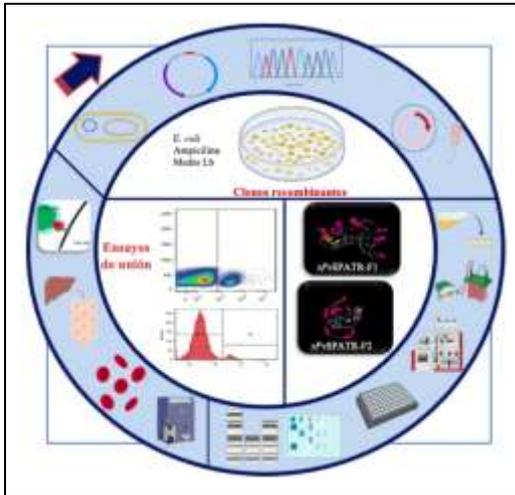


Dos fragmentos recombinantes derivados de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* interactúan con reticulocitos, pero no con células hepáticas humanas.

Two *Plasmodium vivax* secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) domain-derived recombinant fragments interact with reticulocytes, but not with human liver cells.

#### Graphical Abstract (GA)



Fragmentos recombinantes de la proteína PvSPATR interactúan con células hospederas.

**Dos fragmentos recombinantes derivados de la proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) de *Plasmodium vivax* interactúan con reticulocitos, pero no con células hepáticas humanas.**

**Two *Plasmodium vivax* secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) domain-derived recombinant fragments interact with reticulocytes, but not with human liver cells.**

**Andrés Felipe Cárdenas Carpeta\***

\* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño

Dirigido por: Gabriela Arévalo Pinzón M.Sc, P.hD.

### **Resumen**

El ciclo de invasión de *Plasmodium* al ser humano involucra un alto número de proteínas que le permiten interactuar e invadir a las células hospederas. Recientes estudios en especies como *Plasmodium falciparum* han mostrado que la proteína SPATR se expresa en el esporozoito y merozoito, es antigénica y esencial para la invasión a células eritroides y hepáticas. Sin embargo, poco se conoce sobre su actividad de unión a células hospederas en *Plasmodium vivax*, uno de los parásitos con mayor distribución a nivel mundial. Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en determinar la actividad de unión de dos fragmentos recombinantes de PvSPATR a hepatocitos y reticulocitos humanos. A partir de plásmidos recombinantes que contenían las secuencias codificantes para dos fragmentos de la proteína PvSPATR, se transformaron células BI21-AI que fueron utilizadas para la expresión de rPvSPATR-F1 y rPvSPATR-F2. Una vez expresadas ambos fragmentos, estos fueron purificados por cromatografía de afinidad. La unión de las proteínas rPvSPATR-F1 y rPvSPATR-F2 a hepatocitos y a reticulocitos humanos fue cuantificada por citometría de flujo. Los resultados mostraron que las dos regiones recombinantes interactuaron solo con reticulocitos humanos, sugiriendo la participación de PvSPATR en interacciones del tipo receptor-ligando en el estadio eritrocítico y sugiriendo estas regiones como posibles blancos de acción para prevenir esta enfermedad.

### **Abstract**

The *Plasmodium* human invasion cycle involves many proteins enabling it to interact with and invade host cells. Recent studies in species such as *Plasmodium falciparum* have shown that the secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) protein is expressed in sporozoites and merozoites, is antigenic and essential for the invasion of erythroid and liver cells. However, little is known about its host cell binding activity in *Plasmodium vivax*, one of the most widely-distributed parasites worldwide. This work has thus been focused on determining two PvSPATR recombinant fragments' human hepatocyte and reticulocyte binding activity. BI21-AI cells transformed from recombinant plasmids containing two PvSPATR fragments' encoding sequences were used for expressing rPvSPATR-F1 and rPvSPATR-F2 and then purified by affinity chromatography. rPvSPATR-F1 and rPvSPATR-F2 binding to human hepatocytes and reticulocytes was quantified by flow cytometry. Both recombinant regions only interacted with human reticulocytes, suggesting PvSPATR participation in receptor-ligand type interactions during the erythrocyte stage and that these regions could be targets of action for preventing this disease.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium vivax*, ligand-receptor, recombinant proteins.

## **Introducción.**

La malaria se ha convertido en un grave problema para la humanidad debido a los complejos mecanismos de invasión que utiliza el parásito protozoario *Plasmodium spp* para invadir las distintas células del ser humano (Cowman, Healer, Marapana, & Marsh, 2016). Este parásito pertenece al filo Apicomplexa, género *Plasmodium* y consta de alrededor de 100 especies de *Plasmodium*, cinco de las cuales infectan al ser humano (Ashley, Pyae Phyo, & Woodrow, 2018). La alta morbilidad y significativa mortalidad de la malaria humana es causada principalmente por las especies de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. El segundo de ellos es considerado la especie más mortal a nivel mundial con una amplia distribución en el continente africano. Por su parte, *P. vivax* es la especie con la mayor distribución a nivel mundial, principalmente en Asia y el continente americano. Estos parásitos fueron en 2019 responsables de 229 millones de casos clínicos y cerca de 409.000 muertes principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (WHO, 2020).

En Colombia, el 85% del territorio rural se encuentra debajo de los 1600 metros sobre el nivel del mar, facilitando las condiciones climáticas y geográficas que necesita el vector transmisor de la malaria, convirtiéndose en un grave problema de salud pública (Espinosa-Velez, Altamiranda-Saavedra, & Correa, 2020; Salud, 2021). Según datos del Instituto Nacional de Salud a la semana epidemiológica 40 del año 2021 se han notificado al sistema de vigilancia de salud pública (SIVIGILA) un acumulado de 55705 casos de los cuales 26688 correspondieron a casos clínicos por *P. vivax* y 28540 por *P. falciparum* (Instituto Nacional de Salud, 2021).

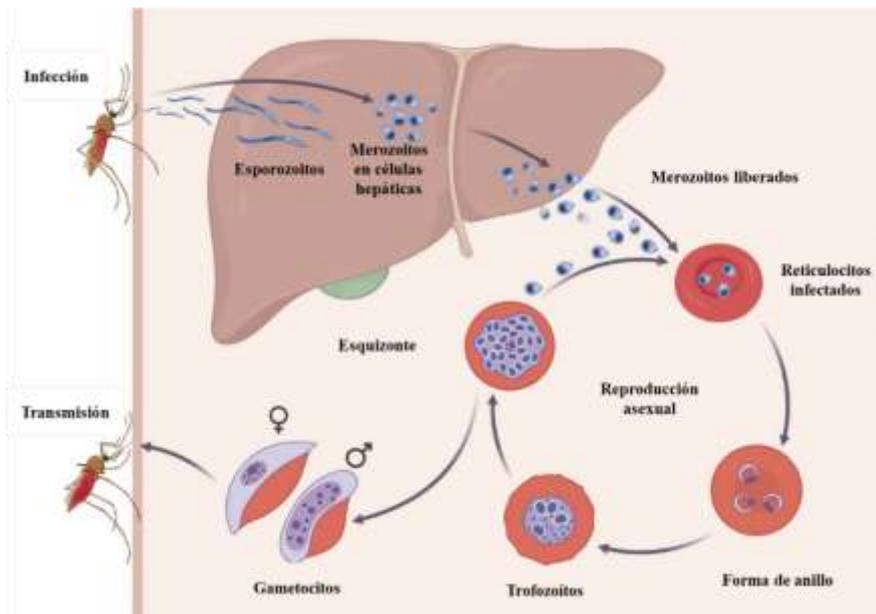
A nivel biológico tanto *P. falciparum* como *P. vivax* comparten un ciclo de vida similar (Figura 1), sin embargo, *P. vivax* presenta algunas características que lo diferencian significativamente de *P. falciparum* e impactan no solo el componente epidemiológico sino el avance en el conocimiento molecular de este parásito (Tabla 1). Entre estas diferencias se puede destacar la capacidad de *P. vivax* para permanecer latente en el hígado en forma de hipnozoito (Campo, Vandal, Wesche, & Burrows, 2015). Esta forma latente puede reactivarse mucho después de la infección primaria y dar como consecuencia una infección en el estadio sanguíneo recidivante complicando la erradicación de este parásito (Campo et al., 2015). Otra característica diferencial de *P. vivax* es su capacidad de invadir solo glóbulos rojos jóvenes (reticulocitos) que ocupan tan solo el 1% de células sanguíneas a nivel periférico (Galinski & Barnwell, 2008), lo que ha obstaculizado el mantenimiento de esta especie en cultivo continuo *in vitro* y como consecuencia es difícil acceder a las macromoléculas de parásito,

realizar ensayos funcionales que evalúen terapias o antígenos vacunales y obtener formas sexuales para replicar la infección en mosquitos (Adams & Mueller, 2017).

**Tabla1.** Principales diferencias entre *P. vivax* y *P. falciparum*.

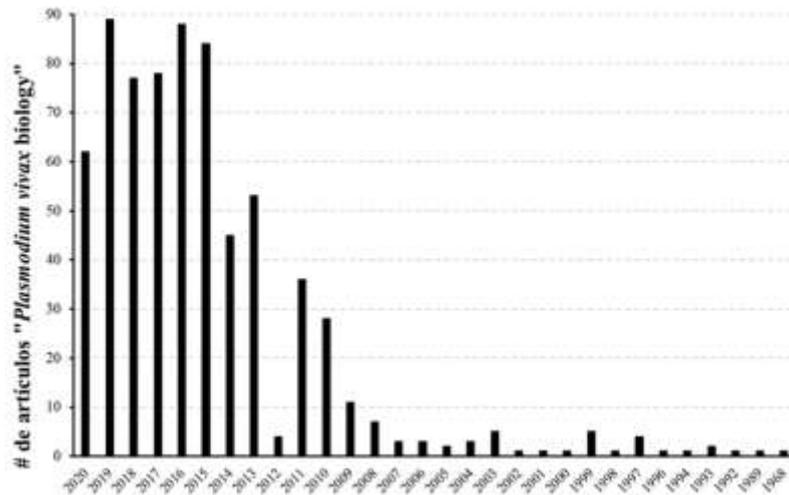
<b>Especies</b>	<b><i>Plasmodium vivax</i></b>	<b><i>Plasmodium falciparum</i></b>
<b>Gametocitos infecciosos en el torrente sanguíneo</b>	Presente (conduce a una transmisión más temprana).	La transmisión es tardía.
<b>Esporogonia en mosquito</b>	Corta duración (facilita la transmisión).	Larga duración.
<b>Desarrollo en mosquito</b>	Puede ocurrir en regiones templadas	Requiere altas temperaturas y por lo tanto se propaga menos.
<b>Densidad de parásitos en sangre periférica</b>	Baja (infección pasada por alto fácilmente).	Puede ser muy alta
<b>Diversidad genética de la población de mosquitos</b>	Alta diversidad global.	Menos diversa
<b>Etapas del hipnozoito en hígado</b>	Si (genera recaídas y dificultades en su control)	No se conoce que ocurra
<b>Mortalidad</b>	Poco frecuente	Frecuente
<b>Inmunidad</b>	Adquirida rápidamente	Adquirida lentamente
<b>Tipo de célula que invaden a nivel sanguíneo</b>	Reticulocitos (1% del total de la población de glóbulos rojos)	Glóbulos rojos de todos los estados madurativos.
<b>Año de publicación del genoma.</b>	Gemona: Carlton, J. M. y cols 2008 (Carlton et al., 2008)	Genoma: Gardner y cols 2002 (Gardner et al., 2002)

Todo esto, bloquea drásticamente la comprensión de los mecanismos moleculares que *P. vivax* utiliza para invadir las células humanas (Chan, Dietrich, Nguitragool, & Tham, 2020). Para resolver estos inconvenientes el uso de cepas provenientes de pacientes infectados con *P. vivax* (Zhu et al., 2016), el cultivo del parásito en primates no humanos (Ntumngia et al., 2009) y el auge, desarrollo y accesibilidad a las plataformas y proyectos de ciencias ómicas han permitido conocer múltiples aspectos moleculares de *P. vivax* en los últimos 10 años (C. Bourgard, L. Albrecht, A. Kayano, P. Sunnerhagen, & F. T. M. Costa, 2018; Rangel et al., 2020). Esto puede verse representado en la Figura 2 donde se muestra como el auge de las ciencias ómicas coincide con el aumento en el número de estudios de esta especie parasitaria.



**Figura 1. Ciclo de vida de Plasmodium.** El ciclo de infección de la malaria inicia con la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* quien a través de su saliva transmite el parásito en etapa de esporozoito el cual atravesará el capilar dérmico viajando por el torrente sanguíneo. Una vez los esporozoitos atraviesan la barrera endotelial y células de Kupffer en un proceso denominado “atravesamiento celular”, ingresan al parénquima hepático (Mota, Hafalla, & Rodriguez, 2002), allí atravesarán varios hepatocitos antes de establecer su infección en un hepatocito, desarrollando una esquizogonia asexual y dando origen a formas exo-eritrocíticas que se convertirán en cientos de merozoitos. En *P. vivax* se ha encontrado que, durante el desarrollo hepático, una parte de esos esporozoitos arrestan su desarrollo en un estadio denominado hipnozoitos, los cuales pueden permanecer allí durante semanas e incluso meses antes de reactivarse. Una vez los merozoitos son liberados del parénquima hepático se iniciará la fase eritrocítica, donde los merozoitos tendrán la capacidad de invadir glóbulos rojos a través de un proceso orquestado por proteínas contenidas en la membrana y organelos especializados (roptrias y micronemas). Dentro del glóbulo rojo el parásito adquirirá distintas morfologías pasando de anillo, trofozoito y esquizonte, que lisarán los glóbulos rojos invadidos. Los nuevos merozoitos tendrán la capacidad de invadir nuevos glóbulos rojos amplificando la parasitemia e intensificando la sintomatología clínica. En *P. vivax* se ha documentado que sus células hospederas son los reticulocitos, que solo representan entre el 1-2% del total de glóbulos rojos en circulación. Una parte de esos merozoitos no se desarrollarán hasta esquizonte, sino que, pasarán a formar gametocitos, los cuales serán tomados por el mosquito para llevar a cabo la reproducción sexual para producir nuevos esporozoitos que serán inoculados en un nuevo hospedero humano. Tomado y modificado de <https://thebiologynotes.com/plasmodium-vivax-life-cycle/>

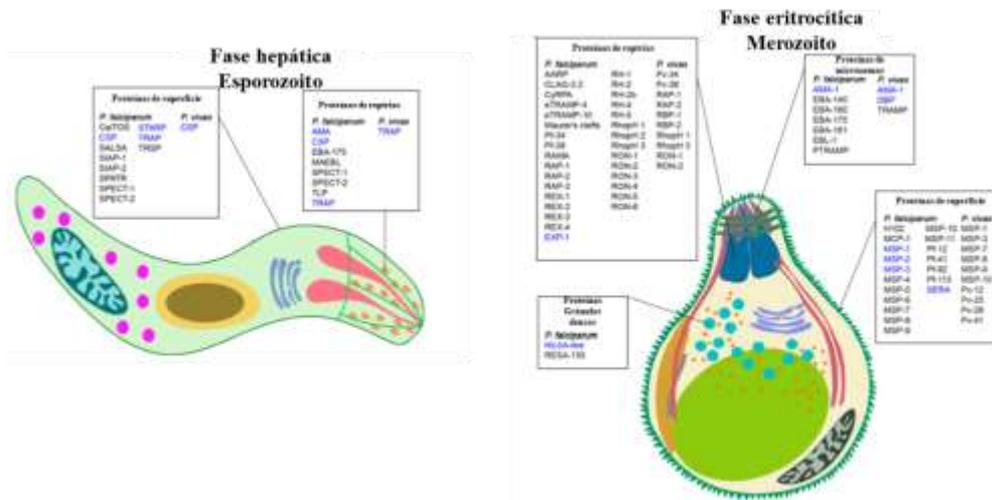
Pese a ello, hasta hoy no se cuenta con candidatos contundentes o métodos terapéuticos que frenen el desarrollo de esta enfermedad. Actualmente tan solo se reportan dos ensayos clínicos para *P. vivax* de estadio eritrocito y cerca de 25 ensayos clínicos en *P. falciparum* que cubren estadio pre-eritrocítico, eritrocítico y fase sexual (Draper et al., 2018; Lyke, 2017). Este hecho, incentiva a los investigadores a reunir esfuerzos para conocer en detalle que proteínas de *P. vivax* pueden ser claves en su proceso de invasión y sirvan como puntos calientes de intervención para el desarrollo de vacunas o medicamentos contra esta especie que afecta significativamente a cerca del 70% de la población mundial (Price et al., 2007).



**Figura 2.** Número de publicaciones sobre la biología de *P. vivax*. palabras de búsqueda en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> “*Plasmodium vivax* biology”)

Durante proceso de invasión, tanto el esporozoito como el merozoito descargan desde sus organelos especializados (roptrias y micronemas) una serie de proteínas que interactúan específicamente con la célula hospedera (Figura 3). El estadio pre-eritrocítico del parásito representa un atractivo blanco de acción debido a que es la primera forma invasiva dentro del humano y permanece más expuesto al sistema inmune antes de acceder a la célula hospedera. En *P. vivax* tan solo dos proteínas han sido estudiadas a profundidad: la proteína circunsporozoito-CSP (del inglés, circunsporozoite protein) (Arnot et al., 1985) y la proteína anónima relacionada a trombospondina-TRAP (del inglés thrombospondin-related adhesion protein) (Sultan et al., 1997). Por su parte el estadio eritrocítico es responsable de la sintomatología clínica de la enfermedad y severidad por lo que se convierte también en un blanco de estudio en el complejo ciclo de vida de *Plasmodium* (Figura 1).

En *P. vivax* se ha descrito que un número importante de proteínas podrían participar en la interacción parásito-reticulocito. Sin embargo, solo dos interacciones han sido completamente caracterizadas, la interacción entre la proteína de unión a Duffy-DBP (del inglés Duffy Binding Protein) con el receptor para quimioquinas-DARC (Receptor de antígeno Duffy para quimioquinas) (Miller, McAuliffe, & Mason, 1977) y la proteína homóloga a reticulocito 2b-Rh2b con el receptor de transferrina CD71 (Gruszczyk et al., 2018). Pese a ello, aún se carece de información sobre antígenos que participan en los procesos de adhesión e invasión en los dos estadios parasitarios.



**Figura 3: Formas parasitarias de Plasmodium presentes en el ser humano.** Se muestra la forma del esporozoito (izquierda) y del merozoito (derecha), cuyas células son eucariotas y presentan organelos especializados denominados roptrias, micronemas y gránulos densos. Se muestran las proteínas expresadas por *P. falciparum* y *P. vivax* y se han sugerido participan en interacciones receptor-ligando. Como se muestra en la figura un número reducido de proteínas han sido caracterizadas en *P. vivax* respecto a *P. falciparum*. Tomado y modificado de (Skwarczynski et al., 2020).

De forma interesante se ha encontrado que, aunque el esporozoito y merozoito contienen el mismo genoma, estos, presentan perfiles proteómicos y transcriptómicos diferenciales (C. Bourgard, L. Albrecht, A. C. A. V. Kayano, P. Sunnerhagen, & F. T. M. Costa, 2018) (Roth et al., 2018), esto significa que las proteínas expresadas y utilizadas para invadir la célula hospedera son distintas entre los esporozoitos y merozoitos, lo que complejiza aún más el estudio de los parásitos de la malaria. Por tal motivo, para atacar ambas fases del parásito en el humano, se requerirá del estudio profundo de los antígenos expresados en ambos estadios con el objeto de bloquear las principales interacciones hospedero-patógeno.

Diferentes estudios han reportado la presencia y actividad funcional de un antígeno denominado proteína secretada con dominio de repetición de trombospondina alterado (SPATR) en especies como *P. falciparum*, *Plasmodium berghei* y *Plasmodium knowlesi*. En *P. falciparum* se encontró que, a diferencias de varios antígenos de malaria, SPATR es una proteína que se transcribe y expresa en la membrana de esporozoitos y durante todo el ciclo intraeritrocítico, específicamente en las roptrias de los merozoitos (Chattopadhyay et al., 2003). Además de su expresión multiestadio, esta proteína presenta dentro de su estructura un dominio de repetición de trombospondina tipo I (TSR1). Es bien sabido que este dominio está presente en más de 300 proteínas (incluidas proteínas humanas) y se ha involucrado en funciones tales como, motilidad, adhesión e invasión a células hospederas (Dundas, Shears, Sinnis, & Wright, 2019; Hutter et al., 2000; Templeton, Kaslow, & Fidock, 2000). El motivo

central de este dominio es la secuencia WSXW (donde X puede ser cualquier aminoácido) seguido por CSXTCG (Lawler & Hynes, 1986) (Tucker, 2004); como este último motivo (CSXTCG) está ausente en la secuencia de *Pf*SPATR, en esta proteína se ha nombrado como un dominio de trombospondina alterado (Chattopadhyay et al., 2003). Estudios de antigenicidad mostraron que *Pf*SPATR es reconocida por sueros de individuos infectados clínicamente y que la proteína interactúa con la membrana de los hepatocitos humanos. De forma interesante se encontró que anticuerpos dirigidos contra *Pf*SPATR son capaces de inhibir la invasión de los esporozoitos, lo que sugiere a esta proteína como un importante componente vacunal (Chattopadhyay et al., 2003).

Estudios similares fueron realizados en *P. knowlesi*, donde se encontró una localización similar de la proteína *Pk*SPATR a la reportada en *P. falciparum*, así como sus propiedades de adhesión a células hepáticas (H. Curtidor et al., 2008; Mahajan, Jani, Chattopadhyay, Nagarkatti, Zheng, Majam, Weiss, Kumar, Rathore, et al., 2005). El análisis del dominio alterado TSR en *Pk*SPATR arrojó un resultado similar respecto a la carencia del motivo CSXTCG. Adicionalmente se reportó, que la proteína SPATR en *P. knowlesi* contiene una Prolina en el motivo WSPW en comparación con la presencia de un ácido aspártico en *P. falciparum* y una asparagina en *P. yoelli*. Si bien los autores no mencionan las implicaciones estructurales y funcionales de estos cambios en el motivo, estudios posteriores son necesarios para determinar la importancia de estos cambios dependiente de especie (Mahajan, Jani, Chattopadhyay, Nagarkatti, Zheng, Majam, Weiss, Kumar, & Rathore, 2005).

Posteriormente, Curtidor y cols en 2008 determinaron las regiones mínimas de *Pf*SPATR involucradas en la interacción con las células hospedadas. Allí se identificaron cuatro péptidos con alta capacidad de unión (HABPs del inglés High Activity Binding Peptides) a eritrocitos denominados como 32683, 32684, 32686 y 32691, siendo el último HABP una parte del dominio TSR alterado (H. Curtidor et al., 2008). Por su parte, dos péptidos localizados entre los residuos 21-40 y 141-160 mostraron interacción específica con la membrana de células hepáticas (H. Curtidor et al., 2008). Ensayos de tratamientos enzimáticos y entrecruzamientos mostraron que los HABPs de unión a eritrocitos interactúan con un receptor de 35kDa sensible al tratamiento con quimotripsina y tripsina. Estos HABPs fueron capaces de inhibir la invasión de los merozoitos en un 30-40%, sugiriendo que estas regiones pueden ser utilizadas como blancos terapéuticos (H. Curtidor et al., 2008).

Recientemente, Gupta y cols fallaron para generar un knockout del gen *spatr* en la especie de *Plasmodium berghei* lo que sugirió fuertemente su relevancia en el proceso de invasión a glóbulos rojos. Para confirmar este hecho, los autores generaron parásitos de *P. berghei* con un knockout condicional para *PbSPATR* utilizando el sistema FLP/FRT (Roshni Gupta et al., 2020). El silenciamiento condicional del gen *Pbspatr* en el estadio de mosquitos y esporozoitos no afectó la motilidad de los esporozoitos, la invasión a células hepáticas, el desarrollo intrahepático, ni de la salida de los merozoitos del tejido hepático. Así mismo, anticuerpos dirigidos contra la proteína *PbSPATR* no inhibieron la entrada de los parásitos a las células hepáticas. Toda esta evidencia sugiere que la proteína *SPATR* en *P. berghei* no cumple ningún papel fundamental en el estadio del esporozoito diferente a lo publicado en otras especies como *P. knowlesi* y *P. falciparum* (Roshni Gupta et al., 2020). Sin embargo, los autores encontraron que parásitos con silenciamiento del gen *Pbsaptr* son esenciales para el proceso de invasión a las células eritroides sugiriendo un rol esencial de esta proteína en el estadio sanguíneo.

Teniendo en cuenta toda la evidencia experimental de la proteína en diferentes especies de *Plasmodium* (Chattopadhyay et al., 2003; R. Gupta et al., 2020) y en un estudio previo realizado por Garzón Ospina D y cols en 2018 (Garzon-Ospina, Buitrago, Ramos, & Patarroyo, 2018) donde sugiere a *PvSPATR* como un promisorio candidato a vacuna, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad de unión de dos fragmentos recombinantes de la proteína *PvSPATR* a hepatocitos y reticulocitos humanos. Para el su desarrollo se utilizaron técnicas moleculares, bioquímicas y celulares que permitieron definir la actividad de unión de dos regiones de la proteína *PvSPATR* a reticulocitos y hepatocitos humanos. Los resultados mostraron que ambas regiones de *PvSPATR* participan solamente en procesos de adhesión a reticulocitos humanos, sugiriendo a esta proteína como un candidato promisorio en esta etapa del ciclo de vida de *P. vivax*. Estudios futuros deben ser orientados a determinar sus propiedades antigénicas y evaluar las regiones mínimas de interacción de esta proteína con el uso de péptidos sintéticos.

## **1. Materiales y métodos**

### **1.1 Métodos bioinformáticos**

La secuencia de aminoácidos de la proteína PvSPATR (código de acceso: PVX\_002900) de la cepa de referencia Sal-1 fue obtenida y descargada de la base de datos PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app>) (Aurrecochea et al., 2009). A partir de la secuencia se determinó la presencia de péptido señal utilizando el programa SignalP (Armenteros et al., 2019). Los servidores TMHMM (Möller, Croning, & Apweiler, 2002) y Polyphobius (Käll, Krogh, & Sonnhammer, 2007) fueron usados para predecir la presencia de dominios transmembranales, mientras que el software PredGPI se utilizó para predecir anclajes vía glicosilfosfatidilinositol. Los programas DepLoc 1.0 y NetNGlyc 1.0 fueron utilizados para predecir la localización subcelular de la proteína y los sitios de N-glicosilación respectivamente.

### **1.2 Confirmación de clones recombinantes y transformación bacteriana.**

Dos clones recombinantes derivados de la proteína PvSPATR previamente construidos por Acosta Muñoz y Arias García (Acosta Muñoz & Arias García, 2020) fueron extraídos de bacterias *E. coli* TOP10 utilizando el kit de extracción Zyppy Plasmid Miniprep Kit. Los plásmidos fueron nombrados como **pEXP5-CT-PvSAPTR-F1** y **pEXP5-CT-PvSAPTR-F2** y se enviaron a MacroGen para confirmar su secuencia por Sanger. Las secuencias fueron analizadas en el programa CLC-DNA Workbench frente a la cepa de referencia Sal-1. Una vez confirmados los plásmidos, estos fueron usados para transformar bacterias *E. coli* BL21AI. Brevemente, 2µL de plásmido purificado (~200ng) fueron adicionados a 50µL de bacterias competentes BL21AI y 50µL de sales KCM (100 mM KCl, 30mM CaCl<sub>2</sub> y 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Esta mezcla fue incubada durante 20min en hielo seguido de un choque térmico a 42°C por 45 segundos e incubación en hielo durante 5min. Luego de estas incubaciones se adicionaron 250µL de medio enriquecido SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa) y se incubaron las bacterias durante 90min a 37°C en agitación constante. 100µL de mezcla de transformación fueron plaqueados sobre agar Luria Bertani (10 g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura, 10gr/L de NaCl y 3,75g/L de agar) suplementado con 0,1mg/mL de ampicilina.

Para confirmar la presencia del inserto en las colonias que crecieron sobre el agar con ampicilina, cada colonia fue sometida a una PCR de colonia. La amplificación por PCR fue realizada con la enzima Biolasa en un volumen final de reacción de 10 $\mu$ L utilizando el cebador externo T7 (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) que anilla en el promotor T7 del vector pEXP5-CT-TOPO y un primer interno para cada fragmento de SPATR: F1-Rev (TGACATGCCTTTGAACCCGA) y F2-Rev (GGCTGCTCCGATTGACCG) (Acosta Muñoz & Arias García, 2020). Las condiciones de PCR fueron: un primer ciclo a 95°C por 10 min seguido de 25 ciclos de 95°C por 1min, 56°C por 30seg y 72°C durante 1min, con un ciclo final de 72°C durante 10min.

### **1.3 Expresión a gran escala de los fragmentos recombinantes rP<sub>v</sub>SPATR-F1 y rP<sub>v</sub>SPATR-F2 de forma soluble.**

Una colonia recombinante confirmada por PCR para el fragmento F1 de SPATR (residuos 22-132) y otra colonia para la región F2 (residuos 132-274) fueron crecidas en 15mL de medio líquido LB suplementado con 0,1mg/mL de ampicilina durante toda la noche a 37°C. Este pre-inóculo fue utilizado para inocular 200mL de medio líquido LB suplementado con 0,1mg/mL de ampicilina y 0,1% de D-glucosa. El cultivo fue incubado durante 4-6 horas hasta alcanzar la fase logarítmica (DO<sub>620</sub> 0,6-0,8). Posteriormente, la expresión de cada fragmento recombinante fue inducido con la adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,2% y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante.

El cultivo bacteriano fue cosechado a 4500rpm durante 20min a 4°C y el pellet bacteriano fue tratado con buffer A de extracción soluble (50mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl y 25mM de Imidazol) suplementado con lisozima a una concentración final de 1 $\mu$ g/mL y 1X de coctel de inhibidores libre de EDTA. La mezcla fue incubada durante 15min a 37°C seguido de la adición de una solución de DNAsa a una concentración final 0,5 $\mu$ g/mL e incubación a 4°C durante 3 horas. Para acelerar la ruptura de la membrana bacteriana y recuperación de las proteínas recombinantes, la solución bacteriana fue tratada varias veces con nitrógeno líquido. Finalmente, la solución fue centrifugada a 13.000 rpm durante 60min y el sobrenadante fue recuperado y almacenado para verificar la expresión de la proteína por Western blot.

### **1.4 Purificación de los fragmentos recombinantes rP<sub>v</sub>SPATR-F1 y rP<sub>v</sub>SPATR-F2**

El sobrenadante obtenido del proceso de extracción fue utilizado para la purificación de cada uno de los fragmentos recombinantes utilizando un cromatógrafo líquido de proteínas a alta

velocidad (AKT<sub>a</sub> go) (9) mediante el método de afinidad en una columna His Trap de 1ml. La columna fue lavada con 10 volúmenes de buffer A para eliminar las proteínas no retenidas en la columna y finalmente las proteínas recombinantes fueron eluidas en varias fracciones de 1mL de forma isocrática con un buffer de 500mM de imidazol a un flujo de 0.5 mL/min. La presencia y pureza de las proteínas **rPvSPATR-F1** y **rPvSPATR-F2** fue confirmada por Western Blot o Dot Blot y tinción con azul de coomassie respectivamente. Aquellas fracciones donde se evidenciará una única banda de los pesos moleculares esperados para cada región fueron unidas y sometidas a un proceso de diálisis para eliminar el imidazol. Brevemente, las fracciones unidas fueron empaquetadas en una membrana de diálisis o en amicones de 10kDa. En cualquiera de los dos procesos, se esperaba eliminar el imidazol presente en la muestra, mientras se disolvía la proteína en buffer salino PBS con 3% de glicerol para evitar la precipitación de las proteínas recombinantes. Finalmente, las proteínas fueron concentradas en polietilenglicol o durante el uso de amicones (exclusión de 10kDa). La presencia de las proteínas **rPvSPATR-F1** y **rPvSPATR-F2** luego de los procesos de diálisis y concentración fueron confirmados mediante Dot Blot o Western Blot. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford utilizando una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0,5 µg/mL a 25µg/mL en un volumen final de 150µL.

### **1.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), Western Blot y Dot Blot. ~**

Las proteínas extraídas de cultivos bacterianos inducidos o fracciones purificadas o dializadas de las proteínas recombinantes fueron resueltas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15%. Una vez las proteínas de las muestras fueron separadas por su peso molecular, el gel fue utilizado para dos procesos independientes: 1) tinción con azul de Coomassie o 2) transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). En el caso de tinción con azul de Coomassie, el gel fue incubado durante 30min con una solución de azul de Coomassie que contiene 0.1 % de azul de Coomassie G-250 en 50 % metanol y 10% ácido acético. Posteriormente la solución fue retirada y el gel fue desteñado con una solución de metanol al 40%.

Para el proceso de transferencia, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y después la membrana fue lavada varias veces con buffer salino fosfatos con 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween). La membrana fue entonces bloqueada con leche descremada al 5% en buffer PBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente en constante agitación.

Después de tres lavados con PBS-Tween, la membrana fue incubada con anticuerpos anti-histidinas en dilución 1:4500 durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. La membrana fue finalmente lavada y revelada con el kit de sustrato de peroxidasa. Para el Dot Blot, la muestra de proteínas fue sembrada directamente sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada durante 15min en cámara húmeda para permitir la adsorción de las proteínas. Posteriormente la membrana fue bloqueada e incubada con anticuerpos anti-histidina como se realizó para el Western Blot.

### **1.6 Purificación de reticulocitos humanos a partir de sangre periférica.**

Sangre total de mujeres que se encuentran en los últimos días de su periodo menstrual fue obtenida por punción venosa en tubos-EDTA luego de la firma y explicación de un consentimiento informado. La muestra fue lavada varias veces con PBS 1X a 3500 rpm durante 5min. El paquete de células fue diluido en una relación 40:60 con PBS y fue pasado por un filtro estéril (Acrodisc® WBC) para remover los glóbulos blancos. El paquete celular depletado fue lavado varias veces con un buffer desgasificado de D-PBS suplementado con 0,5% de BSA y 2mM de EDTA. Posteriormente, 500µL del paquete de glóbulos rojos depletados fue incubado durante 2 horas a 4°C en agitación constante con 20µL de perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD71 para permitir la unión de los anticuerpos al receptor CD71 presente en reticulocitos. Una vez finalizada la incubación los glóbulos rojos fueron lavados dos veces con buffer D-PBS a 2800 rpm durante 10min y por último las células fueron diluidas en 5mL del mismo buffer. Por otra parte, una columna magnética LS (Miltenyi-biotec) se equilibró con buffer D-PBS desgasificado y se colocó sobre un separador MidiMACS. Posteriormente la solución diluida de glóbulos rojos fue pasada por la columna LS para permitir la unión de los reticulocitos en la columna por magnetismo. Seguidamente, se realizó un lavado con 5mL de buffer D-PBS para eliminar los eritrocitos no unidos a la columna. Para eluir los reticulocitos adheridos a la columna LS, la columna fue retirada del separador MidiMACs y se lavó con 5mL de buffer D-PBS. Una fracción de los reticulocitos purificados fue teñida con Reticount durante 20min y la muestra fue leída en un citómetro FACS Canto II. Los datos fueron analizados en el software FlowJo.

### **1.7 Ensayos de unión de los fragmentos recombinantes a células hepáticas HepG2 y reticulocitos purificados.**

Una vez purificados y confirmada la presencia de los dos fragmentos recombinantes, estos fueron incubados con células hepáticas humanas (HepG2) para determinar la habilidad de

interacción de los fragmentos recombinantes con la membrana de estas células. Brevemente, dos millones de células HepG2 fueron incubadas en presencia de diferentes cantidades de proteínas recombinantes (25µg y 50µg) durante 4 horas a 37°C. Las células fueron centrifugadas para lavar la proteína no unida y fueron bloqueadas con BSA al 0,5% en PBS. Las células fueron incubadas con anticuerpo anti-histidinas marcada con APC (Allophycocyanin) y la viabilidad celular fue medida con yoduro de propidio. En el caso de la unión a los reticulocitos humanos, las dos regiones de la proteína PvSPATR fueron incubadas durante toda la noche con reticulocitos en agitación constante a 4°C. La proteína no unida fue retirada mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10min. Los reticulocitos fueron lavados con 0,5% de BSA en PBS y después incubados con Calceína AM como marcador de viabilidad durante 1 hora a 37°C. Luego del periodo de incubación los reticulocitos fueron incubados con anticuerpos anti-histidinas acoplado a PE. La unión de las proteínas a células HepG2 y reticulocitos humanos fueron leídas en un FACS-Canto II recolectando cerca de 30.000 eventos por muestra y los análisis fueron realizados en el software de análisis FlowJo.

### **1.8 Análisis estadístico**

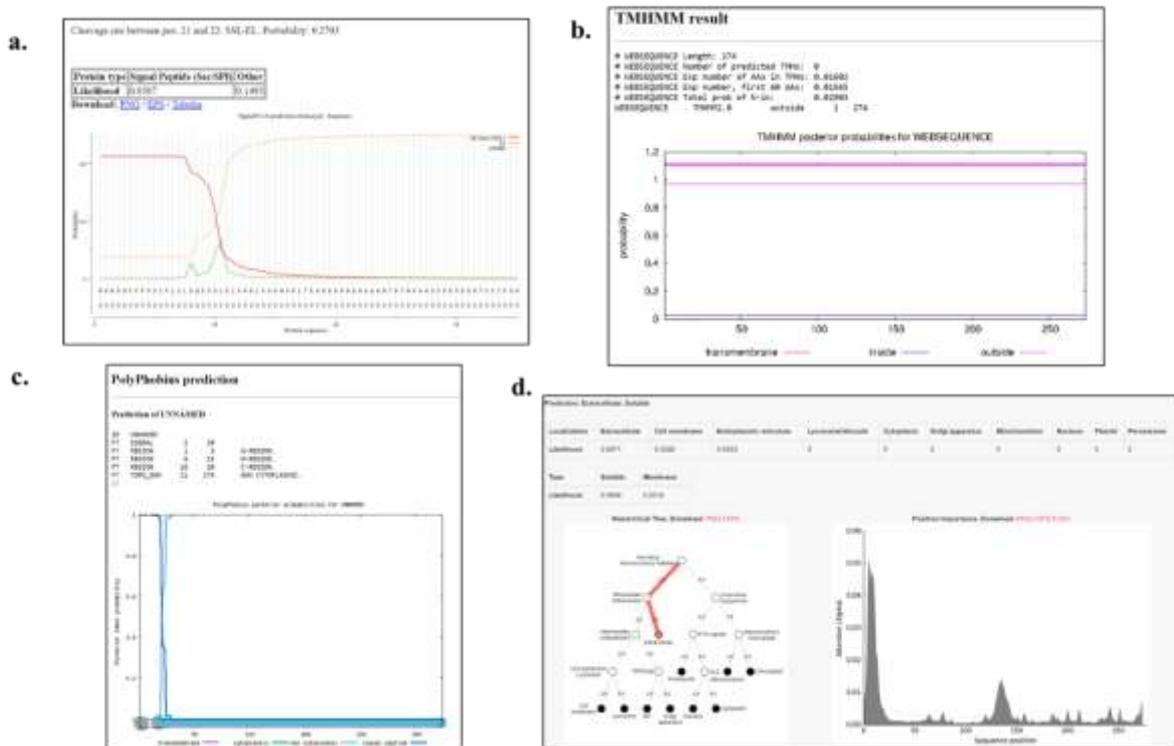
Para determinar si los datos tenían una distribución normal y si había homogeneidad de varianzas se utilizó una herramienta estadística para el análisis de factores de población, SPSS versión 20. Con los resultados obtenidos se hizo una análisis paramétrico recurriendo a un prueba T student.

## **2. Resultados y Discusión**

### **2.1 La proteína PvSPATR es una proteína soluble que se transloca hacia la membrana u organelos apicales. .**

Durante el complejo ciclo de invasión del parásito de la malaria, se han reportado un alto número de proteínas que participan en interacciones del tipo receptor-ligando. En general estos ligandos se caracterizan por; i) la presencia de un péptido señal de exporte hacia organelos especializados o membrana plasmática, ii) dominios transmembranales o anclajes via glicosilfosfatidilinositol o localización extracelular y iii) motivos implicados en adhesión celular. Para evaluar estas características, se tomó la secuencia de aminoácidos de la proteína PvSPATR de la cepa Sal-1 de *P. vivax* para ser evaluada en diferentes herramientas bioinformáticas. Con la herramienta Signal P se encontró que PvSPATR presenta un péptido señal de 21 aminoácidos que es escindido por una peptidasa tipo I entre los residuos L21 y

E22 (Figura 4a). Signal P versión 5.1 es una herramienta bioinformática optimizada que se basa en el método redes neuronales profundas combinado con clasificación de campo aleatorio condicional y aprendizaje de transferencia optimizado para predecir con mayor exactitud y la existencia de un péptido señal (PS) (Armenteros et al., 2019). Aunque no se ha reportado la correcta localización de SPATR en *P. vivax*, previos estudios en otras especies han mostrado su localización en las roptrias. La presencia de péptido señal en *PvSPATR* permitiría que esta proteína se transloque al RE por medio del complejo Sec61 quienes son transportadas a las cisternas de Golgi que las empaqueta en vesículas recubiertas de COPII para ser redistribuidas al cuello y bulbo del orgánulo(Counihan, Kalanon, Coppel, & de Koning-Ward, 2013).



**Figura 4. Análisis bioinformáticos de la secuencia de aminoácidos de *PvSPATR*.** Se muestran los resultados arrojados por cada programa a) SignalP versión 5.1; b) TMHMM; c) Predicción por Polyphobius y finalmente d) Localización subcelular de *PvSPATR* por DepLoc.

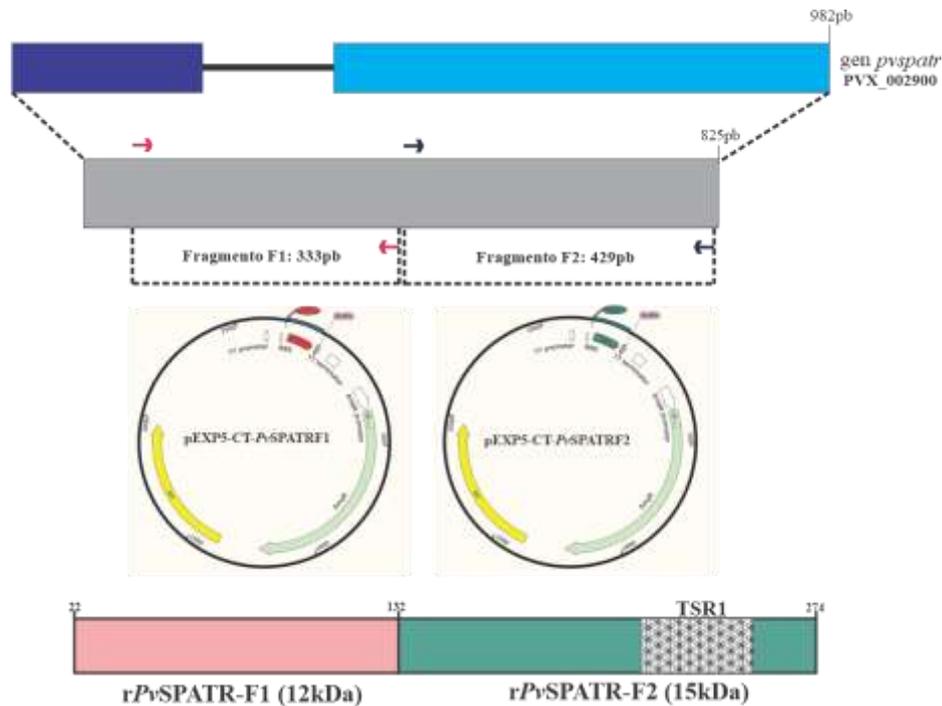
La presencia de dominios transmembrana de *PvSPATR* fue analizada con la herramienta TMHMM quien distingue entre proteínas solubles y transmembranales a partir de modelos ocultos de Markov (Möller et al., 2002). Para *PvSPATR* no se encontró ninguna región transmembranal (Figura 4 b y c) ni anclajes via GPI (datos no mostrados). Para confirmar este resultado, la proteína fue corrida en el programa Polyphibus, el cual combina topología transmembranal y predicción de péptido señal mediante modelos ocultos de Markov y

homología de secuencias. Los resultados mostraron predicciones similares a lo encontrado para SignalP y TMHMM (Figura 4 a-c).

Para determinar la localización subcelular de *PvSPATR* se utilizó el algoritmo de predicción DeepLoc que utiliza el modelo de redes neuronales profundas (Almagro Armenteros, Sønderby, Sønderby, Nielsen, & Winther, 2017). Los resultados de la predicción mostraron una alta probabilidad de que la proteína una vez expresada es secretada (0.9984) o trasladada a los organelos especializados tales como las roptrias (Figura 4d). Estos análisis muestran que *PvSPATR* contiene características típicas de proteínas involucradas en el proceso de invasión.

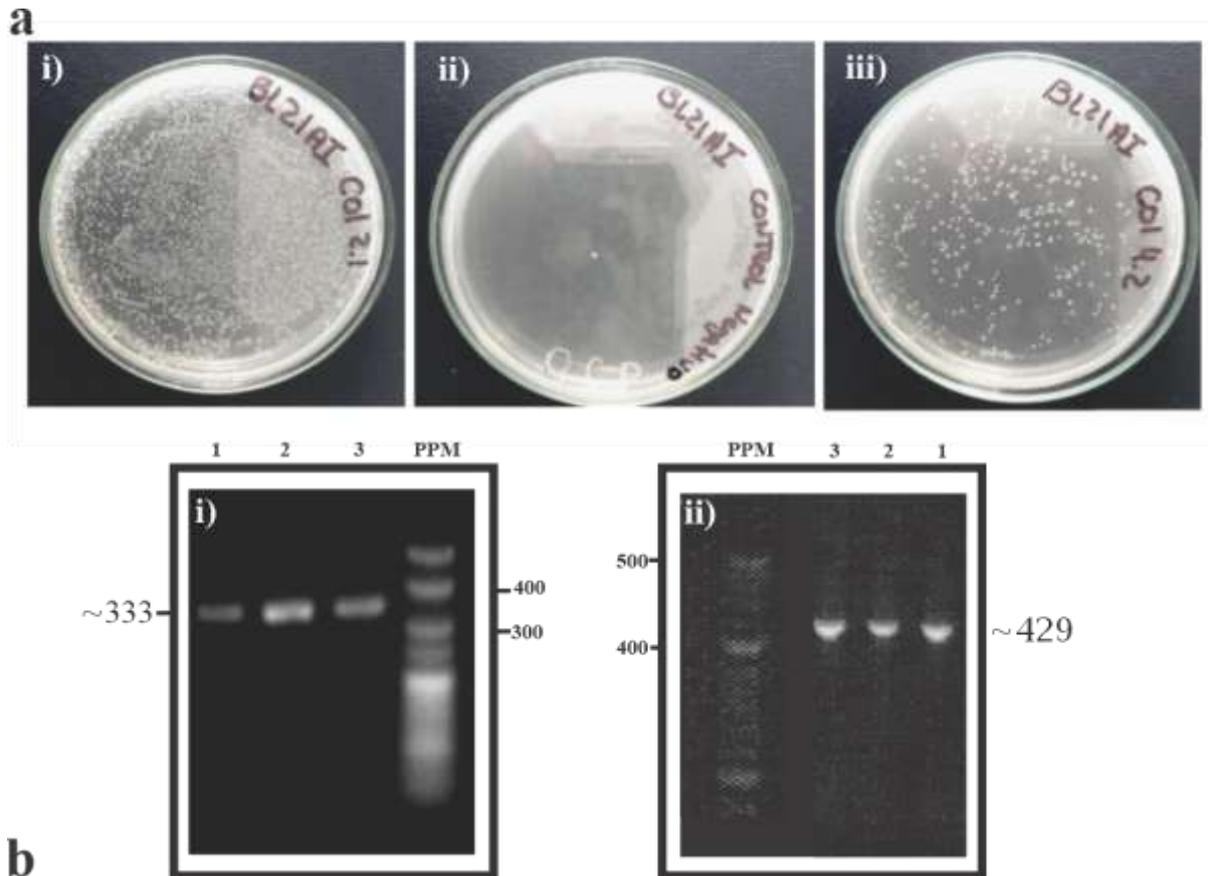
## **2.2 Obtención exitosa de clones para la producción de proteínas recombinantes.**

Previos estudios de diversidad genética han mostrado que una región localizada hacia el extremo carboxi-terminal de la proteína *PvSPATR* presenta una baja diversidad genética con varios sitios de selección negativa con  $\omega$  menores a 1, lo que llevo a sugerir a los autores que esta región podría estar implicada en la interacción con células hospederas (Garzon-Ospina et al., 2018). A partir de allí, *Acosta Muñoz* y *Arias Garcia* en su tesis de pregrado, diseñaron dos plásmidos recombinantes que contenían cada uno una región de la proteína *PvSPATR* denominadas F1 localizada hacia el amino terminal (elevada diversidad genética-selección positiva) y la región F2 localizada hacia el extremo carboxi-terminal (baja diversidad genética) (Figura 5). Con este trabajo realizado, en esta nueva investigación se tomaron bacterias TOP10 recombinantes que contenían los plásmidos pEXP5-CT-*PvSPATR*-F1 y pEXP5-CT-*PvSPATR*-F2 y se usaron para la extracción de estos (Figura 5). Los dos plásmidos fueron confirmados por secuenciación y utilizados para la transformación de bacterias BL21AI. Estas bacterias contienen toda la maquinaria para la expresión de la región génica que codifica para la región F1 y F2 de *PvSPATR* bajo el control del operón araBAD. En este operón se cambió el locus araB por el gen que codifica para la RNA polimerasa T7. Esta polimerasa una vez expresada reconocerá la secuencia promotora del plásmido y permitirá la expresión de las recombinantes.



**Figura 5. Estructura génica de PvSPATR y fragmentos expresados.** Se muestra la estructura del gen *pvspatr* compuesto de dos exones (cajas morada y azul) y un intrón. Una vez el gen se transcribe, el mRNA equivale a un fragmento codificante de 825pb. Sobre esta secuencia (caja gris) se muestra la localización de los cebadores. En flechas rojas los cebadores para amplificar la región F1 y en azul para amplificar la región F2. Cada fragmento amplificado fue clonado en el vector pEXP5-CT-TOPO de acuerdo a previos trabajos (Acosta Muñoz & Arias García, 2020). Cada uno de estos plásmidos denominados pEXP5-CT-*PvSPATRF1* y pEXP5-CT-*PvSPATRF2* se utilizaron para transformar células BL21AI y producir dos fragmentos proteicos que se muestran en color rosado y verde.

Como se observa en la Figura 6a se obtuvieron bacterias recombinantes puntiformes sobre agar LB suplementado con ampicilina para los dos plásmidos recombinantes. No se observaron colonias en bacterias transformadas con agua libre de nucleasas (Figura 6a-ii). Para confirmar la presencia de los fragmentos génicos, se realizaron PCRs sobre tres colonias recombinantes por fragmento. Para las colonias analizadas, se amplificó una banda de aproximadamente 333pb que corresponden al tamaño del fragmento F1 de *Pvspatr* y de 429pb para el tamaño del fragmento F2 de *Pvspatr* (Figura 5 y 6b).



**b**  
**Figura 6. Obtención de clones recombinantes para cada uno de los fragmentos de la proteína PvSPATR. En a se muestra el crecimiento de bacterias recombinantes transformadas con los vectores pEXP5-CT-PvSPATRF1 y pEXP5-CT-PvSPATRF2 y crecidas sobre agar LB mas ampicilina. En b se observan las PCR de colonia de tres colonias recombinantes donde se confirma el tamaño de los fragmentos de F1 y F2. Se nombró cada colonia una como col 2.1, col 3.1 y col 4.1 que representan la región F1 y col 1.2, col 2.2 y col 4.2 quienes contienen el fragmento de 429 pb.**

### 3.3 Dos regiones de la proteína SPATR fueron expresadas exitosamente en un sistema de expresión heteróloga.

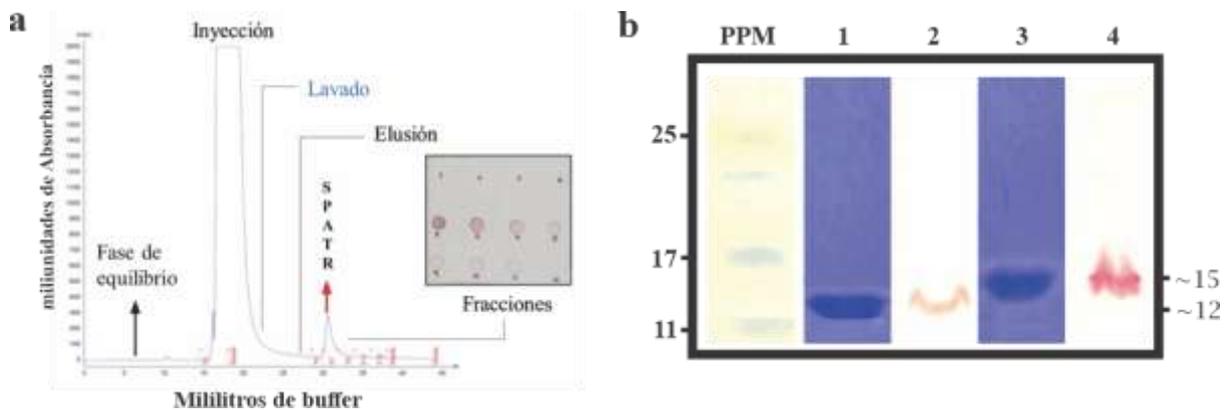
La colonia 2.1 (región F1) y la colonia 4.2 (región F2) fueron crecidas y la expresión de cada proteína fue inducida con L-arabinosa y conseguida luego de una incubación durante toda la noche. Una vez extraída la proteína utilizando buffer soluble suplementado con lisozima, dnasa e inhibidores de proteasa, esta fue resuelta en geles de poliacrilamida y las proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa. Un anticuerpo anti-histidinas fue utilizado para detectar cada proteína recombinante. Ambas regiones fueron clonadas en marco con una etiqueta de seis histidinas. Los resultados mostraron una banda del peso molecular esperado para la proteína **rPvSPATR-F1** de aproximadamente 12.5 kDa y de 15kDa para la proteína **rPvSPATR-F2**. Previos estudios con proteínas recombinantes en malaria han reportado que la mayoría se obtiene en cuerpos o agregados insolubles proteicos, que imponen retos importantes para la solubilización de las proteínas recombinantes. Para esto se requiere de pasos fuertes de solubilización con agentes caotrópicos, seguido de purificación y métodos de

replegamiento de la proteína. Sin embargo, muchas veces estos procesos de solubilización y re-plegamiento son llevados de forma empírica con un bajo rendimiento a nivel de concentración y función (Villaverde & Carrio, 2003). En proyectos de investigación con fines diagnósticos o terapéuticos se requieren cantidades de proteínas puras, solubles y biológicamente activas. Debido a esto los sistemas de expresión deben suplir características de calidad, facilidad de aislamiento y factibilidad económica, además de tener en cuenta características claves como las propiedades bioquímicas de la proteína a trabajar, su localización, modificaciones postraduccionales y características de crecimiento en el hospedero (González & Fillat, 2018).

Afortunadamente, las dos regiones de la proteína PvSPATR fueron obtenidos de forma soluble, lo cual no requirió ningún proceso de denaturación. Por su parte el uso de bacterias como modelo de expresión heteróloga ha sido uno de los más utilizados gracias a su alta densidad de cultivo que permite un mayor número de copias del vector insertado, fácil manipulación molecular, bajos costos de producción, su óptima conservación y gran compatibilidad con técnicas y herramientas biomoleculares (García et al., 2013; Jana & Deb, 2005; Structural Genomics et al., 2008). Sin embargo, la producción de proteínas con modificaciones postraduccionales podría afectar drásticamente su función. Para esto se han reportado otros sistemas como los eucariotas que permiten al investigador aumentar el mosaico y productividad de las proteínas gracias a su eficiencia para permitir modificaciones postraduccionales, correcto plegamiento, actividad *in vivo* y vías secreción. En el caso de las regiones de PvSPATR se ha encontrado que estas no requieren de modificaciones importantes tales como glicosilaciones debido a que no se ha reportado este tipo de modificaciones en esta proteína y a que el parásito tiene una baja capacidad para hacer N-glicosilaciones y no cuenta con el sistema de O-glicosilaciones (Gowda & Davidson, 1999).

Una vez recuperada las proteínas recombinantes, éstas fueron sometidas a un proceso de purificación por cromatografía de afinidad dependiente de metales, utilizando un FPLC. Allí, se aprovechó, la etiqueta de seis histidinas que contienen los fragmentos recombinantes de PvSPATR en el extremo N-terminal en función de la similitud de la histidina con el anillo imidazol y la especificidad que tiene este, para formar un complejo de coordinación con el ligando Ni<sup>+</sup> unido a la matriz (fase estacionaria) en forma de NiSO<sub>4</sub> en la columna HisTrap

FF 1ml que tiene una estructura de poro abierta, se mantiene estable al cambio de Ph y maneja una alta capacidad de unión(Hedlund et al., 2006; Mexico, 2007). La presencia de la proteína se monitorizo a una longitud de onda de 280 nm (absorción de los anillos aromáticos presentes en la proteína), observando un pico de 300mAU (mili-unidades de absorbancia) en el cromatograma (Figura7a). La presencia de las proteínas recombinantes en las fracciones obtenidas fue confirmada por Dot Blot (Figura 7a). Una vez dializadas y concentradas las fracciones de proteínas fueron corridas en geles de poliacrilamida y confirmada la pureza y tamaño de las recombinantes. Como se observa en la figura 7b, luego de los procesos de extracción, purificación, diálisis y concentración se obtuvo una única banda para la región F1 y una banda para la región F2. Las concentraciones de cada fragmento oscilo aproximadamente en 400 µg/mL (rPvSPATR-F1) y en (~700 µg/mL).



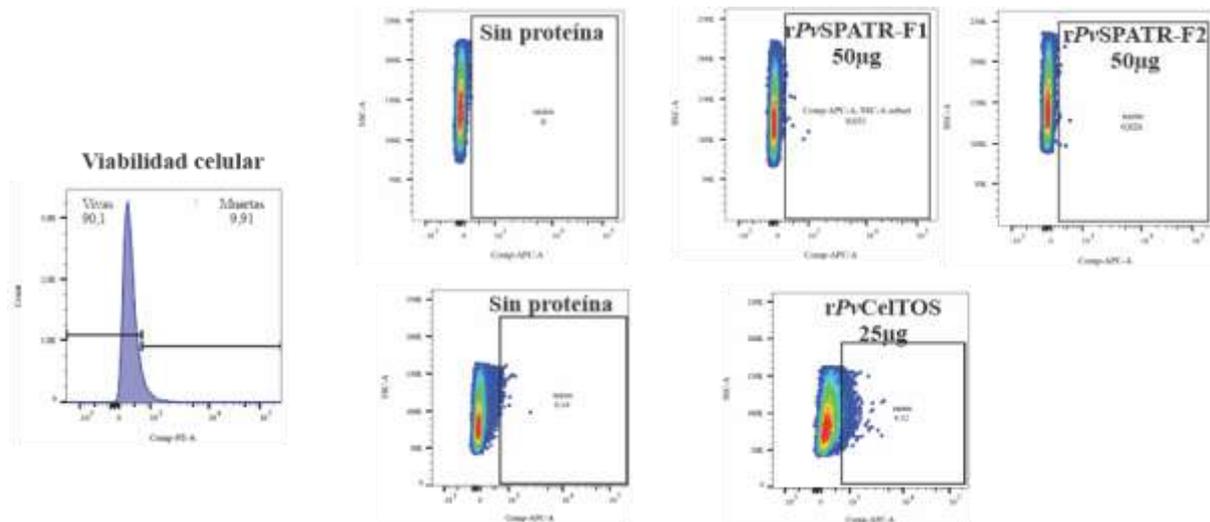
**Figura 7. Purificación de los dominios de la proteína recombinante PvSPATR;** a) cromatograma de purificación por cromatografía de afinidad y verificación de fracciones por Dot Blot. Se obtuvo un pico de 300 mAu midiendo la absorbancia a 280 nm. El tiempo de retención se encuentra entre los 15 mL y 32 mL, 20 minutos aproximadamente. Se observan las fracciones 5, 6 y 7 del dot blot con alta concentración de proteína. Expresión y purificación de la proteína PvSPATR recombinante corrida en SDS-PAGE después de ser purificada por cromatografía de afinidad. Carril 1; patrón de peso molecular, carril 2; azul de comassie unido a proteína soluble F1; carril 3; banda de 12 kDa formada en western blot y posterior purificación de la extracción de PvSPATR F1, carril 4; gel mezclado con azul de comassie fragmento F2, carril 5; banda de ~15 kDa representativa de la región F2.

### 3.4 Ninguna de las regiones de la proteína SPATR interactúan con las células hepáticas

La evaluación de la actividad de unión de los fragmentos rPvSPATR-F1 y rPvSPATR-F2 a células HepG2 se realizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-histidinas acoplado a APC. La selección de la población inicio con la eliminación de dupletas (FSC-A versus FSC-H) seguido de un análisis de tamaño por complejidad (FSC - SSC). A partir de este plot se seleccionó la población de estudio y se midió la viabilidad celular utilizando yoduro de propidio. En general se encontró una viabilidad de ~ 90 % ± 1 (Figura 8a). Sobre la población de células vivas se determinó el porcentaje de unión de cada proteína

recombinante a células hepáticas. Para el fragmento rPvSPATR-F1 se encontró un porcentaje de unión de  $0.056 \pm 0,00778$  y para el fragmento rPvSPATR-F2 de  $0.063 \pm 0,00778$ , lo que sugiere que ninguna de las dos regiones de SPATR de *P. vivax* interactúa con la célula hospedera. Como control de unión se utilizó una proteína recombinante denominada PvCeLTOS que ha mostrado en previos estudios interacción con células hepáticas (Arevalo-Pinzon et al., 2020). Como se muestra en la figura 8, la proteína se unió a HepG2 en un  $4,52\% \pm 1$ .

Previas investigaciones han caracterizado la unión de diferentes proteínas recombinantes en distintas etapas del ciclo de vida de *P. falciparum*, *P. knowlesi* y *P. vivax*. Entre las diversas proteínas que expresa el esporozoito se han encontrado CeLTOS y TRSP (Hernando Curtidor et al., 2012) (Shabani et al., 2017). Por otra parte, estudios de la proteína adhesiva relacionada con trombospondina (TRAP) de *P. falciparum* mostraron una interacción con células HepG2 que fue dependiente de la concentración y saturable a  $20 \mu\text{g}$  de proteína (Mehrizi, Ameri Torzani, Zakeri, Jafary Zadeh, & Babaeekhou, 2018). Por su parte, estudios realizados con la proteína SPATR de *P. falciparum* (Chattopadhyay et al., 2003) y *P. knowlesi* mostraron una fuerte unión con células HepG2 dependiente de la concentración, lo que llevo a sugerir, junto con los estudios de inhibición de la invasión de esporozoitos, que SPATR es un excelente candidato vacunal en el estadio hepático. Sin embargo, recientemente en la especie de *P. berghei*, análisis mutacionales no encontraron una relevancia funcional de SPATR en estadio hepático, pero si en el estadio eritrocítico. En nuestro caso, SPATR de *P. vivax* no interactuó con las células hepáticas lo que sugiere una falta de interacción directa de esta proteína con la superficie de las células blanco.



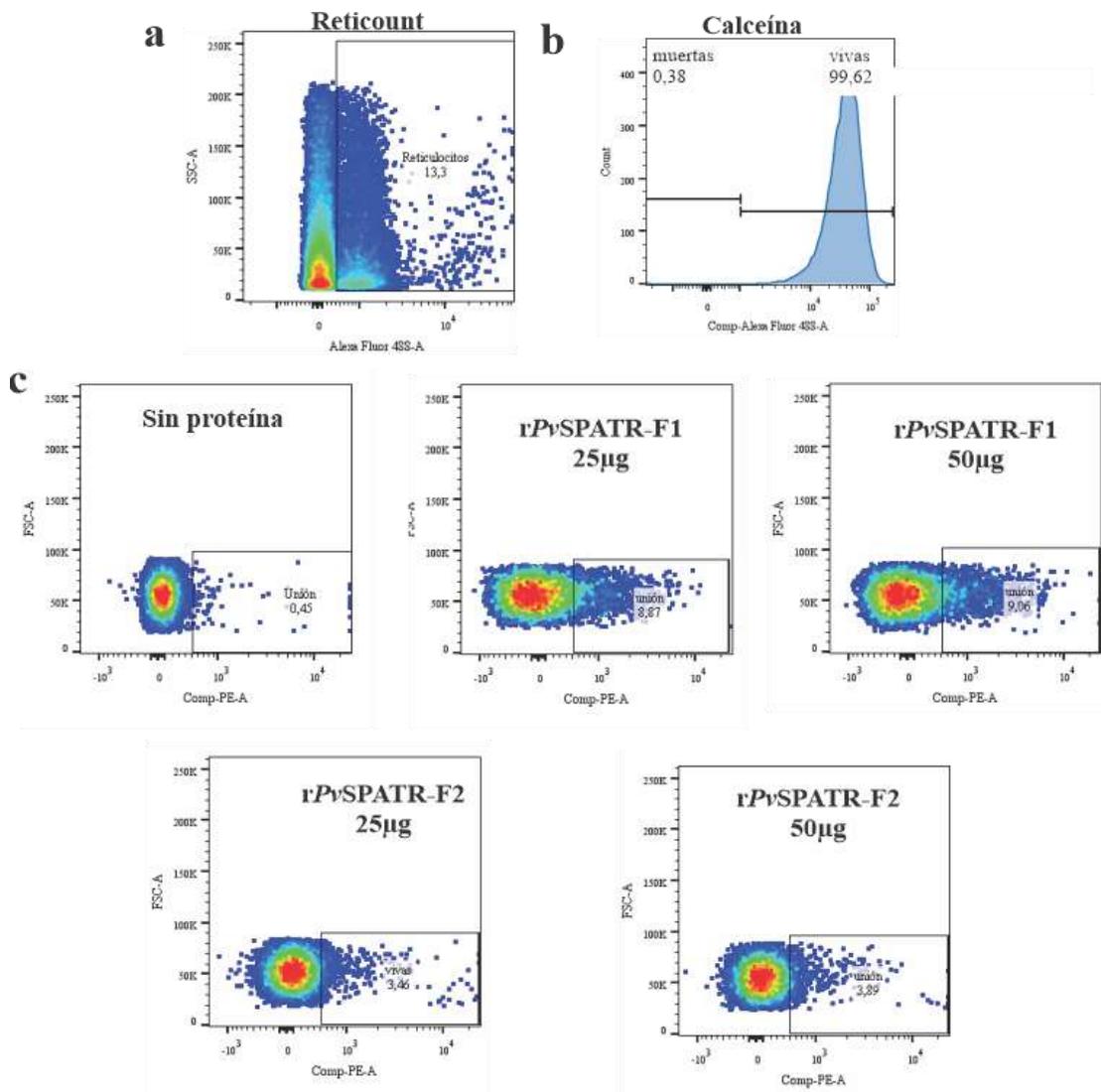
**Figura 8. Actividad de unión de los fragmentos recombinantes a células hepáticas HepG2.** La viabilidad celular fue determinada utilizando yoduro de propidio como el agente que solo ingresa a la célula por pérdida de la integridad de la membrana. Aquellas células que no se desplazaron fueron consideradas como vivas. d) Sobre la población de vivas se determinó el porcentaje de unión. Se muestran las células incubadas en ausencia y en presencia de las proteínas recombinantes. Se hicieron tres réplicas del ensayo cada uno por triplicado. Se muestra el experimento más representativo.

### 3.5 Ambas regiones de la proteína SPATR interactúan con reticulocitos humanos.

Para determinar si los fragmentos recombinantes de SPATR podrían participar en procesos de adhesión sobre reticulocitos humanos se llevó a cabo un ensayo similar al de HepG2 pero con células eritroides. Teniendo en cuenta que *P. vivax* invade reticulocitos humanos CD71<sup>+</sup> (Malleret et al., 2015) y que estos tan solo representan del 0,5% en sangre periférica se hizo un proceso de concentración de reticulocitos a partir de muestras de mujeres en periodos menstruales. Luego del procedimiento descrito en el numeral 1.7, se encontró un enriquecimiento de ~ 13%.

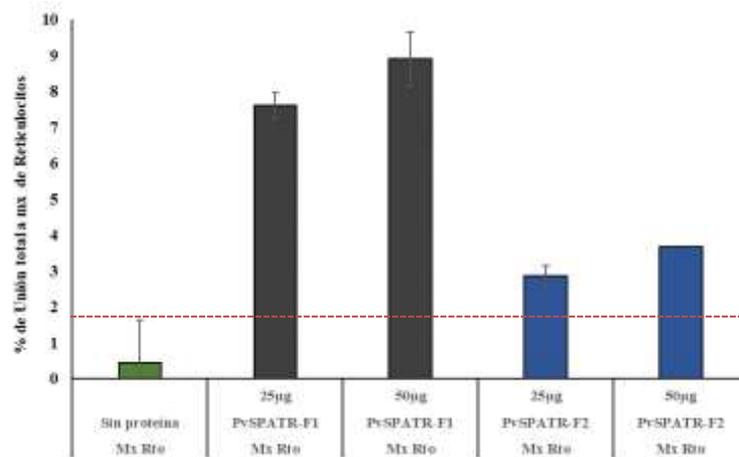
La evaluación de la actividad de unión de los fragmentos rPvSPATR-F1 y rPvSPATR-F2 a muestras de reticulocitos concentrados se realizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-histidinas acoplado a PE. La selección de la población tuvo como parámetros la eliminación de dupletas por altura y área. A partir de este plot se seleccionó la población de estudio y se midió la viabilidad celular utilizando Calceina AM que interactúa con esterasas citosólicas produciendo una fluorescencia verde. Como control se colocaron los reticulocitos solo con el anticuerpo anti-histidinas mostrando un porcentaje de unión de  $0.45 \pm 0,02$ . De forma interesante se encontró que el fragmento rPvSPATR-F1 se unió a las células eritroides en un  $8.9 \pm 0.1344$  y que esta unión fue dependiente de la cantidad de proteína adicionada (Figura 9). De igual forma el fragmento rPvSPATR-F2 también interactuó con estas células mostrando un porcentaje de unión de  $3.67 \pm 0,3041$  dependiente de la concentración. (Figura 9). Los datos mostraron homogeneidad de varianza y distribución

normal. Al hacer el análisis estadístico se determinó que en todas las uniones a reticulocitos humanos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la unión de cada uno de los fragmentos recombinantes y el control sin proteína (Figura 10). Estos datos muestran por primera vez la participación en el proceso de adhesión de la proteína SPATR en el ciclo intraeritrocítico y sugiere continuar con su estudio en aras de identificar en estos fragmentos cuáles son las mínimas regiones de interacción que puedan llegar a servir como blancos terapéuticos para el desarrollo de una vacuna contra esta especie parasitaria que tanto afecta a nuestro país. También se sugieren estudios inmunológicos que muestren las propiedades antigénicas e inmunogénicas de estos dos fragmentos. Por último, se sugiere trabajos adicionales que logren determinar si la unión a muestras concentradas de reticulocitos es a reticulocitos CD71<sup>+</sup>.



**Figura 9. Actividad de unión de los fragmentos recombinantes a muestras concentradas de reticulocitos humanos.** a) se muestra el porcentaje de purificación de reticulocitos humanos a partir de sangre periférica. Se

muestra la señal de los reticulocitos marcados con Reticount leídos con el fluorocromo Alexa 488. b) Viabilidad celular medida utilizando Calceína AM. Este reactivo solo es fluorescente en células vivas. Se muestra el histograma de las células con Calceína. c) Porcentaje de unión de los fragmentos recombinantes a la población de reticulocitos medido con un anticuerpo anti-histidinas acoplado a phycoeritrina-PE. Dos diferentes cantidades de proteínas fueron ensayadas (25µg y 50µg). Se hicieron tres réplicas del ensayo cada uno por triplicado



**Figura 10. Análisis estadístico de unión total de los fragmentos recombinantes a muestras concentradas de reticulocitos humanos.** Los fragmentos recombinantes demuestran una actividad de unión dependiente de la concentración. Porcentajes de unión que sobrepasen la línea roja fueron considerados como positivos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada región y el control sin proteína, así mismo se encontraron diferencias entre las uniones entre cada uno de los fragmentos. Se realizó una prueba t student.

#### 4. Conclusiones

*Plasmodium vivax* se ha convertido en un grave problema de salud pública en la zona de las Américas. El cambio en su biología y mecanismos especializados de invasión producto de la selección natural, ejercida por la migración del mosquito *Anopheles* hembra de zonas tropicales a zonas templadas aumento su capacidad de invasión, induce estados de latencia, su ciclo de desarrollo es más corto y expresa proteínas en la superficie de los glóbulos rojos para adherirse a tejidos y ocultar su presencia del sistema inmune.

La proteína SPATR es una proteína multiestadio, que contiene un TSR alterado y que hasta este trabajo no se conocía las propiedades de adhesión de SPATR en *Plasmodium vivax*. A partir de la secuencia del gen insertada en el plásmido PEXP5-CT-TOPO se obtuvieron clones recombinantes en células competentes BIA21AI, indicados como col 4.2 para el fragmento F1 y col 2.1 para el fragmento F2 que contiene un dominio funcional de repetición de trombospondina alterado 1 (TSR) 1. Las células BL21AI expresaron con éxito los dos fragmentos de *Pv*SPATR como proteínas solubles. Se obtuvo una única banda de peso molecular esperado para la región *Pv*SPATR F1 de 12 kDa y para el fragmento F2 de 15 kDa, observadas a través de un western blot y purificadas por cromatografía de afinidad.

La citometría reveló que ninguno de los fragmentos expresados de PvSPATR interactúan con la membrana de las células HepG2, lo que sugiere que PvSPATR no participa directamente en la interacción receptor-ligando de *P. vivax* en el estadio hepático. Sin embargo, esta proteína si presenta funciones de adhesión sobre una muestra de reticulocitos enriquecidos. Futuros estudios son requeridos para confirmar la interacción específica con reticulocitos CD71+ y determinar la relevancia funcional de esta interacción. La información obtenida de este trabajo es útil para definir blancos terapéuticos en contra de *Plasmodium vivax*.

### **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Antonio Nariño y La Fundación Instituto de Colombia por ayudar a que la ciencia se expanda y el gremio de Bioquímicos aumente.

Agradezco a mi directora de tesis por aceptarme tal como soy, por no abandonarme en mis peores momentos y ayudarme a creer en mí. Sera siempre un ejemplo que seguiré fielmente y una amiga que guardare en mi ser como la maestra de la luz.

A mis profesores de la UAN por otorgarme los pilares para ser un buen profesional. Destaco a las Doctoras Mónica Lozada y María Elisa quienes me exigieron al máximo y plasmaron siempre sus cátedras un escalón más alto a los demás.

A mis profesores de La FIDIC, Jeimmy Castañeda, Fredy pulido y Adriana Barreto quienes respeto y admiro.

A mis compañeros de carrera, en especial a Valentina, Wendy, Nicol y Sergio por ser reales y acompañarme en este camino tan especial para nuestras vidas.

A mi madre por ser tan valiente y guerrera en la vida. Por darme él estudió y enseñarme a ser persona.

Le dedico esta tesis a mi abuelo y padre, que en paz descanse, nunca olvidaré tu sonrisa y buen ejemplo ante la vida. También a la vida y a la naturaleza que merecen un mundo que vea la ciencia como filosofía y no como cultura general, que merecen compasión, respeto y amor.

### **Referencias Bibliográficas**

- Acosta Muñoz, L. M., & Arias García, L. N. (2020). *Clonación y expresión de dos fragmentos de la proteína Spatr de plasmodium vivax en el sistema Escherichia coli*. (Bacteriología y Laboratorio Clínico Investigación), Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca,
- Adams, J. H., & Mueller, I. (2017). The Biology of Plasmodium vivax. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(9). doi:10.1101/cshperspect.a025585

- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, *33*(21), 3387-3395. doi:10.1093/bioinformatics/btx431
- Arevalo-Pinzon, G., Garzon-Ospina, D., Pulido, F. A., Bermudez, M., Forero-Rodriguez, J., Rodriguez-Mesa, X. M., . . . Patarroyo, M. A. (2020). Plasmodium vivax Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) Functionally Restricted Regions Are Involved in Specific Host-Pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 119. doi:10.3389/fcimb.2020.00119
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., . . . Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, *37*(4), 420-423.
- Arnot, D. E., Barnwell, J. W., Tam, J. P., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., & Enea, V. (1985). Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science*, *230*(4727), 815-818. doi:10.1126/science.2414847
- Ashley, E. A., Pyae Phy, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *Lancet*, *391*(10130), 1608-1621. doi:10.1016/S0140-6736(18)30324-6
- Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., . . . Harb, O. S. (2009). PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research*, *37*(suppl\_1), D539-D543.
- Bourgard, C., Albrecht, L., Kayano, A., Sunnerhagen, P., & Costa, F. T. M. (2018). Plasmodium vivax Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*, *8*, 34. doi:10.3389/fcimb.2018.00034
- Bourgard, C., Albrecht, L., Kayano, A. C. A. V., Sunnerhagen, P., & Costa, F. T. M. (2018). Plasmodium vivax Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(34). doi:10.3389/fcimb.2018.00034
- Campo, B., Vandal, O., Wesche, D. L., & Burrows, J. N. (2015). Killing the hypnozoite-- drug discovery approaches to prevent relapse in Plasmodium vivax. *Pathog Glob Health*, *109*(3), 107-122. doi:10.1179/2047773215Y.0000000013
- Carlton, J. M., Adams, J. H., Silva, J. C., Bidwell, S. L., Lorenzi, H., Caler, E., . . . Fraser-Liggett, C. M. (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. *Nature*, *455*(7214), 757-763. doi:10.1038/nature07327

- Chan, L. J., Dietrich, M. H., Nguiragool, W., & Tham, W. H. (2020). Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cell Microbiol*, 22(1), e13110. doi:10.1111/cmi.13110
- Chattopadhyay, R., Rathore, D., Fujioka, H., Kumar, S., de la Vega, P., Haynes, D., . . . Hoffman, S. L. (2003). PfSPATR, a Plasmodium falciparum protein containing an altered thrombospondin type I repeat domain is expressed at several stages of the parasite life cycle and is the target of inhibitory antibodies. *J Biol Chem*, 278(28), 25977-25981. doi:10.1074/jbc.M300865200
- Counihan, N. A., Kalanon, M., Coppel, R. L., & de Koning-Ward, T. F. (2013). Plasmodium rhoptry proteins: why order is important. *Trends in parasitology*, 29(5), 228-236.
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, 167(3), 610-624. doi:10.1016/j.cell.2016.07.055
- Curtidor, H., Arévalo-Pinzón, G., Bermudez, A., Calderon, D., Vanegas, M., Patino, L. C., . . . Patarroyo, M. E. (2012). Binding activity, structure, and immunogenicity of synthetic peptides derived from Plasmodium falciparum CelTOS and TRSP proteins. *Amino acids*, 43(1), 365-378.
- Curtidor, H., Garcia, J., Vanegas, M., Puentes, F., Forero, M., & Patarroyo, M. E. (2008). Identification of peptides with high red blood cell and hepatocyte binding activity in the Plasmodium falciparum multi-stage invasion proteins: PfSPATR and MCP-1. *Biochimie*, 90(11-12), 1750-1759. doi:10.1016/j.biochi.2008.08.003
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., . . . Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe*, 24(1), 43-56. doi:10.1016/j.chom.2018.06.008
- Dundas, K., Shears, M. J., Sinnis, P., & Wright, G. J. (2019). Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection. *Trends Parasitol*, 35(2), 129-139. doi:10.1016/j.pt.2018.11.008
- Espinosa-Velez, Y., Altamiranda-Saavedra, M., & Correa, M. M. (2020). Potential distribution of main malaria vector species in the endemic Colombian Pacific region. *Trop Med Int Health*, 25(7), 861-873. doi:10.1111/tmi.13399
- Galinski, M. R., & Barnwell, J. W. (2008). Plasmodium vivax: who cares? *Malar J*, 7 Suppl 1, S9. doi:10.1186/1475-2875-7-S1-S9
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli %J Vaccimonitor. 22, 30-39.

- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., . . . Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *419*(6906), 498-511. doi:10.1038/nature01097
- Garzon-Ospina, D., Buitrago, S. P., Ramos, A. E., & Patarroyo, M. A. (2018). Identifying Potential *Plasmodium vivax* Sporozoite Stage Vaccine Candidates: An Analysis of Genetic Diversity and Natural Selection. *Front Genet*, *9*, 10. doi:10.3389/fgene.2018.00010
- González, A., & Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*, *37*(1), 14-27.
- Gowda, D. C., & Davidson, E. A. (1999). Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today*, *15*(4), 147-152. doi:10.1016/s0169-4758(99)01412-x
- Gruszczyk, J., Kanjee, U., Chan, L. J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N. T. Y., . . . Tham, W. H. (2018). Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. *Science*, *359*(6371), 48-55. doi:10.1126/science.aan1078
- Gupta, R., Mishra, A., Choudhary, H. H., Narwal, S. K., Nayak, B., Srivastava, P. N., & Mishra, S. (2020). Secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) is essential for asexual blood stages but not required for hepatocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Microbiol*, *113*(2), 478-491. doi:10.1111/mmi.14432
- Gupta, R., Mishra, A., Choudhary, H. H., Narwal, S. K., Nayak, B., Srivastava, P. N., & Mishra, S. (2020). Secreted protein with altered thrombospondin repeat (SPATR) is essential for asexual blood stages but not required for hepatocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular microbiology*, *113*(2), 478-491.
- Hedlund, H., Öberg, K., Lundqvist, J., Marteleur, K., Zou, J., Eshaghi, S., . . . Grasberger, B. L. (2006). New prepacked 96- well filter plates, His MultiTrap FF and His MultiTrap HP for reproducible purification screening of histidine- tagged proteins. In: Wiley Online Library.
- Hutter, H., Vogel, B. E., Plenefisch, J. D., Norris, C. R., Proenca, R. B., Spieth, J., . . . Scheel, J. (2000). Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science*, *287*(5455), 989-994.
- Instituto Nacional de Salud. (2021). *Boletín Epidemiológico semanal: Semana epidemiológica 40 3 al 9 de octubre de 2021*. Retrieved from

- Jana, S., & Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(3), 289-298. doi:10.1007/s00253-004-1814-0
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W429-W432.
- Lawler, J., & Hynes, R. O. (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol*, 103(5), 1635-1648. doi:10.1083/jcb.103.5.1635
- Lyke, K. E. (2017). Steady progress toward a malaria vaccine. *Curr Opin Infect Dis*, 30(5), 463-470. doi:10.1097/QCO.0000000000000393
- Mahajan, B., Jani, D., Chattopadhyay, R., Nagarkatti, R., Zheng, H., Majam, V., . . . Rathore, D. (2005). Identification, cloning, expression, and characterization of the gene for *Plasmodium knowlesi* surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain. *Infection and immunity*, 73(9), 5402-5409.
- Mahajan, B., Jani, D., Chattopadhyay, R., Nagarkatti, R., Zheng, H., Majam, V., . . . immunity. (2005). Identification, cloning, expression, and characterization of the gene for *Plasmodium knowlesi* surface protein containing an altered thrombospondin repeat domain. 73(9), 5402-5409.
- Malleret, B., Li, A., Zhang, R., Tan, K. S., Suwanarusk, R., Claser, C., . . . Russell, B. (2015). *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*, 125(8), 1314-1324. doi:10.1182/blood-2014-08-596015
- Mehrizi, A., Ameri Torzani, M., Zakeri, S., Jafary Zadeh, A., & Babaeekhou, L. (2018). Th1 immune response to *Plasmodium falciparum* recombinant thrombospondin- related adhesive protein (TRAP) antigen is enhanced by TLR3- specific adjuvant, poly (I: C) in BALB/c mice. *Parasite immunology*, 40(7), e12538.
- Mexico, U. A. d. (2007). *Técnicas cromatográficas*. Mexico. [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Miller, L. H., McAuliffe, F. M., & Mason, S. J. (1977). Erythrocyte receptors for malaria merozoites. *Am J Trop Med Hyg*, 26(6 Pt 2), 204-208. doi:10.4269/ajtmh.1977.26.204
- Möller, S., Croning, M. D., & Apweiler, R. (2002). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, 18(1), 218-218.

- Mota, M. M., Hafalla, J. C., & Rodriguez, A. (2002). Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nat Med*, 8(11), 1318-1322. doi:10.1038/nm785
- Ntumngia, F. B., McHenry, A. M., Barnwell, J. W., Cole-Tobian, J., King, C. L., & Adams, J. H. (2009). Genetic variation among Plasmodium vivax isolates adapted to non-human primates and the implication for vaccine development. *Am J Trop Med Hyg*, 80(2), 218-227.
- Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J., & Anstey, N. M. (2007). Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl), 79-87.
- Rangel, G. W., Clark, M. A., Kanjee, U., Goldberg, J. M., MacInnis, B., Jose Menezes, M., . . . Duraisingh, M. T. (2020). Plasmodium vivax transcriptional profiling of low input cryopreserved isolates through the intraerythrocytic development cycle. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(3), e0008104. doi:10.1371/journal.pntd.0008104
- Roth, A., Adapa, S. R., Zhang, M., Liao, X., Saxena, V., Goffe, R., . . . Adams, J. H. (2018). Unraveling the Plasmodium vivax sporozoite transcriptional journey from mosquito vector to human host. *Sci Rep*, 8(1), 12183. doi:10.1038/s41598-018-30713-1
- Salud, I. N. d. (2021). <2021\_Boletin\_epidemiologico\_semana\_36.pdf>. *EBS*, 36, 32.
- Shabani, S. H., Zakeri, S., Salmanian, A. H., Amani, J., Mehrizi, A. A., Snounou, G., . . . Djadid, N. D. (2017). Biological, immunological and functional properties of two novel multi-variant chimeric recombinant proteins of CSP antigens for vaccine development against Plasmodium vivax infection. *Molecular immunology*, 90, 158-171.
- Skwarczynski, M., Chandrudu, S., Rigau-Planella, B., Islam, M. T., Cheong, Y. S., Liu, G., . . . Hussein, W. M. (2020). Progress in the Development of Subunit Vaccines against Malaria. *Vaccines (Basel)*, 8(3). doi:10.3390/vaccines8030373
- Structural Genomics, C., China Structural Genomics, C., Northeast Structural Genomics, C., Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., . . . Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nat Methods*, 5(2), 135-146. doi:10.1038/nmeth.f.202
- Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., . . . Menard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell*, 90(3), 511-522. doi:10.1016/s0092-8674(00)80511-5
- Templeton, T. J., Kaslow, D. C., & Fidock, D. A. (2000). Developmental arrest of the human malaria parasite Plasmodium falciparum within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Molecular microbiology*, 36(1), 1-9.

- Tucker, R. P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 969-974. doi:10.1016/j.biocel.2003.12.011
- Villaverde, A., & Carrio, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, 25(17), 1385-1395. doi:10.1023/a:1025024104862
- WHO. (2020). *World Malaria Report. 20 years of global progress & challenges*. Retrieved from
- Zhu, L., Mok, S., Imwong, M., Jaidee, A., Russell, B., Nosten, F., . . . Bozdech, Z. (2016). New insights into the Plasmodium vivax transcriptome using RNA-Seq. *Sci Rep*, 6, 20498. doi:10.1038/srep20498