



**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**Identificación y caracterización de la proteína del cuello de las roptrias 5 (RON5) en *Plasmodium falciparum* y determinación de las regiones de unión a glóbulos rojos humanos**

**HERNANDO CURTIDOR CASTELLANOS**

**Universidad de la Sabana  
Facultad de Ingeniería  
Programa de Postgrado  
Doctorado en Biociencias  
2013**

**Identificación y caracterización de la proteína del cuello de las roptrias 5 (RON5) en *Plasmodium falciparum* y determinación de las regiones de unión a glóbulos rojos humanos**

**HERNANDO CURTIDOR CASTELLANOS**

**Código 200912420**

Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de:

**Doctor en Biociencias**

Director:

**MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ M.D., Dr. Sc.**

**Universidad de la Sabana  
Facultad de Ingeniería  
Programa de Postgrado  
Doctorado en Biociencias  
2013**



*A mi esposa Luz Adriana, que me toma de la mano y no deja que desfallezca, y a mis hijas María Sue y Lina Sofía, que con su amor me alientan.*

## **Agradecimientos**

Muchas gracias al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo, que con la paciencia de un amigo y la disciplina de un maestro, asumió la dirección de este trabajo.

Al Doctor Manuel Elkin Patarroyo, mi jefe, por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por su ejemplo de tenacidad.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y a mi jefe, por la financiación de este proyecto.

A Gabriela Arévalo-Pinzón, por su incondicional ayuda y consejo, gracias.

A Liliana Patiño, por ser parte de este trabajo y su amistad, gracias.

A mis colegas y amigas Marisol y Magnolia, por su permanente apoyo y consejo.

A mis compañeros Diana, Maritza, Carlos, Martha y a los investigadores de la FIDIC, que de una u otra manera y en diferentes contextos, colaboraron en este trabajo.

A la Dra. Victoria Pando, por recibirme en su laboratorio en Cuernavaca y brindarme su colaboración y amistad.

A mis compañeras del Doctorado, Catalina, Diana, Gabriela y Wendy, por su constante apoyo; y a la Doctora Gloria Eugenia González, gestora y artífice de nuestro proceso de formación.

A los miembros del Comité Tutorial, Dra. Martha R. Fontanilla D., Dra. María T. Reguero R. y Dr. Ignacio Briceño B.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana, a la Dirección del Doctorado en Biociencias, a la Dirección de Investigación y a los docentes, por su colaboración y enseñanzas para mi formación profesional.

## RESUMEN

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes y mortales a nivel mundial. Cinco especies de *Plasmodium* (protozooario intracelular obligado del filo Apicomplexa) infectan al humano, siendo *Plasmodium falciparum* la especie responsable de las manifestaciones clínicas más severas, con amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales del África Subsahariana. Según los estimados de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2010 se presentaron alrededor de 216 millones de casos de malaria y cerca de un millón de muertes, principalmente de niños menores de 5 años. Esta cifra se ha incrementado en los últimos años, luego de la aparición de variantes del parásito que son resistentes a drogas antimaláricas y por la resistencia a los insectidas por parte del mosquito. Es por lo tanto urgente el desarrollo de medidas de control efectivas que permitan la erradicación de esta parasitosis.

El conocimiento del genoma, transcriptoma y proteoma de *P. falciparum*, han permitido el entendimiento de la inmunobiología de este parásito y de sus posibles mecanismos de invasión a las diferentes células hospederas. El ciclo de vida de *P. falciparum* en el glóbulo rojo (GR) es un proceso complejo y coordinado, en el que se involucran diferentes proteínas, solas o formando complejos multiprotéicos, localizadas tanto en la membrana de los merozoítos como en organelos secretorios especializados, conocidos como roptrias, micronemas y gránulos densos.

Recientemente, estudios realizados en *Toxoplasma gondii* (*Tg*), organismo modelo del filo Apicomplexa, han permitido establecer que proteínas derivadas del cuello de las roptrias y denominadas RON (del inglés, *rhoptry neck proteins*) forman un complejo no covalente que se asocia con la proteína de las micronemas AMA-1 (del inglés, *apical membrane antigen 1*), participando activamente durante la invasión a la célula huésped. Se ha reportado que en *P. falciparum* existen proteínas que son homólogas a las RON de *T. gondii* y se ha sugerido que de la misma forma que en *T. gondii*, en *Plasmodium* estas proteínas participan activamente en la invasión.

En este trabajo, se caracterizó la proteína *PfRON5* en la cepa FCB2 de *Plasmodium falciparum*, se identificaron las regiones de unión de la proteína *PfRON5* a GR y se determinó el efecto *in vitro* de estos sobre la invasión de merozoítos a GR humanos.

## ABSTRACT

Malaria is one of the most prevalent and mortal infectious diseases around the world today. Five *Plasmodium* species (obligate intracellular protozoan from the phylum Apicomplexa) infect humans, *Plasmodium falciparum* being the species responsible for the most severe clinical manifestations, having broad distribution throughout tropical and subtropical areas of Sub-Saharan Africa. According to the World Health Organization (WHO), about 216 million cases of malaria occurred during 2010 and around one million deaths happened, mainly among children aged less than 5 years old. This figure has increased during the last few years following the appearance of parasite variants which are resistant to antimalarial drugs, and due to the mosquito becoming resistant to insecticides. Developing effective control measures leading to the eradication of this parasitosis is thus an urgent public health priority in many third world countries.

Knowledge regarding the *P. falciparum* genome, transcriptome and proteome has led to an understanding of this parasite's immunobiology and its possible mechanisms for invading different host cells. The *P. falciparum* life-cycle within red blood cells (RBC) is a complex and coordinated process, involving different proteins, alone or when forming multi-protein complexes, localized on merozoite membrane and in specialized secretory organelles known as rhoptries, micronemes and dense granules.

Recent studies carried out in *Toxoplasma gondii* (*Tg*), the model organism for the phylum Apicomplexa, have led to establishing that rhoptry neck-derived proteins, called rhoptry neck proteins (RON), form a non-covalent complex which is associated with apical membrane antigen 1 (AMA-1) microneme protein which actively participates in host cell invasion. It has been reported that *P. falciparum* has some proteins which are homologous to *T. gondii* RON and it has been suggested that these proteins actively participate in invasion in *Plasmodium* in the same way as in *T. gondii*.

This work was thus aimed at characterizing the *PfRON5* protein in the *Plasmodium falciparum* FCB2 strain, identifying *PfRON5* RBC binding regions and determining *in vitro* their effect on merozoite invasion of human RBC.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPs:** Proteínas Asociadas a AMA-1, del inglés, *AMA1-associated proteins*.
- ACF:** Adyuvante Completo de Freund.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNg:** ADN genómico.
- ADNc:** ADN complementario
- ADNp:** ADN plasmídico.
- AIF:** Adyuvante Incompleto de Freund.
- AMA-1:** Antígeno Apical de Membrana 1, del inglés, *Apical Membrane Antigen 1*.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- BLAST:** Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales, del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*.
- CellTOS:** Proteína para el atravesar células de ooquinetes y esporozoítos, del inglés, *Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites*.
- CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- CR1:** Receptor del complemento tipo 1, del inglés, *Complement Receptor Type 1*.
- CSP:** Proteína Circumsporozoito, del inglés, *Circumsporozoite Protein*.
- DAPI:** Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
- DBL:** Familia de proteínas similares a aquella de unión a Duffy (DBL, del inglés, *Duffy Binding Like*).
- DTM:** Dominio transmembranal.
- EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.
- ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.
- FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína.
- GD:** Gránulos Densos.
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol.
- GR:** Glóbulos rojos.
- GRh:** Glóbulos rojos humanos.
- HABPs:** Péptidos de alta actividad de unión, del inglés, *High Activity Binding Peptides*.
- LB:** Luria Bertani.
- MET:** Microscopia Electrónica de Transmisión.



**MJ:** Unión móvil, del inglés, *Moving Junction*.

**MSP:** Proteína de Superficie del Merozoíto, del inglés, *Merozoite Surface Protein*.

**MVP:** Membrana de la Vacuola Parasitófora.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PBS:** Buffer Fosfato Salino.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*.

**PMSF:** Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.

**PS:** Péptido Señal.

**RBL:** La familia de Proteínas Similares a aquellas de unión a reticulocitos, del inglés, *Reticulocyte Binding Like Proteins*.

**RESA:** Antígeno de superficie del eritrocito infectado en estadio de anillo, del inglés, *Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen*.

**RH:** Proteína homóloga a aquellas de unión al reticulocito, del inglés, *Reticulocyte-binding protein homologue*.

**RIMA:** Antígeno de membrana de los anillos, del inglés, *Ring Membrane Antigen*.

**ROM4:** Proteasa Romboide 4, del inglés, *Rhomboid protease 4*.

**RON:** Proteína del Cuello de las Roptrias, del inglés, *Rhoptry Neck Protein*.

**RP-HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en Fase Reversa, del inglés, *High-Pressure Liquid Chromatography-Reverse Phase*.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico.

**SIVIGILA:** Sistema de Vigilancia en Salud Pública.

**SPECT 1 y 2:** Proteínas de las micronemas del esporozoíto esenciales para el atravesar células 1 y 2, del inglés, *Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal*.

**SUB-2:** Subtilisina 2.

**TA:** Temperatura ambiente.

**TAE:** Tris-Acetato-EDTA.

**TJ:** Enlace Fuerte, del inglés, *Tight Junction*.

**TRAP:** Proteína Adherente Relacionada a Trombospondina, del inglés, *Thrombospondin-Related Anonymous Protein*.

**VP:** Vacuola Parasitófora.

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1.  | Distribución de malaria causada por <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> en el año 2010.                                    | 7  |
| Figura 2.  | Malaria en Colombia.  | 9  |
| Figura 3.  | Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> .   | 11 |
| Figura 4.  | Estructura del merozoíto.   | 13 |
| Figura 5.  | Invasión del merozoíto al GR.   | 16 |
| Figura 6.  | Interacciones merozoíto-GR durante la invasión.   | 18 |
| Figura 7.  | Organización del MJ en <i>Toxoplasma gondii</i> .   | 21 |
| Figura 8.  | Inmunoprecipitación de las proteínas <i>PfRON</i> .   | 23 |
| Figura 9.  | Representación esquemática de la metodología propuesta.   | 25 |
| Figura 10. | Organización del gen MAL8P1.73 en la cepa 3D7.  | 26 |
| Figura 11. | Representación esquemática de los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de ADNg y ADNc del gen MAL8P1.7. | 28 |
| Figura 12. | Mapa del vector pEXP5- CT/TOPO® TA (Invitrogen).  | 32 |
| Figura 13. | Extracción de ADN genómico y amplificación de un fragmento del gen MAL8P1.73 en la cepa FCB-2.                                | 45 |
| Figura 14. | Transcripción del gen MALP1.73.   | 46 |
| Figura 15. | Confirmación de las bacterias recombinantes por PCR.  | 47 |
| Figura 16. | Alineamiento de las secuencias de RON5 en diferentes especies de <i>Plasmodium</i> .  | 49 |
| Figura 17. | Topología hipotética para la proteína <i>PfRON5</i> .   | 51 |
| Figura 18. | Reactividad de sueros anti- <i>PfRON5</i> frente a péptidos inoculados.   | 52 |
| Figura 19. | Tiempo de expresión de la proteína <i>PfRON5</i> durante el ciclo intraeritrocítico.  | 53 |
| Figura 20. | Localización subcelular de <i>PfRON5</i> en esquizontes de la cepa FCB-2 mediante Inmunofluorescencia indirecta.              | 54 |
| Figura 21. | La proteína <i>PfRON5</i> se localiza en el cuello de las roptrias.   | 55 |
| Figura 22. | Obtención de las proteínas recombinantes <i>rPfRON5F1</i> y <i>rPfRON5F4</i> .  | 56 |
| Figura 23. | Unión de <i>rPfRON5F1</i> y <i>rPfRON5F4</i> a GR humanos.  | 57 |
| Figura 24. | Antigenicidad del fragmento recombinante <i>rRON5F1</i> .   | 58 |
| Figura 25. | Tipos de unión para los péptidos de la proteína <i>PfRON5</i> .   | 59 |
| Figura 26. | Perfil de unión a GR humanos de la proteína <i>PfRON5</i> .   | 61 |
| Figura 27. | Saturación de los HABPs de <i>PfRON5</i> .  | 62 |

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 28.</b> | <b>Unión de los HABPs a GR humanos tratados con enzimas.</b>  | <b>63</b> |
| <b>Figura 29.</b> | <b>Residuos críticos para la unión de HABPs a GR humanos.</b> | <b>65</b> |
| <b>Figura 30.</b> | <b>Estructura secundaria por DC de los HABPs.</b>             | <b>66</b> |

## LISTA DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1. Organización de los exones en el gen MAL8P1.73.</b>                                | <b>27</b> |
| <b>Tabla 2. Polimorfismo de la proteína <i>PfRON5</i>.</b>                                     | <b>47</b> |
| <b>Tabla 3. Predicción de dominios transmembranales (DTMs) para la proteína <i>PfRON5</i>.</b> | <b>50</b> |
| <b>Tabla 4. Inhibición de la invasión a GR humanos</b>   | <b>68</b> |

.

## INDICE GENERAL

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.       | Introducción .....  | 3  |
| 2.       | Hipótesis.....  | 5  |
| 3.       | Objetivo General .....  | 5  |
| 4.       | Objetivos Específicos.....  | 5  |
| 5.       | Marco Teórico.....  | 6  |
| 5.1.     | La malaria.....   | 6  |
| 5.2.     | Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> en humanos .....                                    | 9  |
| 5.2.1.   | Fase Hepática .....   | 9  |
| 5.2.2.   | Fase en glóbulos rojos.....   | 12 |
| 5.2.2.1. | Estructura del merozoíto .....  | 12 |
| 5.2.2.2. | Fases de la invasión y proteínas asociadas.....   | 15 |
| 5.2.2.3. | Complejo AMA-1/RONs en la invasión .....  | 20 |
| 6.       | Materiales y Métodos.....   | 25 |
| 6.1.     | Identificación del gen MAL8P1.73 en la cepa FCB-2.....                                  | 25 |
| 6.1.1.   | Búsqueda de genes homólogos y diseño de cebadores .....                                 | 25 |
| 6.1.2.   | Extracción de ácidos nucleicos de <i>Plasmodium falciparum</i> y síntesis de ADNc ..... | 29 |
| 6.1.3.   | Amplificación y clonación del gen MAL8P1.73 .....                                       | 30 |
| 6.1.4.   | Determinación de la secuencia y polimorfismo del gen MAL8P1.73 .....                    | 33 |
| 6.1.5.   | Análisis de la secuencia de PfRON5 de la cepa FCB-2.....                                | 34 |
| 6.2.     | Evaluación de la expresión de la proteína PfRON5.....                                   | 34 |
| 6.2.1.   | Selección y síntesis de los péptidos a inocular.....                                    | 34 |
| 6.2.2.   | Obtención de anticuerpos policlonales.....  | 35 |
| 6.2.3.   | Inmunogenicidad de los péptidos inoculados .....  | 36 |
| 6.2.4.   | Reconocimiento de la proteína PfRON5.....   | 36 |
| 6.2.4.1. | Ensayo de Western blot.....   | 36 |
| 6.2.4.2. | Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....   | 37 |
| 6.2.5.   | Localización subcelular de la proteína PfRON5 .....                                     | 38 |
| 6.2.5.1. | Inmunomicroscopía electrónica .....   | 38 |
| 6.3.     | Obtención de las proteínas rPfRON5F1 y rPfRON5F4 .....                                  | 39 |
| 6.3.1.   | Unión de rPfRON5F1 y rPfRON5F4 a GRh.....   | 41 |
| 6.3.2.   | Antigenicidad de la proteína rPfRON5F1 .....  | 41 |
| 6.4.     | Regiones de PfRON5 que se unen a glóbulos rojos humanos .....                           | 42 |
| 6.4.1.   | Síntesis y marcación de los péptidos con Na <sup>125</sup> I.....                       | 42 |
| 6.4.2.   | Ensayos de unión y saturación .....   | 43 |
| 6.4.3.   | Ensayos de unión con GRh tratados enzimáticamente .....                                 | 43 |
| 6.4.4.   | Determinación de residuos críticos en la unión. ....                                    | 44 |
| 6.4.5.   | Estructura secundaria de los HABPs de la proteína PfRON5.....                           | 44 |
| 6.4.6.   | Inhibición de la Invasión.....  | 44 |
| 7.       | Resultados y discusión .....  | 45 |
| 7.1.     | Obtención del ADN parasitario y amplificación del gen MAL8P1.73 .....                   | 45 |
| 7.2.     | Estudio de la transcripción del gen que codifica para PfRON5.....                       | 45 |
| 7.2.1.   | Amplificación del ADN copia del gen MAL8P1.73.....                                      | 45 |
| 7.2.2.   | Clonación .....   | 46 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 7.2.3. | Determinación de la secuencia y polimorfismo del gen MAL8P1.73 .....                               | 47 |
| 7.2.4. | Análisis de la secuencia de <i>PfRON5</i> de la cepa FCB-2.....                                    | 50 |
| 7.3.   | Evaluación de la expresión de la proteína <i>PfRON5</i> .....                                      | 52 |
| 7.3.1. | Obtención de anticuerpos anti- <i>PfRON5</i> .....   | 52 |
| 7.3.2. | Detección de la proteína <i>PfRON5</i> en lisado de <i>P. falciparum</i> .....                     | 52 |
| 7.3.3. | Localización subcelular de <i>PfRON5</i> .....   | 53 |
| 7.4.   | Unión de las proteínas recombinantes r <i>PfRON5F1</i> y r <i>PfRON5F4</i> a GR humanos.....       | 55 |
| 7.5.   | Sueros de humanos infectados por <i>P. falciparum</i> reconocen a la proteína r <i>PfRON5F1</i> .. | 57 |
| 7.6.   | Péptidos sintéticos derivados de <i>PfRON5</i> se unen a GR humanos.....                           | 58 |
| 7.6.1. | La unión de los HABPs es saturable .....   | 60 |
| 7.6.2. | La unión de los HABPs es sensible al tratamiento enzimático .....                                  | 62 |
| 7.6.3. | Residuos críticos en la interacción HABP-GRh .....   | 64 |
| 7.6.4. | Estructura secundaria de los HABPs de la proteína <i>PfRON5</i> .....                              | 66 |
| 7.6.5. | HABPs de <i>PfRON5</i> inhiben <i>in vitro</i> la invasión de merozoítos a GRh.....                | 67 |
| 8.     | Conclusiones .....   | 69 |
| 9.     | Perspectivas.....  | 70 |
| 10.    | Bibliografía .....   | 71 |
| 11.    | Aspectos éticos.....   | 82 |
| 12.    | Anexos.....  | 83 |
| 13.    | Publicaciones.....   | 87 |

## 1. Introducción

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más ampliamente distribuidas alrededor del mundo, y de acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se presentan alrededor de 216 millones de casos clínicos y cerca de un millón de muertes, siendo las principales víctimas niños menores de 5 años, mujeres embarazadas y adultos en edad productiva. En humanos, la malaria es causada por cinco especies de *Plasmodium*: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo las dos últimas las que presentan mayores tasas de morbilidad y mortalidad [1].

Diferentes estrategias han sido diseñadas y utilizadas para el control y prevención de la malaria, entre ellas el uso de pesticidas, mosquiteros impregnados con insecticidas, drogas antimaláricas y diferentes tipos de vacunas [2-4]. Sin embargo, debido a factores tales como la expansión global de la enfermedad, el incremento de cepas resistentes a drogas antimaláricas, la diversidad genética del parásito, la resistencia del vector a insecticidas y las condiciones socioeconómicas de las poblaciones en riesgo, no ha sido posible obtener éxito en la lucha contra esta enfermedad [1]. Se ha sugerido que una vacuna que incluya diferentes proteínas (multiantígeno) derivadas de distintas formas invasivas (multiestadio), podría ser una estrategia efectiva para prevenir y controlar definitivamente la enfermedad [5-8].

Conocer las interacciones moleculares y celulares parásito-célula hospedera, y particularmente las proteínas relacionadas con la invasión a las diferentes células, es clave para la identificación y selección de las proteínas o fragmentos derivados de ellas, que puedan ser utilizadas o hacer parte en el diseño de un método de control o erradicación de la enfermedad. Esto se ha logrado en gran parte gracias al estudio del genoma, transcriptoma y proteoma de *P. falciparum* [9-12], así como estudios comparativos con otros miembros del filo *Apicomplexa* como *Toxoplasma gondii*, que sugieren que el proceso de invasión es conservado en los miembros de este filo [13].

En *Plasmodium*, el merozoíto es el estadio parasitario que invade a los glóbulos rojos (GR) y ha sido considerado uno de los blancos de estudio más importantes para el desarrollo de una vacuna, considerando que: a) el ciclo de vida en GR es el responsable de los síntomas clínicos de la

enfermedad, b) es posible mantener los estadios de este ciclo en cultivo *in vitro* para *Plasmodium falciparum* y c) proteínas derivadas del merozoíto se exponen al sistema inmune durante el proceso de invasión [14].

Durante la invasión del merozoíto al GR, es indispensable la formación de una interacción fuerte (TJ, del inglés tight junction), entre la membrana del merozoíto y la membrana del GR. Esta unión fuerte migra desde la porción apical del parásito hasta su extremo posterior, por acción del motor actina-miosina, razón por la que también se conoce como unión móvil (MJ, del inglés moving junction) [15-17]. La formación del TJ le permite al parásito iniciar y llevar a cabo la invasión al GR, así como la formación de la vacuola parasitófora, en la cual el parásito se desarrolla y se replica para la próxima generación celular [18].

Recientemente se identificaron en *Toxoplasma gondii* las proteínas que participan en la formación del TJ. Se encontró que la proteína derivada de las micronemas denominada Antígeno Apical de Membrana 1 (*TgAMA1*, del inglés apical membrane antigen) y cuatro proteínas localizadas en el cuello de las roptrias (*TgRON2*, 4, 5 y 8, del inglés rhoptry neck protein), participan en la formación del TJ y por lo tanto en la invasión [15-17]. Para el año 2009, cuando se inició este proyecto de tesis, habían sido caracterizadas en *Plasmodium falciparum* las proteínas *PfRON2*, *PfRON4* y *PfRON6*, homólogas a *TgRON2*, *TgRON4* y *TgRON6*, respectivamente. Además, se reportó que para la proteína recién descrita *TgRON8* no había homólogo en *Plasmodium*, que la proteína *PfRON6* se localiza en el cuello de las roptrias, pero al parecer no hace parte del complejo de proteínas en el TJ [19-22]. Se consideraba que la proteína *PfRON5* sí participaba en la formación del TJ [23], pero aún no había sido caracterizada.

Teniendo en cuenta la importancia que representa el conocimiento de la biología del parásito y la identificación y caracterización de nuevos antígenos en el desarrollo de métodos de control (entre ellos una vacuna de subunidades, multiantígeno y multiestadio), en este trabajo se propuso la identificación de la proteína *PfRON5* en la cepa FCB-2 de *P. falciparum*, así como las regiones de unión de la proteína *PfRON5* a GR y su posible rol en la invasión de merozoítos a GR humanos.



## 2. Hipótesis

El gen homólogo al que codifica para la proteína RON5 de *Toxoplasma gondii* existe y se transcribe en *Plasmodium falciparum*. La proteína codificada PfRON5 se expresa en el cuello de las roptrias del merozoíto y participa en la invasión al glóbulo rojo.

## 3. Objetivo General

Identificación y caracterización de la proteína del cuello de las roptrias 5 (RON5) en *Plasmodium falciparum* y determinación de las regiones de unión a glóbulos rojos humanos.

## 4. Objetivos Específicos

- Amplificar el gen MAL8P1.73 a partir de ADN genómico de *P. falciparum* y determinar su transcripción en el ARN mensajero.
- Evaluar la expresión de la proteína PfRON5 en *P. falciparum* y su localización subcelular con anticuerpos policlonales.
- Producir y purificar la proteína rPfRON5 en *E. coli* y evaluar su antigenicidad.
- Caracterizar las regiones de unión de PfRON5 a GR humanos y determinar su efecto sobre la reinvasión *in vitro*.

## 5. Marco Teórico

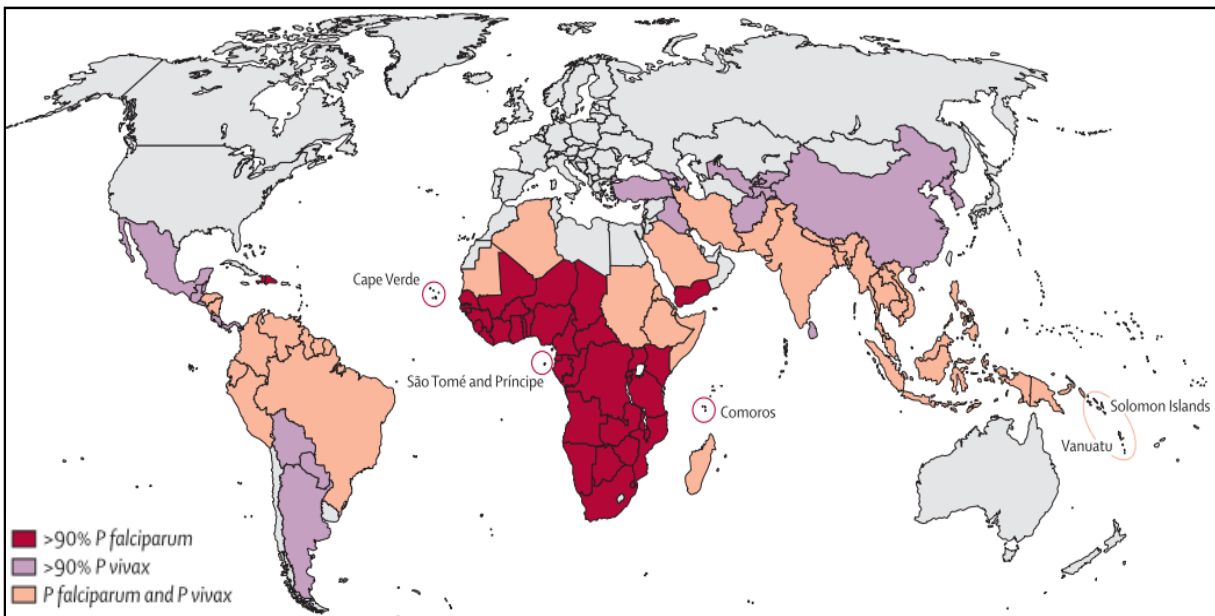
### 5.1. La malaria

La malaria es una de las parasitosis más ampliamente distribuidas en el mundo, es prevalente en cerca de 100 países, especialmente los localizados en áreas tropicales y subtropicales del planeta (Figura 1). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 3.000 millones de personas están en riesgo de ser infectados, y anualmente se presentan entre 216 y 250 millones de casos clínicos en todo el mundo, con aproximadamente 1 millón de muertes, principalmente niños menores de cinco años, mujeres embarazadas y adultos en edad productiva. Son los países Africanos en donde se presenta el 85% de los casos y el 95% de las muertes [24].

La malaria es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, perteneciente al filo *Apicomplexa*. Dentro de este género, existen especies que parasitan reptiles, aves, mamíferos y algunos pueden o no causar enfermedad. En el caso específico del humano, son cinco las especies que lo infectan: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. knowlesi*. *Plasmodium falciparum* es la especie más prevalente (93% de casos), responsable de las complicaciones severas de la enfermedad y causa las mayores tasas de mortalidad (85% de las muertes), todo esto asociado con la capacidad de adhesión que presenta el GR infectado por esta especie de parásito a las células endoteliales y a GR no infectados. *Plasmodium vivax* causa cerca del 40% de los casos anuales de malaria en las zonas tropicales de América Latina y Asia (Figura 1); estas infecciones son menos severas, pero pueden permanecer latentes por mucho tiempo, por la presencia de formas durmientes del parásito en el hígado denominadas hipnozoitos, que dificultan eliminar al parásito en el humano. *P. ovale* y *P. malariae* son causas infrecuentes de morbilidad y las infecciones no tratadas pueden persistir como parasitemias de bajo grado por varias décadas. *P. knowlesi*, descrito originalmente como un parásito que infecta monos macacos, también infecta naturalmente a humanos en algunas áreas de Malasia y causa malaria severa [24-30].

En Colombia, aunque los casos anuales reportados de malaria han disminuido, la malaria todavía es un grave problema de salud pública. Alrededor del 60% de la población colombiana está en riesgo de contraer la enfermedad, debido a que la mayoría del territorio rural está a una altura menor a los 1.700 metros sobre el nivel del mar, lo que hace que se den las condiciones

climáticas, geográficas y epidemiológicas idóneas para la transmisión de la enfermedad. Según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud (INS), para la semana epidemiológica número 31 de 2013 (28 de Julio al 3 de Agosto de 2013) se habían notificado 40.732 casos, de los cuales 27.417 (67,3%) corresponden a *P. vivax*, 12.686 (31,1%) a *P. falciparum*, 611 (1,5%) a la asociación de estas dos y 18 (0,04%) a *P. malariae*. Los departamentos con mayor incidencia de malaria por *P. falciparum* son: Antioquia, Chocó, Córdoba y Bolívar, con cerca del 80,0% de los casos notificados en el país (Figura 2) [31].



**Figura 1. Distribución de malaria causada por *P. falciparum* y *P. vivax* en el año 2010.** Tomado de [32].

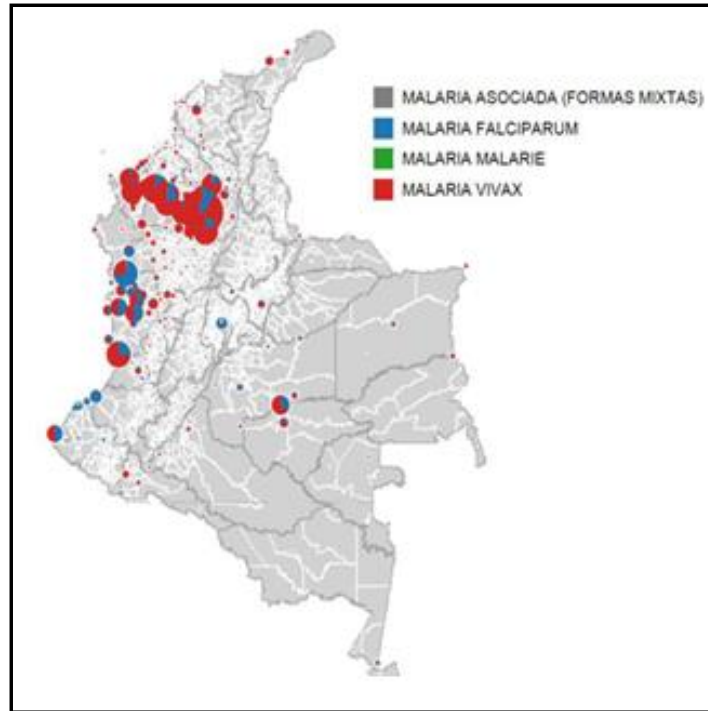
Diferentes estrategias de control han sido implementadas para disminuir las tasas de morbi-mortalidad que causa la malaria, entre las que se encuentran la implementación de campañas de prevención, uso de mosquiteros impregnados con insecticidas [33], nuevos medicamentos [34] y el desarrollo de vacunas siguiendo diferentes aproximaciones y diferentes estrategias [35, 36].

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) se ha desarrollado una metodología lógica y racional para el diseño de una vacuna contra la malaria [37], que se basa en la identificación de regiones funcionales (unión) de proteínas que participan durante la invasión a la célula diana, estos péptidos, denominados de alta capacidad de unión (HABPs, del inglés, *High*

*Activity Binding Peptides*) han sido identificados en 50 proteínas de merozoíto en su interacción con el GR [38], y en aproximadamente 20 proteínas del estadio pre-eritrocítico en su interacción con células hepáticas [39].

El análisis del polimorfismo genético de cada uno de los HABPs mostró que algunos péptidos son conservados en secuencia, mientras otros HABPs presentan variaciones. En monos *Aotus*, los HABPs variables inducen respuesta de anticuerpos no protectora frente al reto experimental, mientras que los HABPs conservados son pobres inmunógenos y no inducen protección. De la misma forma, durante una infección natural, no se han encontrado anticuerpos dirigidos contra los HABPs conservados, fenómeno al que se le ha denominado silencio inmunológico. En un ensayo adicional, utilizando péptidos análogos de glicina de los HABPs (cada residuo fue reemplazado independientemente por glicina), se encontró que algunos de los residuos eran críticos para la unión a GR, es decir, el análogo de glicina no se unía al GR de la misma forma que el HABP original [40]. Posteriormente, se encontró que al sustituir los residuos críticos por otros aminoácidos (HABPs modificados), algunos de estos HABPs modificados inducían altos títulos de anticuerpos pero de corta vida y no protegían frente al reto experimental con una cepa de *P. falciparum* adaptada a monos *Aotus*. Otro grupo de HABPs modificados inducían anticuerpos de larga duración pero no protectivos, y un último grupo de HABPs modificados inducía anticuerpos de larga duración asociados a la protección de monos *Aotus* [5]. Estos resultados fueron claves para establecer uno de los principios del desarrollo de una vacuna basada en péptidos sintéticos multi-estadío, en el cual, para inducir una apropiada respuesta inmune, los residuos críticos en la unión a la célula hospedera deben ser reemplazados por aminoácidos con masa, volumen y superficie similar, pero con polaridad opuesta [5].

La relación entre la respuesta inmune y la modificación de los HABPs, se estableció con estudios de estructura tridimensional, en los que se encontró que los HABPs modificados difieren en estructura respecto a los HABPs nativos, permitiendo el correcto acople del péptido en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, optimizando la presentación antigénica en la sinapsis inmunológica, y generando así una respuesta inmune protectora [41]. Estos análisis inmunológicos y estructurales, han suministrado las reglas necesarias para el diseño de una vacuna completamente efectiva contra la malaria [6].



**Figura 2. Malaria en Colombia.** Se observan las regiones de Colombia afectadas por malaria y la especie de parásito causante de la malaria para el año 2011. Adaptado de [31].

## 5.2. Ciclo de vida del *Plasmodium* en humanos

El filo Apicomplexa comprende un grupo variado de parásitos intracelulares obligados con capacidad de infectar a un amplio rango de huéspedes, entre los cuales se encuentran algunos de importancia clínica y veterinaria, tales como *Cryptosporidium*, asociado con enfermedades gastrointestinales, *Toxoplasma*, relevante en pacientes inmunocomprometidos, *Eimeria*, que causa coccidiosis en gallinas, y *Plasmodium*, el agente causal de la malaria. Las diferentes formas invasivas (zoitos) de estos parásitos se caracterizan por la capacidad de invadir activamente las células hospederas mediante la secreción de proteínas contenidas en organelos apicales especializados: roptrias, micronemas, gránulos densos y exonemas, y la acción de un motor actina-miosina [42, 43].

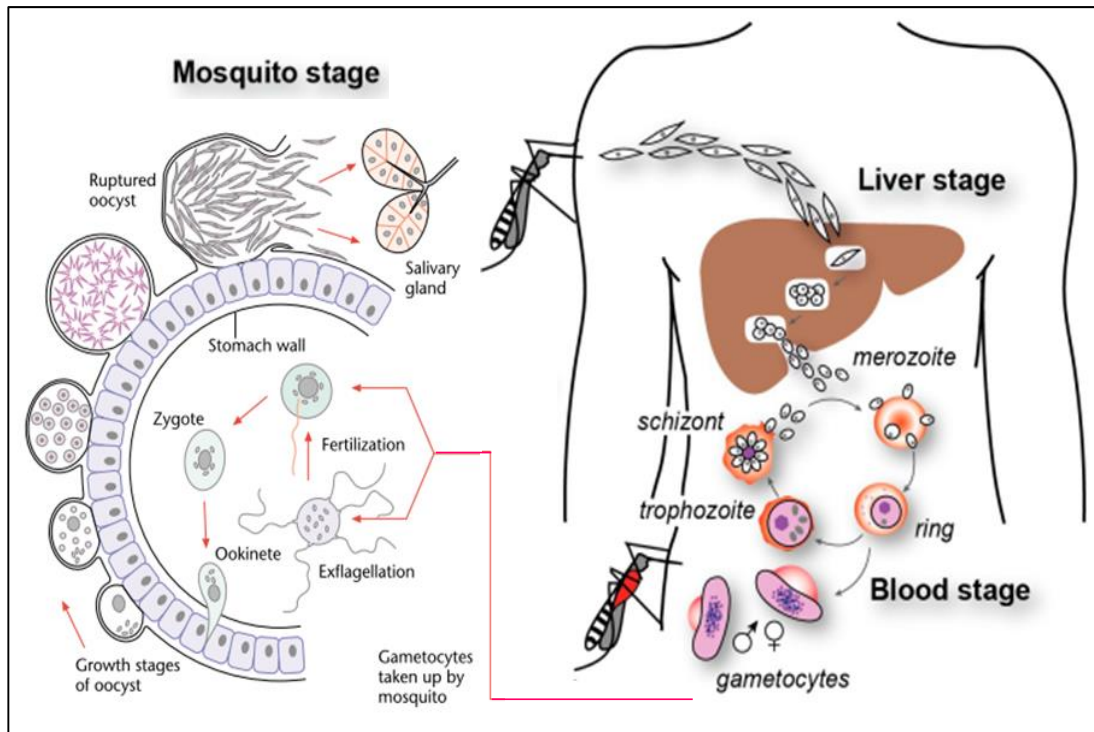
### 5.2.1. Fase Hepática

El ciclo de vida de *Plasmodium* spp consta de dos fases definidas con dos diferentes hospederos: una fase sexual que se desarrolla en la hembra del mosquito del género *Anopheles* (hospedero-

vector) y una fase asexual que se desarrolla en el hospedero vertebrado (Figura 3). El ciclo inicia cuando un mosquito infectado que se está alimentando inyecta esporozoítos en el tejido subcutáneo del hospedero; estos alcanzan el torrente sanguíneo y viajan hasta el hígado, donde invaden hepatocitos [44].

Se ha reportado que en ratones, algunos merozoítos invaden células de la piel, se desarrollan y liberan merozoítos infectivos [45]. Los esporozoítos que alcanzan los sinusoides hepáticos se deslizan sobre el endotelio, se fijan a éste vía proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG, del inglés heparan sulfate proteoglycan), atraviesan la capa sinusoidal a través de las células de Kupffer [46], cruzan el espacio de Disse y migran a través de varios hepatocitos hasta que finalmente invaden uno de ellos, dando inicio a la formación de una vacuola parasitófora [44, 47]. Se ha descrito que la proteína circumsporozoito (CSP, del inglés circumsporozoite protein) y la proteína anónima relacionada a trombospondina (TRAP, del inglés thrombospondin related anonymous protein) son los ligandos del parásito que son reconocidos por los HSPG, éstos actúan como receptores, fijando al parásito sobre el endotelio [48-50]. El paso a través de las células de Kupffer y de los hepatocitos, está mediado por las proteínas de las micronemas del esporozoíto esenciales para atravesar células 1 y 2 (SPECT 1 y 2, del inglés sporozoite protein essential for cell traversal) [51, 52], la proteína para atravesar células de ooquinetes y esporozoítos (CelTOS, del inglés cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites) [53], la proteína similar a TRAP (TLP, del inglés TRAP-like protein) [54] y una proteína con actividad fosfolipasa (PL, del inglés phospholipase) [55]. La invasión a hepatocitos está mediada por la proteína CSP (asociada con la unión) [44], la proteína TRAP (asociada con la movilidad necesaria para la invasión) [49, 56] y la proteína AMA-1 derivada de las micronemas del parásito [57].

Se ha descrito que luego del contacto inicial esporozoíto-hepatocito se aumenta la secreción de las proteínas AMA-1 y TRAP, y que el dominio extracelular de esta última interactúa con la glicoproteína Fetuina-A de la membrana del hepatocito y asociada a la matriz extracelular [44, 58]. Adicionalmente, se ha reportado que la proteína tetraspanina CD81 del hepatocito es requerida para regular la actividad de otras proteínas receptoras durante la invasión [59].



**Figura 3. Ciclo de vida del *Plasmodium*.** El mosquito inocula esporozoítos que llegan al hígado e invaden hepatocitos, donde ocurre esquizogonia exoeritrocítica (replicación asexual). Los merozoítos producidos invaden GRs en el torrente sanguíneo, maduran de trofozoítos tempranos o anillos a trofozoítos maduros, y luego a esquizontes segmentados, de donde se liberan nuevos merozoítos aptos para invadir nuevos GR y continuar el ciclo. Algunos merozoítos se diferencian a formas sexuales (micro y macrogametocitos), que son ingeridos por otro mosquito. Posteriormente, se induce la gametogénesis, se forman los microgametos (exflagelación) que fertilizan a los macrogametos para producir el cigoto, se diferencia a ooquinete y penetra las células epiteliales del intestino del mosquito y se convierte en oocisto; éste sufre varios ciclos de replicación asexual para producir esporozoítos, que migran a las glándulas salivales del mosquito, desde donde son inoculados al humano, completando así el ciclo de vida [60, 61]. La imagen fue adaptada de [62, 63].

En el interior de los hepatocitos, los esporozoítos generan esquizontes tisulares, que mediante sucesivas divisiones mitóticas y dependiendo de la especie, producen entre 10,000 a 30,000 merozoítos, que una vez liberados al torrente sanguíneo infectan GR, iniciando lo que se denomina el ciclo asexual eritrocítico. Esta etapa del ciclo de vida del parásito dentro del hepatocito dura de 5 a 8 días, es asintomática y se conoce muy poco acerca de las interacciones moleculares y celulares que se presentan en el parásito y el hepatocito [44, 64]. Estudios realizados con *P. berghei*, sugieren que las proteínas reguladas en esporozoítos infectivos 3 y 4 (UIS3, 4, del inglés up-regulated in infective sporozoites gene) y la proteína Pb36p, son definitivos para el desarrollo del parásito dentro del hepatocito, aunque no se conoce su función exacta [44].

Hasta ahora se desconoce el mecanismo de salida de los merozoítos de los hepatocitos y las señales asociadas a este mecanismo, se ha propuesto que en *P. falciparum*, la salida de los merozoítos se da luego de la ruptura de la membrana de los hepatocitos, sin embargo, estudios con *P. berghei* y *P. yoelii* muestran que la salida de los merozoítos se da luego que el parásito ha inducido la separación de los hepatocitos infectados y la formación de vesículas (merosomas) llenas de merozoítos, que alcanzan el lumen sinusoidal y liberan los merozoítos [65, 66].

### **5.2.2. Fase en glóbulos rojos**

La fase en GRs una de las más estudiadas en el ciclo de vida del *Plasmodium*, ya que es posible mantener cultivo *in vitro* de estos estadios parasitarios [67]. Esta fase está asociada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad [68] y el merozoíto, la forma del parásito que infecta a los GR, es considerado de gran importancia a nivel inmunológico, ya que se expone al sistema inmune cuando es liberado al torrente sanguíneo, justo antes de invadir a un GR [69].

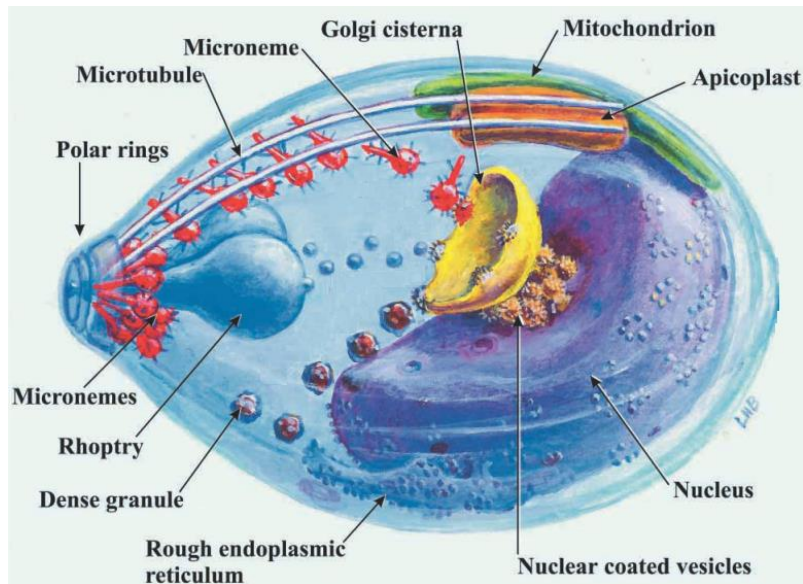
En esta fase, los merozoítos liberados de los merosomas invaden a los GR, formando una vacuola parasitófora donde residen y se multiplican, pasando de estadio de anillo o trofozoíto joven a trofozoíto y finalmente a esquizontes (Figura 3). Luego de 48 a 72 horas, dependiendo de la especie [70], se liberan nuevos merozoítos que están en capacidad de invadir otros GR [71].

#### **5.2.2.1. Estructura del merozoíto**

Los merozoítos son células ovoides pequeñas con tamaño variable según especie, con una longitud aproximada de 1,5 hasta 2,5 $\mu$ m y de 1,0 hasta 2,0 $\mu$ m de ancho [72], poseen la maquinaria celular básica de una célula eucariota: núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas. El merozoíto tiene su superficie cubierta por una capa de filamentos gruesos, los cuales a su vez están formados por un grupo de filamentos delgados (2-3nm), que están anclados a la membrana plasmática y son los encargados de reconocer a los GR. A medida que el merozoíto invade al GR, estos filamentos son procesados o hidrolizados por enzimas derivadas del parásito [69, 73-75]. Los merozoítos (Figura 4), se caracterizan por poseer organelos secretorios especializados propios del filo: roptrias y micronemas (localizados en el polo apical), gránulos densos y exonemas (en *P. falciparum*), localizados en el citoplasma; todos ellos son vesículas membranosas que coordinada y secuencialmente descargan su contenido



proteico durante la invasión a los GR [76, 77]. Algunos de los organelos están anclados al citoesqueleto, lo que ayuda a dar la forma típica ovoide o de limón al merozoíto [72, 78].



**Figura 4. Estructura del merozoíto.** Figura modificada de [79].

Las **roptrias** son vesículas pequeñas en forma de pera unidas a la membrana del merozoíto (Figura 4), miden ~550nm x 250nm y en estado maduro se pueden distinguir dos regiones, una tiene forma de bulbo basal, que se alarga hasta formar los ductos (o cuello de las roptrias) [76, 80]. Por microscopia electrónica de transmisión (MET), el bulbo aparece como una región granular homogénea, mientras que el ducto tiene una apariencia heterogénea electrolúcida [81]. No se han encontrado membranas internas que separen estos dos sub-compartimentos y se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas se almacenan en regiones particulares dentro de las roptrias.

Aunque las roptrias se encuentran en todos los parásitos Apicomplexa, varían en tamaño y número, lo que ha sido relacionado con el tipo de células que invade cada parásito [81-83], de hecho, las proteínas del bulbo de las roptrias no poseen ortólogos entre *P. falciparum* y *T. gondii*, lo que indica que los antígenos albergados allí son únicos de cada género y muestra la adaptación de estos organelos a su respectiva célula blanco [84].

En *Plasmodium*, las roptrias contienen proteínas en complejos no covalentes o solas, que juegan un papel importante en la invasión a los GR: el complejo de proteínas de las roptrias de alto peso molecular (RhopH1, 2 y 3, del inglés high molecular mass roptry protein) que se ubica en el ducto de las roptrias, al igual que la proteína de las roptrias de 225 kDa (p225 kDa), un complejo de proteínas de bajo peso molecular (RAP-1, 2 y 3, del inglés roptry associated protein), ubicadas en parte basal del bulbo [71, 76] y un grupo de proteínas que por su localización se han denominado proteínas del cuello de las roptrias (RON1, 2, 3, 4, 5, 6 y 12, del inglés roptry neck protein) [19, 20, 22, 85-88]. Cerca del polo apical, se localizan proteínas denominadas proteínas homologas a las proteínas de *Plasmodium vivax* que se unen a reticulocitos (*Pf*RH1, *Pf*R2Ha, *Pf*R2Hb, *Pf*RH4 y *Pf*RH5, del inglés reticulocyte binding protein homologues) [89-93]. Se ha descrito que la proteína receptor de complemento 1 (CR1, del inglés complement receptor) y receptor de complemento 147 o basigina, son los receptores en membrana de GR para las proteínas *Pf*RH1 y *Pf*RH5, respectivamente [94-96].

Las **micronemas** son vesículas más pequeñas que las roptrias y su número varía según la especie, en *P. falciparum* se observan como sacos fusiformes de aproximadamente 120nm de largo, unidos o agrupados al extremo final del ducto de las roptrias y tienen un interior granular fino limitado por su membrana citoplasmática [76]. Las micronemas contienen proteínas que son esenciales en el reconocimiento e interacción merozoíto-GR, entre estas, se ha descrito una familia de proteínas similares a la proteína de unión a Duffy (DBL, del inglés duffy binding ligand) [97], y denominada ligandos de unión a eritrocito (EBL, del inglés erythrocyte binding ligand), entre las que se incluyen las proteínas de unión a eritrocito de 140, 175 y 181 kDa (EBA-140, 175 y 181, del inglés erythrocyte binding ligand) [98-102], la proteína denominada ligando de unión a eritrocitos-1 (EBL-1) [103], y el antígeno apical de membrana-1 (AMA-1, del inglés apical membrane antigen) [104]. Se ha descrito que las glicoforinas A, B y C son los receptores en membrana de GR para las proteínas EBA-175, EBL-1 y EBA-140, respectivamente [105]. Aunque se reportó que el dominio III de la proteína AMA-1 se une a la proteína Kx [106], recientemente se postuló un hecho sin precedentes: las proteínas *Pf*RON2, 4 y 5 forman un complejo que es translocado a la membrana del GR, donde *Pf*RON2 actúa como receptor para AMA-1, siendo esta la primera evidencia de la cooperación de proteínas de diferentes organelos en la invasión [20, 107-109].

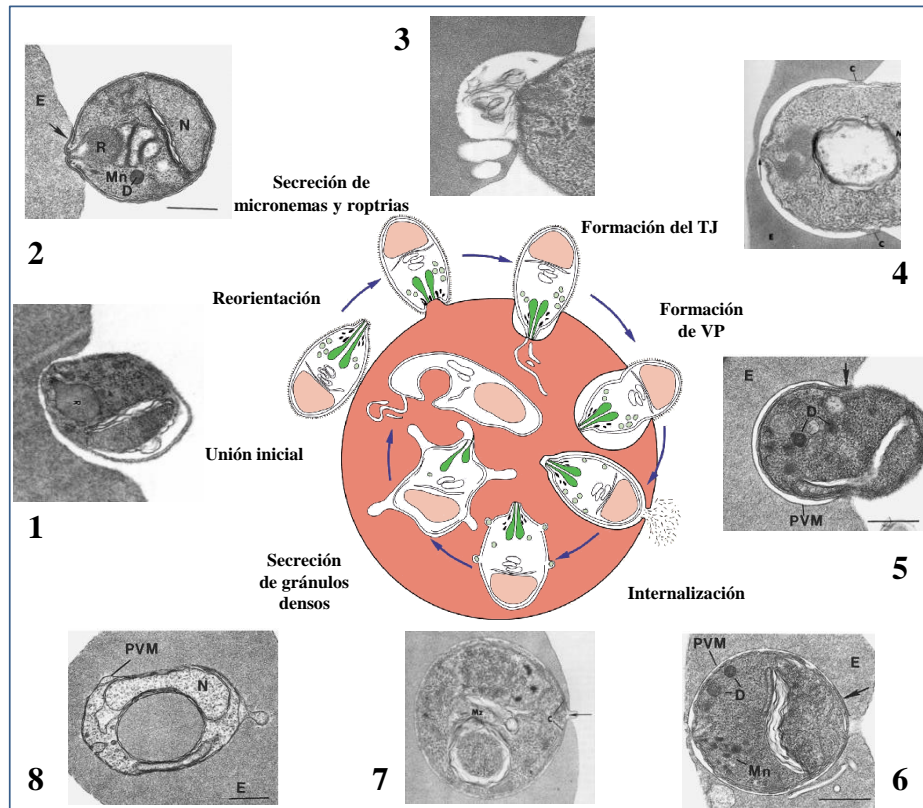
Los **gránulos densos** son vesículas membranosas de forma circular, con un diámetro de ~80nm y situados en el citoplasma entre las roptrias y el núcleo del merozoíto. Los gránulos densos se trasladan hacia la superficie del merozoíto una vez éste ha invadido al GR, y a través de la membrana, liberan su contenido por exocitosis dentro de la vacuola parasitófora. Esta descarga induce cambios morfológicos en la membrana de la vacuola parasitófora: se forman protuberancias o prolongaciones en forma de dedo, que se extienden al citoplasma del GR invadido [76]. En los gránulos densos se han caracterizado 4 proteínas: el antígeno de superficie del eritrocito infectado con anillos (RESA, del inglés ring-infected erythrocyte surface antigen ), el antígeno de membrana de anillo (RIMA, del inglés ring membrane antigen) y dos serina proteasas del tipo subtilisina (*PfSUB-1* y *PfSUB-2*, del inglés subtilisine) [76, 110]. Se ha postulado que la proteína RESA cruza la membrana de la vacuola parasitófora e interactúa con la espectrina en el citoesqueleto del GR y que la serina proteasa *PfSUB-1* está asociada con el procesamiento de varias proteínas de superficie del merozoíto (MSP1, 6 y 7, del inglés merozoite surface protein) y con la activación del antígeno rico en serinas (SERA, del inglés serin repeat antigen), que es una proteasa asociada con la lisis de las membranas de la VP y del GR infectado, previo a la liberación de merozoítos [111]. En un reporte reciente, se describe que en *P. falciparum*, la proteína *PfSUB-1* no está contenida en los granulos densos, sino en vesículas un poco más alargadas y elongadas que los granulos densos que fueron denominados exonemas [77].

#### **5.2.2.2. Fases de la invasión y proteínas asociadas**

Estudios con *P. knowlesi* mostraron que la invasión de merozoítos es un proceso que toma pocos segundos y que podía ser dividido en tres etapas bien diferenciadas: unión del merozoíto por su región anterior al GR y reorientación, deformación de la membrana del GR y entrada del merozoíto por invaginación de la membrana del GR (Figura 5) [112]. Posteriormente se reportó que el merozoíto unido apicalmente al GR forma una estructura específica, denominada unión fuerte (de *tight junction* (TJ) en inglés), en la interfaz con la membrana del GR [73] y que durante la invasión, esta unión se hace móvil en forma de anillo (unión móvil o deslizante (de *moving junction* en inglés)), se conecta con el motor actina-miosina para impulsar al merozoíto dentro de la VP naciente y está asociada con la liberación del contenido de los organelos secretorios, que a su vez están relacionados con mecanismos de señalización [73, 75, 76, 113, 114]. Recientemente, se reportó tanto en *T. gondii* como en *P. falciparum*, que la unión de las proteínas de las

micronemas a los receptores en la membrana de GR, activa la exocitosis de los componentes de las roptrias que participan en la formación del TJ, y en la remodelación de la VP [113, 115].

Se ha reportado que cerca de 60 proteínas podrían estar involucradas en la invasión del merozoíto al GR con base en algunos de los siguientes criterios o varios de ellos: a) por la transcripción del gen y la expresión de la proteína hacia el final del ciclo intraeritrocítico, b) si anticuerpos dirigidos contra la proteína o algunas de sus regiones, inhiben la invasión, o c) si no es posible obtener parásitos *knock out* para el gen codificante de la proteína. A pesar del gran número de proteínas aparentemente involucradas en la invasión, para la gran mayoría no se conoce su función exacta y/o su receptor sobre la membrana del GR [12, 71, 116].

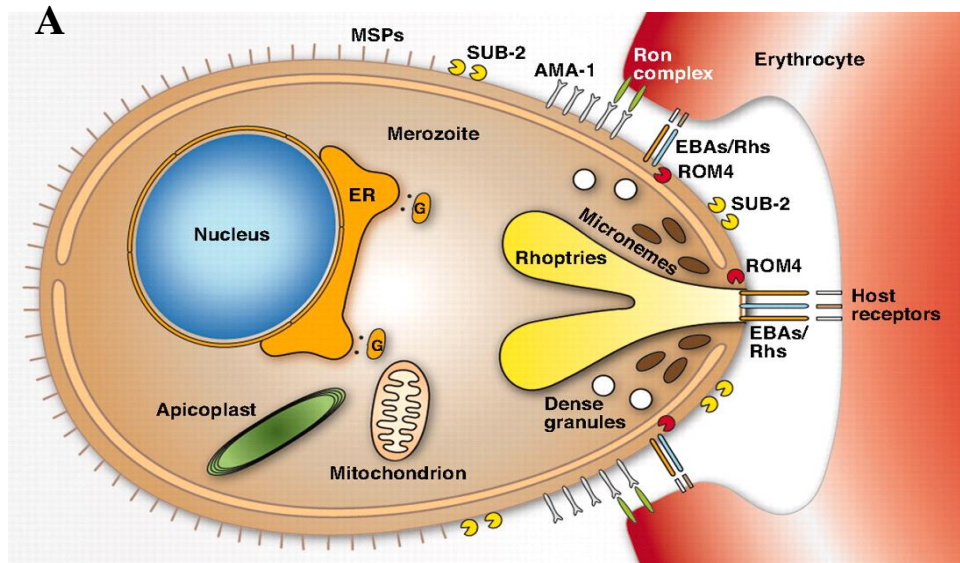


**Figura 5. Invasión del merozoíto al GR.** En la imagen superior se observan los principales eventos asociados con el proceso de invasión: 1. unión o contacto inicial, 2. reorientación apical y unión irreversible, 3. liberación del contenido de las micronemas y de las roptrias, 4. formación de la unión fuerte (TJ), 5. entrada o invasión del merozoíto e inicio de la formación de la vacuola parasitófora, 6. terminación de la entrada del merozoíto, 7. Liberación del contenido de los gránulos densos y cierre o sellado de la membrana del GR, y 8. parásito internalizado. Se observa como durante la invasión o internalización, por acción de diferentes proteasas del parásito, proteínas de la superficie del parásito son liberadas al medio. Figura modificada de [74, 117].

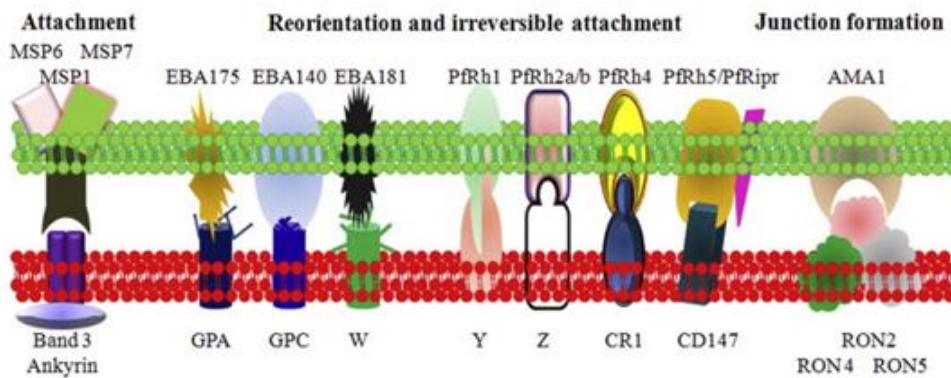
Se ha postulado que la **unión inicial** merozoíto-GR es reversible y están involucradas proteínas de la superficie o MSPs, principalmente las que se encuentran ancladas a la membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés glycosphosphatidylinositol) tales como MSP-1, 4, 5, 8 y 10, así como las proteínas solubles MSP-2, 3, 6, 7 y 9. Sin embargo, se ha reportado que es principalmente MSP-1, en complejo no covalente con proteínas de membrana como MSP-3, MSP-6, MSP-7, MSP-9, y proteínas de las roptrias como RAP-1, RAP-2, RhopH1 y RhopH3, la proteína que tiene un papel determinante en el reconocimiento y unión inicial al GR vía la proteína intercambiadora de aniones banda 3 (Figura 6) [62, 118-120].

Luego de la unión inicial, el merozoíto se debe **reorientar**, de tal forma que su polo apical debe quedar enfrente hacia la superficie del GR [14]. Se ha descrito que la reorientación es un proceso activo mediado por flujo de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ), que da inicio a la formación del TJ [121, 122], y es fundamental para el proceso de invasión: si se interrumpe la formación del TJ, el parásito no invade al GR [23, 123]. Diferente evidencia indica que la proteína AMA-1 es crítica para invasión y para la formación del TJ: no es posible obtener parásitos *knock out* para el gen de AMA-1 en *P. falciparum* y un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítope de AMA-1 en *P. knowlesi*, no inhibe la unión merozoíto-GR, pero inhibe la reorientación y por lo tanto la invasión [124, 125].

Recientemente, se reportó que la baja concentración de iones potasio en el plasma sanguíneo, induce un aumento en la concentración de calcio en el citosol del merozoíto, a través de una vía mediada por fosfolipasa C, que a su vez, induce la secreción de proteínas de las micronemas tales como EBA-175 y AMA-1; además, la unión de EBA-175 a glicoforina A, restaura los niveles basales de calcio e induce la secreción del contenido de las roptrias [113]. Las proteínas secretadas de las micronemas y de las roptrias han sido clasificadas como adhesinas que se unen directamente a receptores sobre la membrana de GR e invasinas que participan en la invasión, pero no se unen a algún receptor particular [62]. Las principales adhesinas pertenecen a la familia EBL (micronemas), que incluye a EBA-15 y cuatro genes parálogos al gen codificante de EBA-175: EBA-140, EBA-165, EBA-181 y EBL-1 y la familia *PfRH* (roptrias), para la mayoría de las cuales se ha identificado o caracterizado su receptor en membrana de GR (Figura 6) [62, 116, 126].



**B**



**Figura 6. Interacciones merozoíto-GR durante la invasión.** **A.** Una vez el parásito se reorienta, ligandos provenientes de los organelos del parásito (*P. falciparum*: EBA-175, EBA-140, EBA-181, *Pf*RH1, *Pf*RH2a/b, *Pf*RH4 y *Pf*RH5) interactúan con receptores sobre la superficie del GR y activan la formación del TJ. Algunas interacciones receptor-ligando son liberadas durante la invasión por el procesamiento de los ligandos del parásito con la proteasas romboide 4 (ROM4, del inglés rhomboid-like protease) y SUB-2. Recientemente, se ha descrito que *Pf*AMA-1 participa en la formación del TJ a través de la interacción con un complejo formado con proteínas del cuello de las roptrias (RONs), que se translocan a la superficie de la membrana del GR. Figura tomada de [127]. **B.** Se observan esquematizadas las principales interacciones entre ligandos del parásito y receptores en la membrana del GR. Las proteínas receptoras W, Y y Z, aún no han sido identificadas y caracterizadas. Figura modificada de [126].

La proteína AMA-1 ha sido asociada con la reorientación del merozoíto luego de la unión inicial, y con la descarga del contenido del bulbo de las roptrias [124, 125, 128]. Estudios recientes realizados en *T. gondii* y *P. falciparum*, indican que AMA-1 desempeña también un papel crítico en la formación del MJ (y por lo tanto en la invasión), ya que a través del cuello de las roptrias es

translocada a la membrana del merozoíto, donde actúa como ligando de unión a los GR [129, 130]. Es interesante mencionar que el ligando sobre la membrana de GR al cual se une AMA-1, es un complejo formado por proteínas derivadas del cuello de las roptrias: RON2, 4, 5 y 8 en *T. gondii*, y RON2, 4 y 5 en *P. falciparum* (Figura 6), todas ellas denominadas proteínas asociadas a AMA-1 (AAPs, del inglés AMA associated proteins). La interacción AMA-1/AAPs se da por la interacción específica de AMA-1 con la proteína RON2, y la inhibición de esta interacción o de la formación del complejo AAPs inhibe la invasión [23, 108, 131].

Las proteínas de la familia EBL se caracterizan por tener en su secuencia un dominio rico en cisteínas, conservado en todas las proteínas de la familia, conocido como dominio DBL y asociado con la unión a los receptores sobre la membrana del GR [98, 132]. Las proteínas de las familias EBL y *PfRH* están relacionadas con la variación fenotípica que permite que diferentes cepas de *P. falciparum* invadan utilizando rutas alternas de invasión, esto es, utilizar diferentes receptores sobre la membrana del GR para realizar la invasión [133-135]. La evidencia para este hecho, surge de los estudios realizados con diferentes cepas de *P. falciparum*, que invaden GR deficientes en glicoforina A, GR carentes de residuos de ácido siálico, o GR que han sido pre-tratados con enzimas [102, 136, 137], de tal forma que se propone que el uso en combinación de las proteínas EBLs-Rhs, da al merozoíto la capacidad de tomar 25 diferentes rutas alternas para la invasión [138].

Se ha sugerido que las proteínas actúan coordinadamente, las Rhs “sensan” que la célula a la que se ha unido el merozoíto, así como los receptores de membrana, sean los adecuados para invadir, induciendo así el reclutamiento de ligandos de mayor afinidad, como las proteínas EBLs [135, 138, 139].

Finalmente, la secreción del contenido de las micronemas y de las roptrias da inicio a la **internalización** del parásito, el TJ se torna móvil (MJ), y los lípidos y proteínas secretados del bulbo de las roptrias participan en la formación de la membrana de la VP, mientras que algunas adhesinas son procesadas por enzimas del parásito como la *PfSUB-1* o las proteasas *PfROM1* y 4, de tal forma que son liberadas al medio o sólo permanece la región anclada a membrana (Figura 6) [76, 111, 140, 141].

Una vez el MJ ha migrado completamente a la parte posterior del parásito, se cierra la VP y los gránulos densos secretan su contenido; el parásito inicia entonces su proceso de replicación asexual, para producir múltiples merozoítos que una vez liberados, iniciarán un nuevo ciclo de invasión y replicación en los GR [71, 142].

### **5.2.2.3. Complejo AMA-1/RONs en la invasión**

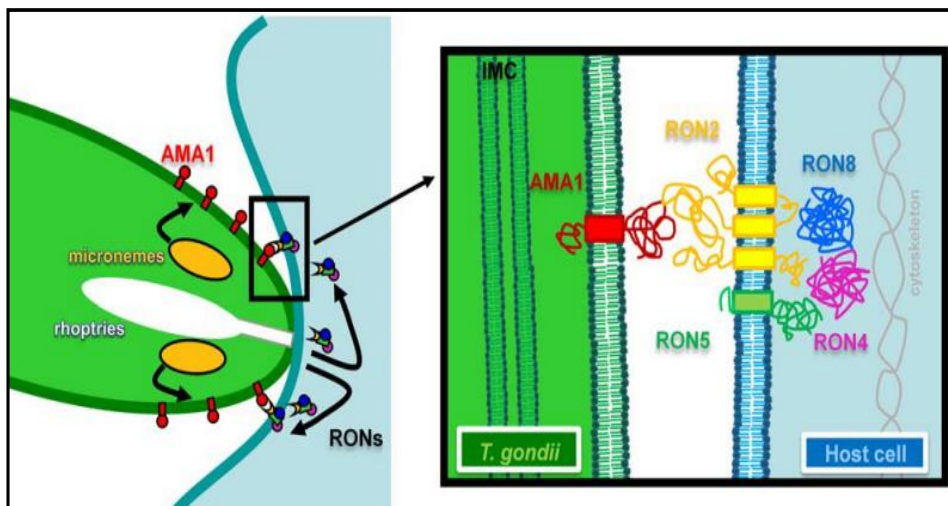
En *Plasmodium*, la descripción del MJ fue hecha hace casi 35 años [73], pero hasta hace 8 años, sólo se conocía de una proteína asociada a esta interacción merozoíto-GR [143]. Sin embargo, el estudio del proteoma de las roptrias de *T. gondii*, permitió la identificación de 9 proteínas: cinco localizadas en el bulbo y cuatro localizadas en el cuello (*TgRON*), con homólogos en *Plasmodium*, lo que sugiere que son conservadas y pueden estar involucradas en funciones comunes vitales para estos parásitos, como son la invasión o la creación de la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) [84]. Estos estudios fueron clave para el conocimiento de la composición molecular del TJ o MJ, y las interacciones presentes tanto en *T. gondii* como en *P. falciparum*.

En dos estudios simultáneos independientes, uno utilizando un anticuerpo monoclonal (T5 4H1) dirigido contra una fracción enriquecida de roptrias de *T. gondii*, y el segundo usando ensayos de inmunoprecipitación, se describe que las proteínas *TgRON2*, *TgRON4* y *TgRON5* se asocian con *TgAMA-1* en el MJ durante la invasión de taquizoítos de *T. gondii* a fibroblastos humanos [15, 144]. Posteriormente, se identificó a la proteína *TgRON8* como un integrante adicional del complejo *TgRONs-TgAMA-1*, que es indispensable para la invasión de taquizoítos [17, 145].

Las observaciones realizadas en diferentes estudios utilizando IFI, microscopía electrónica y permeabilización selectiva de membrana, llevaron a plantear un modelo en el cual se sugiere que una vez se inicia la invasión, las proteínas *TgRONs* del cuello de las roptrias, son liberadas al extremo apical del taquizoíto y se relocalizan en la superficie de la célula huésped, para formar la estructura similar a un anillo, junto a *TgAMA-1*, que ha sido translocada desde las micronemas (Figura 7) [109, 146]. El modelo propone (aunque no explica cuál es el mecanismo), que las proteínas RON son insertadas por el parásito directamente en la membrana de la célula huésped, sirviendo a su vez de receptor(es) para la proteína *TgAMA-1* (Figura 7). Se sugiere que como



*TgRON4* y *TgRON8* no contienen DTMs, son expuestas a la cara citoplasmática de la célula huésped, mientras que *TgRON5* y *TgRON2*, que contienen dominios transmembranales (DTMs), son expuestas sobre la cara exterior de la célula hospedera y, de esta forma, quedan disponibles para la interacción específica con AMA-1 (Figura 7). Adicionalmente, se encontró que la interacción AMA-1/RON2 fue resistente al tratamiento con detergente, lo que indica que estas dos proteínas interactúan fuertemente y son los componentes mínimos requeridos para la formación del complejo [109].



**Figura 7. Organización del MJ en *Toxoplasma gondii*.** Se observa una representación del modelo propuesto para el MJ. Las proteínas RON son secretadas en complejo hacia la célula hospedera, y actúan como receptor de AMA1, que ha sido secretada de las micronemas. En el recuadro, se observa con más detalle el modelo para la interacción RONs-AMA1 y la topología de las proteínas *TgRON2*, 4, 5 y 8. Figura tomada de [109].

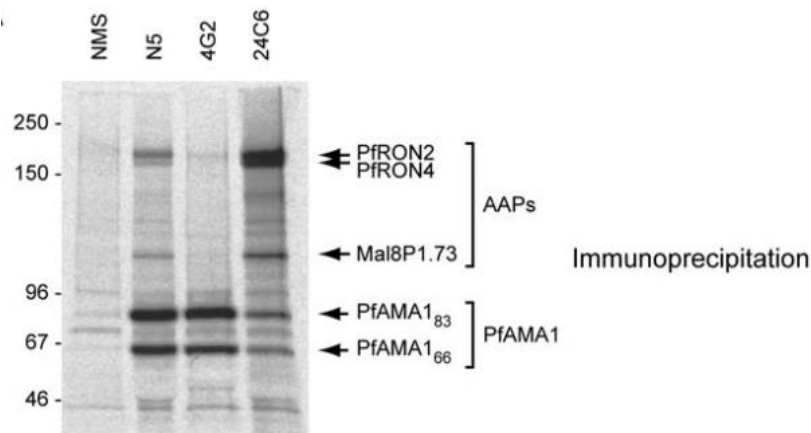
En *P. falciparum*, la interacción AMA-1/RONs ha sido confirmada experimentalmente mediante ensayos de inmunoprecipitación (Figura 8), lo que llevo a sugerir la existencia de un mecanismo conservado entre *P. falciparum* y *T. gondii* [20, 21, 23, 147], aunque con algunas diferencias: RON 8 está ausente en *P. falciparum* [17, 109]. Se han identificado y caracterizado las proteínas *PfRON2* (*Pf14\_0495*) [20] y *PfRON4* (*Pf11\_0168*), que es translocada a membrana de GR [21]; ellas se asocian específicamente a la proteína *PfAMA-1* y se localizan en el cuello de las roptrias. Otras proteínas tales como *PfRON1* [87], *PfRON3* [86], *PfRON6* [22], *PfRON12* [148] y la proteína apical del cuello de las roptrias (*PfARNP*, del inglés apical rhoptry neck protein) [149], identificadas recientemente, no hacen parte del complejo AMA-1/AAPs. Aunque se localizan en

el cuello de las roptrias y se han asociado con el MJ y con la invasión, las proteínas *PfRON1*, *PfRON6*, *PfRON12* y *PfARNP* no forman complejo con AMA-1 o con alguna otra RON. *PfRON3* se expresa en esquizontes tardíos, se localiza en el bulbo de las roptrias e interactúa con *PfRON2* y *PfRON4*, pero no con *PfAMA-1*, lo que sugiere que *PfRON3* participa en la formación de un nuevo complejo de proteínas RONS (RON2/RON3/RON4), previo a la formación del complejo AMA-1/AAPs [86]. *PfRON6* se localiza en el cuello de las roptrias, pero no se ha demostrado ninguna interacción con las proteínas del complejo del TJ [22] .

Diferentes estudios han mostrado que la interacción AMA-1/RON2 es crítica para la invasión [107, 108, 131, 150, 151], y que la región conservada carboxi-terminal comprendida entre los residuos V1295 a P1359 para *TgRON2*, y de M2020 a K2067 en *PfRON2*, es la que interactúa específicamente con el ectodominio de la proteína *TgAMA-1* y *PfAMA-1*, respectivamente [108, 150, 152]. La incubación de ambos parásitos con la región carboxi-terminal recombinante de RON2, disminuyó la eficiencia de la invasión, mostrando la relevancia funcional de esta interacción [108]. En *P. falciparum*, el anticuerpo 4G2, que reconoce una región conservada del dominio II de *PfAMA-1*, se une a AMA-1 libre, pero no es capaz de unirse al complejo AMA1/RONS, y como consecuencia, no inmunoprecipita ninguna proteína RON [23]. Se sugirió que el mecanismo de inhibición de la invasión mediado por este anticuerpo, estaría dado a través de cambios conformacionales en AMA-1 o un impedimento estérico que bloquea la interacción AMA-1/RONS [23, 123]. Posteriormente, estudios de estructura tridimensional, mostraron que la unión del anticuerpo 4G2 al bucle del dominio II de AMA-1, impide cambios conformacionales inducidos por la interacción AMA-1/RON2 [153].

Ensayos adicionales han mostrado la importancia de la interacción AMA-1/RON2: el péptido R1, que fue derivado de una librería de expresión, se une al canal hidrofóbico de *PfAMA-1*, inhibe la formación del complejo AMA-1/RONS e inhibe fuertemente la invasión de merozoítos a GR [147]. Sin embargo, la forma recombinante del extremo carboxi-terminal de *PfRON2* compite eficientemente con el péptido R1 en la unión sobre el ectodominio recombinante de AMA-1 [108].

Se sugirió que la semejanza funcional de estas dos moléculas podría explicarse por la similitud de en secuencia de R1 (VFAEFLPLFSKFGSRMHILK) con *PfRON2* (LFASIGPYLFAPMAGLAVWNILK), indicando que R1 podría estar imitando en parte, la interacción AMA-1/RON2 [150], lo que fue confirmado al determinarse la estructura cristalina de *PfAMA-1* en complejo con el péptido R1 [151]. Adicionalmente, se encontró que un péptido de *PfRON2* (residuos 2021-2059), derivado de la región de unión a AMA-1, se une a secuencias de AMA-1 derivadas de distintas cepas de *P. falciparum*, mientras que el péptido R1 solo se une a AMA-1 de las cepas D10 y 3D7 [151]. Consistente con estos datos, se encontró que *PfRON2* tiene alta capacidad para inhibir la invasión a GR por parásitos de diferentes cepas de *P. falciparum*, contrario a lo que ocurre con el péptido R1, que muestra una especificidad restringida [151].



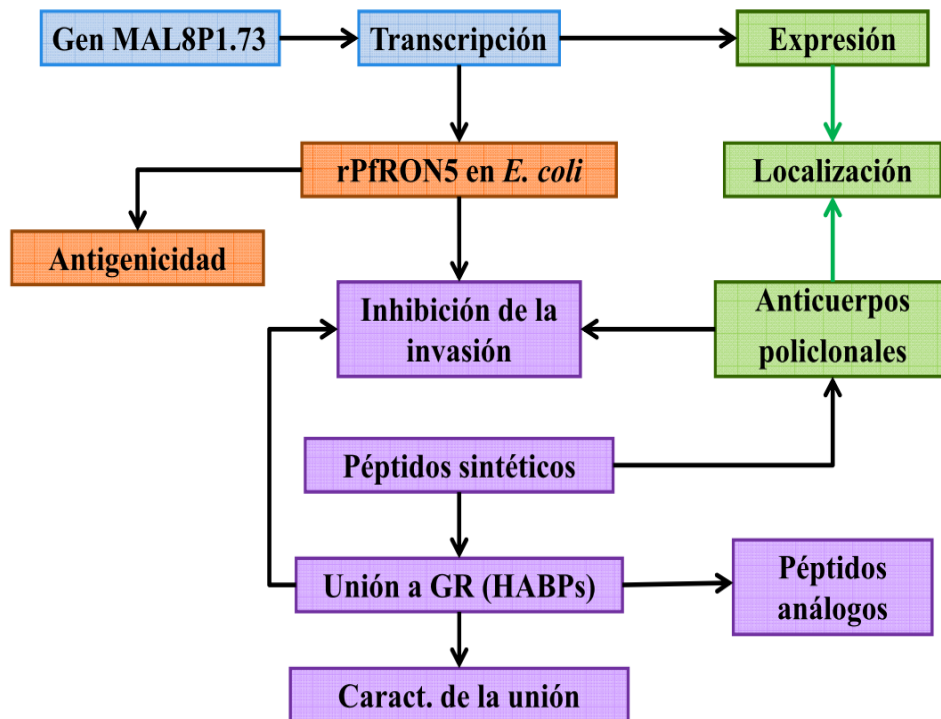
**Figura 8. Inmunoprecipitación de las proteínas *PfRON*.** Aunque ya se había reportado la interacción AMA-1/RON2/RON4 [20], en esta imagen tomada de: [23], se muestra por primera vez en *P. falciparum* la interacción AMA-1/RON2/RON4/Mal8P1.73 (RON5). La inmunoprecipitación de extracto de esquizontes marcados metabólicamente se hizo con suero de ratón sin inmunizar (NMS, del inglés non immunised serum), anticuerpo policlonal N5 anti-*PfAMA-1*, anticuerpo monoclonal 4G2 anti *PfAMA-1* y anticuerpo monoclonal 24C6 anti-*PfRON4*. Se observa que el anticuerpo 4G2 solo reconoce y precipita a *PfAMA1* libre, mientras que N5 reconoce AMA-1 y precipita las proteínas RONs, y 24C6 reconoce a RON4 y precipita a RON2, Mal8p1.73 (RON5) y AMA-1.

Finalmente, se reportó que el dominio rico en cisteínas del extremo carboxi-terminal (residuos 1857-2062) de *PfRON2* expresado sobre células COS-7, se une GR y que esta unión fue sensible al tratamiento de los GR con neuraminidasa y resistente a quimotripsina. Esta es la primera evidencia de una interacción directa entre RON2 y receptores sobre la célula huésped [152].

Recientemente, en un estudio encaminado a determinar la función de AMA-1 y RON4 en la invasión de parásitos Apicomplexa, se encontró que mientras AMA-1 no es esencial para la invasión de esporozoítos a su célula huésped, RON4 es requerida para la invasión de los esporozoítos a células hepáticas [154]. Estos datos indican que RON4 actúa independientemente de AMA-1 en esporozoítos de *P. berghei*. Por el contrario, AMA-1 juega un papel importante en merozoítos de *Plasmodium*, indicando que la maquinaria de invasión puede ser diferente en las dos fases del ciclo de vida del parásito. Cuando los autores evaluaron la función de AMA-1 en taquizoítos que tienen AMA-1 endógena inactivada y el gen *ama-1* controlado mediante el sistema tet, encontraron que los parásitos forman el TJ en ausencia de AMA-1. En el TJ se localiza RON4 y RON2, pero no AMA-1, contrario a lo reportado en estudios previos. Los autores proponen que AMA-1 puede estar involucrada en la unión eficiente de los parásitos a la célula huésped, y en el incremento de la frecuencia de la formación del TJ. Este estudio cuestiona la composición del TJ en los parásitos Apicomplexa, y reevalúa la función de AMA-1 en el TJ [154].

Se ha descrito que la proteína *PfRON5* (que correspondería al producto del gen MAL8P1.73) y su homóloga *TgRON5*, están asociadas a RON2 y RON4 en la formación del TJ [23], pero para el año 2009 (fecha de inicio de este trabajo), aún no había sido caracterizada en *P. falciparum*. Teniendo en cuenta la importancia que identificar y caracterizar nuevos antígenos representa en el conocimiento de la biología del parásito y en el desarrollo de métodos de control, en este trabajo se propuso identificar la proteína *PfRON5* en la cepa FCB-2 de *P. falciparum*, caracterizar de las regiones de unión a GRh y determinar su posible rol en la invasión de merozoítos a GRh.

## 6. Materiales y Métodos

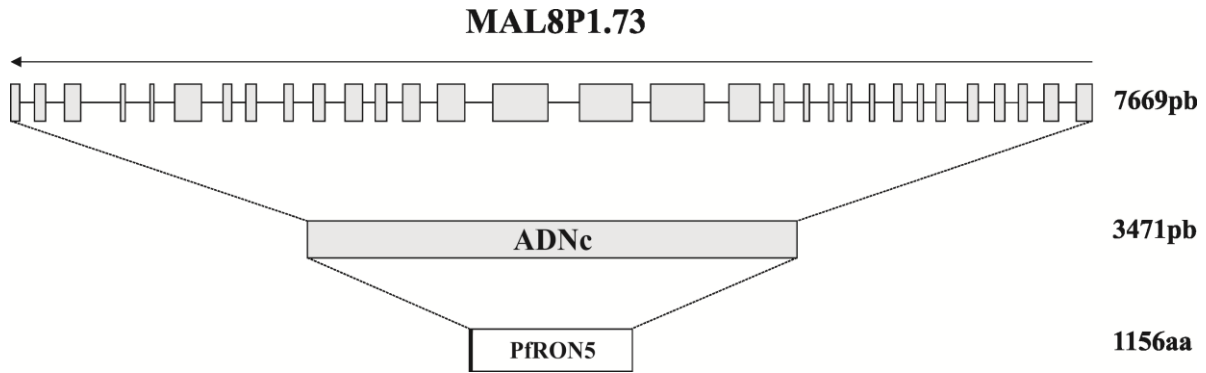


**Figura 9. Representación esquemática de la metodología propuesta.** Cada uno de los colores está asociado con un objetivo específico.

### 6.1. Identificación del gen MAL8P1.73 en la cepa FCB-2

#### 6.1.1. Búsqueda de genes homólogos y diseño de cebadores

Se había sugerido que la proteína *TgRON5* (Ts4705) tiene un homólogo hipotético en *P. falciparum*, correspondiente a la proteína con número de acceso gI23499117 [84]. El gen codificante en la cepa 3D7, de acuerdo a la base de datos PlasmoDB, es MAL8P1.73 (PF3D7\_0817700) y se localiza en el cromosoma 8 con una longitud de 7669pb. De acuerdo a lo reportado en esta base de datos, MAL8P1.73 se transcribiría en un ARN mensajero de 3471pb, codificando una proteína de 1156 aminoácidos. Los resultados del software Spidey [155] y los datos publicados en PlasmoDB, muestran que este gen está compuesto de 31 exones y 30 intrones (Figura 10 y Tabla 1).



**Figura 10. Organización del gen MAL8P1.73 en la cepa 3D7.** Se muestra la distribución de los 31 exones a lo largo de la secuencia de ADNg (7669pb), la secuencia transcrita predicha para el gen (3471pb) y el producto del gen que correspondería a una proteína de 1156 residuos. La flecha indica el sentido de la transcripción.

La búsqueda de secuencias homólogas al gen MAL8P1.73 por BLASTp, identificó homólogos en las siguientes especies de *Plasmodium* (códigos de la base de datos PlasmoDB): *P. vivax* cepa Sal-1 (PVX\_089530), *P. knowlesi* cepa H (PKH\_051420), *P. berghei* cepa ANKA (PBANKA\_071310), *P. yoelii* cepa 17XNL (PY02282), y *P. chabaudii* (PCHAS\_072220). Adicionalmente, se encontraron homólogos en otros géneros del filo Apicomplexa (códigos del NCBI): *Babesia bovis* (XP\_001611063.1), *Theileria annulata* (XP\_953613.1), *Theileria parva* cepa Muguga (XP\_766682.1), *Toxoplasma gondii* (ACY08774.1), y *Neospora caninum* (NCLIV\_055360, base de datos ToxoDB).

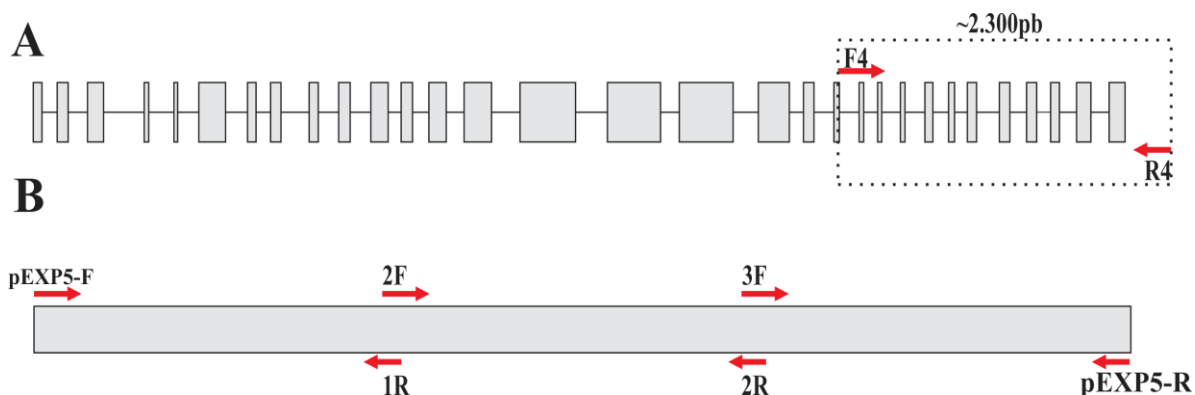
Los cebadores utilizados en todas las reacciones de PCR se diseñaron sobre la secuencia de ADNg y ADNc del gen MAL8P1.73 de la cepa de referencia 3D7, obtenida de la base de datos PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org>) [156]. Para su diseño, se utilizó el programa Gene Runner v3.05 y se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: tamaño del oligonucleótido (entre 18-25 nucleótidos), temperatura de fusión ( $T^{\circ}$  similares entre los cebadores) y alta especificidad, es decir, secuencia única en el ADN molde y única entre diferentes organismos, para lo cual se realizó un análisis con la herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Finalmente, se descartó que los cebadores seleccionados formaran estructuras secundarias que puedan interferir con la hibridación al molde.

**Tabla 1. Organización de los exones en el gen MAL8P1.73.**

| <b>Gen MAL8P1.73 (<i>Pf</i>RON5)</b> |                 |                 |                      |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| <b>Exón No.</b>                      | <b>ADN (pb)</b> | <b>ARN (pb)</b> | <b>Longitud (pb)</b> |
| 1                                    | 1-60            | 1-60            | 60                   |
| 2                                    | 168-245         | 61-138          | 78                   |
| 3                                    | 381-494         | 139-252         | 114                  |
| 4                                    | 779-811         | 253-285         | 33                   |
| 5                                    | 988-1014        | 286-312         | 27                   |
| 6                                    | 1163-1351       | 313-501         | 189                  |
| 7                                    | 1505-1564       | 502-561         | 60                   |
| 8                                    | 1666-1740       | 562-636         | 75                   |
| 9                                    | 1938-2003       | 637-702         | 66                   |
| 10                                   | 2146-2226       | 703-783         | 81                   |
| 11                                   | 2371-2493       | 784-906         | 123                  |
| 12                                   | 2584-2664       | 907-987         | 81                   |
| 13                                   | 2779-2901       | 988-1110        | 123                  |
| 14                                   | 3026-3219       | 1111-1304       | 194                  |
| 15                                   | 3419-3809       | 1305-1694       | 390                  |
| 16                                   | 4033-4407       | 1695-2069       | 375                  |
| 17                                   | 4539-4916       | 2070-2447       | 378                  |
| 18                                   | 5093-5311       | 2448-2666       | 219                  |
| 19                                   | 5410-5484       | 2667-2741       | 75                   |
| 20                                   | 5624-5662       | 2742-2780       | 39                   |
| 21                                   | 5801-5833       | 2781-2813       | 33                   |
| 22                                   | 5931-5960       | 2814-2843       | 30                   |
| 23                                   | 6091-6123       | 2844-2876       | 33                   |
| 24                                   | 6263-6319       | 2877-2933       | 57                   |
| 25                                   | 6427-6471       | 2934-2978       | 45                   |
| 26                                   | 6561-6626       | 2979-3044       | 66                   |
| 27                                   | 6786-6860       | 3045-3119       | 75                   |
| 28                                   | 6977-7048       | 3120-3191       | 72                   |
| 29                                   | 7146-7208       | 3192-3254       | 63                   |
| 30                                   | 7328-7429       | 3255-3356       | 102                  |
| 31                                   | 7557-7669       | 3357-3468       | 112                  |

Para la amplificación de una región del ADNg de la cepa FCB-2, se utilizaron los cebadores: **F4** 5'-CAT ATC TAT AAA AGT TGG AGG-3' y **R4** 5'- CAA ATA ATA AAA GAA AAT GTA G-3' que amplifican un fragmento de ~2300 pares de bases (pb) que incluye 2100pb del extremo 3' del gen y ~270pb de región extragénica (Figura. 11). Como control, se amplificó una región de 2377pb del gen *Pfron2* utilizando los cebadores: *PfRON2-F3* 5'-CGAATGACAGTATGCTAAATG-3' y *PfRON2-R3*: 5'-ATTAACATAGATGTAGAATTAGC-3'.

Para amplificar el gen completo MAL8P1.73 (~3468pb) a partir de ADNc de las cepas FCB-2 y PAS-2, se diseñaron los cebadores pEXP5-F: 5'-ATG TTG AAA TAC ACT TTG CTC AT-3' y pEXP5-R: 5'-AGG TAT TCT AGT GTG TAC AAT AA-3'. Para obtener la secuencia completa del gen a partir de ADNc se utilizaron los cebadores T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3 y pEXP5-CT-Sec-rev: 5'- CAA GGG GTT ATG CTA GTT AT -3' del vector de expresión pEXP5-CT/TOPO y se diseñaron cuatro cebadores internos denominados: 1R 5'-TAA AAC GAC ATC AGC ACT AG-3', 2F 5'-TCA AAA ACG GCA CAA AGA AG-3', 2R 5'-TAT CAA CGG CAA TTC TTA AAA T-3' y 3F 5'-ACA AAG ATA AGT ATA AGA AAA C-3' (Figura 11).



**Figura 11. Representación esquemática de los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de ADNg y ADNc del gen MAL8P1.73.** A) Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento de ~2300pb del gen MAL8P1.73 a partir de ADNg. B) Cebadores utilizados (pEXP5-F y pEXP5-R) para la amplificación completa (~3468pb) del gen MAL8P1.73 de ADNc. Los cebadores 2F, 3F, 1R y 2R se usaron para obtener la secuencia completa del gen.



Para la amplificación y posterior expresión de dos fragmentos del gen MAL8P1.73, denominados F1, que cubre desde el nucleótido 64 al 918 (aminoácidos 21-306) y F4, que cubre desde el nucleótido 2629 hasta el final del gen (residuos 877-1155), se diseñaron dos sets de cebadores: F1 Directo 5'-ATG AAA CTT TTC GAT ACA CTT CTT C-3', F1 Reverso 5'-TAA TAG TGT TCC CTT TTG AAT C-3' y F4 Directo 5'-ATG AGA GAA CTC GAG AGA ACC C-3', F4 Reverso 5'-AGG TAT TCT AGT GTG TAC AAT A-3'.

### **6.1.2. Extracción de ácidos nucleicos de *Plasmodium falciparum* y síntesis de ADNc**

Parásitos sincronizados de *P. falciparum* de la cepa FCB-2 fueron cultivados *in vitro* utilizando las técnicas previamente descritas [67]. El ADN genómico (ADNg) fue extraído mediante el kit de purificación Wizard<sup>®</sup> Genomic ADN Purification (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. La sangre total infectada se trató con una solución de lisis celular, seguido del tratamiento con una solución de lisis nuclear que permite la liberación del material genético. Posteriormente, el lisado celular se trató con solución de precipitación de proteínas, que separa las proteínas de los ácidos nucleicos. Finalmente, el sobrenadante se incubó con isopropanol para precipitar el ADN. La integridad del ADNg extraído, se verificó mediante gel de agarosa al 1% en TAE (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,002M, pH 8,5). Para visualizar el ADN, se utilizó SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen), que se intercala entre las bases de ADN y permite su visualización con luz ultravioleta.

El ARN total de las cepas FCB-2 y PAS-2 se extrajo utilizando el método de Trizol [157] y tratamiento con RQ1 ADNasa libre de ARNasa. El trizol es una solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol, que mantiene la integridad del ARN mientras los componentes celulares son disueltos. La muestra de parásito se mezcló con la solución de trizol y se incubó durante 24h a -70°C. Posteriormente, se adicionó cloroformo y se centrifugó a 12000 × g. La adición de cloroformo, seguido por la centrifugación, permite la separación de la solución dentro de una fase orgánica y una acuosa donde permanece el ARN. La fase acuosa se transfirió a un tubo y el ARN se precipitó utilizando alcohol isopropílico. El ARN precipitado se lavó con etanol al 70% y por último el ARN se disolvió en agua libre de ARNasas y se almacenó a -70°C.

Para la síntesis de ADN copia (ADNc), se tomaron 3µL de ARN total tratado con ADNasa y se utilizó la enzima SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de secuencia aleatoria, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADNc se sintetizó en un volumen final de 20µL con un ciclo inicial de 5min a 65°C, seguido de un ciclo de 60min a 50°C y finalmente un ciclo de 15min a 70°C. Para remover el molde de ARN, se adicionó 1µL de ARNasa H y se incubó durante 20min a 37°C. La transcriptasa utilizada para la síntesis, es una versión de la enzima del Virus de la Leucemia Moloney (M-MLV) producto del gen *pol*, que ha sido modificada para reducir la actividad ARNasa H y presenta mayor estabilidad térmica. Los cebadores de secuencia aleatoria son oligonucleótidos de seis bases sintetizados al azar y tienen el potencial de reconocer muchos puntos en una secuencia de ADN y actúan como cebadores para la síntesis de ADNc grandes.

### **6.1.3. Amplificación y clonación del gen MAL8P1.73**

La amplificación por PCR de la región de ~2400pb del gen MAL8P1.73 a partir de ADNg, se hizo con la enzima KAPA HiFi™ HotStart (KAPA BIOSYSTEMS) en un volumen final de reacción de 25µL que contenían 12,5µL de 2x KAPA HiFi Ready Mix, 1,5µL de cada cebador (F4 y R4) a una concentración de 5µM y 7,5µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 5min a 95°C seguido de 35 ciclos de 20seg a 98°C, 15s a 54°C y 2,5min a 72°C y finalmente un ciclo de 5min a 72°C.

Para la amplificación del ADNc del gen MAL8P1.73 de las cepas FCB-2 y PAS-2, se utilizó la enzima de alta fidelidad TAQXpedite™ (EPICENTRE Biotechnologies) en un volumen final de 25µL, que contenía 12,5µL de TAQXpedite PCR master Mix, 2,5µL de cada cebador (pEXP5-F y pEXP5-R) a una concentración de 5µM y 6,5µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C por 30s seguido de 40 ciclos de 95°C por 10s, 60°C por 10s y un ciclo final de 72°C por 2min.

Para la reacción de PCR de los fragmentos F1 y F4, se utilizó un volumen final 21µL que contenía: buffer de reacción Green GoTaq Flexi 5X, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTP 1,25mM, 0,5µM de cada cebador y 0,3 U de la enzima Go Taq Hot Start (Promega). La PCR inició con un paso de denaturación de 94°C por 5min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 20s y 72°C por 1min. Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%

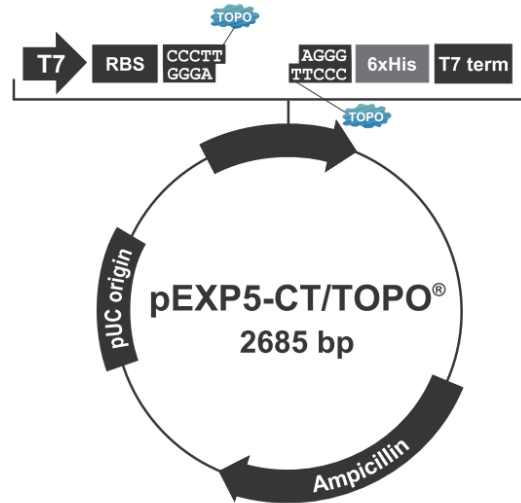
en buffer Tris acetato-EDTA (TAE que contiene 4,84gr/L de Tris-Base pH 8,5, 0,74gr/L de Na<sub>2</sub>EDTA y 1,14mL de ácido acético glacial) y el ADN se tiñó con SYBR Safe (Invitrogen). Para determinar el peso molecular de cada amplicón, se utilizó un patrón de peso molecular de 200pb a 10kb o de 500pb a 5kb.

Una vez evaluada la calidad de los amplicones, se purificaron mediante el kit Wizard PCR preps (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregan 5 volúmenes de solución salina tamponada al producto de PCR, con el fin de mantenerlo en un rango de pH entre 6-7,5 para la eliminación de los cebadores. Luego, esta mezcla se transfirió a un filtro donde el ADN queda adherido a la membrana del filtro, y se eliminan los componentes de la reacción de PCR como dNTPs y enzima. Posteriormente, se agregó una solución de lavado a base de etanol para eliminar rastros de contaminantes y se centrifugó. Por último, se adicionó buffer Tris 10mM para eluir el ADN.

Teniendo en cuenta que el ADNc total del gen MAL8P1.73 se amplificó con una enzima de alta fidelidad, el producto purificado se sometió a una reacción adicional para la adición de una adenina en sus extremos 3', y así permitir la clonación TOPO TA en el vector pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen) (Figura 12). Para esto, se utilizó la enzima BIOLASE™ (BIOLINE) que adiciona una adenina en los extremos 3' de la molécula de ADN de doble hebra independientemente del templado. La reacción con volumen final de 10µL que contenía 4µL de producto de PCR purificado, 1µL de buffer 10X, 0,5µL de MgCl<sub>2</sub>, 2µL de dATP y 1µL de Taq polimerasa, se incubó durante 45min a 70°C en un termociclador.

Finalmente, los productos de PCR purificados de los fragmentos F1, F4 y el ADNc (3400pb) se ligaron independientemente en el vector de expresión pEXP5-CT/TOPO mediante clonación TOPO TA. Brevemente, se utilizaron 4µL de cada producto de PCR purificado y se mezclaron con 0,5µL de plásmido junto con 0,5µL de agua libre de nucleasas y 1µL de solución salina en un volumen de reacción final de 6µL. La reacción se incubó durante 45min a temperatura ambiente (TA). Con el fin de obtener varias copias del constructo que contuviesen la región codificante del fragmento de interés, la reacción de ligación se utilizó para transformar células de *Escherichia coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen), según las especificaciones del

fabricante. Para este fin, 2µL de reacción de ligación se mezclaron con 100µL de células TOP10 y la reacción se incubó durante 20min en hielo y posteriormente se indujo choque térmico a 42°C durante 2min seguido de 5min en hielo.



**Figura 12. Mapa del vector pEXP5-CT/TOPO® TA (Invitrogen).** Se observa la organización del vector vector pEXP5-CT/TOPO® TA. Se observa el gen que confiere la resistencia a ampicilina (Ampicillin), la región donde queda inserto el producto de PCR de interés (entre los extremos donde actúa la topoisomerasa (TOPO)), el promotor T7, el sitio de unión del ribosoma (RBS), la región de poli-histidinas (6xHis) y el origen de replicación (pUC origin). La secuencia completa del vector está disponible en sitio web [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

Posteriormente, se adicionaron 250µL de medio S.O.C (2g de triptona, 0,5g de extracto de levadura, 0,05g de NaCl, 0,05g de MgCl<sub>2</sub> y 0,05g de MgSO<sub>4</sub> en 100mL) y se incubó durante una hora a 37°C en agitación constante. 80µL de la reacción se extendió en cajas de agar Luria Bertani (LB) (10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura, 10g/L NaCl, 1,5% p/v de agar) que contenía ampicilina (100µg/L) como marcador de selección y posteriormente se incubaron durante 16h a 37°C. Se hicieron PCRs de colonia para evaluar la presencia del plásmido recombinante en las colonias que crecieron blancas puntiformes. Para el ADNc se hicieron dos PCRs, en la primera se utilizaron los cebadores **T7** y **1R**, que anillan en el vector de expresión y en el producto de PCR, respectivamente y amplifican una región de ~1263pb. En la segunda PCR, se utilizaron los cebadores pEXP5-CT-Sec-rev y **3F** que anillan en el vector de expresión y en el producto de PCR, respectivamente, y amplifican una región de ~1338pb. Las condiciones de amplificación se basaron en un ciclo inicial de 5min a 95°C, seguido de 25 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 54°C y 3min a 72°C y finalmente un ciclo de 10min a 72°C.

Para los fragmentos F1 y F4, se utilizaron los cebadores T7 y el reverso correspondiente a cada fragmento. Las condiciones de PCR para el fragmento F1 fueron: temperatura de denaturación: 95°C por 10min, seguido de 25 ciclos de 95°C por 1min, 54°C por 1min y 72°C por 2min, y un ciclo de 72°C por 10min; para el fragmento F4, una temperatura de denaturación de 95°C por 10min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30s, 52°C por 20s y 72°C por 1min y un ciclo de 72°C por 10min. Luego, cada colonia que contenía el plásmido recombinante de interés, se creció en medio líquido LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina y se dejó toda la noche en agitación constante a 37°C. Seguido a ello, los plásmidos se purificaron usando el kit de purificación UltraClean mini plasmid prep (MO BIO Laboratories). Brevemente, las bacterias se re-suspendieron y homogenizaron en un pequeño volumen de buffer (solución I) que contenía ARNasa. Posteriormente, se adicionaron 100µL de la solución II (pH 12) que contenía SDS y ayuda a la lisis bacteriana en un ambiente alcalino. Para neutralizar, se adicionó la solución III, que contiene sales que se precipitan cuando interactúan con el SDS y neutralizan el pH alcalino. Esta solución se centrifugó a  $16000 \times g$  y se tomó el sobrenadante, donde se encontraba el ADN plasmídico (ADNp) y se transfirió a un filtro. Luego, se adicionó una solución con etanol para limpiar del ADN de impurezas y por último se adicionó una solución con 10mM de Tris, para eluir de ADNp del filtro.

Los plásmidos recombinantes que contenían los fragmentos F1 y F4 se sometieron a una confirmación adicional mediante restricción enzimática. Para el fragmento F1, se utilizaron las enzimas XbaI y EcoRI, y para el fragmento F4, se utilizaron las enzimas HincII y XhoI. Cada reacción se hizo en un volumen final de 15µL que contenía 10µL de ADNp, 1,5µL de buffer para la enzima de restricción específica, 1µL de albúmina sérica bovina (BSA), 5U de cada enzima de restricción y 1µL de agua libre de nucleasas. Cada reacción se incubó durante 6h a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima por incubación durante 20min a 65°C. Los productos se visualizaron en geles de agarosa como se describió arriba.

#### **6.1.4. Determinación de la secuencia y polimorfismo del gen MAL8P1.73**

Una vez verificadas las colonias por PCR de colonia y restricción enzimática, se extrajo ADNp de tres colonias (provenientes de PCRs independientes). Cada ADNp se envió a secuenciar a MacroGen Inc (Seúl, Corea). Como se mencionó previamente, el ADNc del gen MAL8P1.73 de

las cepas FCB-2 y PAS-2 se secuenciaron usando los cebadores T7, pEXP5-CT-Sec-rev, 1R, 2F, 2R y 3F (Figura 11). Para los dos fragmentos (F1 y F4), se utilizaron los cebadores T7 y pEXP5-CT-Sec-rev. Una vez obtenidas las secuencias, cada electroferograma se analizó con el programa CLC DNA Workbench (CLC bio).

### 6.1.5. Análisis de la secuencia de P $\beta$ RON5 de la cepa FCB-2

Los datos de la secuencia primaria del gen MAL8P1.73 y los perfiles de expresión fueron obtenidos de <http://www.plasmodb.org>. Las secuencias señal putativas fueron evaluadas con las herramientas bioinformáticas Polyphobius e InterProScan [158, 159] y la búsqueda de dominios transmembranales (DTMs) se realizó con los predictores: Phobius, Tmpred, TMHMM, ConpredII y Polyphobius [158, 160-163]. La búsqueda de motivos y dominios se hizo en InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) y en la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Los alineamientos de las secuencias de ADN y proteína se realizaron con la herramienta Clustal W [164] y el grado de similitud entre cada secuencia encontrada y P $\beta$ RON5 con el software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>).

## 6.2. Evaluación de la expresión de la proteína P $\beta$ RON5

### 6.2.1. Selección y síntesis de los péptidos a inocular

Con el fin de obtener anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína P $\beta$ RON5, la secuencia de aminoácidos se tomó como plantilla para la selección de péptidos epítopes B-lineales. Para esto, se tuvieron en cuenta tres parámetros: 1) altos puntajes de antigenicidad, hidrofiliidad y accesibilidad al solvente obtenidos con el programa ANTHERPROT [165], 2) valores altos obtenidos con la herramienta BepiPred [166], y 3) que los péptidos se localizasen a lo largo de toda la proteína, para poder tener anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de la proteína, en caso que ésta sufriese un procesamiento proteolítico. Se seleccionaron tres péptidos de 20 aminoácidos de longitud, nombrados de acuerdo a nuestro sistema serial de numeración: 36924 (CG<sup>33</sup>FKKPKPFFKKNEIKKGIDKDE<sup>52</sup>GC), 36923 (CG<sup>348</sup>ADYDLSEYKNEFSPSKTAQR<sup>367</sup>GC) y 36926 (CG<sup>776</sup>RCDHFNRSKNIDNVKTKKNK<sup>795</sup>GC). Cada uno de los péptidos se sintetizó mediante síntesis múltiple en fase sólida t-Boc/Bzl [167, 168], y se analizaron por cromatografía líquida de

alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF. A cada péptido se le adicionaron residuos de glicina y cisteína en la región N y C terminal para permitir la polimerización [169].

### **6.2.2. Obtención de anticuerpos policlonales**

Dos conejos Nueva Zelanda (69 y 73) no reactivos por Western blot frente a lisado de *P. falciparum* fueron inoculados (día 0) intramuscularmente con la mezcla de los tres péptidos poliméricos que contenía 250µg de cada péptido, emulsificados en adyuvante completo de Freund (ACF). Los conejos recibieron dos dosis adicionales del inóculo, emulsificado en adyuvante incompleto de Freund (AIF) los días 20 y 40. Los animales se sangraron en el día 60 y los sueros colectados fueron almacenados a -20°C.

Para eliminar anticuerpos inespecíficos, cada suero se adsorbió en tres diferentes columnas de sefarosa acopladas con sonicado de *E. coli*, lisado de GR de conejo o péptido sintético SPf66 [4]. Para la preparación del lisado de *E. coli*, se creció un inóculo de la cepa DH5α durante toda la noche en medio LB. Al día siguiente, se obtuvieron las bacterias por centrifugación, se re-suspendieron en un coctel que contenía pepstatina, leupeptina, ARNasa, ADNasa, lisozima y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, del inglés phenylmethanesulfonyl fluoride), y se incubaron en agitación por 25 min a 37°C; posteriormente, se sonicaron por 3 min (80% de amplitud), se centrifugó y el sobrenadante fue resuspendido en buffer de acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 1,0M y NaCl 0,5M pH 8,3). Los GR obtenidos de conejos sanos se lisaron con saponina al 0,2% (Sigma) y se re-suspendieron en buffer de acoplamiento.

El sonicado de *E. coli*, el lisado de GR de conejo y el péptido sintético SPf66 [4, 170] se acoplaron de manera individual a columnas de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (Amersham Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se disolvió el ligando (sonicado, lisado o péptido) en buffer de acoplamiento, teniendo en cuenta que por 1mL de columna se necesitan 3,5 mg de proteína. Se adicionó esta solución a la resina activada previamente con HCl 1mM y se dejó toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, se hicieron lavados con buffer de acoplamiento, se adicionó buffer de bloqueo (Tris-HCl 0,1M

pH 8), y se dejó en agitación 2h a TA. Se hicieron 5 lavados alternando soluciones de pH: pH 4 (CH<sub>3</sub>COONa 0,1M, NaCl 0,5M) y pH 8 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5M).

### **6.2.3. Inmunogenicidad de los péptidos inoculados**

Para determinar la inmunogenicidad de los péptidos inoculados en conejo, se hizo un ensayo de ELISA. Para esto, 1) las placas de ELISA fueron recubiertas con 10 µg/mL de cada uno de los péptidos inoculados (36924, 36923 y 36926) y se incubaron a 37°C por 1h, toda la noche a 4°C, y de nuevo a 37°C por 1h. 2) Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se incubaron con 0,5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% por 1h a TA. 3) Los sueros (69 y 73) fueron adicionados a la placa por duplicado en una dilución 1:100, se incubó por 1h a 37°C y se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% para remover el exceso de anticuerpo no unido a los péptidos. 4) Se adicionó un anticuerpo tipo IgG de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories) diluido 1:5000 y se incubó 1h a 37°C, se realizaron de nuevo 5 lavados. 5) Se reveló con el kit TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL Laboratories) y se leyó la absorbancia de la placa a 620nm en un lector de ELISA (Lab Systems Multiskan MS).

### **6.2.4. Reconocimiento de la proteína PFRON5**

A partir de un cultivo *in vitro* de *P. falciparum* de la cepa FCB-2 sincronizado con sorbitol, se obtuvieron GR infectados con parásitos en cada uno de los estadios: anillos (4–8 h), trofozoítos jóvenes (19–24 h), trofozoítos maduros (26–31 h), esquizontes (42–47 h) y merozoítos libres (Mz). Los GR infectados se lavaron con PBS y se lisaron con saponina al 0,2% (Sigma). Después de 5 lavados con PBS, los parásitos se trataron con solución de lisis PMSF 100mM, SDS al 20%, EDTA 0,5M pH 8,3 y iodoacetamida 100mM), se centrifugó y se recuperaron las proteínas para análisis por Western blot (WB).

#### **6.2.4.1. Ensayo de Western blot**

Las proteínas de cada uno de los extractos de los diferentes estadios intraeritrocíticos del parásito se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 8% bajo condiciones denaturantes, con un voltaje constante de 120V. A cada gel se le adicionó 2mg de proteína cuantificada por el método de ácido bicinonínico (BCA, del inglés bicinchoninic acid) con el kit micro-BCA (Thermo Scientific). Las proteínas resueltas en los geles se transfirieron a



una membrana de nitrocelulosa y posteriormente la membrana se lavó y se bloqueó con leche descremada al 5% en buffer salino Tris (TBS)-Tween al 0,05%. Se cortaron tiras de 3mm de ancho y cada tira se incubó durante 1h con los sueros preinmunes e inmunes (pre-adsorbidos) de cada conejo (69 o 73) en una dilución 1/40 en solución bloqueadora TBS-Tween. Luego de 3 lavados con TBS-Tween 0,05%, las tiras se incubaron por 1h con un anticuerpo tipo inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-conejo acoplado a fosfatasa (1:5000). La membrana se reveló con el kit comercial NBT/BCIP (Promega). Marcadores de peso molecular (NEB) fueron utilizados para calcular el peso molecular de las proteínas reconocidas.

La especificidad del reconocimiento de los sueros de los conejos por la proteína de interés, se determinó en un ensayo similar al anterior, excepto que los sueros hiperinmunes fueron incubados con la mezcla de los péptidos inoculados (400 $\mu$ M) por 1 h a 37°C, antes de ser incubados con las tiras de nitrocelulosa.

#### **6.2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Extendidos de sangre infectada con la cepa FCB-2 de *P. falciparum* (parasitemia final 5-7%), se fijaron con 4% de formaldehído por 10min en un frasco Coplin seguido de 3 lavados con PBS filtrado. Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% por 5min a TA, se lavaron 2 veces con PBS filtrado y se bloquearon por 30min con PBS-BSA al 1% a 37°C. Las láminas se lavaron 3 veces con PBS filtrado y se incubaron con 300 $\mu$ L de suero policlonal anti-*Pf*RON5 como anticuerpo primario a una dilución de 1/20 durante 1h, seguido de tres lavados con PBS. Como anticuerpo secundario, se utilizó anticuerpo anti-conejo marcado con fluoresceína (FITC, del inglés fluorescein isothiocyanate) (Vector Laboratories) por 1h seguido de tres lavados con PBS filtrado. Por último, se tiñeron los núcleos del parásito con una solución de 2 $\mu$ g/mL de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, del inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) por 20min a TA. Las láminas se lavaron una vez con PBS-Tween al 0,05% y dos veces con PBS filtrado. Las láminas se secaron en un cuarto oscuro y se adicionó 50 $\mu$ L de glicerol/solución salina (1:1), se sellaron con una laminilla y se observaron al microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes se tomaron con una cámara Olympus DP2 y se realizó la sobreposición de las imágenes con el software Volocity (Perkin Elmer).

Para los estudios de colocalización, se utilizaron sueros de monos *Aotus* inoculados con los péptidos modificados 24148 (derivado del HABP 5501 de la proteína MSP-1) [171, 172], el péptido 36340 (derivado del HABP 33460 de la proteína RAMA) [173] y el péptido 38556 (derivado del HABP 37742 de la proteína *Pf*RON5-secciones 6.4.4. y 7.5.3.). Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-*Aotus* acoplado a Rodamina.

## **6.2.5. Localización subcelular de la proteína *Pf*RON5**

### **6.2.5.1. Inmunomicroscopía electrónica**

Esquizontes de *P. falciparum* provenientes de la cepa FCB-2 se fijaron por 2h a 4°C con una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5% en PBS. Luego, se hicieron dos lavados con PBS por centrifugación a 2500 × g durante 5min. El pellet se deshidrató mediante inmersión en etanol a diferentes concentraciones: 50%, 70%, 90% y 100%, durante 15min cada una a TA. En cada paso de la deshidratación, las muestras se centrifugaron a 2500 × g por 5min y la inmersión en etanol al 100% se realizó dos veces. La inclusión del parásito se llevó a cabo en resina LR-White de manera gradual utilizando primero etanol al 100% y resina LR-White en relación 1:1, luego en relación 2:1 y finalmente resina pura. En cada uno de estos pasos se incubó por 18h a TA [20]. Luego de la polimerización en frío de la resina (1μL de acelerador/500μL de resina por 20min), se hicieron cortes ultrafinos de 80nm de grosor [22] y se montaron sobre rejillas de níquel (300mesh) cubiertas con membranas de soporte de colodión. Para el inmunomarcaje, las rejillas se bloquearon con PBS-leche descremada al 5%-Tween 20 al 0,01% a 37°C durante 30min, seguido de tres lavados de PBS-BSA 1%-Tween 20 al 0,01%. Luego, se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-péptidos de *Pf*RON5 a 4°C durante toda la noche, seguido de tres lavados bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente, las rejillas se incubaron con anticuerpo anti-conejo conjugado con oro coloidal (10nm, Aurion) en dilución 1:50 en solución de bloqueo por una hora a 37°C. Se realizaron de nuevo tres lavados y se fijó sobre hielo por 10 min en glutaraldehído al 2,5%. Por último, se realizaron lavados con agua destilada, y se tiñó con acetato de uranilo al 5% en agua destilada durante 5min [20]. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi Hu-12A.

### 6.3. Obtención de las proteínas rPfRON5F1 y rPfRON5F4

Una vez analizadas las secuencias de cada uno de los ADNp de los fragmentos F1 y F4 (sección 6.1.4), se seleccionó un clon de cada fragmento y se purificó el ADNp para la transformación de las células BL21-AI (Invitrogen). Brevemente, 100µL de células BL21-AI se mezclaron con 5µL del plásmido pEXP5-rPfRON5F1 y se incubaron durante 20min en hielo; luego, se indujo choque térmico a 42°C durante 30s seguido de 5min en hielo. Para la selección de las bacterias recombinantes, la reacción se plaqueó en cajas de agar LB que contenían ampicilina. Las colonias blancas puntiformes, se repicaron en cajas con medio Luria Bertani (LB) que contenía L-arabinosa (0,2%) para inducir la expresión de la proteína y ampicilina (100 µg/mL); se incubaron a 37°C por 4h y posteriormente una muestra de la colonia se transfirió a membrana de nitrocelulosa y ésta se incubó por 10min sobre un papel de filtro humedecido con una solución de SDS al 10%.

A continuación, la membrana se incubó con varios papeles de filtro humedecidos con los diferentes buffers: 5min con buffer denaturante (1,5M de NaCl y 0,5M de NaOH), seguido de 5min de incubación con buffer neutralizante (1,5M de NaCl y 0,5M Tris HCl), y finalmente 5min con PBS filtrado. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0,05% por 5min cada uno y se bloqueó con leche en PBS-Tween al 0,05% por 1h. Después de 3 lavados con PBS-Tween al 0,05%, la membrana se incubó con anticuerpo monoclonal antihistidina acoplado a peroxidasa (1:4,500) en una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 0,05% durante 1h a TA. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0,05%, el dot blot fue revelado con el kit de substrato peroxidasa VIP (Vector Laboratories) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Un clon recombinante (positivo por dot-blot) fue cultivado en agitación constante (~300 rpm) a 37°C durante 12h en medio líquido Terrific Broth (TB) (12g/L de triptona, 24g/L de extracto de levadura, 4mL/L de glicerol, 2,31g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 12,54g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) suplementado con 0,1mg/mL de ampicilina y 0,2% de glucosa. Este cultivo se usó para inocular 950mL de medio líquido TB suplementado con 100µg/mL de ampicilina y 0,2% de glucosa y se incubó a 37°C hasta alcanzar densidad óptica entre 0,4-0,6 a 620nm. La expresión del fragmento rPfRON5F1 se indujo con L-arabinosa al 0,2% durante 4h a 37°C en agitación constante y el tiempo óptimo de expresión se evaluó por WB cada hora durante 4h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a

16000 × g durante 30min y la proteína recombinante se solubilizó en buffer de extracción denaturante (urea 6M, imidazol 15mM, Tris-Cl 10mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM y 10mg/mL de lisozima) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, iodoacetamida 1mM, EDTA 1mM y 1mg/mL de leupeptina), seguido por disrupción celular utilizando un sonicador Branson digital. Finalmente, la solución se centrifugó a 21000 × g durante 20min a 4°C y el sobrenadante claro se utilizó para verificar la expresión de la proteína por WB. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad usando resina de Ni<sup>+2</sup>-NTA (Qiagen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el sobrenadante se incubó con la resina Ni<sup>+2</sup>-NTA durante toda la noche a 4°C en agitación constante. La solución resina-proteínas se transfirió a una columna y se lavó exhaustivamente con buffer denaturante hasta eliminar todas las proteínas no retenidas en la resina. Las proteínas rPfRONF1 y rPfRONF4 se eluyeron con imidazol en gradiente de concentración (50mM, 65mM, 80mM, 100mM, 250mM y 500mM) en buffer denaturante. Los componentes de cada fracción fueron separados por SDS-PAGE y analizados por tinción de azul de Coomassie y WB. Las fracciones que contenían la proteína recombinante se dializaron exhaustivamente frente a PBS pH 7,0 para eliminar la urea y renaturar las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes dializadas se concentraron usando acetona fría en una relación 3:1 y se incubó toda la noche a 4°C. La solución se centrifugó a 16000 × g por 20min y se homogenizó en PBS. Finalmente, las proteínas se cuantificaron mediante el método micro-BCA, usando como patrón de referencia BSA. Para la detección de las proteínas en las diferentes muestras (antes y después de la inducción y las fracciones de purificación), los geles se incubaron durante 20min en agitación constante con una solución de tinte que contenía metanol al 50%, ácido acético al 10% y azul de Coomassie al 0,2%. Posteriormente, los geles se incubaron con solución decolorante (30% de metanol y 10% de ácido acético) y se analizó cada una de las muestras.

Para el WB, se utilizó el anticuerpo monoclonal antihistidinas acoplado a peroxidasa (1:4,500) (Sigma) en leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0,05% durante 1h a TA. Se reveló con el kit de substrato peroxidasa VIP (Vector Laboratories) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### **6.3.1. Unión de rPfRON5F1 y rPfRON5F4 a GRh**

Para determinar si las proteínas se unen a GRh, proteína recombinante (16µg) se incubó con GR al 5% en buffer salino HEPES (HBS) (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) durante 2h a 4°C. Se lavó 2 veces con HBS y se bloqueó por 1h con BSA al 1% en HBS. Luego, los GR se incubaron por 1h a 4°C con suero anti-péptidos PfRON5 (suero 69) en una dilución 1/40 (rPfRON5F1) y con el anticuerpo monoclonal antihistidinas (rPfRON5F4). Para rPfRON5F1, las células se lavaron dos veces con HBS y se incubaron con anticuerpos anti conejo marcado con fluoresceína en una dilución 1/25 en HBS y azul de Evans 1:100 por 1h a 4°C. Como control positivo de la unión (para las dos proteínas), GR al 5% tratados con HBS-BSA al 1% durante 1 h a 4°C, se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-glicoforina A y B (Sigma) (dilución 1:400 en HBS) por 1h a 4°C. Luego de dos lavados con el mismo buffer, se incubaron con un anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína (Vector Laboratories) 1h en dilución 1:30 en HBS y azul de Evans 1:100 a 4°C. Una gota de cada una de las muestras se colocó en una lámina y se observó al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). Muestras de GR solos o sin el anticuerpo primario, fueron utilizadas como control negativo de la unión.

### **6.3.2. Antigenicidad de la proteína rPfRON5F1.**

Para evaluar el reconocimiento de la proteína rPfRON5F1 por sueros de pacientes con malaria, 1µg de proteína recombinante se sembró por pozo en cajas de 96 pozos y se incubó durante 1 h a 37°C y posteriormente a 4°C durante toda la noche. Cada caja se lavó 5 veces con PBS-Tween al 0,05% y cada pozo se bloqueó con 200µL de leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0,05% durante 1h. A cada pozo se le adicionaron 100µL de una dilución 1:100 de sueros de pacientes infectados con *P. falciparum* o de sueros de individuos sanos y se incubaron durante 1h a 37°C. Los pozos se lavaron 5 veces con PBS-Tween al 0,05% y se incubaron con 100µL de anticuerpo secundario anti-IgG humano acoplado a peroxidasa en una dilución 1:8000 por 1h a 37°C. El exceso de anticuerpo fue removido lavando 3 veces con PBS-Tween al 0,05% y los pozos fueron revelados usando el kit TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL Laboratories) según las instrucciones del fabricante; la absorbancia de las cajas se leyó a 620nm (A620). Cada suero se ensayó por triplicado y las diferencias en el reconocimiento de la proteína rPfRON5F1 por sueros de pacientes infectados con *P. falciparum* e individuos sanos se evaluaron mediante la Prueba de los Rangos con Signo de Wilcoxon [174].

En un ensayo adicional, la proteína rPfRON5F1 se separó por SDS-PAGE al 12% y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween al 0,05% durante 1h y posteriormente se lavó tres veces durante 5min con TBS-Tween al 0,05%. La membrana se cortó en tiras de 4mm y cada tira se incubó durante 1h a TA con: 1) suero de conejo anti-RON5 (1/40), 2) suero de conejo anti-RON5 previamente incubado con los péptidos inoculados, y 3) anticuerpo monoclonal antihistidinas (1:5000). Las tiras se lavaron tres veces con TBS-Tween al 0,05% y finalmente las tiras 1 y 2 se incubaron durante 1h con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa en una dilución 1:5000. Las tiras se lavaron tres veces con TBS-Tween al 0,05% y el complejo se reveló con el kit Alkaline Phosphatase Substrate BCIP/NBT (Vector Laboratories), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La tira 3 incubada con el anticuerpo monoclonal antihistidinas se reveló con el kit de substrato peroxidasa VIP (Vector Laboratories).

#### **6.4. Regiones de *Pf*RON5 que se unen a glóbulos rojos humanos**

##### **6.4.1. Síntesis y marcación de los péptidos con Na<sup>125</sup>I.**

Péptidos de 20 aminoácidos de longitud que cubren la secuencia de la proteína *Pf*RON5 (MAL8P1.73) se sintetizaron químicamente mediante el sistema de síntesis múltiple en fase sólida [168, 175], utilizando aminoácidos t-Boc (Bachem) y resina MBHA (0,5 meq/g). Los péptidos se separaron de la resina por la técnica de clivaje alto con ácido fluorhídrico [176], se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC, del inglés reverse phase high-pressure liquid chromatography) y por espectrofotometría de masas MALDI-TOF (Bruker). A los péptidos que no contenían un residuo de tirosina (Y) en su secuencia, se les adicionó este residuo en el extremo carboxi-terminal para permitir el radiomarcaje con Na<sup>125</sup>I.

Para el radiomarcaje de los péptidos, 5µg de cada uno de ellos se incubó con 5µL de Na<sup>125</sup>I (100mCi/mL) (ARC) y 15µL de cloramina T (2,8 mg/mL), utilizado como agente oxidante durante la reacción. Luego de 15min de reacción, se adicionaron 15µL de metabisulfito de sodio (2,3 mg/mL) para detener la reacción. El péptido radiomarcado se separó del total de la reacción mediante una columna de Sephadex G-10 (Pharmacia). Cada fracción recogida se cuantificó en un contador gamma (Packard Cobra II).

#### **6.4.2. Ensayos de unión y saturación**

Para determinar las regiones de unión de *Pf*RON5 a GRh, sangre total de individuos sanos se lavó con buffer HBS hasta remover el plasma. Posteriormente,  $2 \times 10^7$  GR se incubaron con cantidades crecientes de péptido radiomarcado (10-200nM) en presencia (unión inespecífica-UI) o ausencia (unión total-UT) de péptido no radio-marcado (16 $\mu$ M). Las muestras se llevaron a un volumen final de 200 $\mu$ L con HBS y se incubaron por 90min a TA [38]. Luego, las células se lavaron dos veces con buffer HBS y la radiación asociada a los GR se cuantificó en el contador gamma (Packard Cobra II). Una vez se determinaron los péptidos de alta actividad de unión o HABPs (del inglés, *High Activity Binding Peptides*), para algunos de ellos y a partir de su secuencia, se diseñaron péptidos que conservan la composición de aminoácidos pero tienen secuencia desordenada, utilizando la herramienta Shuffle Protein [177]. Los péptidos desordenados se sintetizaron y se probaron en ensayo de unión a GR siguiendo la misma metodología.

Para determinar las constantes de disociación (*Kd*), los coeficientes de Hill ( $n_H$ ) y los sitios de unión por célula para algunos HABPs, se realizó un ensayo de unión modificado. Brevemente,  $1,5 \times 10^7$  GR se incubaron con cantidades crecientes de péptido radiomarcado (0-3200nM) en ausencia o presencia de péptido no-radiomarcado (20nM) en un volumen final de 255 $\mu$ L durante 90min a TA. Luego de dos lavados con HBS, se cuantificó la radioactividad asociada a las células en un contador gamma (Packard Cobra II). Los ensayos de unión y saturación se realizaron por triplicado.

#### **6.4.3. Ensayos de unión con GRh tratados enzimáticamente**

Con el ánimo de determinar la naturaleza del receptor al cual se unen los HABPs sobre la membrana del GR, se evaluó la unión específica de los HABPs a GR tratados enzimáticamente. Brevemente, GR en suspensión (60%) fueron incubados con 150 $\mu$ U/mL de neuraminidasa (ICN 9001-67-6) en una solución con buffer HBS pH 7.4, 1mg/mL tripsina (Sigma T-1005) o 1mg/mL quimotripsina (Sigma C-4129), por 60min a 37°C. Luego de la incubación, los GR se lavaron dos veces con HBS y se utilizaron en un ensayo de unión convencional. GR sin ningún tratamiento fueron utilizados como control positivo de la unión (100%).

#### **6.4.4. Determinación de residuos críticos en la unión.**

Para determinar cuáles son los residuos directamente involucrados en la unión a GR (residuos críticos de unión), se sintetizaron análogos de glicina para 6 HABPs (37663, 37665, 37672, 37636, 37642 y 37745) distribuidos a lo largo de la proteína y se probaron en un ensayo de unión competitiva con los HABPs. En este ensayo,  $2 \times 10^7$  GR se incubaron 90min con cada HABP radiomarcado (100nM) en presencia o ausencia del HABP no-radiomarcado y de cada uno de sus análogos de glicina sin radiomarcado (12, 40 y 160  $\mu$ M) [40]. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con buffer HBS y se cuantificó la radiación asociada a los GR.

#### **6.4.5. Estructura secundaria de los HABPs de la proteína PfRON5**

Se realizaron estudios de dicroísmo circular para obtener información acerca de la estructura secundaria de los HABPs de PfRON5. Cada uno de los péptidos (0,1mM) se analizó en una celda de cuarzo termostataada usando como co-solvente 2,2,2-trifluoroetanol (TFE, del inglés trifluorethanol) al 30% v/v [178]. Los espectros se obtuvieron a TA con el espectrómetro Jasco J-810 y se hizo un promedio de tres barridos partiendo de 260nm a 190nm a una velocidad de barrido de 20nm/min y ancho de banda de 1nm. Los datos se colectaron con el software Spectra Manager y se analizaron con los programas SELCON3, CONTINLL y CDSSTR [179, 180].

#### **6.4.6. Inhibición de la Invasión**

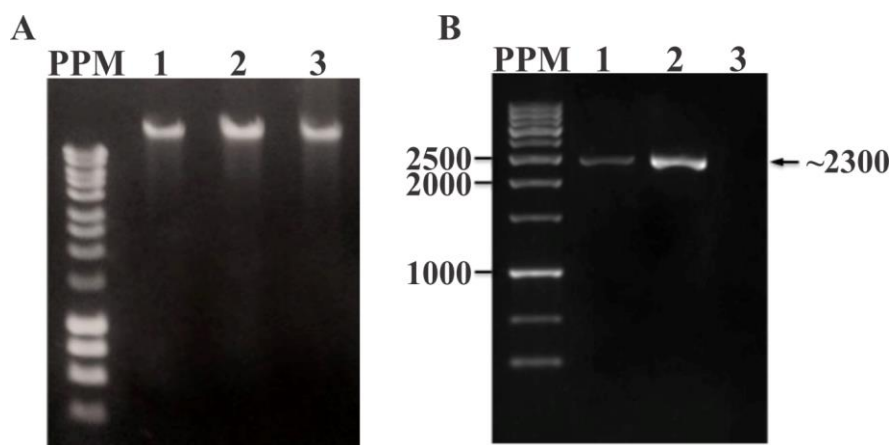
Para determinar la capacidad de la proteína rPfRON5F1 y de los HABPs solos o en mezclas de inhibir la invasión de merozoítos de la cepa FCB-2 a GRh, diferentes concentraciones de péptido (50, 100 y 200  $\mu$ M), se incubaron con un cultivo sincronizado de *P. falciparum* en fase de esquizontes [67, 181]. Luego de incubar por 18 horas a 37°C en una atmosfera de 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>, el medio se removió y se hizo tinción de las células con hidroetidina [182] durante 30min a 37°C y se lavaron 3 veces con PBS. La suspensión se analizó con un citómetro FACScan (Becton Dickinson) y el software CellQuest v 1.1 [183]. Como controles, se utilizaron GRh infectados sin tratar y GRh infectados tratados con EGTA, cloroquina, péptidos de baja capacidad de unión y péptidos con secuencia desordenada. Cada ensayo se realizó por triplicado.



## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Obtención del ADN parasitario y amplificación del gen MAL8P1.73

Se extrajo ADN de la cepa FCB-2 y se evaluó su integridad en gel de agarosa al 1%. Se observa una única banda de alto peso molecular y de buena concentración, lo que muestra que el ADN no se degradó durante el proceso de purificación (Figura 13A). Con el ADN parasitario se hizo PCR para amplificar un fragmento de ~2100pb del gen MAL8P1.73 con los cebadores F4 y R4 (Figura 11). En la Figura 13B se observa en el gel un producto de ~2300pb que corresponde al producto del fragmento del gen MAL8P1.73 esperado más 200pb de la región 3' extragénica. Estos resultados indican la presencia del gen MAL8P1.73 en la cepa FCB-2 de *P. falciparum*.



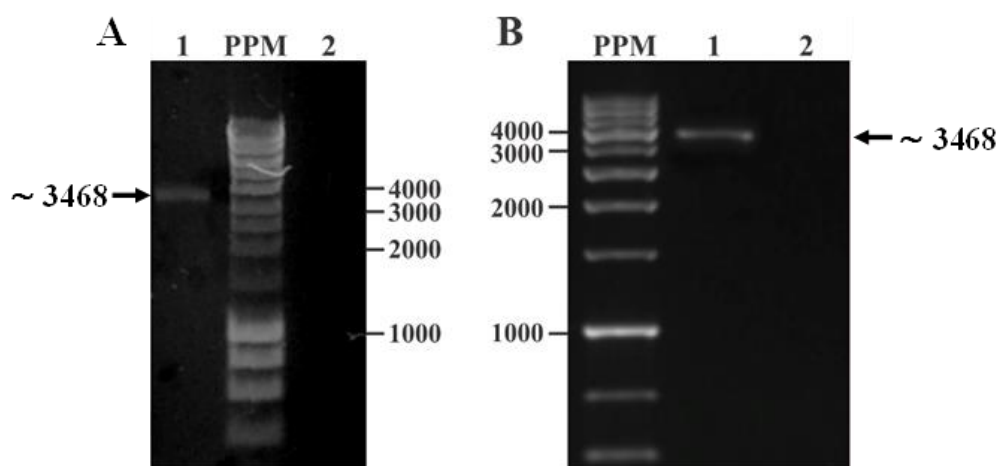
**Figura 13. Extracción del ADN genómico y amplificación de un fragmento del gen MAL8P1.73 en la cepa FCB-2.** A. Se observan tres muestras de ADN, producto de tres extracciones independientes con el kit Wizard® Genomic ADN Purification (Promega). B. Se observa una banda ~2300pb (línea 1) que corresponde a un fragmento amplificado del gen MAL8P1.73. Línea 2: control positivo correspondiente a un fragmento del gen *Pftron2* con un peso aproximado de ~2377pb. Línea 3: control negativo.

### 7.2. Estudio de la transcripción del gen que codifica para *PfRON5*

#### 7.2.1. Amplificación del ADN copia del gen MAL8P1.73

Teniendo en cuenta que el gen MAL8P1.73 está presente en la cepa FCB-2, se evaluó su transcripción mediante la amplificación del gen completo a partir de ADNc de esquizontes. Este ensayo se realizó para las cepas FCB-2 y PAS-2. En la Figura 14, se observa como producto de la

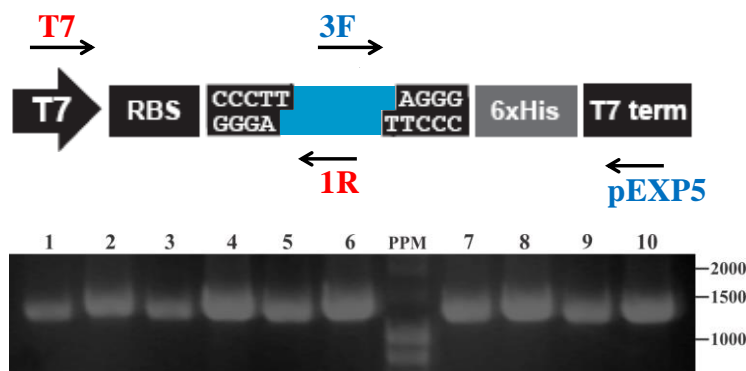
amplificación por PCR una única banda de ~3468pb que corresponde al peso molecular esperado, lo que sugiere que este gen se transcribe en la fase tardía del ciclo intraeritrocítico del parásito en ambas cepas. El análisis de transcripción de la cepa 3D7 muestra que el mayor número de transcritos para el gen MAL8P1.73 se encuentra en la fase de esquizontes y que el pico de transcripción está entre las 40 y 45h del ciclo [12]. La transcripción de genes y la expresión de sus productos en el estadio de esquizontes tardíos o segmentados ha sido asociado con la liberación de los merozoítos de los GR infectados y/o con la subsecuente invasión de los merozoítos a nuevos GR.



**Figura 14. Transcripción del gen MAL8P1.73.** Mediante electroforesis de ADN se visualiza un producto amplificado de ~3468pb que corresponde a todo el ADNc del gen MAL8P1.73 en las cepas FCB2 (A) y PAS-2 (B). La línea 1, corresponde a la amplificación del gen MAL8P1.73. Línea 2: control negativo. PPM (Patrón de Peso Molecular).

### 7.2.2. Clonación

La región codificante del gen MAL8P1.73 obtenida por la amplificación específica del ADNc sintetizado, se insertó en el vector pEXP5-CT/TOPO® TA (Invitrogen). Este constructo se utilizó para transformar células *E. coli* TOP10 competentes. Luego de la transformación, se obtuvieron colonias pequeñas, transparentes y puntiformes. Se seleccionaron varias colonias para confirmar la presencia del inserto en cada clon. La PCR de cinco colonias utilizando cebadores del vector y del inserto muestran los productos de peso molecular esperado: 1263pb y 1338pb (Figura 15).



**Figura 15. Confirmación de las bacterias recombinantes por PCR.** Representación esquemática del inserto ligado (azul) en el vector de expresión y los cebadores utilizados para la PCR de colonia. En el gel, los carriles del 1, 3, 5 y 7 corresponden a un fragmento de ~1263pb amplificado con los cebadores T7 y 1R, mientras que los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 muestran una banda de ~1338 con los cebadores 3F y pEXP5R.

### 7.2.3. Determinación de la secuencia y polimorfismo del gen MAL8P1.73

Se obtuvo la secuencia del ADNp proveniente de tres clones recombinantes y de PCRs independientes para cada cepa (FCB-2 y PAS-2). Se consideró que existía un cambio en la secuencia respecto a la secuencia de la cepa de referencia 3D7 cuando el cambio estaba presente en los 3 clones secuenciados. El alineamiento de la secuencia consenso de la cepa FCB-2, junto con la cepa de referencia 3D7, mostró cuatro sustituciones nucleotídicas que producen cambio en tres aminoácidos: Pro92Ser, Phe266Leu y Glu1015Asp (Tabla 2).

**Tabla 2. Polimorfismo de la proteína PfrON5**

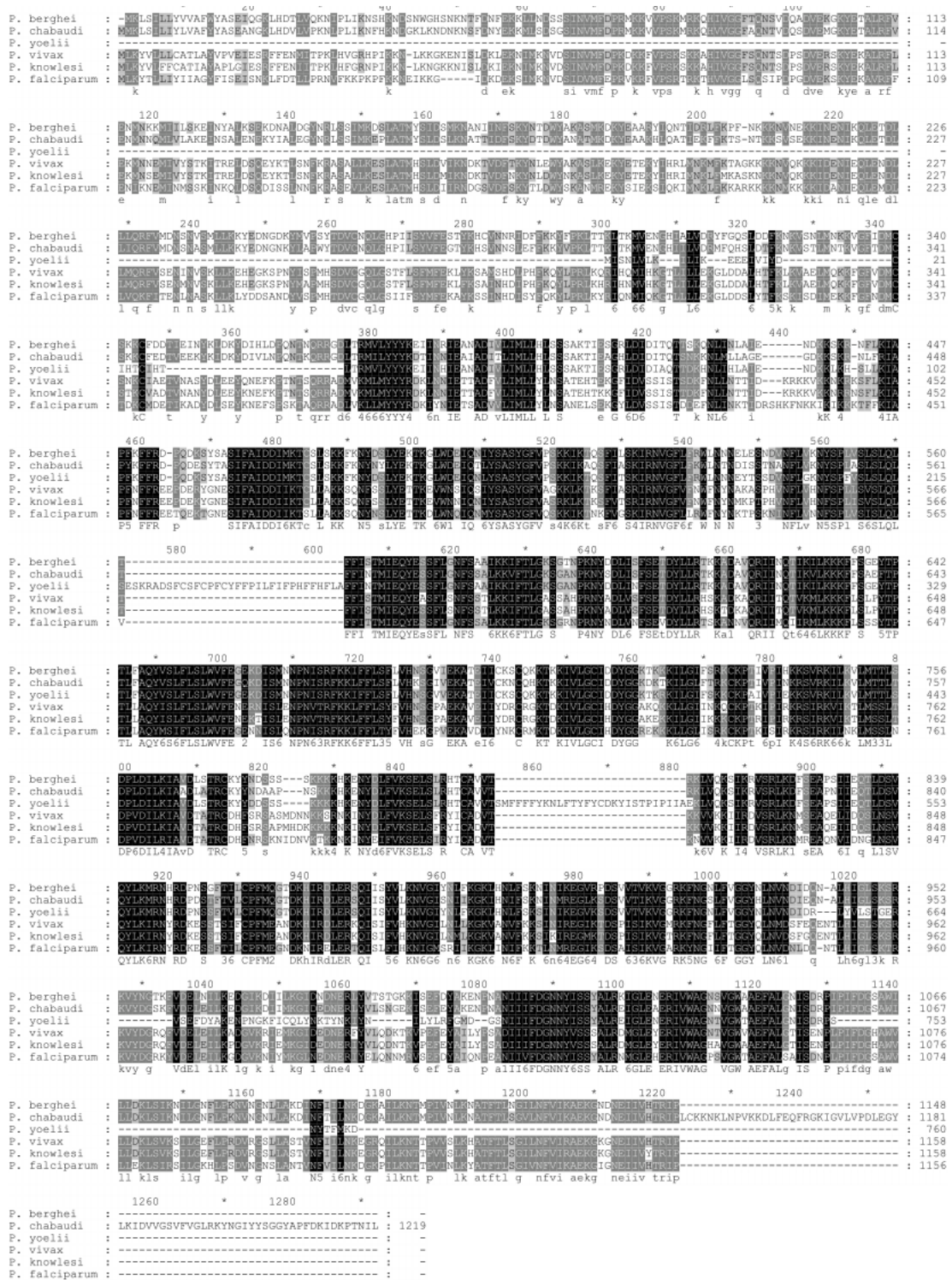
| Posición del nucleótido | Cepa |       |       | Posición del aminoácido | Cepa |       |       |
|-------------------------|------|-------|-------|-------------------------|------|-------|-------|
|                         | 3D7  | FCB-2 | PAS-2 |                         | 3D7  | FCB-2 | PAS-2 |
| 274                     | C    | T     | T     | 92                      | P    | S     | S     |
| 798                     | C    | A     | A     | 266                     | F    | L     | L     |
| 2058                    | A    | C     | C     | 686                     | T    | T     | T     |
| 2543                    | A    | A     | G     | 848                     | Q    | Q     | R     |
| 3045                    | A    | T     | T     | 1015                    | E    | D     | D     |

La secuencia consenso de la cepa FCB-2 se depositó en la base de datos del GenBank con el número de acceso HQ424431. Para la cepa PAS-2, se encontraron los mismos cambios que presenta la cepa FCB-2 y un cambio adicional que produce cambio de aminoácido Gln848Arg (Tabla 2 y Anexo 1). Estos datos indican un alto grado de conservación entre las cepas evaluadas

en el gen MAL8P1.73 y en su producto, la proteína *PfRON5*, y están de acuerdo a lo reportado en un estudio reciente donde se analizó a gran escala la variación genética de cerca de 227 aislados clínicos de *P. falciparum* derivados de diferentes regiones endémicas, y se encontró que el gen MAL8P1.73 y la proteína *PfRON5* presentan variaciones mínimas en su secuencia [184]. Lo anterior podría sugerir que la proteína es funcionalmente importante para el parásito y relevante en la búsqueda de antígenos candidatos en el diseño de métodos de control. Se ha reportado que una de las principales razones para no tener una vacuna totalmente efectiva, es el enorme polimorfismo de las proteínas del parásito; esta variabilidad se fija en las poblaciones parasitarias como consecuencia de las presiones selectivas por parte del sistema inmune. La ausencia de polimorfismo puede ocurrir por falta de presiones selectivas positivas o por restricciones funcionales en el caso de una proteína funcionalmente importante; en este caso particular, el bajo polimorfismo permitiría evitar respuestas alelo-específicas [6, 185, 186].

El alineamiento múltiple con las secuencias de las proteínas homólogas encontradas, muestra que la región carboxi terminal es más conservada que la región amino terminal y que la longitud de las secuencias es mayor en los géneros más ancestrales como *Neospora*, *Theileria* y *Toxoplasma* (Anexo 2). Cuando se hizo el alineamiento múltiple sólo con las secuencias de RON5 de las diferentes especies de *Plasmodium*, se encontró un alto grado de conservación de esta proteína en el género *Plasmodium*, particularmente la región central de la proteína (Figura 16). Los valores de identidad (I) y similitud (S) entre *PfRON5* y sus diferentes homólogos en *Plasmodium* y parásitos del filo Apicomplexa, mostraron los siguientes resultados en orden descendente: *P. vivax* (I 68,7% y S 84,8%), *P. knowlesi* (I 68,3% y S 84,3%), *P. berghei* (I 56% y S 75,7%), *P. chabaudi* (I 53% y S 72%), *P. yoelii* (I 32% y S 45%), *B. bovis* (I 17% y S 33%), *T. annulata* (I 15% y S 32,7%), *T. parva* (I 12,7% y S 29%), *N. caninum* (I 11,8% y S 27%) y *T. gondii* (I 10% y S 26,5%) [187].

Cuando se hizo una búsqueda en el genoma completo de *P. falciparum* utilizando como plantilla la secuencia de *PfRON5*, no se encontró similitud con otras proteínas del parásito, incluidas las localizadas en el cuello de las roptrias. Igualmente, no se encontraron en *PfRON5* dominios o motivos característicos con las herramientas utilizadas (datos no mostrados).



**Figura 16. Alineamiento de las secuencias de RON5 en diferentes especies de *Plasmodium*. Se muestra el alineamiento para las proteínas RON5 de *Plasmodium berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. vivax* y *P. knowlesi*. El sombreado indica el porcentaje de identidad. Letras blancas sobre fondo negro representan residuos con 100% de similitud, letras blancas sobre fondo gris representan residuos con 80% de similitud, y letras negras sobre fondo gris representan los residuos con 60% de similitud [187].**

#### 7.2.4. Análisis de la secuencia de *PfRON5* de la cepa FCB-2

Se utilizó la secuencia primaria de la proteína *PfRON5* para la búsqueda del péptido señal (PS) y dominios transmembranales (DTMs). Para las dos características se tuvo en cuenta la herramienta PolyPhobius que predice la topología transmembranal y el péptido señal [158]. En la secuencia de aminoácidos de *PfRON5* se encontró un PS predicho de 19 aminoácidos (residuos 1-19) con un sitio probable de clivaje por una peptidasa entre los aminoácidos I19-S20. La presencia del PS en la proteína podría estar relacionada directamente con el transporte y almacenamiento de *PfRON5* en organelos secretorios o su expresión sobre la membrana plasmática. Con esta misma herramienta, se encontraron dos DTMs que se localizan entre los residuos 554-573 y 642-663 (Tabla 3). La predicción de DTMs con otras herramientas bioinformáticas como Tmpred, ConpredII, TMHMM2.0 y Phobius, mostro diferencias en cuanto al número y posición de los DTMs. Esta discrepancia es posiblemente debida a los diferentes enfoques de cada predictor: Tmpred, se basa en un análisis estadístico de los datos consultados en relación con la base de datos TMbase, que otorga puntaje usando una combinación de matrices de peso [161]; TMHMM2.0, Phobius y Polyphobius usan aprendizaje de máquina, principalmente modelos ocultos de Markov. La diferencia entre ellos radica en que Phobius y Poliphobius usan además redes neuronales artificiales para predecir la presencia de péptido señal. Poliphobius, se basa también en la predicción por similitud, ya que calcula las probabilidades teniendo en cuenta alineamientos de secuencias homólogas [158, 160, 162].

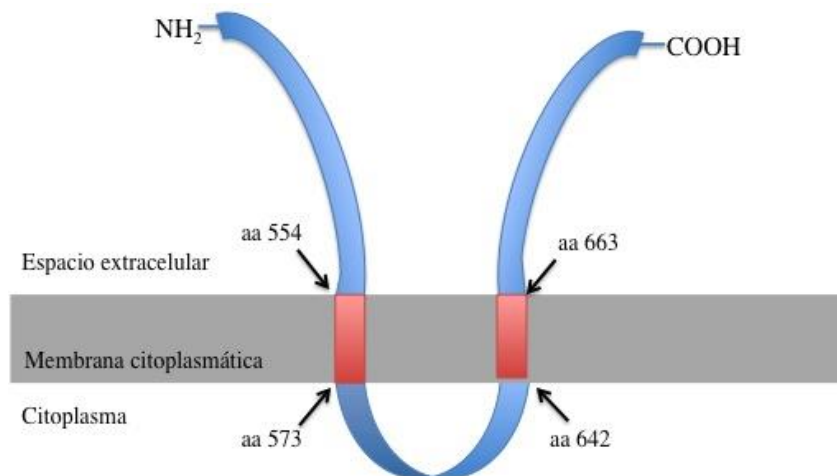
**Tabla 3. Predicción de dominios transmembranales (DTMs) para la proteína *PfRON5***

| Predictor   | Número de DTMs | Posición   | Referencia                |
|-------------|----------------|--|---------------------------|
| THMM2.0     | 0              |  | Krogh y cols., 2001       |
| Phobius     | 2              | 6-24<br><b>640-663</b>   | Kall y cols., 2004        |
| Tmpred      | 5              | 1-19<br>250-270<br>383-403<br><b>555-573</b><br><b>645-663</b> | Hofmann K y Stoffel. 1993 |
| ConpredII   | 1              | <b>554-574</b>   | Arai y cols., 2004        |
| Polyphobius | 2              | <b>554-573</b><br><b>642-663</b>                               | Kall y cols., 2005        |

ConpredII realiza un consenso basado en el promedio de los resultados de varios predictores (KKD, TMpred, TopPred II, DAS, TMAP, MEMSAT 1.8, SOSUI, TMHMM 2.0 and HMMTOP 2.0) [163].

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que en los grupos de entrenamiento de los predictores existe baja representación de las secuencias de protozoos respecto a las demás secuencias eucariotas, lo cual dificulta la predicción de DTMs en estos organismos. La diferencia en el número de DTMs predichos, también ha sido reportada para otras proteínas del cuello de las roptrias como *PfRON2* y *TgRON2* [20, 150]. Para *TgRON2*, se reportaron inicialmente 3 DTMs, y luego se demostró que el tercer dominio (residuos 1346-1348) no correspondía a un DTM, ya que esta región se encuentra en el medio extracelular durante la invasión en el TJ [150].

Basados en que Polyphobius tiene en cuenta la similitud con otras secuencias para la predicción de DTMs y que éstos son conservados en otros géneros y especies de Apicomplexa (a excepción de *Toxoplasma* y *Neospora*, en la cuales no se predicen DTMs), se puede sugerir que los residuos 554 al 573 y los residuos 642 al 663 corresponden a los DTMs de la proteína *PfRON5*. En este modelo, los residuos 20-553 y 664-1156 se encuentran en el medio extracelular y los residuos 574 al 641 en el citoplasma de la célula hospedera (Figura 17).

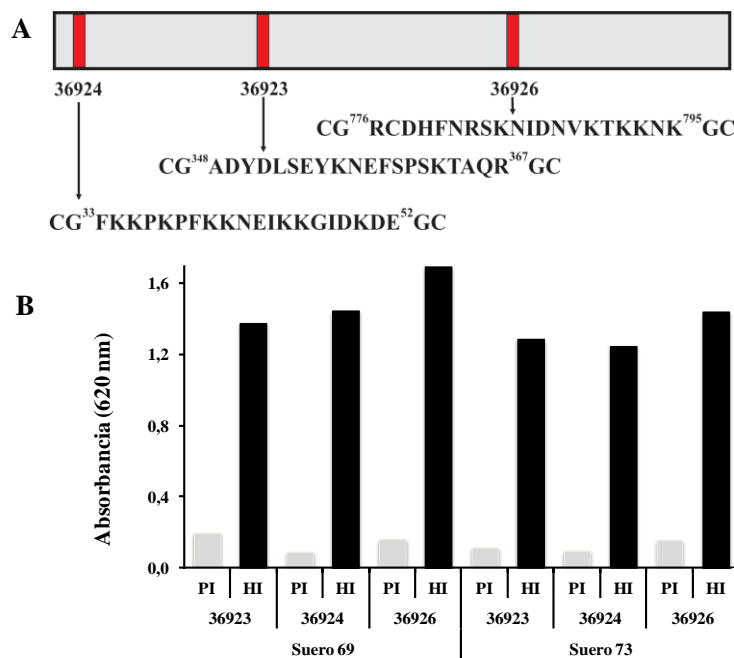


**Figura 17. Topología hipotética para la proteína *PfRON5*.** Se propone un modelo en el cual la proteína *PfRON5* tiene dos dominios transmembranales entre los residuos 554-573 y 642-663.

### 7.3. Evaluación de la expresión de la proteína *PfRON5*

#### 7.3.1. Obtención de anticuerpos anti-*PfRON5*

La reactividad de los anticuerpos policlonales de conejo anti-péptidos (36924, 36923 y 36926) de *PfRON5* se determinó mediante ELISA. En la Figura 18, se observa que después de la inoculación hay un aumento en el reconocimiento de los péptidos por parte de los sueros hiperinmunes (69 y 73), en comparación con los sueros preinmunes. Este resultado indica que los sueros policlonales pueden utilizarse en el reconocimiento de la proteína *PfRON5*.



**Figura 18. Reactividad de sueros anti-*PfRON5* frente a péptidos inoculados.** A. Secuencia y localización de los péptidos de *PfRON5* inoculados en conejos. B. Los resultados del ensayo de ELISA muestran que los sueros hiperinmunes (HI) reconocen a los péptidos inoculados, a diferencia de los sueros preinmunes (PI).

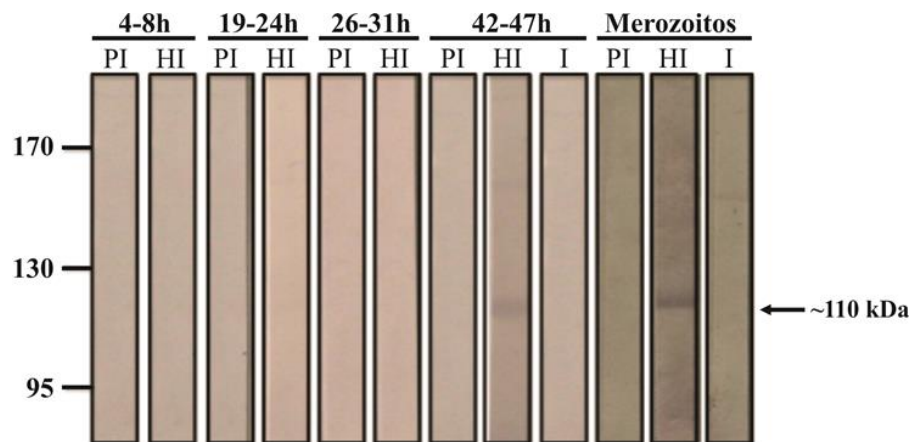
#### 7.3.2. Detección de la proteína *PfRON5* en lisado de *P. falciparum*

Los anticuerpos policlonales anti péptidos de *PfRON5* se usaron en ensayos de WB para evaluar la expresión de *PfRON5* en estadios intraeritrocíticos de la cepa FCB-2. En la Figura 19, se observa que solo los sueros hiperinmunes reconocen específicamente una proteína de ~110 kDa en esquizontes y merozoítos libres de la cepa FCB-2, que aunque difiere con el peso molecular predicho en PlasmoDB (133,7 kDa), correspondería a *PfRON5*. Reportes previos muestran que



para algunas proteínas localizadas en las roptrias (*TgRON2*, *TgRON4*), el peso teórico difiere del experimental debido a procesamientos post-traduccionales, presencia de regiones repetidas o migraciones electroforéticas anómalas [144, 147, 188].

La identidad de la proteína *PfRON5* y la especificidad del reconocimiento, se confirmó cuando los sueros hiperinmunes fueron preincubados con los péptidos poliméricos de *PfRON5* usados en la inmunización de los conejos, previo al ensayo de WB. Teniendo en cuenta que la preincubación con los péptidos removería los anticuerpos anti-*PfRON5* del suero hiperinmune, la ausencia de reconocimiento de proteínas en los lisados de esquizontes y merozoítos, confirma que la banda de ~110 kDa observada es, en efecto, *PfRON5* (Figura 19).

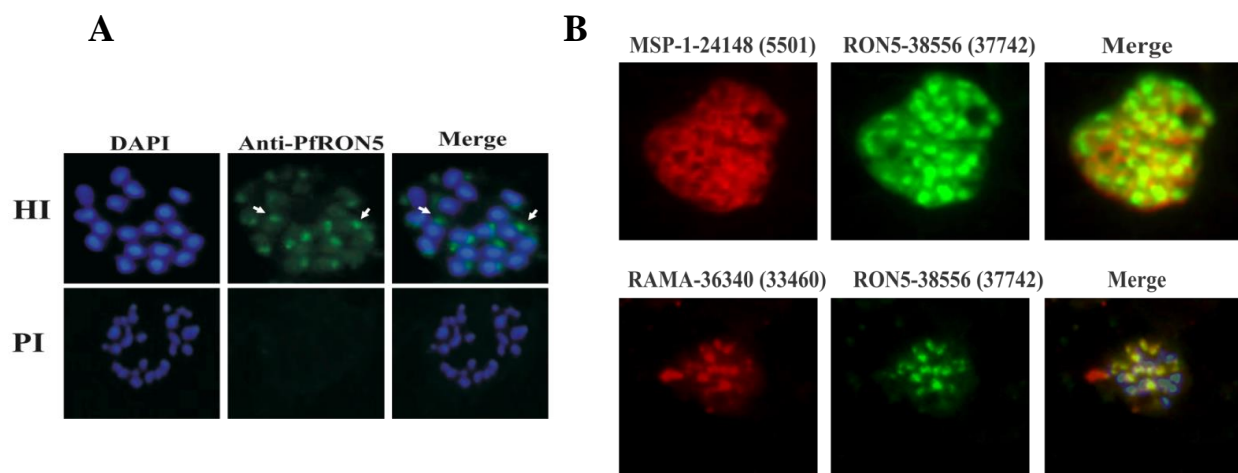


**Figura 19. Tiempo de expresión de la proteína *PfRON5* durante el ciclo intraeritrocítico.** WB realizado con lisados de parásito de la cepa FCB-2 en diferentes tiempos: anillos (4–8 h), trofozoítos jóvenes (19–24 h), trofozoítos maduros (26–31 h), esquizontes (42–47) y merozoítos libres. Se observa una única banda específica en los estadios de esquizontes y merozoítos libres. PI: suero preinmune; HI: suero hiperinmune; I: suero hiperinmune preincubado con los péptidos de *PfRON5* inoculados, antes de realizar el WB. A la izquierda se observa el patrón de peso molecular en kDa.

### 7.3.3. Localización subcelular de *PfRON5*

Los anticuerpos policlonales anti-péptidos de *PfRON5* se usaron en un ensayo de IFI para determinar la localización subcelular de la proteína. En la Figura 20, se observa un patrón de reconocimiento punteado sobre los esquizontes, típico para las proteínas localizadas en los organelos apicales [189] y diferente al patrón de los núcleos del parásito (azul). El doble marcaje sobre esquizontes tardíos de *P. falciparum* utilizando anticuerpos dirigidos contra MSP-1 (localizada en la superficie del parásito) y RAMA (expresada en las roptrias del parásito),

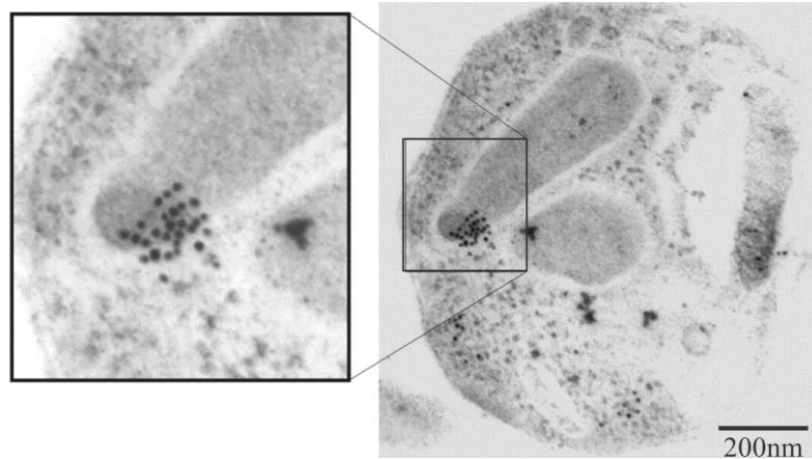
muestran que el patrón punteado de *PfRON5* se sobrepone parcialmente con el patrón de la proteína RAMA [189], lo que sugiere que *PfRON5* se localiza en las roptrias, pero no en el mismo compartimiento de RAMA (Figura 20). Varios reportes han sugerido que las roptrias se dividen en dos compartimentos denominados cuello y bulbo [81, 190], y que ciertos antígenos del parásito se distribuyen preferencialmente en estos compartimentos [19, 191]. Esta distribución se ha asociado con el papel funcional y con el tiempo de la descarga de los componentes durante el proceso de invasión [192]. De esta forma, las proteínas albergadas en el cuello de las roptrias se liberan primero y estarían implicadas en las interacciones con la célula huésped, mientras las proteínas del bulbo estarían participando en la formación de la VP [193].



**Figura 20. Localización subcelular de *PfRON5* en esquizontes de la cepa FCB-2 mediante Inmunofluorescencia indirecta.** A. Anticuerpos anti-*PfRON5* reconocen una proteína apical sobre esquizontes tardíos de la cepa FCB-2 de *P. falciparum* (verde). En azul, se muestran los núcleos de los parásitos dentro de los GR. Las flechas muestran un patrón punteado sólo con el suero hiperinmune (HI). Se observa la ausencia de fluorescencia verde en el suero preinmune (PI). B. Doble tinción con anticuerpos anti-RAMA o anti-MSP1 y anti-*PfRON5* (verde). No se encontró sobreposición entre *PfMSP1* y *PfRON5*, pero sí sobreposición parcial entre la proteína *PfRAMA* y *PfRON5*.

Por lo tanto, para examinar la localización de *PfRON5* en las roptrias, se llevaron a cabo estudios de microscopía inmunoelectrónica utilizando anticuerpos anti-péptidos de *PfRON5*. La Figura 21 muestra que las partículas de oro coloidal se localizaron específicamente en el cuello de las roptrias, similar a lo reportado para otras proteínas del cuello como *PfRON4* [19] y *PfRON2* [20]. La localización subcelular de *PfRON5* en el cuello de las roptrias sugiere la participación de esta proteína en la entrada del parásito a su célula hospedera. Estudios previos de inmunoprecipitación, han mostrado que *PfRON5* se asocia con *PfRON4*, *PfRON2* y *PfAMA-1*, todas ellas asociadas al TJ [23, 147]. Recientemente, se ha reportado que la proteína *PfRON2*,

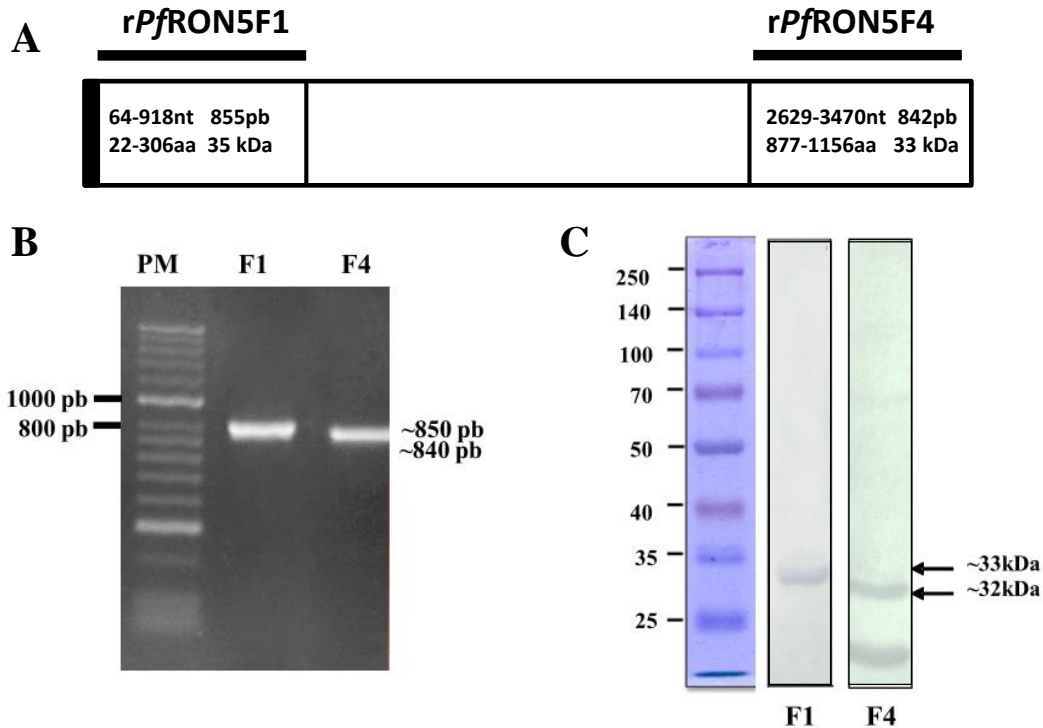
además de hacer parte de un complejo macromolecular y servir de receptor para la proteína AMA-1, interactúa con receptores sobre la célula hospedera [152].



**Figura 21. La proteína PfRON5 se localiza en el cuello de las roptrias.** Inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos policlonales anti-péptidos de PfRON5 y GRh infectados con *Plasmodium falciparum* de la cepa FCB-2, muestran la localización de la proteína PfRON5 en el cuello de las roptrias.

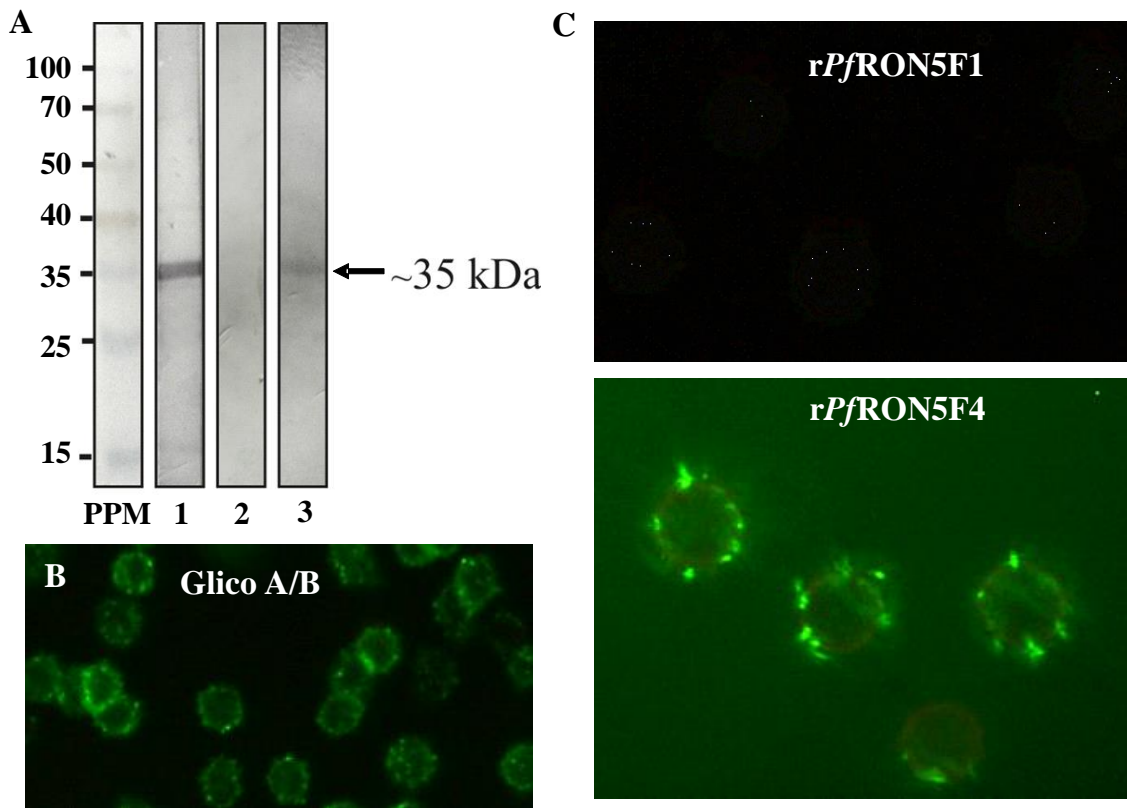
#### **7.4. Unión de las proteínas recombinantes rPfRON5F1 y rPfRON5F4 a GR humanos.**

De acuerdo a reportes previos que han sugerido que PfRON2 interactúa con receptores sobre la célula huésped [152], se expresaron dos regiones de la proteína PfRON5 y se incubaron con GR humanos. La selección de las regiones a expresar, se hizo teniendo en cuenta la topología de la proteína sugerida por los análisis bioinformáticos (Figura 17, Tabla 3). Las regiones a expresar (N- y C-terminal) se amplificaron mediante PCR y se clonaron en el vector de expresión pEXP5-CT/TOPO (Figura 22 A y B). La expresión de las dos proteínas se hizo utilizando el sistema de expresión en *E. coli* bajo la inducción con L-arabinosa. Como se observa en la Figura 22, se obtuvieron proteínas de ~33kDa (rPfRON5F1) y ~32kDa (rPfRON5F4) que fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal antihistidinas, el cual está dirigido hacia una secuencia específica de seis histidinas adicionada por el vector al extremo C-terminal de la proteína. Para la proteína rPfRON5F4, se detectó una banda adicional de ~23kDa, que correspondería a un producto de degradación. Para los ensayos de unión a GR humanos, la banda de ~32kDa de rPfRON5F4 se separó del producto de degradación mediante electro-elución.



**Figura 22. Obtención de las proteínas recombinantes *rPfRON5F1* y *rPfRON5F4*.** **A.** Representación esquemática de la proteína RON5, donde se localizan los fragmentos expresados en *E. coli*. Se muestra la longitud en nucleótidos y en aminoácidos. **B.** Amplificación de los fragmentos F1 y F4 del gen MAL8P1.73 a partir de ADNc de la cepa FCB-2. El gel de agarosa muestra los dos productos de ADN amplificados con pesos aproximados de 850pb y 840pb para F1 y F4, respectivamente. **C.** Reconocimiento por WB de las proteínas recombinantes por anticuerpo monoclonal antihistidinas.

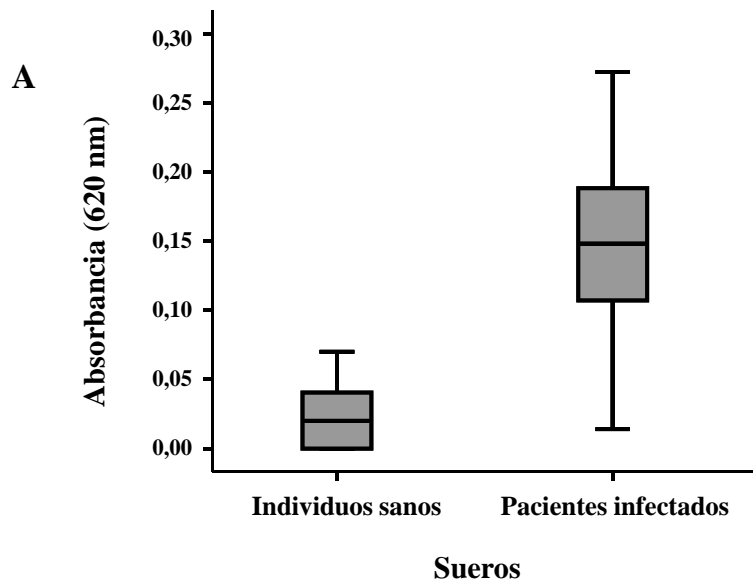
Para los ensayos de unión y reconocimiento de la proteína *rPfRON5F1*, se utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra los péptidos poliméricos (36923, 36924 y 36926), mientras que para la proteína *rPfRON5F4*, se utilizó un anticuerpo monoclonal antihistidinas marcado con fluoresceína. Como se observa en la Figura 23, los anticuerpos policlonales reconocen específicamente la proteína *rPfRON5F1* con un peso molecular aproximado de ~33kDa. Cuando *rPfRON5F1* y *rPfRON5F4* se incubaron con los GR humanos, se observó por inmunofluorescencia que ambas proteínas se unen a la superficie del GR con un patrón punteado similar al encontrado para el reconocimiento de glicoforina A/B sobre la superficie del GR. La unión de estos dos fragmentos a membrana de GR, coincide con la topología predicha para *PfRON5* (Figura 17), donde se sugiere que las regiones amino y carboxi-terminal de la proteína se encuentran expuestas hacia el medio extracelular.



**Figura 23. Unión de *rPfRON5F1* y *rPfRON5F4* a GR humanos.** **A.** Reconocimiento de la proteína *rPfRON5F1* con sueros policlonales. El suero 73, obtenido en conejo inoculado con los péptidos 36923, 36924 y 36926 de *PfRON5*, se utilizó para el reconocimiento específico de la proteína recombinante *rPfRON5F1* (Línea 1). Cuando el suero hiperinmune se preincubó con los péptidos inoculados, se pierde el reconocimiento de la proteína recombinante (Línea 2). La línea 3 muestra el reconocimiento de la proteína con anticuerpo monoclonal antihistidinas. **B.** Reconocimiento de Glicoforina A/B con anticuerpo monoclonal de ratón anti-glicoforina A, seguido con anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína. **C.** GR incubados con la proteína *PfRON5-F1* (arriba) y *PfRON5-F4* (abajo). Se observa un patrón punteado fluorescente sobre los GRs. Las muestras de GR solos o sin el anticuerpo primario no mostraron ninguna señal de fluorescencia (datos no mostrados).

### 7.5. Sueros de humanos infectados por *P. falciparum* reconocen a la proteína *rPfRON5F1*

Se determinó mediante ELISA la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína *rPfRON5F1* en 45 sueros de pacientes con episodios de malaria por *P. falciparum* que viven en regiones endémicas de Colombia. La mayoría de los sueros de pacientes infectados con *P. falciparum* presentaron reactividad frente a la proteína *rPfRON5F1* (Figura 24) ( $A_{620} 0,18 \pm 0,016$ ) comparada con las muestras de individuos sanos ( $A_{620} 0,031 \pm 0,08$ ), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,000$ ). (Prueba de los Rangos con Signo de Wilcoxon [174])



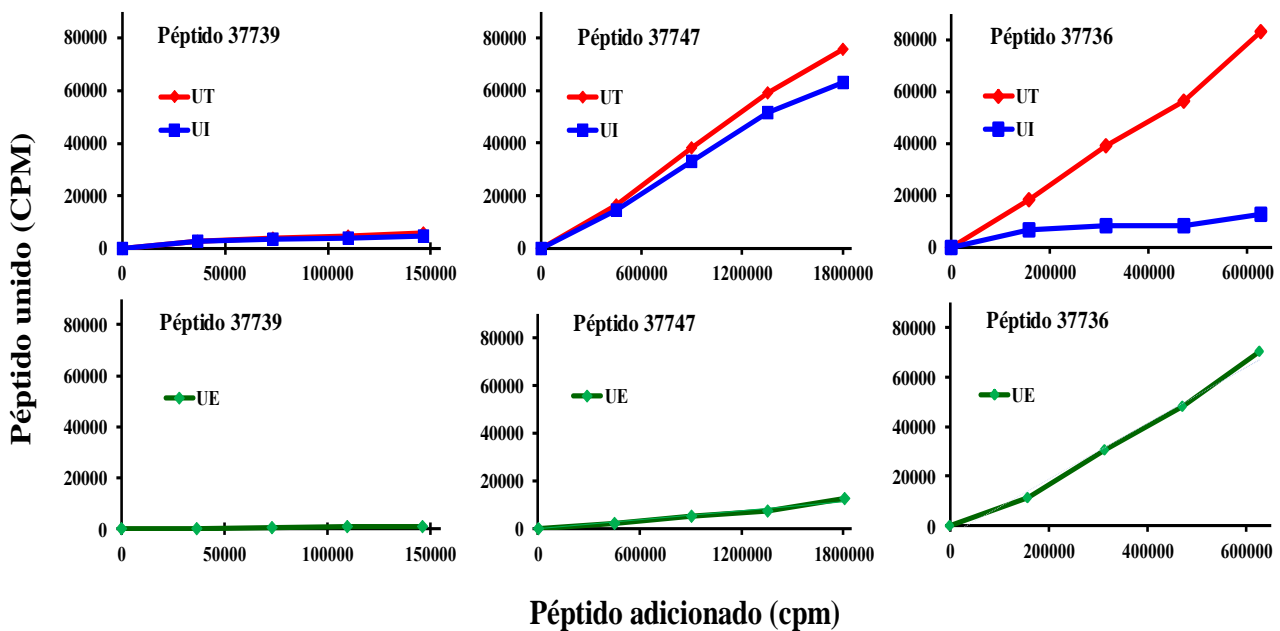
**Figura 24. Antigenicidad del fragmento recombinante rPfRON5F1.** Se utilizaron 23 sueros de individuos sanos y se compararon con 45 sueros de pacientes con infección por *P. falciparum*. Cada suero se diluyó en 1:100 y se ensayaron por triplicado.

### 7.6. Péptidos sintéticos derivados de PfRON5 se unen a GR humanos

Para tamizar las regiones de unión de la proteína PfRON5 a GR humanos, 45 péptidos no superpuestos se sintetizaron y se probaron en un ensayo de unión a GR (secciones 6.4.1. y 6.4.2.). Los datos obtenidos del ensayo, se utilizaron para graficar la unión total (UT: unión de péptido radiomarcado) y la unión inespecífica (UI: unión en presencia de péptido no-radiomarcado). La diferencia entre las curvas de unión total y unión inespecífica corresponde a la unión específica (UE). Los péptidos mostraron tres distintos comportamientos de unión: 1) No unión a GR humanos (baja unión total y baja unión inespecífica), 2) unión inespecífica a GR (alta unión total e inespecífica), y 3) unión específica (alta unión total y baja unión inespecífica) (Figura 25).

Aquellos péptidos que en la curva de unión específica mostraron una pendiente  $m \geq 0,02$  se consideraron péptidos de alta capacidad de unión o HABPs. Un valor de  $m \geq 0,02$  significa que el péptido se une por lo menos en un 2% a los GR. Esto es teniendo en cuenta un modelo de interacción bimolecular, que identifica interacciones con afinidad en el rango nM y alrededor de 100000 sitios de unión por célula [38]. Para 16 péptidos distribuidos a lo largo de toda la

secuencia de la proteína, la curva de UE presento  $m \geq 0,02$  (Figura 26), por lo tanto, se consideraron como HABPs. De manera interesante, el péptido 37727 estaría localizado en la región citoplasmática, lo que sugiere que el modelo topológico propuesto no es del todo correcto. Sin embargo, la presencia de HABPs en mayor número en los extremos (C y N terminal) de la proteína y el hecho de que las proteínas recombinantes *rPfRON5F1* y *rPfRON5F4* (que contienen en su secuencia algunos HABPs), se unen a GR, soporta el modelo. Se ha reportado que durante la invasión, la proteína RON2 es insertada en la membrana de GR, pero su región C terminal queda expuesta al medio para interactuar con la proteína AMA-1 y con receptores sobre la membrana del GR [108, 152].



**Figura 25. Tipos de unión para los péptidos de la proteína *PfRON5*.** Los ensayos de unión mostraron la presencia de péptidos que no se unen (péptido 37739), péptidos de alta unión inespecífica (péptido 37747) y 16 péptidos de alta capacidad de unión específica, como el péptido 37736 ( $m \geq 0,02$ ). En las figuras de la parte superior, se graficó la unión total (UT en rojo), obtenida de la unión de péptido radiomarcado a GR, la unión inespecífica (UI en azul), obtenida de la unión de péptido radiomarcado a GR en presencia de un exceso del mismo péptido sin radiomarcado, y representa la unión que no fue desplazada por el péptido sin radiomarcado. En las figuras de la parte inferior, se graficó la unión específica (UE en verde), que se obtiene al sustraer la UI de la UT ( $UE=UT-UI$ ).

Teniendo en cuenta que hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual las proteínas RON son translocadas a la membrana de GR y cómo están organizadas dentro del complejo

RONs, no se debe descartar que regiones de la proteína *PfRON5* estén en permanente contacto con la membrana de GR o momentáneamente durante su paso a la cara citoplasmática de éste.

En un ensayo de unión adicional, se observó que péptidos con igual composición de aminoácidos a la de los HABPs, pero con diferente secuencia primaria, se unen en un porcentaje mucho menor que el de los HABPs (Figura 26). Esta característica de la unión de los HABPs y sus análogos de secuencia desordenada ha sido previamente observada con otros HABPs derivados de diferentes proteínas del merozoito [194, 195]. También se ha reportado que un péptido de 11 residuos, derivado de la subunidad *Gas* de la proteína G de GR, inhibe la invasión del merozoito, mientras que el análogo de secuencia desordenada afecta mínimamente la invasión [196]. En ambos casos, se sugiere que la unión específica de los HABPs y la actividad inhibitoria del péptido de 11 residuos, son dependientes de la secuencia y no de la composición de aminoácidos.

#### **7.6.1. La unión de los HABPs es saturable**

Para evaluar la interacción HABP-GR, se realizó un ensayo de unión similar al del tamizaje inicial, pero utilizando concentraciones mayores de péptido radiomarcado. En la Figura 27, se observa que a medida que se adiciona mayor concentración de ligando (HABP radiomarcado), los sitios de unión van siendo ocupados por el ligando y la unión va en aumento, hasta el punto en que todos los sitios de unión están ocupados y la unión no aumenta más, es decir, la unión de los 3 HABPs evaluados es saturable.

El análisis de las curvas de saturación [38, 197], muestra que las  $K_d$  de los HABPs 37727, 37736 y 37744 tienen valores alrededor de 1000 nM, que el número de sitios de unión por célula está entre 65000-265000, y que la interacción de los HABPs con el receptor sobre el GR presenta cooperatividad positiva ( $nH > 1$ ) (Figura 27). Este resultado es muy interesante en el contexto de interacciones relevantes en procesos biológicos: la interacción HABP-GR es específica, con valores de mediana afinidad y saturable [197].



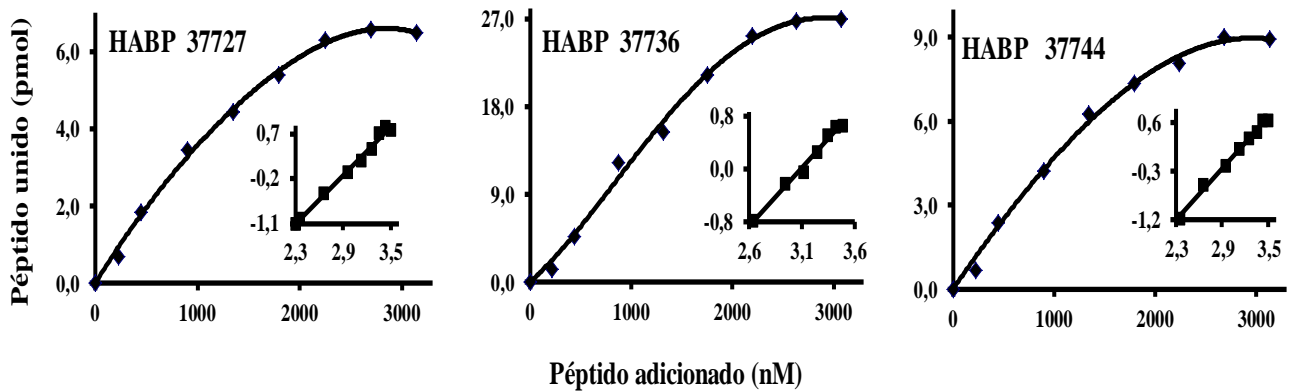
**A**

|              | Péptido | Secuencia  | Actividad de Unión Específica (%)           |     |
|--------------|---------|--|---|-----|
|              |         |  |   | 2   |
| Extracelular | 37662   | 194 MNKLFK KARKKKKNM KKKKIY                      | 213   | ND  |
|              | 37663   | 231 ENLNASKLLKLYDD SANDYV                        | 250   |     |
|              | 37664   | 251 SP MHTD VCGQLGSIIFSYMF                       | 270   | ND  |
|              | 37665   | 271 EKAYKSSINHDISYFQKYL P                        | 290   |     |
|              | 37666   | 291 RLK YRIQNM IQKGTLLLEK                        | 310   | ND  |
|              | 37667   | 311 GLDDSLYTFKSKISDIM EKK                        | 330   |     |
|              | 37668   | 331 FGFNDMCTDKC MDETIKADY                        | 350   |     |
|              | 37669   | 351 DLSEYKNEFSPSKTAQR RAD                        | 370   |     |
|              | 37670   | 371 LVKLLMY YRDKIYNIETS A                        | 390   |     |
|              | 37671   | 391 DVVLI ML LYLNSAN ELS EKG                     | 410   |     |
|              | 37672   | 411 YLDVSSSISTDDEFNLINKTI                        | 430   |     |
|              | 37673   | 431 DRSHKFNKKIKIKKKTFFK IY                       | 450   |     |
|              | 37674   | 451 APFNFFREETQEKTGNESI FY                       | 470   |     |
|              | 37675   | 471 AIDDI IKTSL LAKK SQNYNS                      | 490   |     |
|              | 37676   | 491 LYETT KD LWNQIQNMYS ASY                      | 510   |     |
|              | 37677   | 511 GFVQSKKIKTNKFVGSKIR NY                       | 530   |     |
|              | 37678   | 531 VGFLLRWFN YNKTPSKNIN FY                      | 550   | ND  |
|              | 37726   | 551 LVN N F S P L V S I S L O L V F F I T Y      | 570   | ND  |
|              | 37727   | 571 T M I E Q Y E S S F L G N F S S A L K K      | 590   |     |
|              | Intra   | 37728  | 591 I F T L G K S G R N P R N Y N D L V N F | 610 |
| 37729        |         | 611 S E V D Y L L R T S K A N N V Q R I I M      | 630   |     |
| 37730        |         | 631 Q I I R M L K K K F L S S S Y T P T L L      | 650   |     |
| 37731        |         | 651 A Q Y M S I F L S L W V F E G E N N I S      | 670   | ND  |
| Extracelular | 37733   | 671 L Q N P N I S R F K K I F F L T Y F V        | 690   |     |
|              | 37734   | 691 E K G P V E K A V D I I Y N K C R M K T      | 710   |     |
|              | 37735   | 711 D K I V L G C I H D Y G G R E K K K L L      | 730   |     |
|              | 37736   | 731 G L I S R K C K P T K I S I R K R S I R Y    | 750   |     |
|              | 37737   | 751 K I L N K L M S S L N D P V D I L R I A Y    | 770   |     |
|              | 37738   | 771 V D T A T R C D H F N R S K N I D N V K Y    | 790   |     |
|              | 37739   | 791 T K K N K I N Y E I F V K S E L S I R Y      | 810   |     |
|              | 37740   | 811 I C A D V T K N V V K K I I R D V S R L Y    | 830   |     |
|              | 37741   | 831 K N M R E A Q N V I D N G L N S V Q Y L      | 850   |     |
|              | 37742   | 851 K I R N Y R D K E S S F T I L C P F M E      | 870   |     |
|              | 37743   | 871 G N D K N I R E L E R T Q I S L F I H K Y    | 890   |     |
|              | 37744   | 891 N I G M S R I I K G K L I N I F K K T L Y    | 910   |     |
|              | 37745   | 908 K T L N M R E G I K S D S A I S I K V G Y    | 927   |     |
|              | 37746   | 939 G Y Q L N V D N L D Q N T L H I G L S K      | 958   |     |
|              | 37747   | 959 T R K V Y D G R K Y V D E L E I L K G D      | 978   |     |
|              | 37748   | 979 G V K N I Y M K G L N E D N E R I Y E L      | 998   |     |
|              | 37749   | 999 Q N N M R V S E F D Y A I Q N P E A N I I    | 1019  |     |
|              | 37750   | 1020 V F D G N N Y I S S Y A L R N M G L E H     | 1039  |     |
|              | 37751   | 1040 E R I V W A G P S V G W T A E F A L S A I Y | 1059  |     |
|              | 37752   | 1060 I S D N P L P I F D G S A W V L L E K L Y   | 1079  |     |
|              | 37753   | 1080 S I R S I L G K H L P S D V N G N S L A Y   | 1099  |     |
|              | 37754   | 1090 P S D V N G N S L A N T V N F V I L N K Y   | 1109  |     |

**B**

| Péptido | Secuencia                  | Actividad de unión específica (%) |   |
|---------|----------------------------|-----------------------------------|---|
|         |                            |                                   | 2 |
| 37672   | 411 YLDVSSSISTDDEFNLINKTI  | 430                               |   |
| 38660   | SVE DNDLNKSTLIYIFIDTS      |                                   |   |
| 37736   | 731 GLISRKCKPTKISIRKRSIRY  | 750                               |   |
| 38663   | KPTRTSRKILISKRGII RSKY     |                                   |   |
| 37740   | 811 ICADVTKNVVKKIIRDVSRLY  | 830                               |   |
| 38661   | KSTKDVDI IKVNLTVAVIRRY     |                                   |   |
| 37744   | 891 NIGMSRIIKGKKLINIFKKTLY | 910                               |   |
| 38662   | IGSKFMGLKILIRNKTIY         |                                   |   |

**Figura 26. Perfil de unión de la proteína P<sub>f</sub>RON5 a GRh. A.** Las barras de color negro representan la pendiente (m) de la curva de unión específica o actividad de unión (%) para cada uno de los péptidos de P<sub>f</sub>RON5. Para realizar la marcación, se adicionó un residuo de tirosina en aquellos péptidos que no lo contenían en su secuencia. A la izquierda, en gris la ubicación de los DTMs predichos. **B.** Perfil de unión de los HAPs y sus análogos desordenados a GRh. Los análogos se unen mucho menos que los HAPs.



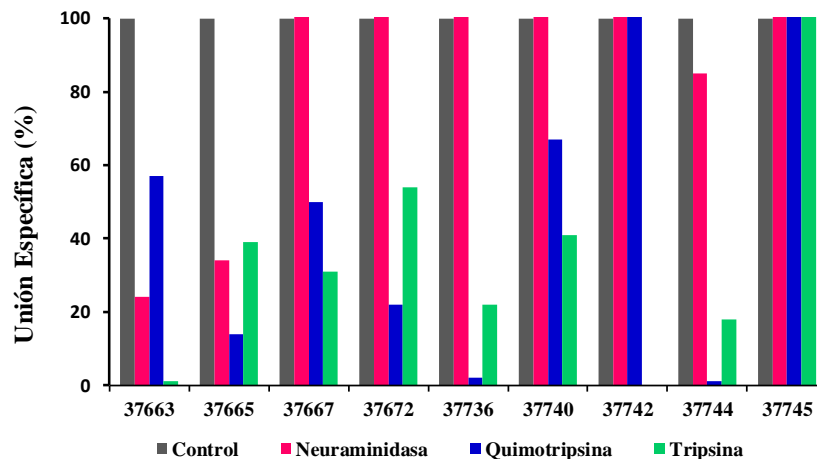
**Figura 27. Saturación de los HABPs de *Pf*RON5.** A partir de la curva de saturación y de la gráfica inserta, se calculan los valores de  $K_d$ , número de sitios de unión (NSU), y el coeficiente de Hill ( $n_H$ ). En la gráfica inserta, la abscisa es Log F y la ordenada es Log (B/Bmax - B). F corresponde al péptido libre, B la cantidad de péptido unido y Bmax es la cantidad máxima de péptido unido. Los valores calculados de  $K_d$ , NSU y  $n_H$  para los HABPs 37727, 37736 y 37744 son  $K_d$ : 950, 1050 y 1080 nM, NSU: 65000, 265000 y 88000,  $n_H$ : 1,7, 2,0 y 1,5, respectivamente.

### 7.6.2. La unión de los HABPs es sensible al tratamiento enzimático

La naturaleza del receptor en membrana de GRh al cual se unen los HABPs, puede ser estudiada determinando el efecto que el tratamiento enzimático de los GR previo al ensayo de unión tiene en el resultado [136, 198]. Los GR fueron tratados con neuraminidasa, que remueve carbohidratos como el ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc, del inglés N-acetylneuraminic acid) de glicoproteínas como glicoforina A, B y C, tripsina que degrada glicoforina A y B, y quimotripsina que degrada la glicoforina B y proteínas como banda 3 [199, 200]. Luego del ensayo de unión, para cada tratamiento, la unión específica de los HABPs (Figura 28) se comparó con la unión obtenida con GR sin tratamiento (100% de unión) y se analizaron en conjunto los resultados de los tres tratamientos.

Se observa que, excepto para los HABPs 37763 y 37765, localizados en el extremo N-terminal de *Pf*RON5, el tratamiento con neuraminidasa no afecta la unión de los HABPs (Figura 28). Esto sugiere que la unión de los HABPs no es dependiente de NeuNAC o de cargas. Por el contrario, el tratamiento con tripsina afecta la unión de todos los HABPs, excepto el HABP 37745, reduciendo la unión entre el 45% (HABP 37672) y el 80% (HABP 37744), y elimina completamente la interacción de los HABPs 37663 y 37742. El tratamiento con quimotripsina no

afecta la unión de los HABPs 37742 y 37745 (localizados hacia el C-terminal de la proteína), disminuye entre un 35 a 85% la unión de los HABPs 37663, 37665, 37667, 37672 y 37740, y elimina la interacción de los HABPs 37736 y 37744 con el GR.



**Figura 28. Unión de los HABPs a GR humanos tratados con enzimas.** Se determinó el efecto del tratamiento enzimático (neuraminidasa, quimotripsina y tripsina) sobre la unión de los HABPs. Se realiza un ensayo de unión típico, excepto que los GR han sido tratados previamente con las enzimas. La unión a GR sin tratar se considera como el 100% de unión.

Aunque no se observa un consenso en el efecto del tratamiento enzimático sobre la unión de los HABPs (Figura 28) como para poder postular un único receptor para los HABPs, y por lo tanto para *PfRON5*, es posible hacer algunas agrupaciones, por ejemplo: la unión de los HABPs 37667, 37672, 37736 y 37740 es resistente a neuraminidasa, pero sensible a tripsina y quimotripsina. Esto es bien interesante, ya que recientemente se reportó que la proteína receptor de complemento 1 (CR1) es el receptor para la proteína *PfRH4* y que esta interacción es resistente a neuraminidasa y sensible a tripsina y quimotripsina [95, 96]; nuestros resultados sugieren un comportamiento similar en *PfRON5*. De otra parte, mientras la unión de los HABPs 37663 y 37665 es sensible a los tres tratamientos, la unión del HABP 37745 no se afecta con ninguno de ellos. Hasta el momento, no se ha reportado algún receptor sobre membrana que presente este patrón frente al tratamiento enzimático con las tres enzimas [201]. Por su parte, la unión del HABP 37742 se afecta sólo con tripsina, un comportamiento similar al que ha sido descrito para el receptor denominado “X”, que no ha sido caracterizado y para el cual no se conoce el ligando del parásito con el que estaría interactuando [201, 202]. Lo anterior puede sugerir entonces que los HABPs, aun siendo derivados de la misma proteína, se unen a diferentes

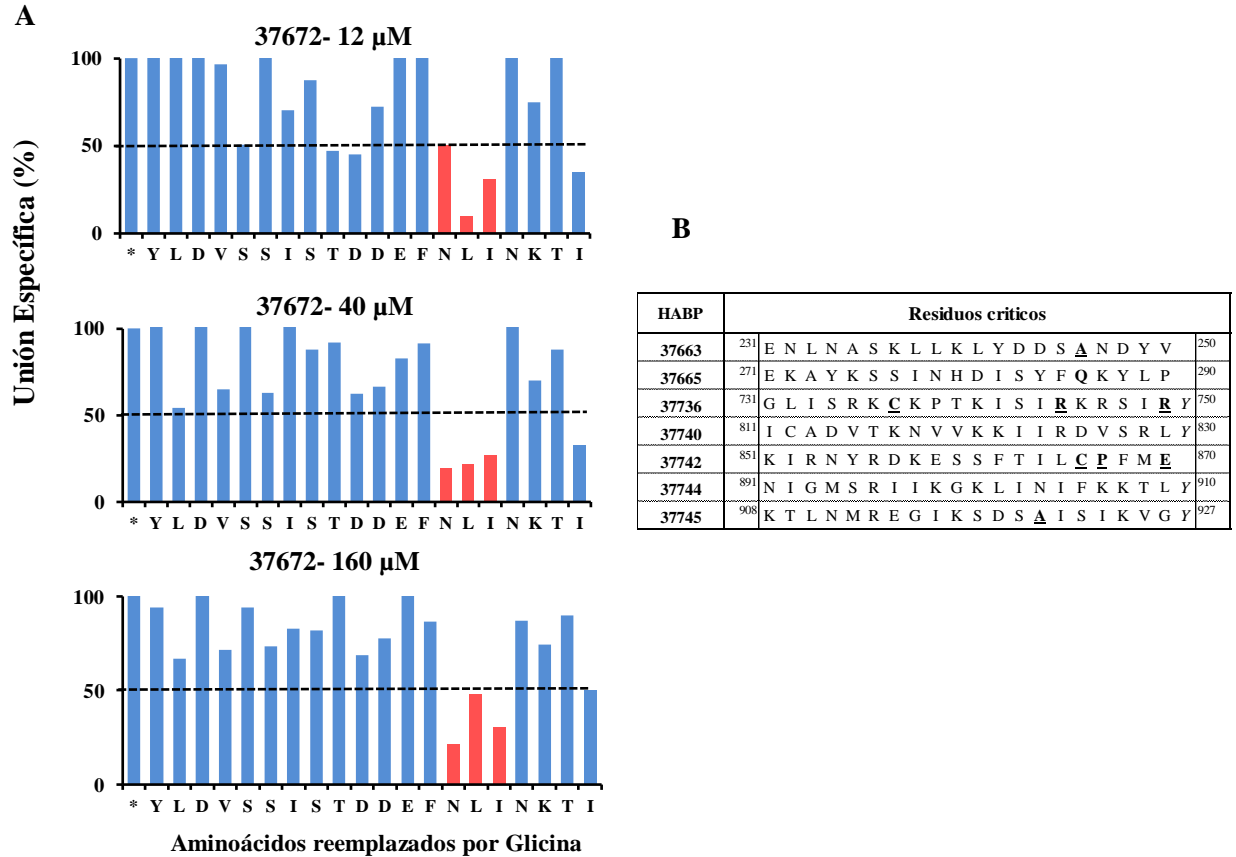
receptores y por eso se obtienen patrones de unión diferentes, sin embargo, también es posible que los HABPs tengan un mismo receptor pero un sitio de unión diferente. Por ejemplo, la unión de los HABPs 37736 y 37744 se afecta casi de la misma forma con el tratamiento enzimático (Figura 28) y la afinidad por su receptor es muy similar (Figura 27), sin embargo, difieren en el número de sitios de unión por célula (288000 vs. 88000).

### **7.6.3. Residuos críticos en la interacción HABP-GRh**

Estudios previos han mostrado que las regiones de unión a las células hospederas, es decir los HABPs, son útiles en el diseño de subunidades que puedan ser incluidas en una vacuna sintética contra la malaria, que incluya diferentes proteínas de los tres estadios infectivos del parásito [5, 203]. El primer paso es identificar cuáles son los residuos directamente responsables de la unión de los HABPs a los GRh. Para esto, se realiza un ensayo de unión competitiva entre el péptido original (HABP) radiomarcado y los análogos de glicina (competidor) a tres diferentes concentraciones. Se considera que si el péptido competidor no desplaza al menos un 50% la unión del péptido original, el cambio del residuo original por glicina afectó la unión y, por lo tanto, es un residuo crítico para la unión del HABP al GR [38].

En la Figura 29, se observa a modo de ejemplo las gráficas para la determinación de los residuos críticos (N424, L425, I426) en la unión del HABP 37672 a GR y en la tabla anexa, los residuos críticos para los HABPs 37663, 37665, 37736, 37742 y 37745. Se encontró además, que los HABPs 37740 y 37744 no presentan residuos críticos en la unión a GR, lo que sugiere que todos los residuos participan de igual manera en la unión, de tal forma que el reemplazo de solo uno no afecta la unión.

Para determinar la importancia de los residuos críticos en la inducción de respuestas inmunes protectoras, es necesario diseñar y sintetizar péptidos análogos a los HABPs (HABPs modificados), en los cuales se reemplaza el o los residuos críticos de acuerdo a sus características fisicoquímicas [5]. Posteriormente, los resultados de la inmunización de los monos *Aotus* y del reto experimental, nos dirán cual o cuales de las modificaciones fueron las más adecuadas para inducir respuesta inmune protectora.



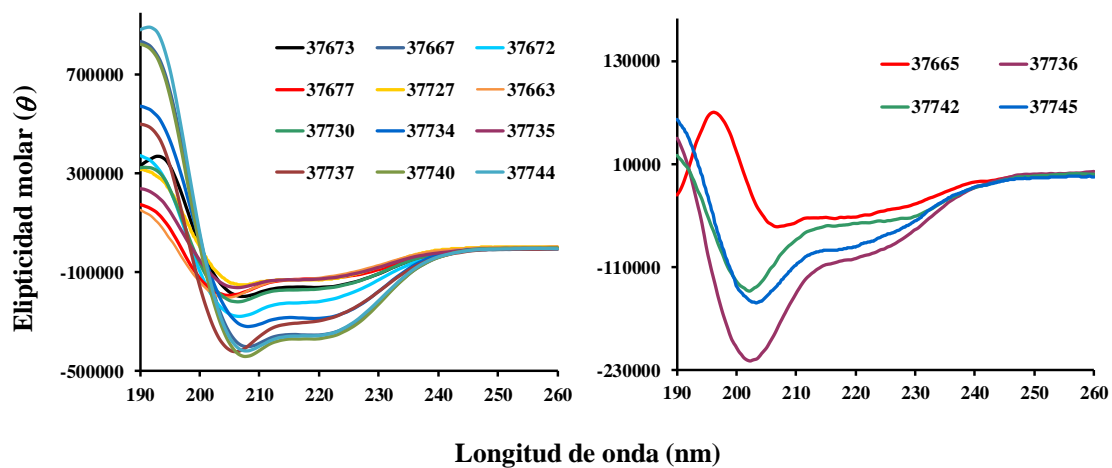
**Figura 29. Residuos críticos para la unión de HABPs a GR humanos.** **A.** Para este ensayo, se sintetizaron péptidos análogos, en los cuales se reemplaza cada uno de los residuos por glicina. El ensayo de unión es similar al inicial, excepto que la inhibición de la unión del HABP radiomarcado, se hace con cada uno de los análogos de glicina y con el HABP sin radiomarcado como control de la unión. Si el análogo de glicina no es capaz de desplazar al péptido original por lo menos en un 50%, se considera que el residuo cambiado es crítico en la unión. **B.** Se resaltan en negrilla los residuos críticos determinados para cada uno de los HABPs. Los HABPs 37740 y 37744 no presentaron residuos críticos en la unión a GR.

En un trabajo publicado recientemente, se probó la reactividad de sueros humanos contra 91 proteínas recombinantes que representan la mayoría de las proteínas de membrana y organelos del merozoito [204]. De las proteínas localizadas en el cuello de las roprrias se incluyeron RON2 (C y N terminal), RON3 (N y C terminal), RON4 y RON6, y se encontró que había altos niveles de anticuerpos contra RON2, que muestran fuerte asociación con inmunidad protectora [204]. En un ensayo preliminar, el HABP modificado 38556 (KIRNYRDKESSFTIL**S**T**F**M**F**), análogo del HABP 3774, indujo respuesta inmune de anticuerpos (aunque no protectora) en monos *Aotus* (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que los anticuerpos inducidos reconocen a la proteína *Pf*RON5 en esquizontes de la cepa FCB-2 (Figura 19), este resultado, junto con el hecho de que

la proteína rPfRON5F1 es reconocida por sueros de pacientes con episodios de malaria (Figura 24), sugieren que valdría la pena hacer un ensayo similar al reportado arriba por Richards, para evaluar la antigenicidad de PfRON5 y sus HABPs. Además, podrían realizarse estudios adicionales de inmunogenicidad en la búsqueda de subunidades candidatas a ser incluidas en una vacuna contra la malaria.

#### 7.6.4. Estructura secundaria de los HABPs de la proteína PfRON5

La estructura de los HABPs derivados de PfRON5 fue determinada por difracción circular (DC) y luego de la deconvolución de los datos [179, 180], se encontró que los HABPs presentan diferentes elementos estructurales en su estructura secundaria (hebras beta, hélices alfa y estructura al azar), aunque la mayoría presentan predominantemente estructura de hélice alfa (Figura 30). De manera interesante, en trabajos previos se ha reportado que HABPs y HABPs modificados derivados de proteínas localizadas en las roptrias, presentan preferencialmente estructura de alfa hélice, lo que se ha relacionado directamente con la capacidad de los HABPs modificados de unirse con alta afinidad a moléculas específicas del sistema inmune [205].



**Figura 30. Estructura secundaria por DC de los HABPs.** La mayoría de los HABPs presentan estructura de alfa hélice (derecha), con espectro característico con máximo alrededor de 190nm y dos mínimos alrededor de 208 y 222nm. Algunos HABPs presentan estructura desordenada o de hojas beta (izquierda).

Aunque algunos autores plantean que la estructura de péptidos cortos no representa la estructura correspondiente de la proteína nativa [206], nuestros resultados previos de la estructura

tridimensional determinada por resonancia magnética nuclear (NMR, del inglés nuclear magnetic resonance) de algunos HABPs derivados de las proteínas EBA-175, TRAP, AMA-1 y MSP-1, muestran que la estructura es prácticamente la misma que la determinada por cristalografía de rayos X con proteínas recombinantes completas [207]. De tal forma, que la obtención de la estructura por DC de los HABPs, nos aproxima acertadamente a la estructura que la región donde están incluidos los HABPs tendrá en la proteína nativa.

#### **7.6.5. HABPs de *Pf*RON5 inhiben *in vitro* la invasión de merozoítos a GRh**

Para establecer si la proteína *Pf*RON5 tiene un papel fundamental en la invasión a GR, se determinó el efecto de los HABPs sobre la reinvasión de los merozoítos a GR humanos, en un cultivo *in vitro* [67, 181]. En la Tabla 3, se observa que los HABPs inhiben la invasión entre un 6 a un 37%, y que este efecto inhibitorio es dependiente de la concentración, lo que indica que los HABPs se unen a los GR, impiden la unión del merozoito al GR y reducen la capacidad infectiva de los merozoítos. Es interesante observar que la proteína *rPf*RON5F1, que incluye los HABPs 67663 y 67665, inhibe fuertemente la invasión de los merozoitos a los GR y que la actividad inhibitoria de los HABPs aumenta cuando se usan en mezclas (Tabla 4).

Para determinar la especificidad del efecto inhibitorio de los HABPs sobre el proceso de invasión, se probó el efecto de los péptidos de secuencia desordenada (análogos de los HABPs), en la invasión de merozoitos a GR. Se encontró que los péptidos de secuencia desordenada tienen un efecto mínimo sobre la invasión. Este resultado sugiere, una vez más, que la actividad de unión de los HABPs y su capacidad inhibitoria de la invasión es dependiente de la secuencia de aminoácidos y no de su composición, de tal forma que para este caso se puede plantear una relación secuencia-actividad de unión.

Estos resultados de unión y de la especificidad de la misma, junto con los descritos en los apartes anteriores, que muestran que la proteína *Pf*RON5 es conservada y se expresa en el cuello de la roptrias de estadios del parásito relacionados con la invasión, que regiones de unión (recombinante o HABPs) inhiben la invasión *in vitro* del merozoito a GRh y que resultados preliminares muestran que un HABP modificado induce respuesta inmune en monos *Aotus*, sugieren que la proteína *Pf*RON5 desempeña un papel fundamental en la invasión. Igualmente,

los 16 HABPs de la proteína *Pf*RON5 con secuencia conservada son excelentes candidatos para ser incluidos en estudios inmunológicos para evaluar su potencial como subunidad en una vacuna contra la malaria.

**Tabla 4. Inhibición de la invasión de merozoitos a GR por HABPs de *Pf*RON5**

| Inhibidor                    | Inhibición de la invasión (%) <sup>a</sup> |             |             |    |
|------------------------------|--|-------------|-------------|----|
|                              | 50 $\mu$ M                                 | 100 $\mu$ M | 200 $\mu$ M |    |
| <b>HABPs</b>                 | 37663                                      | 14          | 17          | 20 |
|                              | 37665                                      | 18          | 23          | 32 |
|                              | 37667                                      | 14          | 19          | 26 |
|                              | 37672                                      | 13          | 18          | 31 |
|                              | 37673                                      | 17          | 22          | 30 |
|                              | 37677                                      | 18          | 23          | 27 |
|                              | 37730                                      | 12          | 28          | 54 |
|                              | 37734                                      | 12          | 12          | 22 |
|                              | 37736                                      | 17          | 19          | 26 |
|                              | 37737                                      | 17          | 26          | 38 |
|                              | 37740                                      | 17          | 25          | 33 |
|                              | 37742                                      | 14          | 23          | 48 |
|                              | 37745                                      | 6           | 16          | 27 |
|                              | <b>Mezcla de HABPs</b>                     | 37663/37665 |             | 48 |
| 37665/37667                  |  |             | 51          |    |
| 37672/37673                  |  |             | 58          |    |
| 37677/37727                  |  |             | 49          |    |
| 37734/37735                  |  |             | 48          |    |
| 37736/37737                  |  |             | 50          |    |
| 37740/37742                  |  |             | 50          |    |
| 37744/37745                  |  |             | 54          |    |
| <b>Péptidos desordenados</b> | 38660 ( <b>37762</b> )                     | 1           | 9           | 12 |
|                              | 38663 ( <b>37736</b> )                     | 0           | 8           | 16 |
|                              | 38661 ( <b>37740</b> )                     | 3           | 7           | 13 |
|                              | 38662 (37744)                              | 9           | 13          | 14 |
| <b>r<i>Pf</i>RON5F1</b>      |  | 22          | 43          | 92 |
| LABP                         | 37751                                      | 4           | 6           | 7  |
| Cloroquina                   | (0,93 mg/mL)                               |             |             | 92 |

<sup>a</sup> Las desviaciones estandar fueron menores del 10%



## 8. Conclusiones

- El gen MAL8P1.73 se transcribe en el estadio eritrocítico de la cepa FCB-2 de *P. falciparum*.
- La secuencia de aminoácidos de la proteína *PfRON5* de las cepas FCB-2 y PAS-2 presenta baja variabilidad respecto a la cepa de referencia 3D7.
- La proteína *PfRON5* se localiza en el cuello de las roptrias de merozoitos de la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum*.
- La proteína *PfRON5* tiene péptido señal y dos DTMs predichos, que sugiere que las regiones amino- y carboxi-terminal se encuentran expuestas para la interacción con la membrana de los GR.
- Las proteínas recombinantes *rPfRON5F1* y *rPfRON5F4*, que contienen las regiones amino- y carboxi-terminal, respectivamente, se unen a receptores sobre la membrana de los GRhs.
- La proteína recombinante *rPfRON5F1* inhibe la invasión *in vitro* de merozoítos a GRh y es reconocida por sueros de pacientes con infección natural por *P. falciparum*.
- Se identificaron dieciséis péptidos en la proteína *PfRON5* que presentan unión específica a proteínas de la membrana de GRh sensible al tratamiento con tripsina y quimotripsina.
- Los HABPs de la proteína *PfRON5* inhiben en forma aditiva y dependiente de la concentración la invasión *in vitro* de merozoitos a GRh.

## 9. Perspectivas

- Para determinar cómo y con cuál proteína está interactuando *PfRON5* en el complejo RON2/RON4/RON5, se deben hacer ensayos de interacción proteína-proteína o péptido-proteína. Es necesario obtener fragmentos recombinantes de diferentes longitudes de las proteínas *PfRON2* y *PfRON4* para determinar cuáles interactúan entre sí, y luego con péptidos sintéticos cortos, determinar las regiones involucradas en esta interacción.
- Para determinar con certeza la identidad del receptor en membrana de GR para *PfRON5*, se pueden realizar ensayos de entrecruzamiento luego del ensayo de unión o de inmunoprecipitación, utilizando los anticuerpos policlonales anti-péptidos de *PfRON5*, y finalmente las proteínas aisladas se pueden identificar por espectrometría de masas-masas.
- Para determinar la inclusión de los HABPs de la proteína *PfRON5* en una vacuna sintética multiantígeno, multiestadio de subunidades, es necesario evaluar en monos *Aotus* la inmunogenicidad y la capacidad protectora de los HABPs modificados ante el reto experimental con el parásito *Plasmodium falciparum*.

## 10. Bibliografía

1. WHO, *World Malaria Report 2009*, W.H. Organization, Editor 2011, World Health Organization.
2. Good, M.F., *Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 117-25.
3. Ridley, R.G., *Malaria: to kill a parasite*. Nature, 2003. **424**(6951): p. 887-9.
4. Patarroyo, M.E., et al., *A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 1988. **332**(6160): p. 158-61.
5. Patarroyo, M.E. and M.A. Patarroyo, *Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines*. Acc Chem Res, 2008. **41**(3): p. 377-86.
6. Patarroyo, M.E., A. Bermudez, and M.A. Patarroyo, *Structural and Immunological Principles Leading to Chemically Synthesized, Multiantigenic, Multistage, Minimal Subunit-Based Vaccine Development*. Chem Rev, 2011.
7. Tsuji, M. and F. Zavala, *Peptide-based subunit vaccines against pre-erythrocytic stages of malaria parasites*. Mol Immunol, 2001. **38**(6): p. 433-42.
8. Matuschewski, K., *Vaccine development against malaria*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 449-57.
9. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
10. Foth, B.J., et al., *Quantitative time-course profiling of parasite and host cell proteins in the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Mol Cell Proteomics, 2011.
11. Sims, P.F. and J.E. Hyde, *Proteomics of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Expert Rev Proteomics, 2006. **3**(1): p. 87-95.
12. Bozdech, Z., et al., *The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E5.
13. Proellocks, N.I., R.L. Coppel, and K.L. Waller, *Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins*. Trends Parasitol, 2010. **26**(6): p. 297-304.
14. Cowman, A.F., et al., *Functional analysis of Plasmodium falciparum merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002. **357**(1417): p. 25-33.
15. Alexander, D.L., et al., *Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles*. PLoS Pathog, 2005. **1**(2): p. e17.
16. Baum, J., et al., *Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma*. Trends Parasitol, 2008. **24**(12): p. 557-63.
17. Straub, K.W., et al., *Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements*. Cell Microbiol, 2009. **11**(4): p. 590-603.
18. Kaneko, O., *Erythrocyte invasion: vocabulary and grammar of the Plasmodium rhoptry*. Parasitol Int, 2007. **56**(4): p. 255-62.
19. Alexander, D.L., et al., *Plasmodium falciparum AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(7): p. 1169-73.
20. Cao, J., et al., *Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites*. Parasitol Int, 2009. **58**(1): p. 29-35.

21. Morahan, B.J., et al., *Plasmodium falciparum*: genetic and immunogenic characterisation of the rhoptry neck protein PfRON4. *Exp Parasitol*, 2009. **122**(4): p. 280-8.
22. Proellocks, N.I., et al., *Characterisation of PfRON6, a Plasmodium falciparum rhoptry neck protein with a novel cysteine-rich domain*. *Int J Parasitol*, 2009. **39**(6): p. 683-92.
23. Collins, C.R., et al., *An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(1): p. e1000273.
24. WHO, *World Malaria Report 2012*, W.H. Organization, Editor 2012, World Health Organization.
25. Rowe, J.A., et al., *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications*. *Expert Rev Mol Med*, 2009. **11**: p. e16.
26. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. *Lancet*, 2012. **379**(9832): p. 2151-61.
27. Murray, C.J., et al., *Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis*. *Lancet*, 2012. **379**(9814): p. 413-31.
28. Cogswell, F.B., *The hypnozoite and relapse in primate malaria*. *Clin Microbiol Rev*, 1992. **5**(1): p. 26-35.
29. Sabbatani, S., S. Fiorino, and R. Manfredi, *The emerging of the fifth malaria parasite (Plasmodium knowlesi): a public health concern?* *Braz J Infect Dis*, 2010. **14**(3): p. 299-309.
30. Antinori, S., et al., *Plasmodium knowlesi: the emerging zoonotic malaria parasite*. *Acta Trop*, 2013. **125**(2): p. 191-201.
31. Grupo ETV - INS, *Semana Epidemiológica 31 (28 de julio – 3 de agosto de 2013)*. 2013. **Boletín: Agosto 10 de 2013**.
32. Feachem, R.G., et al., *Shrinking the malaria map: progress and prospects*. *Lancet*, 2010. **376**(9752): p. 1566-78.
33. Gamble, C., et al., *Insecticide-treated nets for the prevention of malaria in pregnancy: a systematic review of randomised controlled trials*. *PLoS Med*, 2007. **4**(3): p. e107.
34. Miller, L.H., et al., *Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments*. *Nat Med*, 2013. **19**(2): p. 156-67.
35. Schwartz, L., et al., *A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table*. *Malar J*, 2012. **11**: p. 11.
36. Tyagi, R.K., N.K. Garg, and T. Sahu, *Vaccination Strategies against Malaria: novel carrier(s) more than a tour de force*. *J Control Release*, 2012. **162**(1): p. 242-54.
37. Patarroyo, M.E., A. Bermudez, and M.A. Patarroyo, *Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development*. *Chem Rev*, 2011. **111**(5): p. 3459-507.
38. Rodriguez, L.E., et al., *Intimate molecular interactions of P. falciparum merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design*. *Chem Rev*, 2008. **108**(9): p. 3656-705.
39. Curtidor, H., et al., *Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine*. *Curr Med Chem*, 2011. **18**(29): p. 4470-502.
40. Curtidor, H., et al., *Plasmodium falciparum acid basic repeat antigen (ABRA) peptides: erythrocyte binding and biological activity*. *Vaccine*, 2001. **19**(31): p. 4496-504.

41. Patarroyo, M.A., et al., *3D analysis of the TCR/pMHCII complex formation in monkeys vaccinated with the first peptide inducing sterilizing immunity against human malaria*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9771.
42. Gonzalez, V., et al., *Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(3): p. 259-72.
43. Plattner, F. and D. Soldati-Favre, *Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 471-87.
44. Prudencio, M., A. Rodriguez, and M.M. Mota, *The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 849-56.
45. Gueirard, P., et al., *Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18640-5.
46. Pradel, G. and U. Frevert, *Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1154-65.
47. Mota, M.M., J.C. Hafalla, and A. Rodriguez, *Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1318-22.
48. Frevert, U., et al., *Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes*. J Exp Med, 1993. **177**(5): p. 1287-98.
49. Muller, H.M., E. Scarselli, and A. Crisanti, *Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of Plasmodium falciparum in parasite-host cell interactions*. Parasitologia, 1993. **35 Suppl**: p. 69-72.
50. Kappe, S.H., K. Kaiser, and K. Matuschewski, *The Plasmodium sporozoite journey: a rite of passage*. Trends Parasitol, 2003. **19**(3): p. 135-43.
51. Ishino, T., et al., *Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer*. PLoS Biol, 2004. **2**(1): p. E4.
52. Ishino, T., Y. Chinzei, and M. Yuda, *A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection*. Cell Microbiol, 2005. **7**(2): p. 199-208.
53. Kariu, T., et al., *CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts*. Mol Microbiol, 2006. **59**(5): p. 1369-79.
54. Moreira, C.K., et al., *The Plasmodium TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites*. Cell Microbiol, 2008. **10**(7): p. 1505-16.
55. Bhanot, P., et al., *A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6752-60.
56. Sultan, A.A., et al., *TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites*. Cell, 1997. **90**(3): p. 511-22.
57. Silvie, O., et al., *A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9490-6.
58. Jethwaney, D., et al., *Fetuin-A, a hepatocyte-specific protein that binds Plasmodium berghei thrombospondin-related adhesive protein: a potential role in infectivity*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5883-91.
59. Silvie, O., et al., *Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 93-6.
60. Ghosh, A., M.J. Edwards, and M. Jacobs-Lorena, *The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century*. Parasitol Today, 2000. **16**(5): p. 196-201.

61. Fujioka, H. and M. Aikawa, *Structure and life cycle*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 1-26.
62. Cowman, A.F., D. Berry, and J. Baum, *The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell*. J Cell Biol, 2012. **198**(6): p. 961-71.
63. Bannister, L.H. and I.W. Sherman, *Plasmodium*. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009.
64. Good, M.F., D.C. Kaslow, and L.H. Miller, *Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 57-87.
65. Sturm, A., et al., *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*. Science, 2006. **313**(5791): p. 1287-90.
66. Baer, K., et al., *Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature*. PLoS Pathog, 2007. **3**(11): p. e171.
67. Trager, W. and J.B. Jensen, *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 1976. **193**(4254): p. 673-5.
68. Oakley, M.S., et al., *Clinical and molecular aspects of malaria fever*. Trends Parasitol, 2011. **27**(10): p. 442-9.
69. Bannister, L.H., et al., *A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. Parasitol Today, 2000. **16**(10): p. 427-33.
70. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
71. Cowman, A.F. and B.S. Crabb, *Invasion of red blood cells by malaria parasites*. Cell, 2006. **124**(4): p. 755-66.
72. Barnwell, J.W.y.G., M.R., *Invasion of Vertebrate Cells: Erythrocytes*. In: *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. 1998: p. 93-120.
73. Aikawa, M., et al., *Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite*. J Cell Biol, 1978. **77**(1): p. 72-82.
74. Bannister, L.H., et al., *Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro*. Parasitology, 1975. **71**(3): p. 483-91.
75. Ladda, R., M. Aikawa, and H. Sprinz, *Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites*. J Parasitol, 1969. **55**(3): p. 633-44.
76. Preiser, P., et al., *The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion*. Microbes Infect, 2000. **2**(12): p. 1461-77.
77. Yeoh, S., et al., *Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1072-83.
78. Langreth, S.G., et al., *Fine structure of human malaria in vitro*. J Protozool, 1978. **25**(4): p. 443-52.
79. Bannister, L.H., et al., *Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 18): p. 3825-34.
80. Kats, L.M., et al., *Plasmodium rhoptries: how things went pear-shaped*. Trends Parasitol, 2006. **22**(6): p. 269-76.
81. Bannister, L.H., et al., *Ultrastructure of rhoptry development in Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts*. Parasitology, 2000. **121** ( Pt 3): p. 273-87.
82. Speer, C.A., et al., *Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of Neospora caninum and Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 1999. **29**(10): p. 1509-19.

83. Blackman, M.J. and L.H. Bannister, *Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **117**(1): p. 11-25.
84. Bradley, P.J., et al., *Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in Toxoplasma gondii*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 34245-58.
85. Curtidor, H., et al., *Identification of the Plasmodium falciparum rhoptry neck protein 5 (PfRON5)*. Gene, 2011. **474**(1-2): p. 22-8.
86. Ito, D., et al., *Plasmodial ortholog of Toxoplasma gondii rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body*. Parasitol Int, 2011. **60**(2): p. 132-8.
87. O'Keeffe, A.H., et al., *A novel Sushi domain-containing protein of Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **140**(1): p. 61-8.
88. Srivastava, A., et al., *Localization of apical sushi protein in Plasmodium falciparum merozoites*. Mol Biochem Parasitol, 2010. **174**(1): p. 66-9.
89. Galinski, M.R., et al., *A reticulocyte-binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1213-26.
90. Rayner, J.C., et al., *A Plasmodium falciparum homologue of Plasmodium vivax reticulocyte binding protein (PvRBPI) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1571-81.
91. Triglia, T., et al., *Identification of proteins from Plasmodium falciparum that are homologous to reticulocyte binding proteins in Plasmodium vivax*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 1084-92.
92. Kaneko, O., et al., *Gene structure and expression of a Plasmodium falciparum 220-kDa protein homologous to the Plasmodium vivax reticulocyte binding proteins*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(2): p. 275-8.
93. Baum, J., et al., *Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol, 2009. **39**(3): p. 371-80.
94. Crosnier, C., et al., *Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 534-7.
95. Spadafora, C., et al., *Complement receptor 1 is a sialic acid-independent erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog, 2010. **6**(6): p. e1000968.
96. Tham, W.H., et al., *Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17327-32.
97. Adams, J.H., et al., *A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7085-9.
98. Sim, B.K., et al., *Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1941-4.
99. Sim, B.K., et al., *Primary structure of the 175K Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion*. J Cell Biol, 1990. **111**(5 Pt 1): p. 1877-84.
100. Mayer, D.C., et al., *Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5222-7.
101. Thompson, J.K., et al., *A novel ligand from Plasmodium falciparum that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes*. Mol Microbiol, 2001. **41**(1): p. 47-58.

102. Gilberger, T.W., et al., *A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from Plasmodium falciparum defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14480-6.
103. Peterson, D.S. and T.E. Wellems, *EBL-1, a putative erythrocyte binding protein of Plasmodium falciparum, maps within a favored linkage group in two genetic crosses*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **105**(1): p. 105-13.
104. Peterson, M.G., et al., *Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 3151-4.
105. Bei, A.K. and M.T. Duraisingh, *Functional analysis of erythrocyte determinants of Plasmodium infection*. Int J Parasitol, 2012. **42**(6): p. 575-82.
106. Kato, K., et al., *Domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5552-7.
107. Srinivasan, P., et al., *Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(32): p. 13275-80.
108. Lamarque, M., et al., *The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001276.
109. Besteiro, S., et al., *Export of a Toxoplasma gondii rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000309.
110. Trager, W., et al., *Transfer of a dense granule protein of Plasmodium falciparum to the membrane of ring stages and isolation of dense granules*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4656-61.
111. Koussis, K., et al., *A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion*. EMBO J, 2009. **28**(6): p. 725-35.
112. Dvorak, J.A., et al., *Invasion of erythrocytes by malaria merozoites*. Science, 1975. **187**(4178): p. 748-50.
113. Singh, S., et al., *Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000746.
114. Carruthers, V.B. and L.D. Sibley, *Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts*. Eur J Cell Biol, 1997. **73**(2): p. 114-23.
115. Boothroyd, J.C. and J.F. Dubremetz, *Kiss and spit: the dual roles of Toxoplasma rhoptries*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(1): p. 79-88.
116. Harvey, K.L., P.R. Gilson, and B.S. Crabb, *A model for the progression of receptor-ligand interactions during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol, 2012. **42**(6): p. 567-73.
117. Miller, L.H., et al., *Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation*. J Exp Med, 1979. **149**(1): p. 172-84.
118. Kauth, C.W., et al., *Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31517-27.
119. Li, X., et al., *A co-ligand complex anchors Plasmodium falciparum merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5765-71.
120. Ranjan, R., et al., *Proteome analysis reveals a large merozoite surface protein-1 associated complex on the Plasmodium falciparum merozoite surface*. J Proteome Res, 2011. **10**(2): p. 680-91.



121. Lew, V.L. and T. Tiffert, *Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events?* Trends Parasitol, 2007. **23**(10): p. 481-4.
122. McCallum-Deighton, N. and A.A. Holder, *The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol, 1992. **50**(2): p. 317-23.
123. Treeck, M., et al., *Caught in action: mechanistic insights into antibody-mediated inhibition of Plasmodium merozoite invasion.* Trends Parasitol, 2009. **25**(11): p. 494-7.
124. Mitchell, G.H., et al., *Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells.* Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 154-8.
125. Triglia, T., et al., *Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species.* Mol Microbiol, 2000. **38**(4): p. 706-18.
126. Li, J. and E.T. Han, *Dissection of the Plasmodium vivax reticulocyte binding-like proteins (PvRBPs).* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **426**(1): p. 1-6.
127. Kappe, S.H., et al., *That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda.* Science, 2010. **328**(5980): p. 862-6.
128. Mital, J., et al., *Conditional expression of Toxoplasma gondii apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4341-9.
129. Howell, S.A., et al., *Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31311-20.
130. Healer, J., et al., *Independent translocation of two micronemal proteins in developing Plasmodium falciparum merozoites.* Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5751-8.
131. Srinivasan, P., et al., *Disrupting malaria parasite AMA1-RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 2261.
132. Chitnis, C.E., et al., *The domain on the Duffy blood group antigen for binding Plasmodium vivax and P. knowlesi malarial parasites to erythrocytes.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1531-6.
133. Gaur, D., D.C. Mayer, and L.H. Miller, *Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites.* Int J Parasitol, 2004. **34**(13-14): p. 1413-29.
134. Taylor, H.M., M. Grainger, and A.A. Holder, *Variation in the expression of a Plasmodium falciparum protein family implicated in erythrocyte invasion.* Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5779-89.
135. Duraisingh, M.T., et al., *Phenotypic variation of Plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes.* EMBO J, 2003. **22**(5): p. 1047-57.
136. Gaur, D., et al., *Plasmodium falciparum is able to invade erythrocytes through a trypsin-resistant pathway independent of glycophorin B.* Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 6742-6.
137. Pasvol, G., J.S. Wainscoat, and D.J. Weatherall, *Erythrocytes deficiency in glycophorin resist invasion by the malarial parasite Plasmodium falciparum.* Nature, 1982. **297**(5861): p. 64-6.
138. Iyer, J., et al., *Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families.* Mol Microbiol, 2007. **65**(2): p. 231-49.
139. Gunalan, K., et al., *The role of the reticulocyte-binding-like protein homologues of Plasmodium in erythrocyte sensing and invasion.* Cell Microbiol, 2013. **15**(1): p. 35-44.

140. Blackman, M.J., et al., *A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.* J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 379-82.
141. Baker, R.P., R. Wijetilaka, and S. Urban, *Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria.* PLoS Pathog, 2006. **2**(10): p. e113.
142. Bannister, L.H. and G.H. Mitchell, *The fine structure of secretion by Plasmodium knowlesi merozoites during red cell invasion.* J Protozool, 1989. **36**(4): p. 362-7.
143. Klotz, F.W., et al., *A 60-kDa Plasmodium falciparum protein at the moving junction formed between merozoite and erythrocyte during invasion.* Mol Biochem Parasitol, 1989. **36**(2): p. 177-85.
144. Lebrun, M., et al., *The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion.* Cell Microbiol, 2005. **7**(12): p. 1823-33.
145. Straub, K.W., et al., *The moving junction protein RON8 facilitates firm attachment and host cell invasion in Toxoplasma gondii.* PLoS Pathog, 2011. **7**(3): p. e1002007.
146. Carruthers, V. and J.C. Boothroyd, *Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion.* Curr Opin Microbiol, 2007. **10**(1): p. 83-9.
147. Richard, D., et al., *Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites.* J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14815-22.
148. Knuepfer, E., et al., *RON12, a novel Plasmodium-specific rhoptry neck protein important for parasite proliferation.* Cell Microbiol, 2013.
149. Hans, N., et al., *Identification of novel rhoptry neck protein of Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol, 2013. **188**(1): p. 34-9.
150. Tyler, J.S. and J.C. Boothroyd, *The C-terminus of Toxoplasma RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex.* PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001282.
151. Vulliez-Le Normand, B., et al., *Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex.* PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002755.
152. Hossain, M.E., S. Dhawan, and A. Mohammed, *The cysteine-rich regions of Plasmodium falciparum RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion.* Parasitol Res, 2012. **110**(5): p. 1711-21.
153. Tonkin, M.L., et al., *Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide.* Science, 2011. **333**(6041): p. 463-7.
154. Giovannini, D., et al., *Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa.* Cell Host Microbe, 2011. **10**(6): p. 591-602.
155. Wheelan, S.J., D.M. Church, and J.M. Ostell, *Spidey: a tool for mRNA-to-genomic alignments.* Genome Res, 2001. **11**(11): p. 1952-7.
156. Aurrecochea, C., et al., *PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D539-43.
157. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.* Biotechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
158. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information.* Bioinformatics, 2005. **21 Suppl 1**: p. i251-7.

159. Quevillon, E., et al., *InterProScan: protein domains identifier*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W116-20.
160. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. J Mol Biol, 2004. **338**(5): p. 1027-36.
161. Hofmann K and W. Stoffel, *TMbase - a database of membrane spanning proteins segments*. Biol Chem Hoppe-Seyler, 1993. **374**: p. 166.
162. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): p. 567-80.
163. Arai, M., et al., *ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W390-3.
164. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): p. 4673-80.
165. Deleage, G., et al., *ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities*. Comput Biol Med, 2001. **31**(4): p. 259-67.
166. Larsen, J.E., O. Lund, and M. Nielsen, *Improved method for predicting linear B-cell epitopes*. Immunome Res, 2006. **2**: p. 2.
167. Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. J. Am. Chem. Soc., 1963. **85**: p. 2149-2154.
168. Houghten, R.A., *General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 5131-5.
169. Lioy, E., et al., *Synthesis, Biological, and Immunological Properties of Cyclic Peptides from Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein-1 This work was supported by a long-term fellowship of the Human Frontier Science Program Organization (HFSP-0-LT 25/97) and by a Research Grant from the Roche Research Foundation*. Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**(14): p. 2631-2635.
170. Patarroyo, M.E., et al., *Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides*. Nature, 1987. **328**(6131): p. 629-32.
171. Urquiza, M., et al., *Identification of Plasmodium falciparum MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells*. Parasite Immunol, 1996. **18**(10): p. 515-26.
172. Torres, M.H., et al., *Modified merozoite surface protein-1 peptides with short alpha helical regions are associated with inducing protection against malaria*. Eur J Biochem, 2003. **270**(19): p. 3946-52.
173. Pinzon, C.G., et al., *Studies of Plasmodium falciparum rhoptry-associated membrane antigen (RAMA) protein peptides specifically binding to human RBC*. Vaccine, 2008. **26**(6): p. 853-62.
174. Wilcoxon, F., *Individual Comparisons by Ranking Methods*. Biometrics Bulletin, 1945. **1**: p. 80-83.
175. Merrifield, R., *Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide*. J Am Chem Soc, 1963. **85**: p. 2149.
176. Tam, J.P., W.F. Heath, and R.B. Merrifield, *SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction*. Int J Pept Protein Res, 1983. **21**(1): p. 57-65.

177. Stothard, P., *The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences*. Biotechniques, 2000. **28**(6): p. 1102, 1104.
178. Roccatano, D., et al., *Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12179-84.
179. Sreerama, N., S.Y. Venyaminov, and R.W. Woody, *Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy*. Protein Sci, 1999. **8**(2): p. 370-80.
180. Compton, L.A. and W.C. Johnson, Jr., *Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication*. Anal Biochem, 1986. **155**(1): p. 155-67.
181. Lambros, C. and J.P. Vanderberg, *Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture*. J Parasitol, 1979. **65**(3): p. 418-20.
182. van der Heyde, H.C., et al., *Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects of leukocytes on the malarial parasite Plasmodium falciparum*. Clin Diagn Lab Immunol, 1995. **2**(4): p. 417-25.
183. Wyatt, C.R., W. Goff, and W.C. Davis, *A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites*. J Immunol Methods, 1991. **140**(1): p. 23-30.
184. Manske, M., et al., *Analysis of Plasmodium falciparum diversity in natural infections by deep sequencing*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 375-9.
185. Takala, S.L. and C.V. Plowe, *Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'*. Parasite Immunol, 2009. **31**(9): p. 560-73.
186. Escalante, A.A., A.A. Lal, and F.J. Ayala, *Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Genetics, 1998. **149**(1): p. 189-202.
187. Nicholas, K.B. and J. Nicholas, H.B., *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.* [http://www.psc.edu/biomed/genedoc\[Online.\]](http://www.psc.edu/biomed/genedoc[Online.]), 1997.
188. Ogun, S.A. and A.A. Holder, *Plasmodium yoelii: brefeldin A-sensitive processing of proteins targeted to the rhoptries*. Exp Parasitol, 1994. **79**(3): p. 270-8.
189. Topolska, A.E., et al., *Characterization of a membrane-associated rhoptry protein of Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4648-56.
190. Stewart, M.J., S. Schulman, and J.P. Vanderberg, *Rhoptry secretion of membranous whorls by Plasmodium falciparum merozoites*. Am J Trop Med Hyg, 1986. **35**(1): p. 37-44.
191. Cooper, J.A., et al., *The 140/130/105 kilodalton protein complex in the rhoptries of Plasmodium falciparum consists of discrete polypeptides*. Mol Biochem Parasitol, 1988. **29**(2-3): p. 251-60.
192. Zuccala, E.S., et al., *Subcompartmentalisation of proteins in the rhoptries correlates with ordered events of erythrocyte invasion by the blood stage malaria parasite*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46160.
193. Counihan, N.A., et al., *Plasmodium rhoptry proteins: why order is important*. Trends Parasitol, 2013. **29**(5): p. 228-36.
194. Arevalo-Pinzon, G., et al., *A single amino acid change in the Plasmodium falciparum RH5 (PfRH5) human RBC binding sequence modifies its structure and determines species-specific binding activity*. Vaccine, 2012. **30**(3): p. 637-46.

195. Garcia, J., et al., *Conserved regions of the Plasmodium falciparum rhoptry-associated protein 3 mediate specific host-pathogen interactions during invasion of red blood cells.* Peptides, 2010. **31**(12): p. 2165-72.
196. Harrison, T., et al., *Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection.* Science, 2003. **301**(5640): p. 1734-6.
197. Attie, A.D. and R.T. Raines, *Analysis of Receptor-Ligand Interactions.* Journal of Chemical Education 1995. **72**(2): p. 119-124.
198. Persson, K.E., et al., *Variation in use of erythrocyte invasion pathways by Plasmodium falciparum mediates evasion of human inhibitory antibodies.* J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 342-51.
199. Pasvol, G., *Receptors on red cells for Plasmodium falciparum and their interaction with merozoites.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1984. **307**(1131): p. 189-200.
200. Goel, V.K., et al., *Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5164-9.
201. Baum, J., et al., *Invasion by P. falciparum merozoites suggests a hierarchy of molecular interactions.* PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e37.
202. Dolan, S.A., et al., *Glycophorin B as an EBA-175 independent Plasmodium falciparum receptor of human erythrocytes.* Mol Biochem Parasitol, 1994. **64**(1): p. 55-63.
203. Espejo, F., et al., *Structure, Immunogenicity, and Protectivity Relationship for the 1585 Malarial Peptide and Its Substitution Analogues.* Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**(24): p. 4654-4657.
204. Richards, J.S., et al., *Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development.* J Immunol, 2013. **191**(2): p. 795-809.
205. Reyes, C., et al., *Functional, structural, and immunological compartmentalisation of malaria invasive proteins.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(2): p. 363-71.
206. Corradin, G., et al., *Malaria vaccine development using synthetic peptides as a technical platform.* Adv Immunol, 2012. **114**: p. 107-49.
207. Patarroyo, M.E., et al., *Atomic fidelity of subunit-based chemically-synthesized antimalarial vaccine components.* Prog Biophys Mol Biol, 2010. **102**(1): p. 38-44.

## 11. Aspectos éticos

Para la elaboración de este trabajo, se utilizaron dos conejos Nueva Zelanda con el fin de obtener anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de la proteína PfRON5. El manejo de estos animales, se realizó teniendo en cuenta el título V: La investigación biomédica con animales, de La Resolución Número 8430 de 1993, proclamada por el Ministerio de salud de Colombia. La Declaración Universal de los derechos del animal, proclamada el 15 de octubre de 1978 y aprobada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), y posteriormente, por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y el Estatuto Nacional de Protección animal (Ley 84 de 1989), proclamada por el Congreso de la República de Colombia.

Los sueros de individuos sanos y de pacientes con episodios de malaria por *Plasmodium falciparum*, se tomaron de voluntarios mayores de edad que fueron informados del proyecto que se realiza en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC y de los alcances del mismo. La toma de muestra no represento ningún tipo de riesgo para los voluntarios y fue realizada por un profesional en Bacteriología, bajo la supervisión de un profesional en Medicina. Previo a la toma de la muestra, los voluntarios firmaron un Consentimiento Informado, en presencia de un familiar mayor de edad. No se llevaron a cabo intervenciones experimentales, ni modificaciones intencionadas en los sujetos de investigación, por lo que este proyecto fue considerado como una investigación de bajo riesgo, según los criterios expuestos en la resolución 008430 de Octubre 4 de 1993, artículo 11, del Ministerio de Salud.

## 12. Anexos

### Anexo 1. Alineamiento de la proteína P $\beta$ RON5 de las cepas PAS-2, FCB-2 y 3D7

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
FCB-2 : MLKYTLIIYIIAGYFISEISNKLFDTLLPRNVFKKPKPFKNEIKKGGIDKDEKSIMKNVDSIDVMFEPRVKRFVPSRTRKTHVVGGL : 87
Pas-2 : ..... : 87
3D7 : ..... : 87

      *      100     *      120     *      140     *      160     *
FCB-2 : SQSIsDPGDVEKSKYEKAVRFFENIKNEMINMSSKINKQLDSQDISSLNNFKRASEVLKESLATMHSLDIIRNDGSDVFSKYTLDWY : 174
Pas-2 : ..... : 174
3D7 : ..... : 174

      180      *      200      *      220      *      240      *      260
FCB-2 : SKANMREKYSIEKSIQKIMNKLFPKARKKKKMKKIDANIEQLEMDLLVQKFIENLNASKLLKLYDSDANDYVSPMHTDVCQGQL : 261
Pas-2 : ..... : 261
3D7 : ..... : 261

      *      280      *      300      *      320      *      340
FCB-2 : GSIIISYMFEEKAYKSSINHDISYFQKYLPRLYRIQNMIIQKGTLLLEKGLDSDLYTFKSKISDIMEKKFGFNDMCTDKCMEDETIKA : 348
Pas-2 : ..... : 348
3D7 : ..... : 348

      *      360     *      380     *      400     *      420     *
FCB-2 : DYDLSEYKNEFSPSKTAQRADLVKLLMYYYRDKIYNIETSAADVLMILLYLNSANELSEKGYLDVSSISTDDEFNLINKTIDRSHK : 435
Pas-2 : ..... : 435
3D7 : ..... : 435

      440      *      460      *      480      *      500      *      520
FCB-2 : FNKKIKIKKKTFFKIAPFNFFREETQEKGTGNEISIFAIDDIKTSLLAKKSNQYNSLYETTKDLWNQIQNMYASVYGFVQSKKIKTNK : 522
Pas-2 : ..... : 522
3D7 : ..... : 522

      *      540     *      560     *      580     *      600
FCB-2 : FVGSKIRNVGFLLRWFNYNKTPSKNINFLVNNFSPVLSISLQLVFFITMIEQYESSFLGNFSSALKKIFTLGKSGRNPRNYNDLVN : 609
Pas-2 : ..... : 609
3D7 : ..... : 609

      *      620     *      640     *      660     *      680     *
FCB-2 : FSEVDYLLRRTSKANNVQRIIMQIIRMLKKKFLSSSYTPTLLAQYMSIFLSLWVFEGENNISLQNPNISRFKKIFFLTYFVHEKGPVE : 696
Pas-2 : ..... : 696
3D7 : ..... : 696

      700      *      720      *      740      *      760      *      780
FCB-2 : KAVDIIYNKCRMKTDKIVLGCIDHYGGREKKLLGLISRKCKPTKISIRKRSIRKIILNKLMSLNDPVDILRIAVDTATRCDFHNS : 783
Pas-2 : ..... : 783
3D7 : ..... : 783

      *      800     *      820     *      840     *      860     *
FCB-2 : KNIDNVKTKKNKINYEIVFKSELSIRYICADVTKNVVKIIRDVSRLLKNMREAQNVIDNGLNSVqYLKIRNYRDKESSFTILCPFME : 870
Pas-2 : ..... : 870
3D7 : ..... : 870

      880      *      900      *      920      *      940      *
FCB-2 : GNDKNIRELERTQISLFIHKNI GMSRIIKGLINIFKKTLMREGIKSDSAISIKVGARKYNGIIFGGYQLNVNDLQNTLHIGLS : 957
Pas-2 : ..... : 957
3D7 : ..... : 957

      960      *      980      *      1000     *      1020     *      1040
FCB-2 : KTRKVYDGRKYVDELEILKGDGVKNIYMKGLMEDNERIYELQNNMRVSEFDYAIQNPdANIIVFDGNNYISSYALRNMGLEHERIVW : 1044
Pas-2 : ..... : 1044
3D7 : ..... : 1044

      *      1060     *      1080     *      1100     *      1120     *
FCB-2 : AGPSVGVTAEFALSAISDNPLPIFDGSAWVLEKLSIRSI LKHLPSDVNGNSLANTVNFVILNKDGKPIKNTTPVINLKYATFTL : 1131
Pas-2 : ..... : 1131
3D7 : ..... : 1131

      1140      *
FCB-2 : SGIVNFVIAEKAGIGNEIIVHTRIP : 1156
Pas-2 : ..... : 1156
3D7 : ..... : 1156

```







```

*          1980          *          2000          *          2020          *          2040          *          2060          *          2080          *
P b : *HLN-----VNDIQN-AHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGIKDIIIMKGINEDNEE--VVTSTGK-K---ISEFDIAKEN---ENANIIIFD--GNNYIS : 1020
P ch : *HLN-----VNDIQN-AHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGIKDIIIMKGINEDNEE--VVTSTGK-K---ISEFDIAKEN---ENANIIIFD--GNNYIS : 1021
P y : *HLN-----VNDIQN-AHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGIKDIIIMKGINEDNEE--VVTSTGK-K---ISEFDIAKEN---ENANIIIFD--GNNYIS : 716
P v : *QLN-----VDSFGQENTHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGVKRIEMKGIEDNEE--FVVLQDKT-K---VPEFEAAILY---PSADIIIFD--GNNYIS : 1030
P k : *QLN-----VDSFGQENTHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGVKRIEMKGIEDNEE--FVVLQDKT-K---VPEFEAAILY---PSADIIIFD--GNNYIS : 1030
P f : *QLN-----VDSFGQENTHGLSKSRKVVYDGRK--DGEINLGE--DGVKRIEMKGIEDNEE--FVVLQDKT-K---VPEFEAAILY---PSADIIIFD--GNNYIS : 1028
T p : *AP-----FRIIDKFTNLRKFGESLMDGSDN--EETAND--IPSLIESINIIEHYVYD--DQNTGNGE---GASIVMSERK---FALEYPNFIIIRAVLII : 1782
T a : *AP-----FRIIDKFTNLRKFGESLMDGSDN--EETAND--IPALIESINIIEHYVYD--DQNTGGG---GASIVMSERK---FALEYPNFIIIRAVLII : 1549
T g : *PDAEKMAARAEMVYTAAKASTGKPKRMQLQKATSWIRKKA--AAARKKSK--NRISATFGRGKPPKAKVPDWA--VNAAGCMWTKGVFSTHLI--NEDEMSCNGHEPFR--MWSKQNHIT : 1533
N c : *PDDQRMRAARADVMYSYAAKAGRGRKRMQLQKATSWIRKKA--SVAKRPKS--RRISNAIGKGGKPPKAKVPDWA--VNAAGCMWTKGVFSTHLI--NEDEMSCNGHEPFR--MWSKQNHIT : 1471
B b : *PPP-----EKIPMPESTVNFPGDGVVYHNKKE--AAAVVAVP--LGVNAVMLEKQKVVTK--VYNDKDK-K---IDELAGLEA-----ADFWARA---HLLT : 1368
      GY          6          r          e          lk          y          3

*          2100          *          2120          *          2140          *          2160          *          2180          *          2200          *
P b : ---SYALRKCLEN---BRIVAS--NGV---SAP---EPA---LGNIS--DRPFI--DGSAA--IIL--DRSIRKNLG---NFPKN---VNGNLLAKDIFII--NKDGKAI : 1106
P ch : ---SYALRKCLEN---BRIVAS--NIV---SAP---EPA---LGNIS--DRPFI--DGSAA--IIL--DRSIRKNLG---NFPKN---VNGNLLAKDIFII--NKDGKAI : 1107
P y : ---SYALRKCLEN---BRIVAS--NTV---SAP---EPA---LGNIS--DRPS-----DGSAA--IIL--DRSIRKNLG---NFPKN---VNGNLLAKDIFII--NKDGKAI : 760
P v : ---SSALRDMGLEV---BRIVAS--NTV---SAP---EPA---LGNIS--ENPLI--DGHAA--VVL--DRSIRKNLG---EFP--PRD---VSGSLLASTVFI--NKEGROI : 1116
P k : ---SSALRDMGLEV---BRIVAS--HAV---SAP---EPA---LGNIS--ENPLI--DGHAA--VVL--DRSIRKNLG---EFP--PRD---VSGSLLASTVFI--NKEGROI : 1116
P f : ---SYALRKCLEN---BRIVAS--PSV---SAP---EPA---LGNIS--DNPLI--DGSAA--VVL--EKESIRKNLG---KH--PSD---VNGSLLASTVFI--NKDGKPI : 1114
T p : ---AKLNRSEFTM---GRVMS--DKY---DSE---LGNIS--VPVSDMV---NGQY--LIT--SCLTKD--VGNV--PRL--DK--KSY--DPSGTDIIE--DKG--NEINVEI : 1875
T a : ---AKLNRSEFTM---GRVMS--DKY---DSE---LGNIS--VPVSDMV---NGQY--LIT--SCLTKD--VGNV--PRL--DK--KSY--DPSGTDIIE--DKG--NEINVEI : 1644
T g : ASSSIN--ENNYIVKGGDSDHC--TREALVH--SGIPVY--EPEAGFV--DE--PSNC---VYV--DGY--TTS--D--DINA--SSDS--KSH--AV--RIVDSNGKTI--OGPPTGVVOT : 1648
N c : SSSSIN--EYVIVKSESH--C--TRALLH--SGLPVY--EPEAGFV--EY--RGNAG--GNG--VYV--DNY--TTNG--D--DPSA--SSQS--SSF--AT--RITDSNGKTI--OGPPTGVVOT : 1589
B b : ---AST--EY--YNI---G--E--YEQ---S--L--D--L--H--L--GNIS--D--V--NGKY--LIS--K--K--AD--V--KNVR--KHG---ERIMDQNAS--V--V--AGDGK : 1458
      alr g          w g          GW a          5          L          p          w          l          3

*          2220          *          2240          *          2260          *          2280          *          2300
P b : *KN---TMPVNL--NATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGN--DNE--IVHTR--L : 1148
P ch : *KN---TMPVNL--NATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGN--DNE--IVHTR--L : 1149
P y : *KN---TMPVNL--NATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGN--DNE--IVHTR--L : -
P v : *KN---TTPVSLR--HATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGGKNE--IVHTR--L : 1158
P k : *KN---TTPVSLR--HATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGGKNE--IVYTR--L : 1158
P f : *KN---TTPVSLR--YATFTI-----SGVNFV--RGE-----KGGKNE--IVHTR--L : 1156
T p : *SN---GKK--SE--SHKGE--EGED---EGE--EFL--GG--DNL--SAT--PGA--VKT--RTATY--PT--H--D--L--D--D--F--INM : 1946
T a : *SS---GKK--SE--PHKGE--EGED---EAE--EFL--GG--DNL--SAT--PGA--VKT--RTATY--PT--H--D--L--D--D--F--INM : 1714
T g : *GG---VY--ES--R--NLVSG--HST---GDS--EVR--L--SGPQ-----LTSVAD--DTQ--F--E--DLVLR : 1702
N c : *GG---RVY--SS--R--NLVSG--QTR---GDN--EVR--L--AGPQ-----LTSVAD--DAR--F--E--DL : 1640
B b : AKYPATKPGQPNFDKGGSNF--DTGYG--EVSPA--D--L--RDAE--FDEATN-----TLVLM--L--D--A--P--S--I--L--E--S--P--I--S--N--T--T--E--E--K--P--T--E : 1536
      a          p

```

## 13. Publicaciones

### Artículos:

- *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 5 peptides bind to human red blood cells and inhibit parasite invasion.  
**Curtidor H**, Patiño LC, Arévalo-Pinzón G, Vanegas M, Patarroyo ME, Patarroyo MA.  
**Peptides**. 2013 Aug 8. doi:pil: S0196-9781(13)00268-4.  
Factor de Impacto: **2,52**
- Identification of the *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 5 (PfRON5).  
**Curtidor H**, Patiño LC, Arévalo-Pinzón G, Patarroyo ME, Patarroyo MA.  
**Gene**. 2011 Mar 15; 474(1-2):22-8. doi: 10.1016/j.gene.2010.12.005.  
Factor de Impacto: **2,34**

### Posters

- Identificación de la proteína del cuello de las roptrias 5 en *Plasmodium falciparum* (PfRON5).  
XII congreso colombiano y VI Congreso Internacional de Genética Humana.  
Cartagena, Colombia.  
Octubre de 2012
- Identificación en *Plasmodium falciparum* de la proteína 5 del cuello de las roptrias.  
V Jornada de Socialización de Resultados de Investigación.  
Universidad de la Sabana  
Octubre de 2011
- Péptidos de la proteína 5 del cuello de las roptrias de *Plasmodium falciparum* se unen a glóbulos rojos humanos e inhiben la invasión del parásito.  
VI Jornada de Socialización de Resultados de Investigación.  
Universidad de la Sabana  
Septiembre de 2013