas salivales de mosquitos y células hepáticas ⁴⁷.

4.5.2 Proteínas descritas en *P. vivax*

La descripción de la proteína del circumsporozoito (CSP) ⁴⁸ como la principal en la superficie celular del esporozoito *Plasmodium*, es importante ya que se encuentra en todas las especies causantes de malaria en un nivel de conservación estructural alto ⁴⁹, sin embargo posteriormente se describió a *PvpuCSP* ⁵⁰ como una proteína completamente diferente de la conocida CSP, ya que esta es una proteína de membrana integral implicada en la vía de ubiquitinación y su expresión no se limita solamente a la etapa de esporozoito ⁵⁰ lo que la posiciona como un objetivo de estudio antipalúdico.

La proteína de adhesión relacionada con la trombospondina presente en esta especie (*PvTRAP*) se localiza en la superficie de los esporozoitos ⁵¹, se une a las moléculas de heparán sulfato de los hepatocitos durante el contacto inicial entre los hepatocitos y los esporozoítos invasores. La investigación de la proteína CSP y TRAP conjuntamente pueden funcionar al bloquear la invasión de esporozoitos ⁵²⁻⁵³, ya que en el estudio realizado se obtuvieron diferentes especificidades de unión de anticuerpos que pueden funcionar en diferentes etapas de la invasión de hepatocitos ⁵³.

La proteína secretada por *Plasmodium vivax* con dominio de repetición de trombospondina alterado *PvSPATR* ⁵⁴ está incluida dentro de las proteínas multiestadio importantes en las especies de *Plasmodium*, ya que uno de sus papeles principales dentro de la infección es la invasión al hepatocito, teniendo en cuenta esto, el análisis de este antígeno contribuye en la posible conformación de algún tipo de inmunización que mitigue los daños de la enfermedad en la población.

4.6 Proteína *SPATR*

Esta proteína compuesta por 274 aminoácidos ⁵⁵ está presente en la superficie de los parásitos, posee una versión alterada del dominio de repetición de trombospondina tipo I,⁹ característica relacionada con la movilidad del parásito, la unión a la célula huésped y la invasión de esta; esta proteína se expresa en varias etapas del ciclo parasitario, entre ellas en el merozoíto, gametocito y esporozoíto, siendo en esta fase donde participa en la invasión de células hepáticas ⁵⁶.

En estudios acerca de la unión de la proteína PfSPATR a las células de hepatoma realizados simultáneamente con la proteína Pf-CSP ¹⁷, se generaron resultados similares en los dos antígenos, lo que sugirió a SPATR como un posible ligando del parásito, relacionado con la interacción de esporozoitos y células hepáticas; además se describió que la proteína recombinante PkSPATR producida en *Escherichia coli* se unía con alta especificidad a una línea celular de hepatoma humano llamada HepG2 ⁵⁷, finalmente en un estudio realizado sobre la proteína SPATR en la especie de *Plasmodium berghei*, se concluyó que PbSPATR no es necesaria para la invasión de hepatocitos, sin embargo juega un papel esencial durante las etapas sanguíneas del parásito ⁵⁸.

Debido a la presencia de la proteína en diferentes especies de parásitos de la malaria y su aparición multiestadio dentro de la infección parasitaria, la posiciona como un antígeno importante de estudio, con la finalidad de determinar el papel que desempeña en cada especie de este importante protozoo.

La PvSPATR codificada por 982 pares de bases, en las que cuenta con un intrón de 155 pb ubicado en la posición 230 y dos exones uno al principio del gen entre las posiciones 1 y 230 conformado por 230 pb y el otro ubicado posterior al intrón con 595 pares de bases ubicado en la posición 388 a la posición 982⁵⁵, como se observa en la figura 1.



Figura 1. mapa genético de la proteína *PvSPATR* donde se observa, de color amarillo el intrón , de color verde dos exones uno con un total de 230 pares de bases y otro con 595 pares de bases

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de investigación

El estudio fue de tipo experimental ya que se emplearon técnicas de biología molecular controlando las condiciones en las cuales se llevaron a cabo.

5.2 Enfoque de la investigación

Experimental

5.3 Población

Glóbulos rojos infectados con *Plasmodium vivax*

5.4 Muestra

DNA de parásitos de *Plasmodium vivax* cepa VSG-1 obtenidos a partir de glóbulos rojos infectados con el parásito.

5.5 Procedimientos

5.5.1 Obtención de la muestra

La muestra correspondía al ADNc previamente sintetizado, desde el ARN extraído de la cepa: vivax Colombia Guaviare (VCG-1) usada en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

5.5.2 Identificación del gen *spatr* de *P. vivax*

La secuencia codificante de la proteína PvSPATR fue extraída de la base de datos PlasmoDB, bajo el código de acceso PVX_002900, siendo este gen un homólogo de *Plasmodium falciparum* con código de acceso PF3D7_0212600.

5.5.3 Diseño de cebadores

Los cebadores usados en el proyecto se diseñaron sobre los fragmentos conservados del gen que codifica para PvSPATR, teniendo en cuenta las condiciones establecidas previamente en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), por Garzón y cols⁵⁴. Se procedió entonces a la selección de la secuencia del gen que codifica para la proteína desde PlasmoDB, así tras el análisis de las áreas más conservadas según la ventana deslizante⁵⁴, todas aquellas con un score menor a 1, que se observaron en la ventana deslizante, estas son las consideradas conservadas, es decir presenta selección negativa (figura 2.)

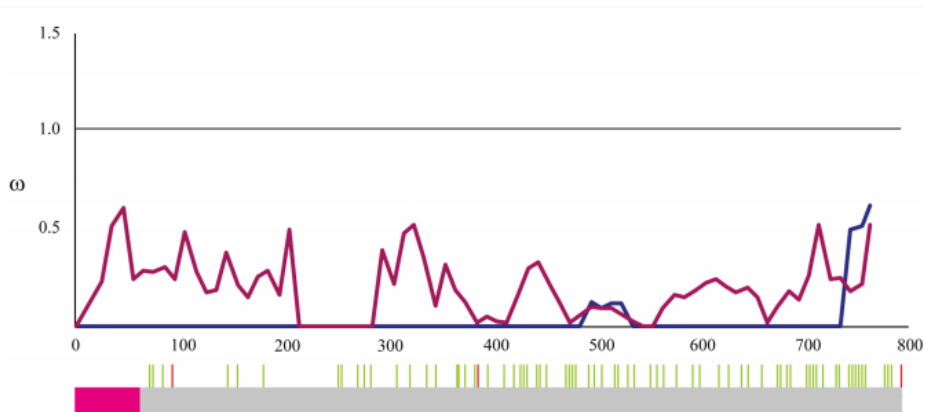


Figura 2. Tomado de Identifying Potential *Plasmodium vivax* Sporozoite Stage Vaccine Candidates: An Analysis of Genetic Diversity and Natural Selection. Ventana deslizante donde se observan las regiones conservadas de la proteína -1 y las variables +1.

A nivel Inter-especie se diseñaron los cebadores basados en la selección previa de dos fragmentos del gen teniendo en cuenta el dominio presente hacia el extremo C-Terminal, analizado con el programa Interproscan como se observa en la figura 3.

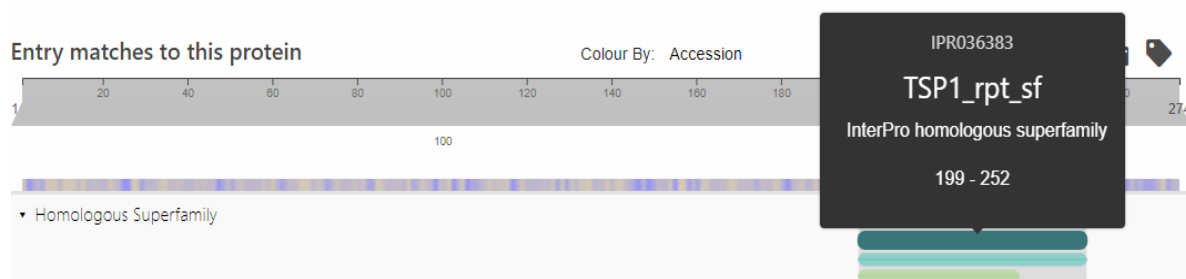


Figura 3. Análisis del dominio TSP1 REPEAT, realizado con el programa Interproscan

Tras el análisis bioinformático realizado previamente por el grupo de Biología Molecular, se definió el uso de los siguientes cebadores, Tabla 1.

NOMBRE	SECUENCIA 5´ - 3´	LONGITUD (pb)	UBICACIÓN	AMPLÍMERO ESPERADO
F1 Dir	atg GAGCTGAGCAAGAACTGTT	20 pb	64- 83 pb	333 pb
F2 Rev	TGACATGCCTTTGAACCCGA	20 pb	396 -377 pb	
F1 Dir	atg TCAGTTGTGATCGACTACGA	20 pb	395 - 413 pb	429 pb
F2 Rev	GGCTGCTCCGATTGACCG	18 pb	822-805 pb	

Tabla 1. Información de cebadores previamente diseñados y utilizados en el presente estudio para la amplificación de los dos fragmentos de la proteína *SPATR*. En la secuencia de los cebadores las letras en minúscula indican una metionina que permite necesaria para que la enzima comience el trabajo.

Así con los cebadores utilizados se esperaba la obtención de un fragmento de 333 pb para el fragmento 1 del gen de la proteína *SPATR* con las ubicaciones de estos cebadores como se muestra en la figura 4.

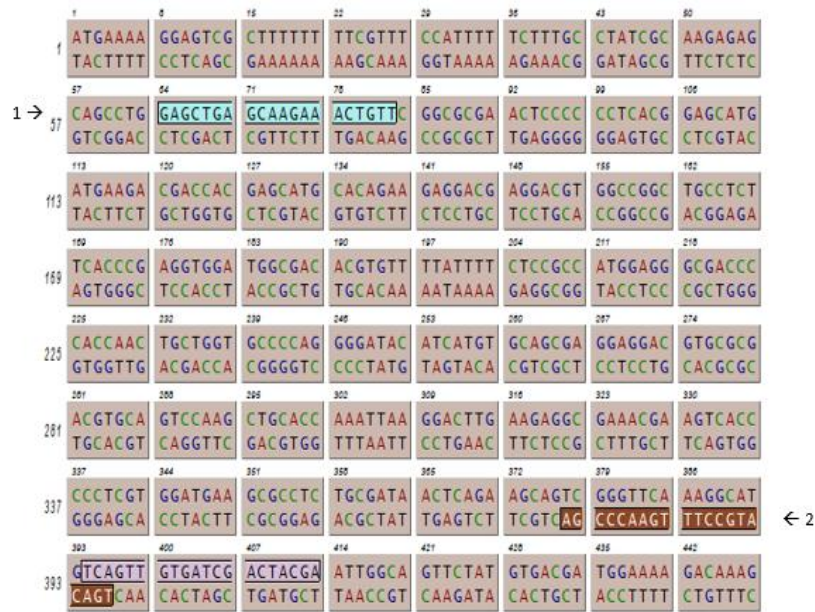


Figura 4. Programa Generunner, ubicación espacial de los cebadores directo y reverso donde 1 corresponde a cebador directo para fragmento 1; comenzando en el par de base número 64 y 2 corresponde al cebador reverso para fragmento 1 terminando en el par de base número 396.

De otro lado, se esperaba la obtención de un fragmento de 429 pb para el fragmento 2 del gen de la proteína *SPATR* con las ubicaciones de estos cebadores como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Programa Generunner, ubicación espacial de los cebadores directo y reverso donde 1 corresponde a cebador directo para fragmento 2; comenzando en el par de base número 396 y 2 corresponde al cebador reverso para fragmento 2 terminando en el par de base número 822

Obteniendo así dos fragmentos que abarcaran la proteína PvSPATR como se observa en la figura 6.



Figura 6. mapa de la proteína *PvSPATR* donde se observa, color azul su dominio de repetición de trombospondina, en colores café y verde los dos fragmentos en la cual es dividida. correspondiendo a fragmento 1 como color café y fragmento 2 a color verde.

5.5.4 Amplificación de SPATR por PCR

Se realizó la estandarización de la PCR para la amplificación de los dos fragmentos del gen con los cebadores diseñados, esto se realizó a partir de ADNc en dilución 1:10. Se realizó la PCR para cada uno de los fragmentos con la enzima KAPA HiFi HotStart ReadyMix 1X, usando cebadores en concentración 5 μ M y agua grado biología molecular, con el fin de obtener amplicones necesarios para

el proceso de clonación, se establecieron temperaturas y tiempos para los diferentes procedimientos del ciclo en el termociclador como se observa en la tabla 2.

Nombre	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	98°C	2 min
Denaturación final	98°C	30 s
Anillamiento	60°C	30 s
Extensión inicial	72°C	45 s
Extensión final	72°C	5 min
Refrigeración	10°C	∞

Tabla 2. Información correspondiente a los procedimientos realizados en 35 ciclos de PCR para amplificación de los dos fragmentos de la proteína SPATR.

Tras diferentes ensayos de estandarización se logró realizar amplificación de los fragmentos 1 y fragmento 2, por triplicado con las condiciones establecidas en la tabla 3.

Fragmentos	Tamaño en pdb	Temperatura	Cantidad
Fragmento 1	333	60°C	Reacción de 25 µL
Fragmento 2	429	60°C	Reacción de 25 µL

Tabla 3. Temperatura de anillamiento establecida para amplificación replicable correspondiente a dos fragmentos de SPATR

5.5.5 Purificación de producto de PCR

Se realizó purificación de los amplímeros obtenidos, con el kit de extracción GeneJET (Thermo Scientific™), el cual se utiliza para purificación de fragmentos

de ADN de 100 pb a 20 kb, ya que elimina eficazmente dímeros de primers y otros contaminantes como sales de PCR y otras mezclas de reacción ⁵⁵.

5.5.6 PCR mix para adición de adeninas

Se adicionaron adeninas en los extremos de cada uno de los fragmentos purificados, proceso útil para permitir ligar los fragmentos del gen al vector pEXP-5-CT/TOPO™ TA Expression Kit - Thermo Fisher Scientific, realizando una mezcla de PCR, con las cantidades establecidas en la tabla 4., en el termociclador se procesó a 70°C durante 30 min y al finalizar se guarda a -20°C, hasta realizar el proceso de ligación.

Producto	Cantidad
Enzima MangoTaq™ DNA Polymerase	0.4 µL
Agua libre de RNAsas	4 µL
Buffer	4 µL
MgCl ₂	0.8 µL
dATPS	0.8 µL
Producto purificado	10 µL

Tabla 4. Productos manejados para PCR mix

5.5.7 Ligación al vector

Los fragmentos con las adeninas adicionadas fueron ligados pEXP-5-CT/TOPO™ TA Expression Kit - Thermo Fisher Scientific, incubando 40 min a temperatura ambiente, las condiciones de ligación se muestran en la tabla 5.

Producto	Cantidad
Solución de sales	1 μ L
Agua libre de RNAsas	1 μ L
Vector pEXP5-CT/TOPO®	0.5 μ L
Producto de PCR	3.5 μ L

Tabla 5. productos usados para la ligación de los fragmentos 1 y 2 de la proteína *PvSPATR*

5.5.8 Transformación

Se usaron células One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli*, de Invitrogen para clonar y propagar la ligación con gran eficiencia, mediante choque térmico a 42°C, luego de una incubación de 5 minutos, se agregó el SOC con el fin de que la membrana de la bacteria se estabilice, e inicie su propagación dejando las transformaciones en el shaker por 1 hora a 37° C con 225 RPM., (Tabla 6).

Productos	Cantidades
Células	100 μ L
Producto de ligación	5 μ L
SOC	250 μ L

Tabla 6 productos usados en el proceso de transformación

5.5.9 Obtención de recombinantes

Se dispuso a plaquear el producto de transformación, en agar Luria Bertani que contiene triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y agar, con ampicilina 0,1 mg/ml, dejando en incubación toda la noche con el fin de obtener el crecimiento de colonias recombinantes, que hayan adquirido la resistencia a la ampicilina al ingresar el plásmido.

5.5.10 PCR confirmación del inserto

Se tomaron unidades formadoras de colonia (UFC) de cada fragmento para ser confirmadas cada una con una reacción de 10 μ L con las especificaciones dadas en la tabla 8. Una vez confirmada la presencia de recombinantes por medio de PCR con MangoTaq™ DNA Polymerase, se guardaron glicerolos de los clones y se extrajeron los plásmidos para enviar a secuenciar a MACROGEN (Seoul, South Korea), con el secuenciador ABI-3730 XL.

Producto	Cantidad
Buffer:	1 μ L
MgCl ₂ :	0,5 μ L
Primer Dir T7 del vector:	1 μ L
Primer Rev de cada fragmento:	1 μ L
dNTPs 1,5 mM:	2 μ L
MangoTaq™ DNA Polymerase:	0,1 μ L
Agua libre de RNAsas	3,4 μ L

Tabla 7. Productos usados en el proceso de PCR colonia para la obtención de colonias clonadas.

5.5.11 Transformación en células BL21-AI para expresión de la proteína

Una vez confirmadas la secuencia se procedió a transformar en células de expresión BL21-AI (Invitrogen), se cultivaron durante la noche a 37°C, en 10 ml de medio Luria Bertani (LB) que contiene 0,1 mg/ml de ampicilina y D-glucosa al 20% (p/v), de estas colonias crecidas, se guardaron glicerolos al 10%.

5.5.12 Obtención de los fragmentos expresados

5.5.12.1 Obtención de forma denaturante

El inóculo inicial se escaló en 100 ml de volumen LB con la misma cantidad de ampicilina y D-glucosa antes mencionadas y se dejó crecer a 37°C usando ~ 250 rpm hasta alcanzar 0.5 OD 600; se usó 0,2% de L-arabinosa (p/v) durante cuatro horas para inducir la expresión. Posterior a este tiempo, se centrifugaron y resuspendieron los pellets en buffer de extracción denaturante, se agregó finalmente lisozima a 0,1 mg/ml y se dejó en el agitador rotatorio toda la noche; luego se procedió a centrifugar para recuperar el sobrenadante.

5.5.12.2 Obtención de los fragmentos de forma nativa

Desde los clones guardados se realiza un inóculo, el cual creció toda la noche a 37°C en shaker a 250 rpm, al siguiente día se llevó a 200 ml con ampicilina y D-glucosa, posterior al crecimiento de 6 horas, luego se dejó durante 30 minutos a -20°C, para favorecer el plegamiento de la proteína y, se indujo con L-arabinosa al 0,2% dejando toda la noche en shaker a ~200 rpm. Luego de centrifugar 5000 rpm por 15 minutos se procedió a resuspender los pellets en buffer de extracción nativa con inhibidores de proteasas, posteriormente adicionando lisozima a 0,1 mg/ml y dejando en agitador rotatorio durante 3 horas, finalmente se realizó sonificado a 45% de amplitud y posterior separación del sobrenadante por centrifugación a 14000 rpm durante 1 hora.

5.5.13 Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación se realizó en el equipo de FPLC, ÄKTA™ Start (GE), a través de tres métodos, donde se utilizó buffer de unión, luego los fragmentos de la proteína

se pasaron por el equipo a un flujo de 0,5 ml/min para permitir el acople al níquel y se realizó lavado para eliminar uniones inespecíficas, en el siguiente método se procedió a realizar lavados con buffer de unión con tritón X-100 y un nuevo lavado con buffer de unión para eliminar el tritón del sistema.

Por último, se usó buffer de elución, con el fin de recuperar en diferentes fracciones por gradiente de concentración de imidazol los fragmentos de la proteína que se encontraban acoplados en la columna de Níquel.

5.5.14 Renaturación de las recombinantes

para el proceso de renaturación se usaron concentraciones decrecientes de buffer úrea, 6 M, 3 M, 1,5 M, 0,75 M, 0,375 M, a las cuales se les adiciona Glutación Oxidado 0,5 mM y reducido 5 mM, para favorecer la formación de puentes disulfuro, en la columna de Níquel, al menor flujo posible al paso de las soluciones y finalmente se recuperó la proteína con el buffer de elución en gradiente con diferentes concentraciones de 50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM, 300 mM y 500 mM.

5.5.15 SDS PAGE y Western blot

La proteína recombinante purificada fue separada por peso en geles SDS-PAGE al 12 % y luego transferidos a membranas de nitrocelulosa, la membrana fue bloqueada con leche descremada en PBS 1X que contiene Tween al 0,5%, realizando 3 lavados con PBS 1X más Tween 0,5%; luego se incubó con anticuerpo monoclonal anti-polihistidina en una solución de leche descremada en PBS-Tween a temperatura ambiente (TA). Después de 3 lavados, fue revelada con el kit de substrato peroxidasa VIP (Vector Laboratories, Burlingame, Canadá).

5.5.16 Diálisis

Una vez confirmada la presencia de proteína en las eluciones, se usaron amicones nuevos de 10,000 da, a los que se les realizaron 3 lavados con agua desionizada filtrada centrifugando a 4000 g de 15-20 min., posteriormente se concentró la proteína por medio de centrifugación bajo las mismas condiciones y se realizaron lavados con PBS 1X con glicerol al 5 % filtrado bajo las mismas condiciones con una temperatura de 15°C; se recuperaron la proteína dializada y finalmente se realizó medición de pH a la proteína y a la fracción no retenida, que arrojaron un pH de ~7 y 8 respectivamente, guardando los productos dializados a -20°C.

5.5.17 Cuantificación de proteínas

5.5.17.1 Cuantificación por método BCA

Se realizó una curva de albúmina de suero bovino (BSA) bajo las siguientes concentraciones observadas en la tabla 8

Concentración de BSA en $\mu\text{g/ml}$ – Diluido en PBS 1X Ph 7,4
0,5 $\mu\text{g/ml}$
1 $\mu\text{g/ml}$
2,5 $\mu\text{g/ml}$
5 $\mu\text{g/ml}$
10 $\mu\text{g/ml}$
25 $\mu\text{g/ml}$
50 $\mu\text{g/ml}$
100 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 8. Curva de albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones de BSA

Se realiza la curva de albúmina de suero bovino y se sirve la proteína PvSPATR para la cuantificación, al tener la proteína con glicerol esta se diluyó en 1/200 para

la obtención apropiada de la cuantificación y se preparó la solución de revelado. Tabla 9., para la posterior lectura fotométrica, se realizó una incubación a 37°C durante 2 horas.

REACTIVOS	50 p
Rx A	25 p
Rx B	24 p
Rx C	1 p

Tabla 9. Cantidad de productos usados para el revelado

Una vez completada la incubación a 37°C se dejó 15 minutos a temperatura (T°) ambiente se realizó posterior lectura fotométrica con precisión a 562 nm.

5.5.17.2 Cuantificación por método Bradford

Se realizó una curva de albúmina de suero bovino con las concentraciones observadas en la tabla 10.

Concentración de BSA en $\mu\text{g/ml}$ – Diluido en PBS 1X Ph 7,4
1,25 $\mu\text{g/ml}$
2.5 $\mu\text{g/ml}$
5 $\mu\text{g/ml}$
10 $\mu\text{g/ml}$
15 $\mu\text{g/ml}$
20 $\mu\text{g/ml}$
25 $\mu\text{g/ml}$

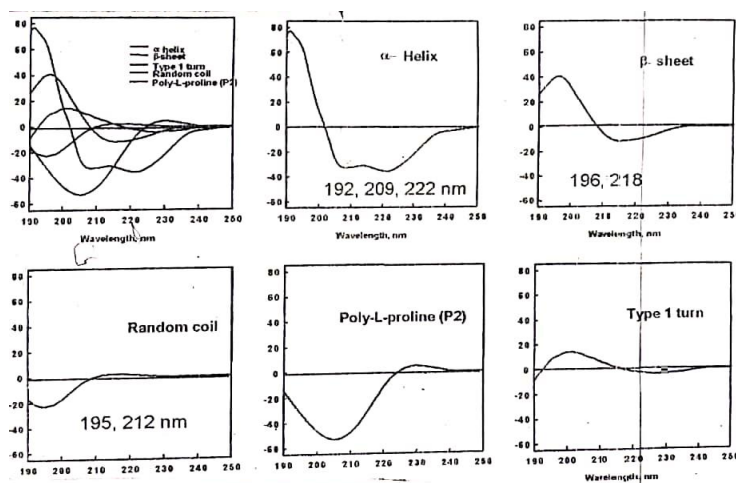
Tabla 10. Curva de albúmina de suero bovino en diferentes concentraciones de BSA

De cada una de las concentraciones de la curva se tomó 150 μl por duplicado, manteniendo la fidelidad esperada que, en el inserto, para montar en una placa de ELISA, una vez dispuesta la curva se agregó la proteína por duplicado 1 μl y duplicado de 5 μl , se dejó incubando por 15 minutos a T° ambiente y se realizó posterior lectura fotométrica con precisión a λ de 595 nm.

5.5.18 Dicroísmo Circular

La determinación de los elementos de estructura secundaria presentes en los dos fragmentos de *PvSPATR* fue realizada por el grupo funcional de síntesis química de la FIDIC, a través del análisis espectroscópico de Dicroísmo Circular (DC) en una solución de trifluoroetanol (TFE), usando un espectropolarímetro marca Jasco, modelo J-810 que funciona a partir de la medición de la luz polarizada que incide sobre una molécula quiral y dependiendo de su dispersión, genera un espectro ⁵⁶; posteriormente analizado a partir de la comparación del gráfico con las estructuras secundarias definidas observadas en la figura 7 y la deconvolución resultante de cada espectro a partir del programa CDPro, el cual emplea tres algoritmos como lo son CONTINLL, SELCON3 y CDSSTR.

Figura 7. Espectros de dicroísmo definidos para las diferentes estructuras secundarias presentes, diseñado en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia



6. RESULTADOS

6.1 Amplificación de los fragmentos de *PvSPATR*

El gen *pvspatr* fue amplificado por PCR con éxito a partir de DNA complementario, obteniendo las dos bandas con los tamaños esperados para los fragmentos amplificados, 333 pb para fragmento 1 y 429 pb para fragmento 2 respectivamente como se observa en la figura 8.

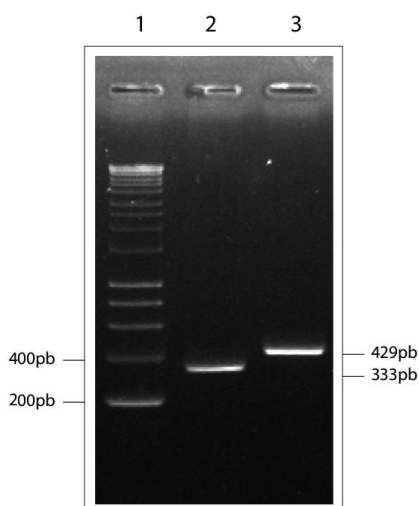


Figura 8. Gel de agarosa de la amplificación de los 2 fragmentos de *PvSPATR* donde 1: HyP II; 2: fragmento 1 (333 pb); 3: fragmento 2 (429 pb)

6.2 Purificación

Al realizar la purificación de los amplímeros se obtuvieron de nuevo las bandas con los tamaños esperados, 333 pares de bases para el fragmento 1 y 429 pares de bases para el fragmento 2 como se observa en la figura 9.

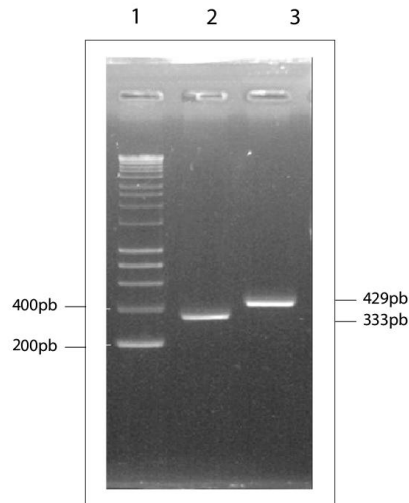


Figura 9. productos purificados de fragmentos 1 y 2 de SPATR donde 1 Hyp II corresponde al marcador Hyp II, 2 corresponde a fragmento 1 con 333 pdb, 3 corresponde a fragmento 2 con 429 pdb

6.3 Obtención de recombinantes

Tras la clonación se obtuvieron las diferentes colonias recombinantes, el tamaño obtenido fue de 360 pares de bases para las colonias del fragmento uno y 456 pares de bases para las colonias del fragmento dos como se observa en la figura 10, debido a los cebadores del vector pEXP-5-CT/TOPO añaden 27 pares de bases a cada fragmento.

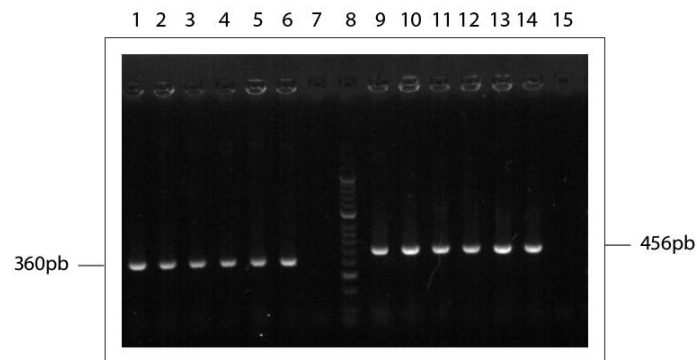


Figura 10. Producto de la PCR colonia de PvSPATR, 1-6: colonias clonadas fragmento 1; 7: control negativo; 8: marcador HyP II 1 Kb; 9-14: colonias clonadas fragmento 2; 15: control negativo

6.4 Secuencia de los fragmentos obtenidos

Tras la secuenciación de los dos fragmentos, se obtuvieron secuencias limpias, para el fragmento 1 como se observa en el electroferograma de la figura 11 y para el fragmento 2 como se observa en la figura 12.

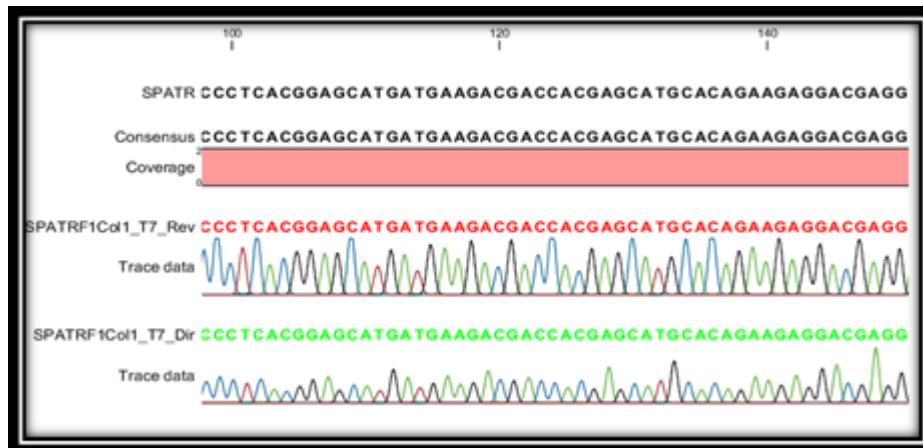


Figura 11. Secuenciación de una colonia procedente del proceso de clonación del fragmento 1 de la proteína *PvSPATR* acoplada con la secuencia de la proteína obtenida de PlasmDB.

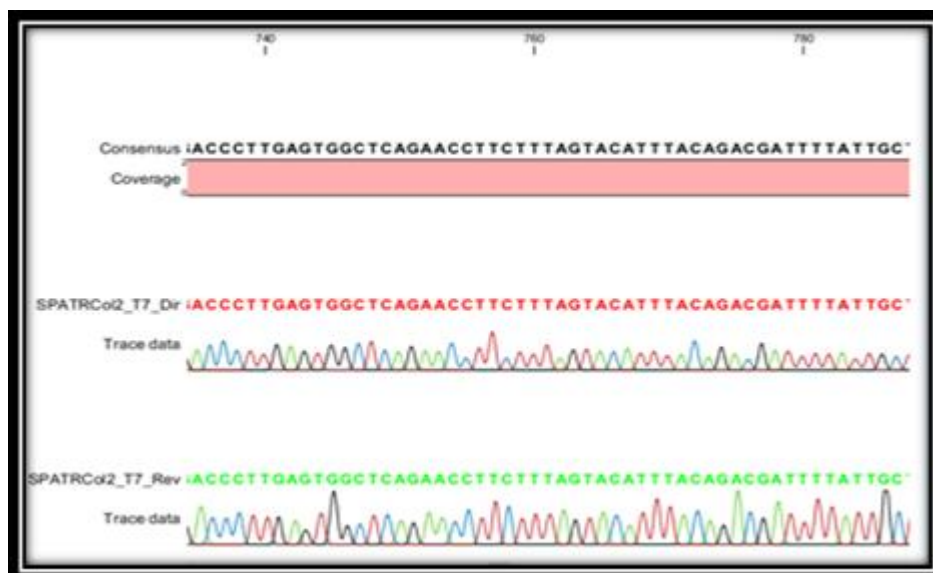


Figura 12. Secuenciación de una colonia procedente del proceso de clonación del fragmento 2 de la proteína *PvSPATR* acoplada con la secuencia de la proteína obtenida de PlasmDB

6.5 Expresión de *PvSPATR* recombinante

Se obtuvo una expresión adecuada de dos colonias para el fragmento uno y de cinco colonias para el fragmento dos, todas completamente funcionales, visibles en un gel de poliacrilamida (figura 13). Teñida con azul de coomassie al 12%, de las cuales fue seleccionada una para continuar con expresión a gran escala.

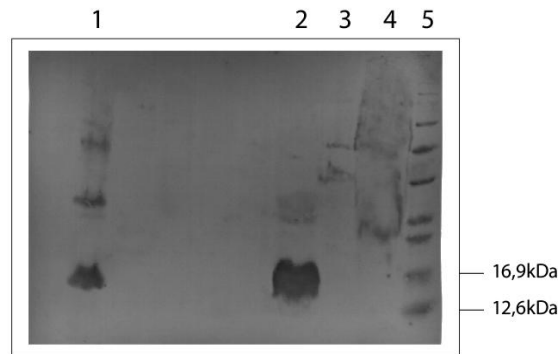


Figura 13. Western blot de la expresión de *PvSPATR* Columna 1: Cultivo inducido con L-arabinosa para fragmento 1 12,6 KDa; Columna 2: Cultivo no inducido (control). Columna 3: Cultivo no inducido por duplicado. Columna 4: Cultivo inducido con L-arabinosa para fragmento 2 de 16,9 KDa. El marcador molecular es mostrado a la derecha del gráfico

La expresión nativa de los fragmentos 1 y 2 de *PvSPATR* se evidencia en la figura 14.

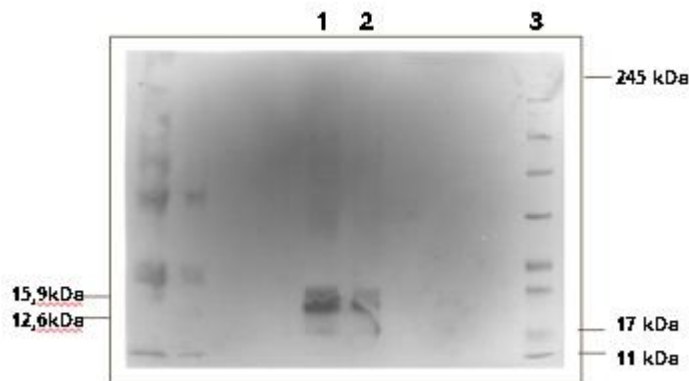


Figura 14. Western blot de la purificación de expresión nativa de *PvSPATR*; 1:fragmento 1; 2: fragmento 2; 3: marcador OP

6.6 Purificación de proteína

En el resultado del Western blot para la identificación de los fragmentos de la proteína en condiciones desnaturalizantes, purificados por medio del reconocimiento de colas de histidinas con el anticuerpo específico, se evidenció claramente la presencia de las bandas esperadas para la colonia seleccionada, así como se observa en la figura 15., el tamaño para el fragmento 1 se evidenció a 12,6 KDa.

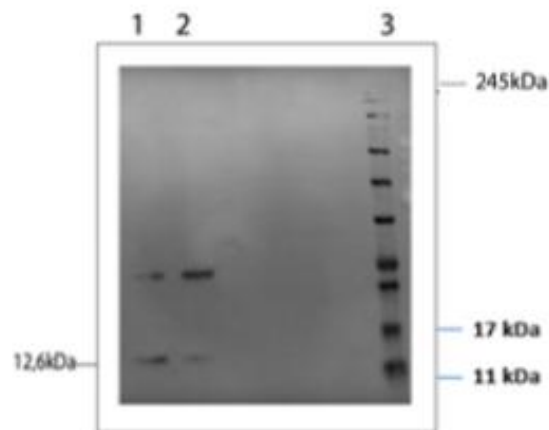


Figura 15. Western blot de la purificación de expresión denaturante de *PvSPATR* para fragmento 1, donde se recuperó la proteína en las dos primeras eluciones de *PvSPATR* purificado y 3 corresponde al marcador.

Así mismo y por Western blot se evidenció la presencia del tamaño esperado para el fragmento 2 correspondientes a 15,9 KDa como se observa en la figura 16.

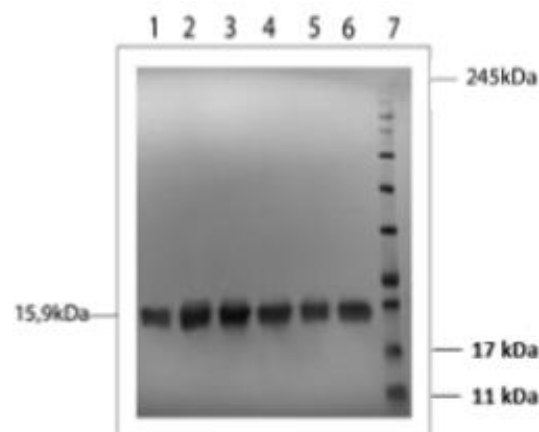


Figura 16. Western blot de la purificación de expresión denaturante de *PvSPATR* para fragmento 2 donde 1-6 corresponde a los gradientes de elución de *PvSPATR* purificado y el 7 el marcador.

6.7 Cuantificación de proteína

En la cuantificación realizada con Pierce™ BCA Protein Assay Kit, se obtuvo una concentración de proteína de 1,2 mg/ml para el fragmento 1, de forma nativa de *PvSPATR* y la proteína de forma renaturada con 2,5 mg/ml con y 2,4 mg/ml para el fragmento 2 nativo de *PvSPATR*, y 3,5 ug/ml de forma denaturante, respectivamente realizado en 3 expresiones juntas, indicando una buena cantidad de proteína, se logró establecer un resultado fiel debido al buen comportamiento de la curva de BSA (figura 17.)

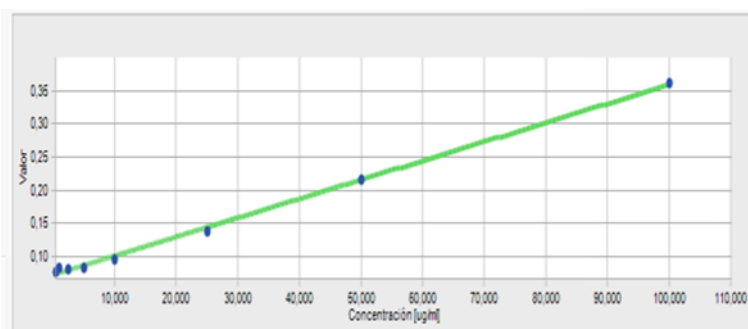


Figura 17. Gráfica obtenida de cuantificación por método BSA con la respectiva curva de BSA donde se observa en el eje Y el valor de las absorbancias dadas y en el eje X las concentraciones de los diferentes analitos.

Para la confirmación de presencia de proteína nativa, con PBS-1X más glicerol al 5%, se compararon los resultados obtenidos en el método BSA con el método de Bradford, que no presenta obteniendo una gráfica con un R2: 0,97 arrojando una concentración de proteína nativa de 0,2 mg/ml para el fragmento 1 y 1,3 mg/ ml para el fragmento 2.

6.8 Dicroísmo Circular

Los resultados obtenidos por medio de esta técnica, basados en los datos de deconvolución, permitieron evidenciar una tendencia estructural con un alto porcentaje helical, sin embargo, los espectros no se relacionan con ninguna de las

estructuras secundarias definidas (figura 7), lo que posiblemente permite describirlas como estructuras no concluyentes.

6.8.1 SPATR Fragmento 1 Renaturalizado

Al observar la deconvolución correspondiente al algoritmo SELCON3 y CONTINLL se identifica una tendencia estructural helicoidal (figura 19), sin embargo, el espectro que se obtuvo (figura 18) a partir del análisis por dicroísmo circular no permite determinar elemento de estructura secundaria presentes en el fragmento 1 renaturado, lo que nos permite inferir que se obtuvo una estructura no concluyente

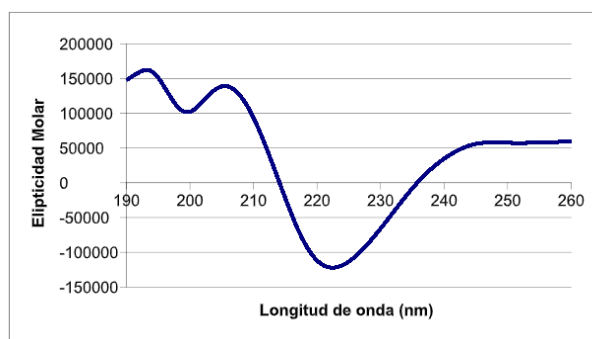


Figura 18. Dicroísmo circular fragmento 1 renaturalizada de *PvSPATR*

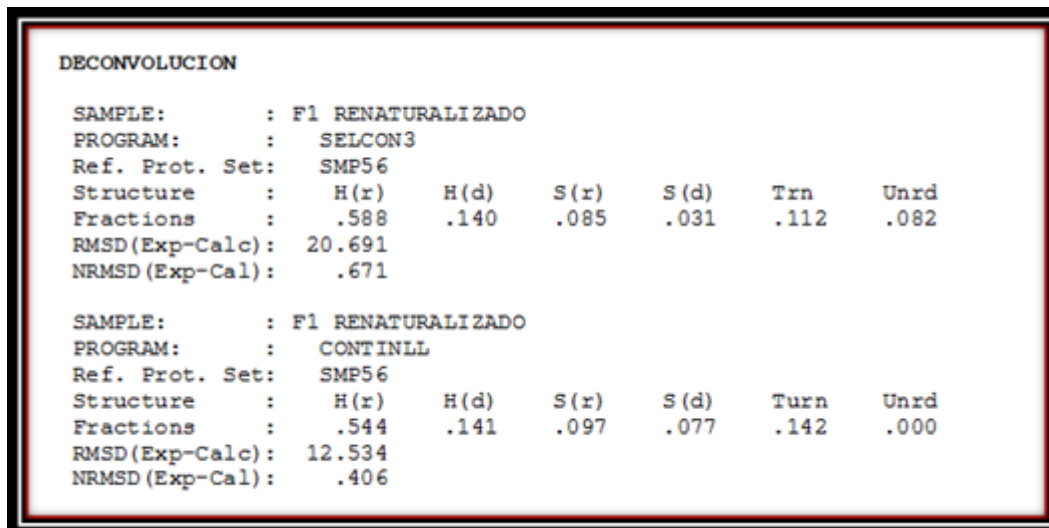


Figura 19. Deconvolución correspondiente al algoritmo SELCON3, y algoritmo CONTINLL

Paralelo al análisis realizado experimentalmente se hizo un análisis in silico que permitió crear un acercamiento a lo esperado del fragmento 1 de la proteína *PvSPATR*, donde se evidenció presencia helicoidal y giros Beta como se observa en la figura 20

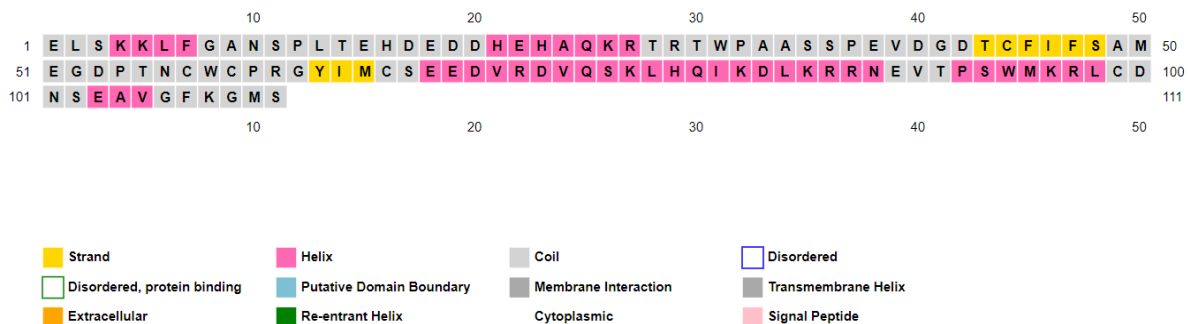


Figura 20. análisis in silico fragmento 1 de *PvSPATR*

6.8.2 Fragmento 2 renaturalizado

Al observar la deconvolución correspondiente al algoritmo SELCON3 y CDSSTR se identifica una tendencia estructural helicoidal (figura 22) ,sin embargo, el espectro que se obtuvo (figura 21) a partir del análisis por dicroísmo circular no permite determinar elemento de estructura secundaria presentes en el fragmento 2 renaturado, lo que nos permite inferir que se obtuvo una estructura no concluyente

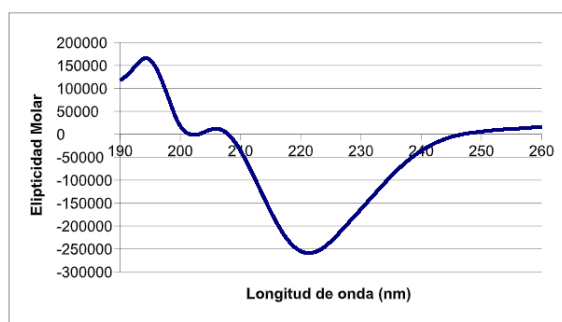


Figura 21. dicróismo circular fragmento 2 renaturalizada de *PvSPATR*

DECONVOLUCION

```

SAMPLE:      : F2 RENATURALIZADO
PROGRAM:     : SELCON3
Ref. Prot. Set: SMP56
Structure    : H(r)   H(d)   S(r)   S(d)   Trn   Unrd
Fractions    : .579   .222   .004   .002   .057   .147
RMSD(Exp-Cal): 31.718
NRMSD(Exp-Cal): .714
  
```

```

SAMPLE:      : F2 RENATURALIZADO
PROGRAM:     : CDSSTR
Ref. Prot. Set: SMP56
Structure    : H(r)   H(d)   S(r)   S(d)   Trn   Unrd
Fractions    : .178   .173   .159   .166   .170   .168
RMSD(Exp-Cal): 4.693
NRMSD(Exp-Cal): .106
  
```

Figura 22. deconvolución correspondiente al algoritmo SELCON3 y algoritmo CDSSTR

Paralelo al análisis realizado experimentalmente se hizo un análisis in silico que permitió crear un acercamiento a lo esperado del fragmento 2 de la proteína *PvSPATR*, donde se evidenció presencia de helicoidal y giros Beta como se observa en la figura 23

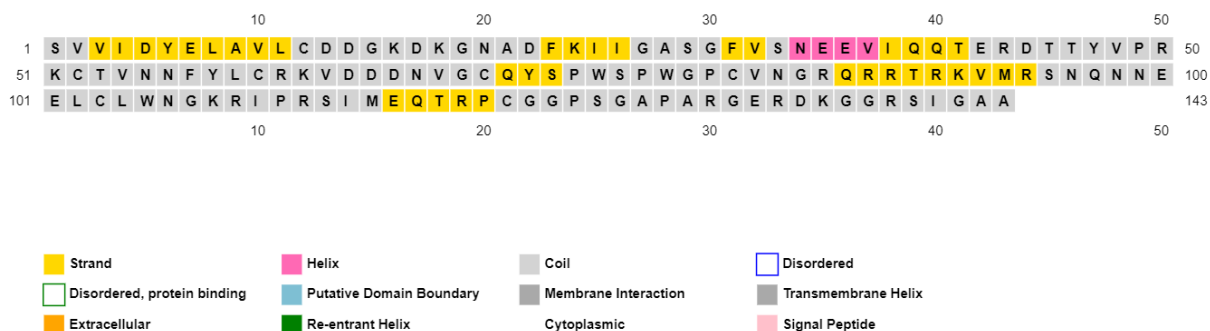


Figura 23. análisis in silico fragmento 2 de *PvSPATR*

6.8.3 Fragmento 2 nativo

Al observar el espectro de la figura 24, la estructura no corresponde a las descritas como (α hélices, hebras Beta, Beta turn, poliprolina), la no deconvolución se generó debido a que la proteína presentó un motivo estructural no considerado en el programa, por lo tanto, la contribución de este al espectro de dicroísmo no se interpretó correctamente, por lo que es posible inferir que su estructura no es concluyente.

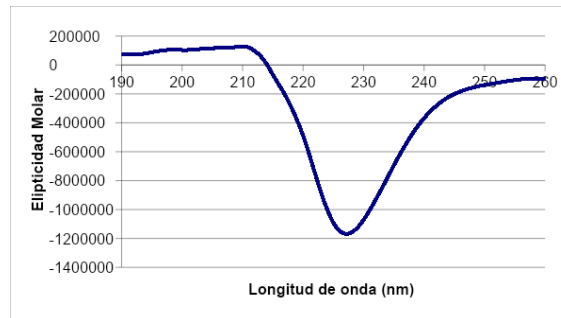


Figura 24. Dicroísmo circular fragmento 2 nativo de *PvSPATR*

7. DISCUSIÓN

Un enfoque lógico para el diagnóstico de la infección por *Plasmodium*, tiene que ver con el estudio de antígenos que se expresen en múltiples etapas del desarrollo del parásito y preferiblemente se asocien con la invasión, secuestro y progresión de la patogénesis en el huésped ⁵⁶, SPATR ha sido estudiada y descrita en *P. falciparum* como un antígeno multiestadio por Chattopadhyay y cols ¹⁷, ya que se expresa en gran cantidad en la superficie del esporozoito y se une dosis dependiente a los hepatocitos durante un ensayo a HepG2, en el que anticuerpos anti PfSPATR, inhibieron la invasión en más de un 80% con anticuerpo en dilución.

En *Plasmodium vivax* esta proteína no había sido clonada ni expresada, y hasta el momento no se conoce su funcionamiento, su papel dentro de la invasión o algún acercamiento a una posible estructura, de acuerdo a lo anterior, para el proceso de normalización de la PCR con el fin de amplificar los fragmentos de la proteína, se revisaron estudios previos de expresión de la proteína SPATR en la especie *P. knowlesi*. Mahajan y cols ⁵⁷ en su investigación se logró la amplificación del ADNc de 786 pb en concentraciones similares a las implementadas con PvSPATR de 772 pb.

Esta proteína SPATR, expresada en varias etapas del ciclo del parásito, contiene un dominio TSR alterado que se conserva entre diferentes especies ⁵⁸, posee una estructura con pliegues ricos en disulfuro ⁵⁹ un estudio realizado por Uchime y cols ⁶⁰ sobre *P. falciparum* describió la importancia del dominio dentro de esta especie, en el que se involucra en la movilidad del parásito y la unión e invasión de la célula huésped ⁶¹, debido a esto se diseñaron los cebadores, con el propósito de abarcar el dominio completamente en uno de los fragmentos, expresándose de forma completa en el fragmento 2, con el fin de realizar estudios posteriores de su estructura y lograr determinar su importancia e interacción en la infección parasitaria por *Plasmodium vivax*.

En el proceso de expresión se trabajó con dos diferentes tipos de células, comenzando por las células BL21 (De3)⁶², competentes de E.coli “la cepa contiene el prophage lambda DE3 que lleva el gen para la ARN polimerasa T7 bajo el control de un promotor T7”⁶³, dichas células son adecuadas para la expresión de genes heterólogos no tóxicos; en trabajos de investigación tales como en la expresión realizada para PkSPATR⁵⁶ se obtuvo un resultado óptimo con la expresión de PvSPATR. En este mismo proceso se trabajó con células BL21 (AI)⁶⁴ siendo estas las de mayor y mejor nivel de expresión, estas células permiten la expresión de genes tóxicos, es una cepa inducible por arabinosa diseñada para brindarle la máxima expresión de proteínas con la regulación más estricta, dada por la D-glucosa que actúa como represor de la expresión, disponible de un sistema de expresión T7⁶².

La expresión de la proteína de forma denaturante generó mejores resultados comparada con la expresión de forma nativa, ya que la cantidad de proteína denaturante expresada fue más alta, así mismo en el proceso de purificación se logró recuperar casi por completo, esto posiblemente se relacione con el uso de urea, el desnaturalizante típico empleado en este tipo de expresión, según Orsini y cols⁶⁵, este reactivo químico usado en bajas concentraciones como las que se implementaron en la expresión de PvSPATR, genera estabilidad en la estructura manteniendo intactos los enlaces disulfuro, logrando inhibir la agregación de proteínas o la creación de cuerpos de inclusión aseguran Yamaguchi y cols⁶⁶, lo que influye de forma muy significativa en la expresión óptima y recuperación de la proteína⁶⁶.

La purificación de la proteína mediante métodos automatizados, presenta diversas ventajas que se pueden relacionar con la calidad en el producto purificado, lo que permitiría explicar la recuperación de PvSPATR, dentro de los beneficios según Ritchie y cols⁶⁷, está la disminución de tiempo de purificación, la programación de los pasos de equilibrio y lavado, no hay necesidad de realizar una preincubación, hay facilidad para realizar un gradiente de elución, se disminuye la posibilidad de que el aire se introduzca en el sistema afectando la resina, se disminuye la

variabilidad que se puede producir con la carga manual de las muestras a través de la inyección controlada de la proteína en la columna y se puede pasar un mayor volumen de proteína, aseguran Murphy y cols ⁶⁸, factores que tendrían que ver con la óptima recuperación de PvSPATR por medio de cromatografía de afinidad en el sistema ÄKTA™ Start (GE).

La cantidad de proteína obtenida de forma renaturada significativamente mayor que la proteína nativa, tendría que ver con la formación de cuerpos de inclusión los cuales son estructuras dinámicas formadas por un equilibrio/desequilibrio entre proteínas que al formarse dificultan la obtención de la proteína por su agregación asegura Wingfield en el 2015 ⁶⁹, quien también afirma que, aunque la purificación de proteínas de tamaños menores a 40 KDa no generan problema, su recuperación es relativamente baja, entre el 5% - 20% ⁶⁹.

Una vez obtenido el producto purificado se continuó con la cuantificación de los fragmentos de PvSPATR dando como respuesta una gran variedad debido a que se usaron métodos diferentes para la proteína obtenida de forma nativa y de forma renaturada. El manejo del ensayo de cuantificación por el método BCA resultó para la proteína en su forma denaturante, mientras que de forma nativa, al precipitarse, se hizo necesario adicionar glicerol al 5%, aditivo que en la tabla de compatibilidad BCA de Thermo Scientific™ ⁷⁰ se permite hasta en un 10%, aunque al realizar la cuantificación, los resultados se salían de la curva; en la segunda versión del manual técnico en ensayo de proteínas de Thermo Scientific™ ⁷⁰ se explica que este tipo de aditivos pueden desencadenar interrupciones principalmente en la sensibilidad del ensayo, ya que es considerado como una sustancia interferente que puede abrumar el análisis y no permitir el desarrollo de los ensayo ⁷⁰.

Para la cuantificación de la extracción nativa se utilizó el método de Bradford, en el ensayo de compatibilidad de reactivos de laboratorios Bio-Rad ⁷¹ se especifica que el manejo de proteínas con glicerol hasta e de un 5% ya que no genera interferencias, además hay un estudio de Crowley y cols ⁷², sobre la proteína LDH que, aunque se cuantificó teniendo adición de glicerol al 10%, se obtuvieron resultados óptimos, como en los dos fragmentos de PvSPATR en su estado nativo con adición del 5% de glicerol.

La precipitación de la proteína en su estado nativo, tendría que ver con reacciones que se derivan de las transiciones conformacionales que le ocurren a su estructura de acuerdo a lo reportado por Greenfield en 1999 ⁷³, pues dentro de estas se encuentran la agregación, oligomerización y precipitación, siendo este último el problema observado en la forma nativa de PvSPATR, esto se puede relacionar con la estabilidad en la proteína generada por diversas fuerzas covalentes según Espinosa ⁷⁴ pues dentro de estas se destacan las interacciones hidrofóbicas que al momento de generar una agregación o se exponga el interior hidrofóbico, genera la precipitación en la proteína ⁷⁵.

El cambio estructural que sufrió la proteína en la renaturación, comparada con su forma nativa, se pudo observar por medio de los espectros obtenidos en el proceso de dicroísmo circular, esto posiblemente se relacione con el cambio de interacciones de los puentes disulfuro, con la interrupción en las interacciones de Van der Waals y con la no formación de puentes de hidrógeno, lo que ocasiona indudablemente una conformación diferente a la inicial y se pierde la relación estructura/ función ⁷⁶.

Por lo que es importante analizar la composición de los fragmentos de la proteína, ya que el fragmento 1 posee cinco cisteínas y el fragmento 2 posee siete cisteínas, y a partir de la oxidación espontánea de estos aminoácidos ubicados contiguamente por su contenido de grupos sulfhidrilo (SH)⁷⁷, se da la formación de enlaces disulfuro de acuerdo a Chang ⁶¹, que se relaciona con diferentes funciones estructurales, catalíticas y de señalización ⁶¹, sin embargo cuando las cisteínas tienen un emparejamiento incorrecto, pueden causar plegamientos y agregaciones erróneas que repercuten de forma directa en el resultado estructural de las proteínas según indica Berkmen ⁷⁸, lo que se podría relacionar con los resultados de elementos de estructura secundaria no concluyentes en el análisis espectroscópico de los fragmentos de PvSPATR.

El espectro obtenido para el fragmento 2 nativo, se puede relacionar con la obtención de la proteína, ya que las modificaciones postraduccionales no pueden ser llevadas a cabo por la bacteria *Escherichia coli*⁷⁹, y estas son necesarias para el correcto plegamiento, estabilidad y actividad biológica de la proteína, por lo que probablemente se pudieron generar puentes disulfuro al azar, en cada lote de expresión y generar esta estructura no concluyente que no deconvolucionó con ningún algoritmo.

La solución de TFE al 30% usada en esta técnica espectroscópica, en concentraciones mayores al 20% favorece la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares según Gast y cols⁸⁰, esto podría relacionarse con la estructura proteica obtenida en el espectro y repercutir en posibles ensayos de unión, ya que los patrones de conformación helical, se vinculan principalmente con actividad de unión a reticulocitos⁸¹.

La aproximación hacia las estructuras secundarias y un análisis conformacional relacionado con cambios por uso de agentes desnaturizantes en PvSPATR no se había realizado hasta ahora, esta técnica de DO permitió un acercamiento hacia estas características básicas en la proteína, que deben ser estudiadas con técnicas más avanzadas en las que se pueda determinar su estructura tridimensional y relacionarlo con la función dentro del parásito.

8. CONCLUSIONES

- Por primera vez se logró la amplificación de fragmentos de PvSPATR a partir de ADN complementario, lo cual permitirá determinar si esta proteína cumple funciones similares a su homólogo *P.falciparum*, involucrado en la unión a células de hepatoma y aparición multiestadio dentro del ciclo

infeccioso.

- Se obtuvieron dos clones a partir del vector pEXP5-CT/TOP, uno para el fragmento 1 y otro para el fragmento 2 los cuales se puede utilizar en posteriores ensayos antigénicos (ELISA) y ensayos de unión que permitan determinar la funcionalidad de los fragmentos, además de realizar péptidos específicos de las regiones que se unan, con el fin de determinar cuál de estas se encarga de mediar la invasión.
- El dicróismo circular no permitió obtener posibles estructuras secundarias claramente definidas en los fragmentos analizados, sin embargo se logró evidenciar su cambio conformacional respecto a la forma de obtención implementada.

9. EXPECTATIVAS

- Realizar un análisis especializado, a través de espectroscopia por resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica con el fin de conocer exactamente su estructura tridimensional y las regiones involucradas en esta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chinchilla Carmona Misael. Vacuna contra la malaria: una sinopsis. Acta pediátr. costarric [Internet]. 1999 Apr [cited 2020 Mar 16] ; 13(2): 78-80. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00901999000200010&lng=en.
2. Ins.gov.co Boletín epidemiológico semanal. 2019 Available in: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%204.pdf>
3. OPS | Paludismo [Internet]. Paho.org. [cited 13 May 2020]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=33&Itemid=40757&lang=es
4. KROTOSKI W. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. 1984;(79):1-11.
5. Ozen M, Gungor S, Atambay M, Daldal N. Cerebral malaria owing to Plasmodium vivax: case report [Internet]. Taylor & Francis Online. 2013 [cited 13 May 2020]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/146532806X107494>

6. Mendis, K, Sina, B.J, Marchesini, P, Carter, R. The neglected burden of Plasmodium vivax malaria. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2001;64(1): 97-106. [online] Available in: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2001.64.97>
7. Carmona Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica [Internet]. Scielo.br. 2003 [cited 12 March 2020]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid
8. Dantés O, Sesma S, Becerril V, Knaul F, Arreola H, Frenk J. Sistema de salud de México [Internet]. Scielo.org.mx. 2009 [cited 12 March 2020]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342011000800017
9. Morahan B, Wang L, Coppel R. No TRAP, no invasion [Internet]. Science direct. 2008 [cited 12 March 2020]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471492208002730>
10. Triglia T, Thompson J, Caruana S, Delorenzi M, Speed T, Cowman A. Identification of Proteins from Plasmodium falciparum That Are Homologous to Reticulocyte Binding Proteins in Plasmodium vivax. ASM journals [Internet]. 2001 [cited 25 June 2019];69(2):1084-1092. Available in: <https://iai.asm.org/content/iai/69/2/1084.full.pdf>
11. Cavasini, C., de Mattos, L., Couto, Á., Couto, V., Gollino, Y., Moretti, L., Bonini-Domingos, C., Rossit, A., Castilho, L. and Machado, R. (2007). Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. Malaria Journal, 6(1).
12. FANG, X., KASLOW, D., ADAMS, J., & MILLER, L. (1991). Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor. Molecular and Biochemical Parasitology, 44(1), 125–132. doi:10.1016/0166-6851(91)90228-x
13. Westenberger SJ, McClean CM, Chattopadhyay R, Dharia NV, Carlton JM, Barnwell JW, Collins WE, Hoffman SL, Zhou Y, Vinetz JM, Winzeler EA. A systems-based analysis of Plasmodium vivax life cycle transcription from human to mosquito. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Apr 6;4(4): e653. doi: 10.1371/journal.pntd.0000653. PubMed PMID: 20386602; PubMed Central PMCID: PMC2850316.
14. García M, García M, Mellado M, Villota J. Patología infecciosa importada I: malaria [Internet]. Aeped.es. 2010 [cited 8 October 2019]. Available from: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/malaria.pdf>
15. Wang, Q., Fujioka, H. y Nussenzweig, V. 2005. Exit of Plasmodium Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. Pathol. (1): 72-79. 6.
16. Pumarola, A. 1995. Microbiología y Parasitología Médica. 2da Edición. Editorial Salvat. Capítulo (76): 832-843. 7.
17. Chattopadhyay R, Rathore D, Fujioka H, Kumar S, de la Vega P, Haynes D et al. PfSPATR, a Plasmodium falciparum Protein Containing an Altered Thrombospondin Type I Repeat Domain Is Expressed at Several Stages of the Parasite Life Cycle and Is the Target of Inhibitory Antibodies [Internet]. Journal of biological chemistry. 2003 [cited 12 March 2020]. Available from: <https://www.jbc.org/content/278/28/25977.long>
18. Poinar G. What Fossils Reveal About the Protozoa Progenitors, Geographic Provinces, and Early Hosts of Malarial Organisms. American Entomologist [Internet]. 2019 [cited 28 June 2019];62(1):22-25. Available in <https://academic.oup.com/ae/article/62/1/22/2194536>
19. King A. Popular Science Monthly/Volume 23/September 1883/Insects and Disease - Mosquitoes and Malaria - Wikisource, the free online library [Internet]. En.wikisource.org. 1883 [cited 28 April 2019]. Available in:

https://en.wikisource.org/wiki/Popular_Science_Monthly/Volume_23/September_1883/Insects_and_Disease_-_Mosquitoes_and_Malaria

20. Ross R, MacCallum M. Descubrimiento del ciclo de vida del parásito de la Malaria | ari.info | ari.info [Internet]. ari.info. 1898 [cited 28 June 2019]. Available from: http://www.animalresearch.info/es/avances-medicos/linea_de-tiempo/descubrimiento-del-ciclo-de-vida-del-parasito-de-la-malaria/
21. Kochar D., Saxena V., Singh N., Kochar S., Kumar V., Das A. Plasmodium vivax malaria. Emerg Infect Dis. 2005 Jan;11(1):132-4. doi: 10.3201/eid1101.040519. PubMed PMID: 15705338; PubMed Central PMCID: PMC3294370.
22. Knudson-Ospina Angélica, Sánchez-Pedraza Ricardo, Pérez-Mazorra Manuel Alberto, Cortés-Cortés Liliana Jazmín, Guerra-Vega Ángela Patricia, Nicholls-Orejuela Rubén Santiago. Perfil clínico y parasitológico de la malaria por Plasmodium falciparum y Plasmodium vivax no complicada en Córdoba, Colombia. rev.fac.med. [Internet]. 2015 oct [citado 2019 Jun 17]; 63(4): 595-607. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112015000400004&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v63.n4.47953>.
23. D. Philippe, J Guerin, Piero, Olliarob, Nostenc, Pierre, y Cols., Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development [Internet]. Science direct. 2002 [cited 1 October 2019]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309902003729>
24. World Health Organization. Control of Tropical Diseases (CTD): Malaria Control. Geneva, Switzerland: WHO Office of Information; 1995.
25. Piero Olliaro, Jacqueline Cattani, Dyann Wirth, PhD. Malaria, the Submerged Disease [Internet]. JAMA Network. 1996 [cited 1 October 2019]. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/394572>
26. Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 1–11
27. Salud M. Minsalud.gov.co. 2019 [cited 1 October 2019]. Available in: <http://minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/malaria.aspx>
28. Olano V, Brochero., Saenz, Quiñones L, Molina ' J. Mapas preliminares de la distribución de especies de Anopheles vectores de malaria en Colombia [Internet]. Redalyc.org. 2019 [cited 1 October 2019]. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/843/84321415.pdf>
29. Sinka M, Bangs M, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetsee M et al. A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors [Internet]. 2012 [cited 1 October 2019];5(1):21. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-69>
30. Press A. Plasmodium [Internet]. Parasite.org.au. 2000 [cited 26 September 2019]. Available from: <http://parasite.org.au/para-site/text/plasmodium-text.html>
31. Liu W, Li Y, Learn G, Rudicell R, Robertson J, Keele B et al. Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. Nature [Internet]. 2010 [cited 26 September 2019];467(7314):5. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864995>
32. Spencer, L., Gómez, A. and Collovini, E., 2016. *Mechanisms of Invasion from Sporozoite And Merozoite Of Plasmodium*. [online] Revistabionatura.com. Available at: <<http://DOI.10.21931/RB/2016.01.02.9>> [Accessed 13 March 2020].
33. Osler W. An Address on the Haematozoa of Malaria. BMJ [Internet]. 1887 [cited 7 October 2019];1(1367):556-562. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20751826>
34. Ortega Medina S, Castro Bruzón Y, Reyes Rodríguez I, Monteagudo Díaz S. Malaria due to Plasmodium falciparum. Presentation of an imported case [Internet]. Scielo.sld.cu. 2018 [cited 7 October 2019]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/ms/v16n3/ms13316.pdf>
35. Price, R., Anstey, N., Guerra, C., Yeung, S., Tjitra, E. and White, N. (2007). Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. The American Journal of Tropical Medicine

- and Hygiene, [online] 77(6_Suppl), pp.79-87. Available in:
https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2007.77.79#related_content
 [Accessed 13 May 2019]
36. Amarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J et al. The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathogens* [Internet]. 2011 [cited 8 October 2019];7(2). Available from:
<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001276>
 37. Carlton J, Adams J, Fraser C. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *nature research*. 2008 [cited 25 June 2019]; 455:757-763. Available in: <https://www.nature.com/articles/nature07327>
 38. OPS/OMS | Paludismo: Información general [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2010 [cited 18 March 2020]. Available from:
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2573:2010-general-information-malaria&Itemid=2060&lang=es
 39. Chai J. PMC. Re-emerging *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea. 2019 [cited 28 June 2019]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733142/>
 40. Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti-Junior C, y Cols., Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Sci Rep*. 2018 Jan 31;8(1):1993. doi: 10.1038/s41598-018-19554-0. PubMed PMID: 29386521; PubMed Central PMCID: PMC5792595
 41. Ballou R, Sherwood J, Neva F. SEGURIDAD Y EFICACIA DE UNA VACUNA DE ESPOROZOITO DE PLASMODIO DE PLASMODIO RECOMBINANTE DE ADN RECOMBINANTE [Internet]. *THE LANCET*. 1987 [cited 18 March 2020]. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)90540-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90540-X)
 42. Spencer L, Gómez A, Collovini E. Mecanismos de invasión del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium* [Internet]. *Revistabionatura.com*. 2016 [cited 18 March 2020]. Available from: <http://revistabionatura.com/files/Mecanismos-de-invasion-del-esporozoito-y-merozoito.pdf>
 43. Lambraño López, J., 2019. *EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA TOXICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN MODELO MURINO, DE UNA MEZCLA DE PÉPTIDOS MODIFICADOS (IMPIPS), CANDIDATA A VACUNA CONTRA MALARIA*. [online] *Bdigital.unal.edu.co*. Available at:
<http://bdigital.unal.edu.co/73552/1/1022976174.2019.pdf> [Accessed 13 March 2020].
 44. Ramya Natarajan, A. and Et al, 2011. *The Malaria Circumsporozoite Protein Has Two Functional Domains, Each with Distinct Roles as Sporozoites Journey from Mosquito to Mammalian Host*. [online] *JEM*. Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039851/> [Accessed 13 March 2020].
 45. Dolo A e. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. - PubMed - NCBI [Internet]. *Ncbi.nlm.nih.gov*. 2020 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10697897>
 46. Pihlajamaa T e. Structure of *Plasmodium falciparum* TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willeb... - PubMed - NCBI [Internet]. *Ncbi.nlm.nih.gov*. 2013 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317521>
 47. Sultan AA e. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. - PubMed - NCBI [Internet]. *Ncbi.nlm.nih.gov*. 1997 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267031>
 48. Huang YT, Lu XM, Jin XB, Zhu JY. Research advances on circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Chin J Parasitol Parasit Dis*. 2012; 30:238–242

49. 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*. 2011; 208:341–356. doi: 10.1084/jem.20101488.
50. Dasha M, Pande V, Sinha A. Putative circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium vivax* is considerably distinct from the well-known CSP and plays a role in the protein ubiquitination pathway [Internet]. Science direct. 2019 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.100024>
51. Castellanos I; A, Arévalo-Herrera M, Restrepo N. *Plasmodium vivax* thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. Scielo. 2007.
52. Frevert U, Cerami P, Shreffler C, Takacs W, Nussenzweig B, Sinnis. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. [Internet]. *J Exp Med*. 1993 [consultado el 18 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2190997/>
53. Sinnis P, Sim BK. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends Microbiol*. 1997 feb;5(2):52-8. doi: 10.1016/s0966-842x(97)84657-4. PMID: 9108930; PMCID: PMC5538855.
54. Garzón-Ospina, D, Buitrago S. Identifying Potential *Plasmodium vivax* Sporozoite Stage Vaccine Candidates: An Analysis of Genetic Diversity and Natural Selection. *Frontier genetics*. 2018.
55. PvSPATR salv1 Plasmodb.org. 2020 [cited 13 March 2020]. Available from: https://plasmodb.org/plasmo/app/record/gene/PVX_002900
56. Palaeya, Mahmud, et al. Cloning, expression, and immunocharacterization of surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain (SPATR) from *Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*. 2013.
57. Mahajan B, Jani D. Identification, Cloning, Expression, and Characterization of the Gene for *Plasmodium knowlesi* Surface Protein Containing an Altered Thrombospondin Repeat Domain [Internet]. American society for microbiology. 2005 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231135/>
58. Gupta, R., Mishra, A., Choudhary, H. H., Narwal, S. K., Nayak, B., Srivastava, P. N., & Mishra, S. (2019). Secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) is essential for asexual blood stages but not required for hepatocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular Microbiology*. doi:10.1111/mmi.14432
59. Biosurplus. Jasco J-810 | Biosurplus [Internet]. BioSurplus.com. 2020 [cited 18 March 2020]. Available from: <https://www.biosurplus.com/store/models/5673-j-810/>
60. Uchime O, Herrera R, Reiter K, Kotova S, Shimp R, Miura K y cols. Analysis of the Conformation and Function of the *Plasmodium falciparum* Merozoite Proteins MTRAP and PTRAMP [Internet]. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 2012 [cited 13 May 2020]. Available from: <https://ec.asm.org/content/eukcell/11/5/615.full.pdf>
61. Chang, J.-Y. (1995a). *J. Biol. Chem.* 270
62. Genomics. BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3) pLysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells [Internet]. Chem-agilent.com. 2001 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200133.pdf>
63. Matsumura, M. y cols. (1989). *Nature* 342, 291-29
64. Invitrogen. BL21-AI™ Competent Cells—maximum expression with tightest regulation [Internet]. Tools.thermofisher.com. 2002 [cited 13 March 2020]. Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/712_021252_BL21AI_bro.pdf
65. Orsini G, Goldberg M. The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine HCl. Refolding versus aggregation. [Internet]. *Journal of Biological*

- Chemistry. 2020 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.jbc.org/content/253/10/3453.long>
66. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies [Internet]. MDPI. 2014 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030991/>
 67. Ritchie Purification Caroline protein. Labome.es. 2012 : <http://www.labome.es/method/Protein-Purification.html>
 68. Murphy M. Patrick J, Orrin J. A, La interacción hidrofóbica automatizada cromatografía en columna de selección para uso en la purificación de proteínas [Internet]. Jove. 2011 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.jove.com/video/3060/la-interaccin-hidrofbcica-automatizada-cromatografa-en-columna-de?language=Spanish>
 69. Wingfield Paul T. Overview of the Purification of Recombinant Proteins [Internet]. PMC. 2015 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410719/>
 70. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook [Internet]. Tools.thermofisher.com. 2020 [cited 13 March 2020]. Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf>
 71. Bio-rad.com. 2020 [cited 13 March 2020]. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6852.pdf
 72. Crowley JackKyte T. Section 3 - Purification and Characterization of Bovine L-Lactate Dehydrogenase [Internet]. Science direct. 2014 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409544-1.00003-5>
 73. Greenfield J. Biomacromolecular Applications of Circular Dichroism and ORD [Internet]. Elsevier. 1999 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://doi.org/10.1006/rwsp.2000.0021>
 74. Espinosa Silva, R., 2015. *Thermodynamic Properties of Hydrophobic Effect in Protein Folding*. [online] Journal de Ciencia e Ingeniería. Available at: <<https://jci.uniautonoma.edu.co/2015/2015-1.pdf>> [Accessed 13 March 2020].
 75. Bitesize Bio. 2020. The ins And Outs of Protein Concentration – Protein Precipitation - Bitesize Bio. [online] Available at: <<https://bitesizebio.com/5924/the-in%E2%80%99s-and-out%E2%80%99s-of-protein-concentration-%E2%80%93-protein-precipitation/>> [Accessed 13 March 2020].
 76. Curtidor H. Identificación y caracterización de la proteína del cuello de las roptrias 5 (RON 5) en Plasmodium falciparum y determinación de las regiones de unión a glóbulos rojos humanos [Doctorado]. Universidad de la sabana; 2013
 77. Fra A, Yoboue E, Sitia R. Cysteines as Redox Molecular Switches and Targets of Disease [Internet]. Frontiers in molecular neuroscience. 2017 [cited 13 May 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5459893/>
 78. Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli [Internet]. El silver. 2011 [cited 13 March 2020]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592811003068>
 79. González A, F. Fillat M. ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN Escherichia coli Medigraphic.com. 2018. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>
 80. GAST K, ZIRWER D, MÜLLER-FROHNE M, DAMASCHUN G. Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: Insights gained from the differences between α -lactalbumin and ribonuclease A. Ncbi.nlm.nih.gov. 1999 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2144273/pdf/10091665.pdf>
 81. Moreno D, Baquero L, Bermudez M, Gómez L, Varela Y, Patarroyo M. Easy and fast method for expression and native extraction of Plasmodium vivax Duffy binding protein fragments [Internet]. Malaria Journal. 2018 [cited 13 May 2020]. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2216-6>

