

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“Purificación de la proteína Duffy Binding Protein (DBP) de  
*Plasmodium vivax* para futura formulación de un candidato vacunal”**

**Presentada por:**

Carlos Guillermo Quiroz Carrillo

**Tesis para optar el Título Profesional de**

**BIÓLOGO**

**Lima-Perú**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Purificación de la proteína Duffy Binding Protein (DBP) de  
*Plasmodium vivax* para futura formulación de un candidato vacunal”**

Presentada por:

**Carlos Guillermo Quiroz Carrillo**

Tesis para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Sc. Elva Ríos Ríos  
**MIEMBRO**

---

Dra. Doris Zúñiga Dávila  
**MIEMBRO**

---

Mg. Sc. Patricia A. Moreno Díaz de Saco  
**ASESORA**

---

Ph.D. Oscar Bruña Romero  
**CO - ASESOR**

## **Dedicatoria**

Dedico la presente tesis a mis padres. Este trabajo es el producto de nuestro esfuerzo en conjunto, ustedes siempre creyeron en nosotros y nos demostraron lo importante que es el conocimiento.

## **AGRADECIMIENTO**

Antes de todo agradezco a Dios, quien siempre ilumina cada uno de los pasos que doy, por haberme brindado la oportunidad y las fuerzas necesarias para realizar mis sueños.

Agradezco a mis padres, Guillermo y Luz, por siempre creer en mí y brindarme las fuerzas y las palabras de apoyo cada vez que me sentí débil. Muchas gracias por siempre estar a mi lado.

Agradezco a mi esposa, mi cómplice y mejor amiga, Sâmela por viajar hasta el otro extremo del continente conmigo y estar siempre a mi lado. Tú eres una pieza clave en este y en todos mis trabajos, muchas gracias.

Agradezco a mi hermana Cynthia, por ser siempre mi amiga y tener aquellas frases de apoyo, muchas gracias manis, sin ti no hubiera podido llegar a donde estoy.

Agradezco a mi hijo Pedro, porque al verte todos los días puedo ver una sonrisa y una fuerza por vivir y de esta forma me otorgas las fuerzas para seguir adelante.

Agradezco a mis abuelos Carlos y Ester, que estuvieron a mi lado toda mi vida, demostrándome lo importante que es el esfuerzo. Gracias a ustedes en cada momento de debilidad saqué fuerzas para continuar esta y otras hazañas.

Así mismo agradezco a mis amigos y familiares, por apoyarme y me dar fuerzas para continuar.

Agradezco a mis compañeros de la agraria, por haber hecho de estos cinco años, inolvidables, gracias muchachos por aquellas horas interminables de estudios, y de mil y unas anécdotas.

Finalmente, agradezco a Patricia y Oscar por orientarme en el desarrollo de la presente investigación, brindándome sus conocimientos, tiempo y paciencia, sin ustedes no hubiera podido conseguirlo, muchísimas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>VI</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>VII</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 3          |
| 1.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....  | 3          |
| 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 3          |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....   | <b>4</b>   |
| 2.1 MALARIA. ASPECTOS GENERALES .....   | 4          |
| 2.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Plasmodium vivax</i> . .....                                    | 7          |
| 2.3 CANDIDATOS VACUNALES CONTRA <i>P. vivax</i> .....                                     | 10         |
| 2.3.1 PROTEINA DUFFY BINDING PROTEIN DE<br><i>P. vivax</i> (PvDBP) .....                  | 13         |
| 2.4 PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTIGENOS CONTRA<br>LA MALARIA EN SISTEMAS PROCARIOTAS ..... | 16         |
| 2.4.1 CONSTRUCCIÓN DE SISTEMAS PROCARIOTAS DE<br>EXPRESIÓN HETERÓLOGA.....                | 19         |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>25</b>  |
| 3.1 MATERIALES UTILIZADOS .....   | 25         |
| 3.1.1 MATERIALES BIOLÓGICOS: .....  | 25         |
| 3.1.2 MATERIAL PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS<br>PROTEÍNAS PURIFICADAS: .....          | 25         |
| 3.1.3 REACTIVOS.....  | 26         |
| 3.1.4 EQUIPAMIENTOS.....  | 27         |
| 3.2 METODOLOGÍA UTILIZADA .....   | 28         |
| 3.2.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN<br>BACTERIANA .....                      | 28         |
| 3.2.2 EXPRESIÓN DE LA REGION DBP-II DE <i>P. vivax</i><br>(PvDBP-II).....                 | 30         |
| 3.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXPRESIÓN .....   | 30         |
| 3.2.4 PURIFICACIÓN DE PvDBP-II.....   | 31         |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.5 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS POR<br>SDS-PAGE Y WESTERN BLOT .....        | 34        |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS Y<br>TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS <i>E. coli</i> ..... | 36        |
| 4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PvDBP-II.....   | 38        |
| 4.2.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXPRESIÓN DE<br>PvDBP-II.....                         | 38        |
| 4.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE PvDBP-II .....                                 | 42        |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>50</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Candidatos vacunales contra malaria vivax en desarrollo. ....10

**Tabla 2:** Técnicas de purificación de acuerdo a la naturaleza de las proteínas. ....23

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Países afectados por la malaria en el año 2013.....  | 4  |
| <b>Figura 2:</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i> .....   | 8  |
| <b>Figura 3:</b> Impacto de los candidatos vacunales en el ciclo biológico de<br><i>P. vivax</i> .....                                      | 12 |
| <b>Figura 4:</b> Interacción entre el merozoíto de <i>P. vivax</i> con los eritrocitos.....   | 12 |
| <b>Figura 5:</b> Estructura del merozoíto de <i>Plasmodium sp.</i> ....   | 13 |
| <b>Figura 6:</b> Ilustración de la estructura de la proteína DBP de <i>P. vivax</i> y la<br>subdivisión de su región DBP-II (PvDBP-II)..... | 14 |
| <b>Figura 7:</b> Principales tipos de vacunas estudiados.....   | 16 |
| <b>Figura 8:</b> Síntesis de una proteína recombinante .....  | 17 |
| <b>Figura 9:</b> Comparación de la expresión de proteínas recombinantes en los<br>diversos sistemas heterólogos.....                        | 18 |
| <b>Figura 10:</b> Optimización del proceso de expresión de las proteínas bacterianas.....   | 31 |
| <b>Figura 11:</b> Procesos de purificación de proteínas bacterianas.....  | 32 |
| <b>Figura 12:</b> Purificación de la proteína PvDBP-II por captura con iones metálicos<br>inmovilizados-IMAC.....                           | 33 |
| <b>Figura 13:</b> Plásmido pQE-32-DBP-II utilizado en el presente trabajo.....  | 36 |
| <b>Figura 14:</b> Verificación de la eficiencia y calidad de la transformación de las<br>bacterias SHuffle® T7 Express lysY.....            | 37 |
| <b>Figura 15:</b> Evaluación de la presencia de las proteínas recombinantes<br>PvDBP-II en cultivos de <i>E. coli</i> . ....                | 39 |
| <b>Figura 16:</b> Optimización del tiempo de cultivo de <i>E. coli</i> . ....   | 40 |
| <b>Figura 17:</b> Determinación de la concentración óptima de IPTG mediante<br>ensayos por SDS-PAGE e inmunoblotting.....                   | 41 |
| <b>Figura 18:</b> Análisis de las proteínas presentes en las bacterias transformadas. ....  | 43 |
| <b>Figura 19:</b> Evaluación del efecto de diversos detergentes durante la purificación<br>proteica. ....                                   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 20:</b> Optimización de la concentración de colato en la purificación de la proteína PvDBP-II. ....                                      | 45 |
| <b>Figura 21:</b> Purificación de la proteína PvDBP-II a partir de cultivos de <i>E. coli</i> M15 y SHuffle T7 Express lysY. ....                  | 46 |
| <b>Figura 22:</b> Evaluación de la capacidad de reconocimiento de las proteínas PvDBP-II de los anticuerpos presentes en el suero de ratones ..... | 47 |

## RESUMEN

La malaria es aún en la actualidad una de las enfermedades infecciosas con mayor importancia en el mundo. Recientes datos describen que a pesar de los esfuerzos por controlar y erradicar esta enfermedad, la falta de una vacuna eficaz contra las principales especies, *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*, así como la aparición de cepas resistentes a los fármacos de primera elección, han obstaculizado el cumplimiento de tales objetivos. Ante tal panorama, el objetivo del presente trabajo fue purificar de forma nativa la región II de la *Duffy binding Protein* de *P. vivax* (PvDBP-II) para ser utilizada en el futuro en la formulación de un nuevo candidato vacunal contra la malaria causada por este agente patógeno. Para lograr tal objetivo bacterias *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY fueron transformadas con el plásmido pQE-32-DBP-II, portador de la secuencia de interés, e inducidas con diferentes concentraciones de IPTG (0.01, 0.1, 1 y 4 mM), a temperaturas (4, 30 y 37 °C) y durante cuatro diferentes tiempos (una, dos, cuatro o dieciséis horas). Finalmente, las proteínas sintetizadas fueron extraídas en presencia y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en presencia de detergentes (Colato, Triton X100 y Tween 20) y purificadas en columnas por afinidad de Ni<sup>2+</sup> en presencia de 10 mM de imidazol. A partir de los resultados observados se puede concluir que la purificación nativa de la proteína PvDBP-II en bacterias *E. coli* SHuffle T7 Express lys fue posible pero su baja eficiencia no hace aún viable su utilización en una formulación vacunal.

**Palabras claves:** *Plasmodium vivax*, malaria, purificación de proteínas, vacunas

## ABSTRACT

Malaria is still one of the most important infectious diseases in the world today. Recent data described that despite the efforts to control and eradicate this disease, the lack of an effective vaccine against the key species, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, as well as the appearance of strains resistant to the drugs of first choice have delayed the success of such objectives. In this situation, the objective of the present study was to purify the region II of the Duffy binding protein (PvDBP-II) for future use in the formulation of new vaccine candidate against malaria caused by *P. vivax*. To achieve this objective, bacteria *E. coli* M15 and SHuffle® T7 Express lysY were transformed with the pQE-32-DBP-II plasmid, carrier of the sequence of interest, and induced with different concentrations of IPTG (0.01, 0.1, 1, and 4 mM), at different temperatures (4, 30 and 37 °C) and during four different times (one, two, four or sixteen hours). Finally, the synthesized proteins were extracted in the presence and absence of  $\beta$ -mercaptoethanol, detergents (Cholate, Triton X100 and Tween 20) and purified by Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography – IMAC in columns by affinity of  $\text{Ni}^{2+}$  in the presence of imidazole 10 mM. From the observed results it can be concluded that the native purification of the PvDBP-II in bacteria *E. coli* SHuffle T7 Express lys was possible but its low efficiency makes its use in a future vaccine formulation unfeasible.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, malaria, protein purification, vaccines

## I. INTRODUCCIÓN

La malaria es un problema de salud mundial que afecta en especial los países tropicales y subtropicales (OMS, 2016). Esta enfermedad tiene como vector al mosquito *Anopheles*, el cual al alimentarse transmite el agente etiológico, *Plasmodium sp.* a su hospedero mamífero (Carter y Mendis, 2002, Kantele y Jokiranta, 2011).

A pesar de que en los últimos años la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con diversos gobiernos, entidades públicas y privadas han conseguido importantes logros en el objetivo de erradicar la enfermedad en el mundo (OMS, 2016), tales logros se encuentran comprometidos debido a la aparición de vectores y agentes etiológicos resistentes a los diversos tratamientos disponibles y a la falta de una vacuna eficiente contra la enfermedad.

Recientemente, según la última actualización de “The Malaria Vaccine Technology Roadmap”, de las cinco especies capaces de producir la enfermedad en los humanos, los parásitos *P. falciparum* y *P. vivax*, son descritos como los más prevalentes y las piezas claves para prevenir y erradicar la enfermedad (Malaria Vaccine Funders Group, 2013)

A pesar de este panorama, son escasos los candidatos vacunales desarrollados enfocados al control de *P. vivax*, en comparación con los estudiados contra *P. falciparum*, esto debido a que *P. vivax* fue descrito inicialmente como una especie benigna, concepto que en los últimos años viene siendo modificado por la aparición de diversas complicaciones mortales provocados por este último agente durante su fase sanguínea (Birkett, et al., 2013).

La elaboración de una vacuna contra *P. vivax* enfocada a reducir tales complicaciones letales de los síntomas típicos, está dirigida básicamente a bloquear la invasión de nuevos eritrocitos, evitando de esta forma, la liberación a la corriente sanguínea de sustancias tóxicas producto de la lisis de estos eritrocitos (Birkett, et al., 2013).

Un paso fundamental durante la fase sanguínea es el reconocimiento de los receptores de membrana de los eritrocitos por las proteínas de membrana de los parásitos. Este trascendental paso las vuelve promisoras componentes de futuros candidatos vacunales. Una de estas proteínas que ha sido descrita como una pieza fundamental en la invasión a los eritrocitos es la proteína duffy binding protein (DBP). En este sentido diversos candidatos vacunales formulados con esta proteína, han demostrado poseer un alto potencial inmunogénico (Casteluber, 2010, Ntumngia y Adams, 2012), aunque son necesarias mayores investigaciones para encontrar la formulación vacunal idónea.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio exploratorio sobre la purificación nativa de la proteína DBP proveniente de *Plasmodium vivax* (PvDBP) y su expresión en un sistema heterólogo.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Purificar la región II de la proteína Duffy Binding Protein del parásito *P. vivax* (PvDBP-II) para la elaboración de un candidato vacunal contra la malaria.

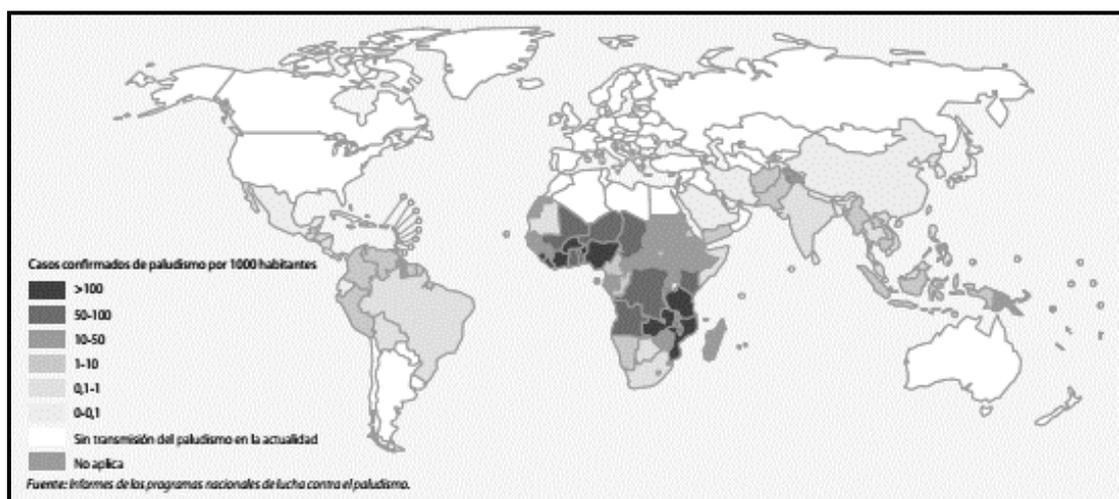
### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Expresar la proteína PvDBP recombinante en *E. coli* usando el plásmido pQE-32-DBP-II portador de la secuencia codificante.
- Optimizar los diversos protocolos de purificación utilizados.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 MALARIA. ASPECTOS GENERALES

La malaria es uno de los mayores problemas de salud pública que afecta al mundo, especialmente en países tropicales y subtropicales, como puede apreciarse en la Figura 1. Esta enfermedad ha demostrado tener un gran impacto en la producción nacional, el crecimiento poblacional y la inversión pública, mermando por estos motivos el desarrollo de los países afectados (Sachs y Malaney, 2002).



**Figura 1. Países afectados por la malaria en el año 2013.**

FUENTE: (OMS, 2014).

Según el último informe de la OMS, en el año 2016 se presentaron 212 millones de nuevos casos de malaria, la mayoría en la región de África (191 millones), seguida por Asia sudoriental (14 millones), Mediterráneo oriental (3,8 millones), Medio oeste del Pacífico (1,2 millones) y América (0,8 millones). Esta cantidad de nuevos casos indican que se logró una disminución aproximada del 20 por ciento en comparación con los registrados en el 2010.

En la región de las Américas se observó en el 2016, que el 19 por ciento de estos casos registrados tuvieron su procedencia en el Perú, lo que lo sitúa en el tercer país con mayor incidencia en Sudamérica, por detrás de Venezuela (30 por ciento de los casos de la región) y Brasil (24 por ciento) (WHO, 2016). En este mismo contexto y de acuerdo con la Dirección General de Epidemiología del MINSA y de la misma OMS, en la última década el Perú ha reportado un incremento de los casos de malaria. Así, en el año 2011 fueron reportados 23060 casos, cifra largamente inferior a la observada en el año 2015 (62220 casos de malaria) y especialmente en el año 2014 (65239 casos). Tal número de incidencias de malaria, nos coloca junto a Venezuela y Nicaragua, en el grupo de países de la región americana que no consiguieron controlar dicho mal (MINSA-DGE, 2016, WHO, 2016).

La malaria es causada por la infección de un protozoo perteneciente al Filo Apicomplexa, Orden Coccidiida, Suborden Haemosporidiiida, Familia Plasmodiidae, Género *Plasmodium*. En la actualidad han sido descritas 150 especies de *Plasmodium sp.*, de las cuales solo cinco han sido descritas como agentes etiológicos de la enfermedad en el hombre (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*) (Carter y Mendis, 2002, Kantele y Jokiranta, 2011). Las características esenciales para su diferenciación son: la morfología, ciclo de vida y los síntomas que producen en sus hospederos.

Los vectores transmisores de esta enfermedad son las hembras de los mosquitos de la Orden Diptera, familia Culicidae y del género *Anopheles*. En el mundo han sido observados aproximadamente 40 especies de *Anopheles* con capacidad de transmitir la malaria al hombre (Hay, et al., 2010), siendo el más distribuido *Anopheles darlingi* seguido de *Anopheles albiparvus*, *Anopheles aquasalis* (Sinka, et al., 2012) y *Anopheles pseudopunctipennis*.

Los síntomas típicos de esta enfermedad pueden aparecer entre los siete y los treinta días y dependen de la especie causadora. Los más comunes son: fiebre, escalofríos, sudores, dolores de cabeza y corporales, náuseas, vómitos y anemia. (Hill, 2011)

La OMS viene desarrollando grandes esfuerzos para motivar el control y la futura erradicación de la malaria como parte de un plan mundial denominado inicialmente “Global Malaria Action Plan 2008-2015 (GMAP)” y posteriormente “Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030”, propuesto en el año 2015 (OMS, 2016). Este plan se basa en diversas prácticas educacionales y preventivas, como la utilización de redes

mosquiteras tratadas con insecticidas y repelentes, y tienen como finalidad alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- En el año 2030, reducir el número de nuevos casos de malaria a por lo menos el 90 por ciento de los registrados en el año 2015.
- Eliminar la enfermedad en por lo menos 35 países endémicos
- Prevenir el resurgimiento de la malaria en países como Egipto, Emiratos Árabes, Marruecos, Arabia Saudita, Iraq, Turquía, Argentina, Paraguay, Costa Rica, entre otros, donde ya se informó su erradicación. Desafortunadamente este objetivo está comprometido por las constantes migraciones originadas por el deterioro de las condiciones socio económicas en las regiones rurales, lo que propicia la propagación de la enfermedad a regiones donde ya había sido eliminada, o en algunos casos, donde nunca fue descrita (Dabiré, et al., 2008, Oliveira-Ferreira, et al., 2010).
- Desarrollar nuevos productos capaces de controlar los vectores y los parásitos, así como una vacuna capaz de controlar los principales agentes etiológicos de la enfermedad en el hombre (OMS, 2016).

De las cinco especies capaces de producir la enfermedad en los humanos, *P. falciparum* y *P. vivax*, son descritos como los más prevalentes y según la última actualización “The Malaria Vaccine Technology Roadmap”, piezas importantes para prevenir y erradicar la enfermedad (Malaria Vaccine Funders Group, 2013). A pesar de esto, son escasos los candidatos vacunales enfocados en el control del parásito *P. vivax*, en comparación con *P. falciparum*, esto debido a que históricamente *P. vivax* fue descrito como una especie benigna, concepto que en los últimos años viene siendo modificado por la aparición de casos severos y hasta mortales provocados por este agente (Baird, 2013).

En el 2016, *P. vivax* provocó aproximadamente 8, 5 millones de nuevos casos de malaria en el mundo, 41 por ciento de estos fuera de la región africana (7,4). Esta incidencia resultó en 3100 muertes (OMS, 2016). Sin embargo, se espera que en los próximos años estas proporciones se amplíen como consecuencia de su alto poder de adaptación, su capacidad de latencia en el hígado (Lumsden, et al., 2011, Markus, 2011) y al desarrollo de resistencia contra los principales fármacos tanto del parásito (Baird, 2009, Severini y Menegon, 2015, Tjitra, et al., 2008) como de su vector transmisor (Cisse, et al., 2015). Las principales complicaciones observadas durante la infección con este agente etiológico son anemia, síndrome respiratorio, desnutrición, malaria cerebral, alteraciones

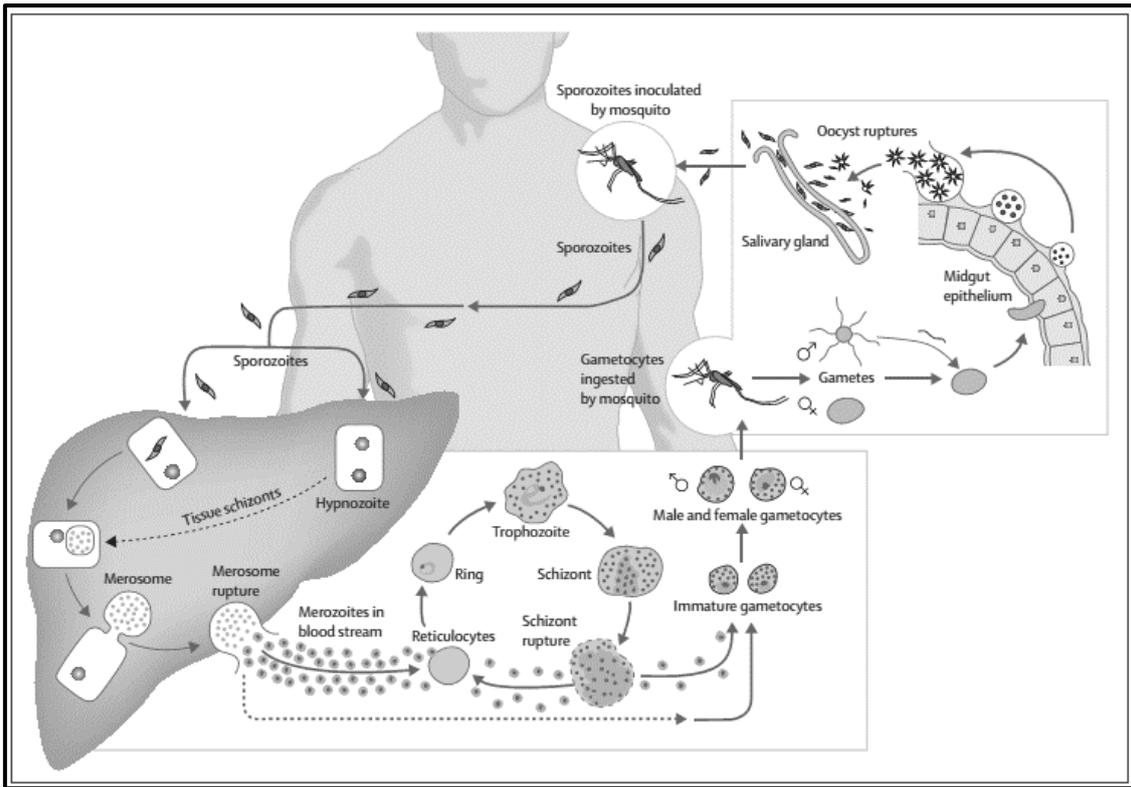
hematológicas, ruptura esplénica y alteraciones renales y pulmonares (Gama, et al., 2011, Price, et al., 2009).

## **2.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Plasmodium vivax*.**

El ciclo de vida del parásito *P. vivax* se diferencia del ciclo de los demás *Plasmodium sp.*, en que este posee las capacidades de infectar únicamente a los reticulocitos, diferenciarse en hipnozoítos y presentar gametocitos durante las primeras fases dentro del hospedero vertebrado.

Así en forma general, los ciclos de los diversos *Plasmodium* pueden ser divididos en dos fases una fase asexual que se desarrolla en el hospedero vertebrado, y otra sexual dentro de las hembras del hospedero invertebrado. Este ciclo puede ser observado en la Figura 2.

Como primer paso, la hembra del mosquito *Anopheles* inocular en el humano aproximadamente 15 esporozoítos durante la primera picadura (Rosenberg, et al., 1990), los cuales migran rápidamente desde las glándulas salivales del insecto hacia los tejidos subcutáneos del mamífero, o en algunos casos menos frecuentes a la corriente sanguínea (Sidjanski y Vanderberg, 1997). Una vez alcanzada la corriente sanguínea, ya sea por el método indirecto o directo, los esporozoítos viajan rápidamente hacia el hígado (de 30 minutos a 1 hora) (Hamilton Fairley, 1947). Este desplazamiento rápido es considerado una técnica evasiva adaptada por el parásito a la acción de opsonización por anticuerpos del hospedero vertebrado (Doolan y Martinez-Alier, 2006).



**Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*.**

FUENTE: (Mueller, et al., 2009).

Una vez alcanzado el hígado, los esporozoítos ingresan a este a través de las células de Kupffer donde invaden a sus primeras células diana, los hepatocitos, comenzando la fase hepática que puede tener una duración de siete a diez días en los diversos primates (Menard, et al., 2013, Pradel y Frevert, 2001).

Durante la fase hepática, los esporozoítos sufren diferentes metamorfosis y se diferencian en trofozoítos, los cuales después de varias divisiones asexuadas darán lugar a los esquizontes (estructuras compuestas por numerosos merozoítos) (Sturm, et al., 2006), o de acuerdo con diversos autores, en un estado latente denominado hipnozoítos. Esta última forma ha sido descrita tanto en *P. vivax* y *P. ovale*, en los cuales se observó que pueden permanecer por semanas o incluso años, después de los cuales por motivos aún desconocidos los hipnozoítos son reactivados continuando normalmente las siguientes etapas (Doerig, et al., 2015, Krotoski, et al., 1982, Markus, 2011).

Después de días de maduración intrahepática, los esquizontes recién formados, en razón de 30-40 mil esquizontes por cada esporozoíto diferenciado (Doerig, et al., 2015), son liberados a los sinusoides hepáticos (vasos sanguíneos especializados) (Sturm, et al., 2006) a través de gemaciones denominadas merosomos, finalizando de esta forma la etapa hepática de la enfermedad y con ella la fase pre eritrocitaria.

La última fase dentro de los primates, o en general de los hospederos mamíferos, es denominada fase eritrocitaria, la cual se inicia con la invasión de los merozoítos, recién liberados del hígado, a los reticulocitos (Hill, 2006). Dentro de estos, cada merozoíto sufrirá sucesivas divisiones asexuadas dando lugar a la aparición de esquizontes eritrocitarios (compuestos aproximadamente por 20 merozoítos).

Después de 72h, cada eritrocito infectado es lisado y los merozoítos liberados, inician ciclos repetitivos complejos de invasión-multiplicación-lisis. Estos ciclos repetitivos son los responsables por los síntomas y complicaciones de la enfermedad, ya que conjuntamente con la liberación de los parásitos son liberados productos tóxicos como los grupos hemo, en la forma de hemozoína (Doerig, et al., 2015), que activan a las células inflamatorias secretoras de citocinas (Hisaeda, et al., 2005).

Finalmente, después de sucesivos ciclos, una pequeña fracción de los merozoítos sufre una nueva metamorfosis, y se diferencian en gametocitos masculinos y femeninos, los cuales invaden a unos nuevos mosquitos después de una segunda picadura, dando inicio a la fase sexual del ciclo de vida del parásito, que tendrá como producto final la migración de nuevos esporozoítos a las glándulas salivales del insecto, donde quedarán almacenados para infectar a un nuevo hospedero vertebral (Doerig, et al., 2015).

### 2.3 CANDIDATOS VACUNALES CONTRA *P. vivax*

Son muchos los estudios que corroboran la posibilidad de formular una vacuna eficiente contra el *Plasmodium vivax*. En este sentido, estudios recientes realizados por Arévalo-Herrera (2014) en pacientes asintomáticos procedentes de zonas endémicas a la malaria, demostraron que los sistemas inmunes de estos individuos ejercen cierto control contra el parásito, debido posiblemente a la presencia de anticuerpos contra este protozooario (De Sousa, et al., 2014, Kano, et al., 2012, Michon, et al., 2000). Por otro lado, recientes estudios complementarios han demostrado que tales anticuerpos son producidos de manera proporcional a la edad en la cual es producida la exposición (Souza-Silva, et al., 2010, Zakeri, et al., 2011).

Sin embargo, en la actualidad los candidatos vacunales contra *P. vivax* son escasos y están restringidos a contables números de antígenos (CS, AMA1, MSP1<sub>19</sub>, DBP y MAEBL, entre otros). Los principales candidatos vacunales contra malaria vivax están descritos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.- Candidatos vacunales contra malaria vivax en desarrollo.**

| Candidato vacunal                | Fase diana            | Referencias  |
|----------------------------------|-----------------------|--|
| <b>Pvs25H</b>                    | Fase sexual           | (Malkin, et al., 2005, Wu, et al., 2008).                                  |
| <b>Pvs28</b>                     |                       | (Hisaeda, et al., 2000).   |
| <b>AnAPN1</b>                    |                       | (Armistead, et al., 2014, Mathias, et al., 2012)                           |
| <b>VMP001, PvCSP-LSP (PvCSP)</b> | Fase pre eritrocítica | (Bennett, et al., 2016, Herrera, et al., 2011, Vanloubbeeck, et al., 2013) |
| <b>ChAd63-PvTRAP/ MVA-PvTRAP</b> |                       | (Bauza, et al., 2014)  |

**Continuación ...**

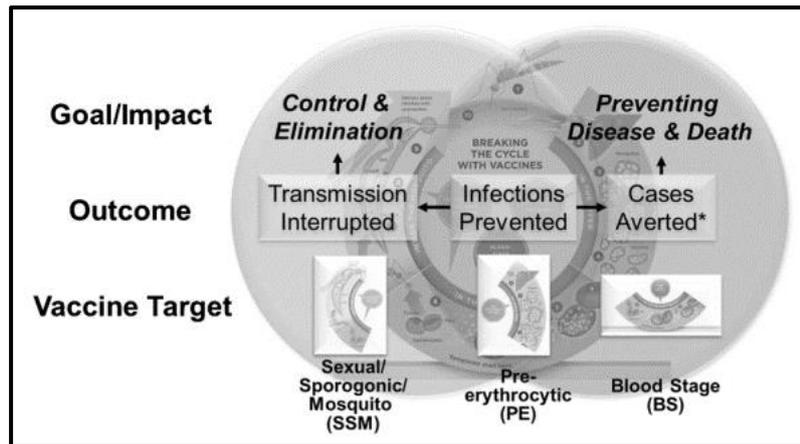
| <b>Candidato vacunal</b>  | <b>Fase diana</b>    | <b>Referencias</b>  |
|---|----------------------|---|
| <b>PvDBPII-DEK<sup>null</sup>,<br/>ChAd63-PvDBPII/<br/>MVA- PvDBPII<br/>(PvDBP)</b> | Fase<br>eritrocítica | (De Cassan, et al., 2015, Moreno, et al., 2008, Ntumngia y Adams, 2012) |
| <b>PvMSP1<sub>19</sub></b>  |                      | (Devi, et al., 2007)  |
| <b>PvAMA1, ChAd63-<br/>PvAMA1/<br/>MVA-PvAMA1</b>                                   |                      | (Bouillet, et al., 2011, Vicentin, et al., 2014).                       |

**FUENTE: Adaptado de (Mueller, et al., 2015)**

La escasez de candidatos vacunales es producto de la falta de un sistema eficiente de cultivo artificial del parásito y de las bajas parasitemias obtenidas de los pacientes. Esta situación adversa ocasionó que en los últimos diez años sólo se desarrollaran estudios en modelos murino y primate, de estos últimos solo uno fue realizado en humanos (Corradin, et al., 2012).

Los candidatos vacunales contra la malaria pueden estar agrupados en:

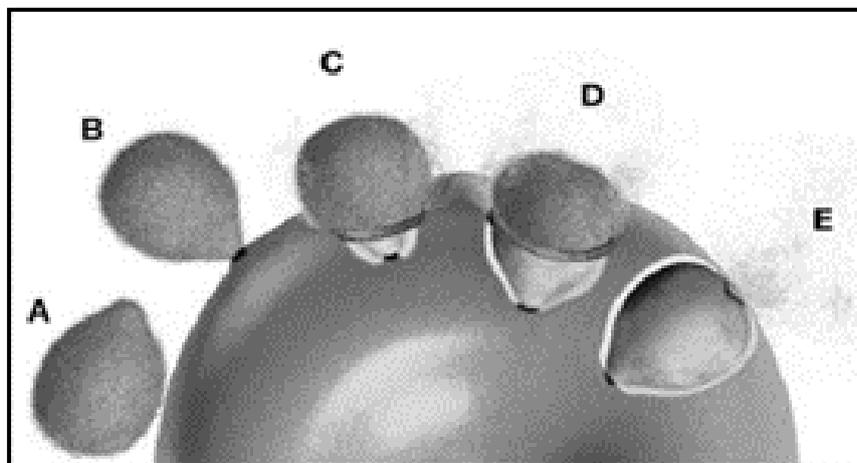
- Candidatos contra la fase sexual. - están enfocados al bloqueo de la transmisión y por consiguiente a la eliminación de la enfermedad.
- Candidatos contra la etapa pre-eritrocitaria. - están enfocados a la prevención de nuevas infecciones.
- Candidatos contra la etapa eritrocitaria.- enfocados a evitar nuevos casos y de esta forma prevenir la aparición de síntomas típicos, así como las posibles complicaciones devenidas de la infección con el parásito (Birkett, et al., 2013). Tal clasificación está representada en la **Figura 3**.



**Figura 3. Impacto de los candidatos vacunales en el ciclo biológico del parásito *P. vivax*.**

FUENTE: (Birkett, et al., 2013).

Durante la última etapa dentro de los hospederos mamíferos, la invasión eritrocitaria, un paso fundamental que debe ser cumplido es el reconocimiento de los receptores de los eritrocitos por parte de las proteínas de membrana de los merozoítos, como puede ser observado en la **Figura 4**.



**Figura 4. Interacción entre el merozoíto de *P. vivax* con los eritrocitos. (A) Reorientación, (B) Adsorción, (C y D) Migración del polo apical y (E) Formación de la vacuola parasitófora final.**

FUENTE: (Cowman y Crabb, 2006).

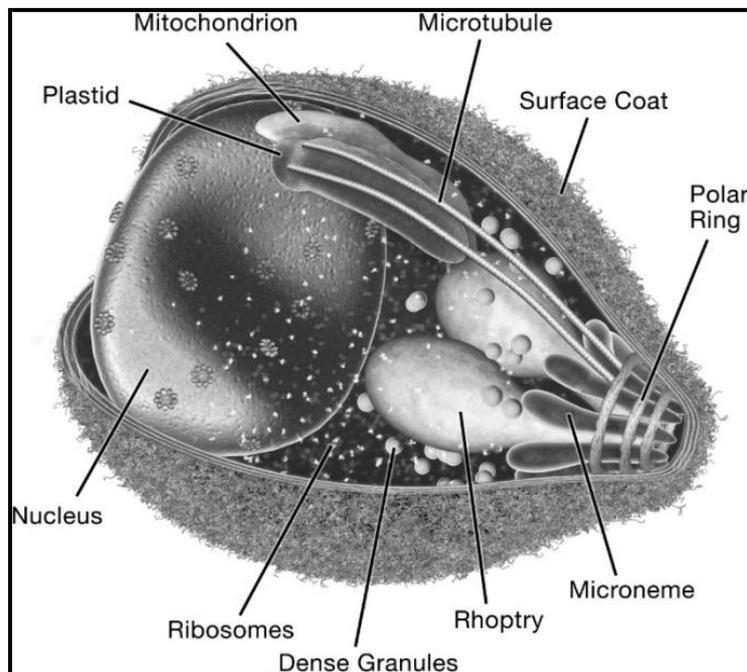
Como puede observarse en la Figura 4, la invasión del eritrocito, envuelve una compleja secuencia de cuatro etapas: reorientación, adsorción con la formación de la unión

irreversible parásito-eritrocito, migración del polo apical y finalmente el ingreso propiamente dicho.

Diversos estudios han descrito que para el éxito de cada una de estas etapas es necesaria la intervención de diferentes proteínas de los merozoítos, siendo las más estudiadas las proteínas de superficie de los merozoítos (MSP-1, MSP-2 y MSP-3), el antígeno 1 de la membrana apical (AMA-1), las proteínas duffy binding protein (DBP) y recientemente los antígenos ricos en triptófano (Cowman y Crabb, 2006, Preiser, et al., 2000, Zeeshan, et al., 2013, Zeeshan, et al., 2015, Zeeshan, et al., 2015).

### 2.3.1 PROTEÍNA DUFFY BINDING PROTEIN DE *P. vivax* (PvDBP)

La proteína de adherencia al grupo Duffy de *P. vivax* (*duffy binding protein*)-PvDBP tiene un peso molecular aproximado de 140 kDa. Esta proteína es codificada por genes de la familia ebl (de las siglas en inglés *erythrocyte binding ligands*), y es un componente constitutivo de los micronemas ubicados en los apicomplejos, los cuales, como se observa en la Figura 5, están conformados por conoides, anillos polares y Róptrias.



**Figura 5. Estructura del merozoíto de *Plasmodium sp.***

FUENTE: (Cowman y Crabb, 2006).

Diversos estudios han descrito la importante función que cumple PvDBP durante la invasión de los eritrocitos (Adams, et al., 1992, Howell, et al., 2006). Esta proteína posee siete regiones cada una con funciones y estructuras diferentes, de esta forma:

- Región I.- Secuencia líder

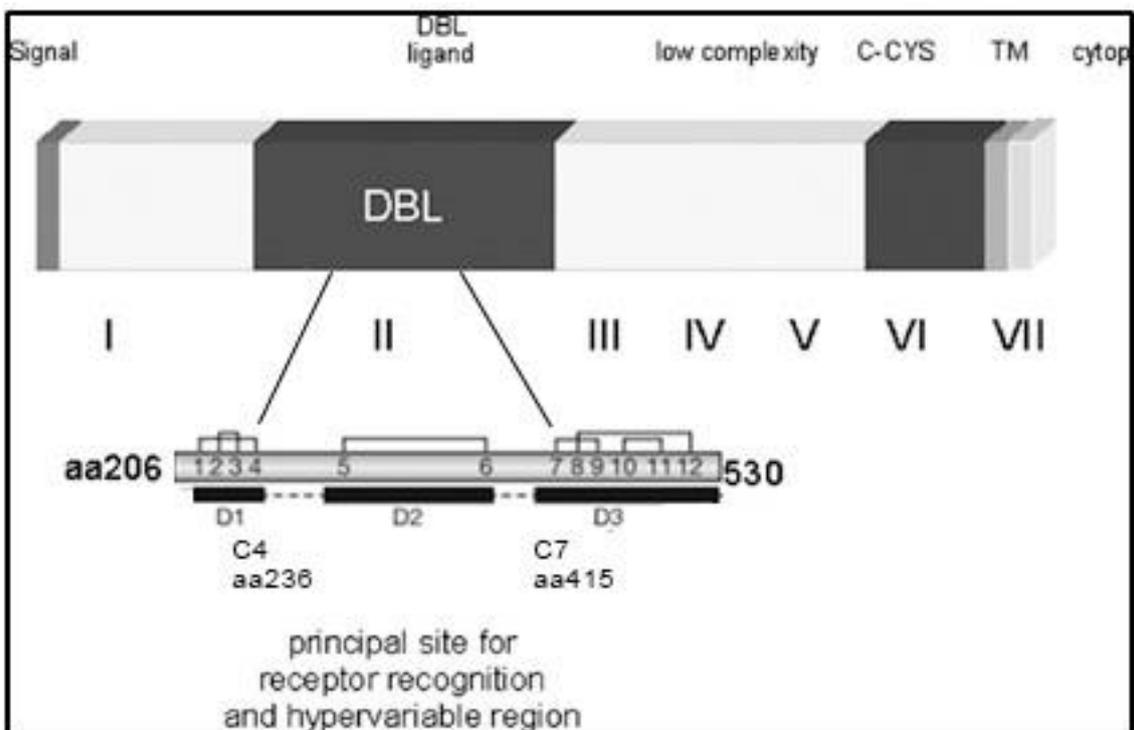
-Región II o DBP-II.- región rica en cisteínas y directamente relacionada con la unión irreversible a los receptores del antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) de los eritrocitos (Chitnis, et al., 1996, Chitnis y Miller, 1994, Singh, et al., 2003), por lo que también es conocida como Duffy-binding-ligand (DBL).

- Regiones III, IV y V.- regiones hidrofóbicas.

- Región VI. Región rica en cisteínas

- Región VII. Única región transmembrana (Adams, et al., 1992).

La distribución de tales regiones puede ser observada en la **Figura 6**.



**Figura 6. Ilustración de la estructura de la proteína DBP de *P. vivax* y la subdivisión de su región DBP-II (PvDBP-II).**

FUENTE: Adaptado de (Singh, et al., 2006, Vanbuskirk, et al., 2004).

La región II o DBL, encargada de la unión con el receptor DARC, esta subdividida en 3 subdominios denominados D1, D2 y D3, como se puede observar en la Figura 6. Estos subdominios poseen secuencias de aminoácidos altamente polimórficas (Baum, et al., 2003, Cole-Tobian, et al., 2002, Tsuboi, et al., 1994, Xainli, et al., 2000) que podrían constituir un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero (Ampudia, et al., 1996, Singh, et al., 2006) y 12 unidades de cisteína unidas a través de seis puentes de azufre (Adams, et al., 1992)

Diversos estudios han comprobado que el sector delimitado por las cisteínas C4 y C7 es el encargado del reconocimiento y unión con los receptores DARC (Horuk, et al., 1993, Singh, et al., 2003, Vanbuskirk, et al., 2004). Recientemente, tal unión fue descrita como un complejo hetero-tetrámico conformado por dos proteínas DBP y dos receptores DARC (Batchelor, et al., 2014).

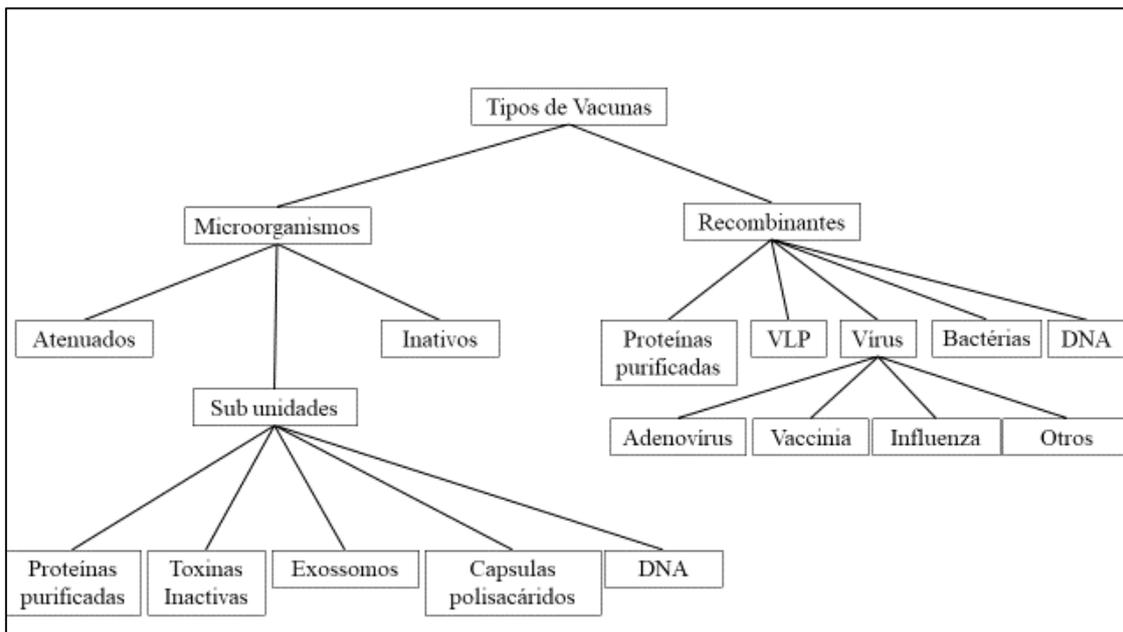
A pesar que durante muchos años se pensó que aquellos humanos deficientes del grupo Duffy (Fy-) sanguíneo, disfrutaban de una resistencia natural a la invasión de los agentes etiológicos *P. vivax* y *P. knowlesi* (Miller, et al., 1976, Wertheimer y Barnwell, 1989), recientes estudios han demostrado que dichos parásitos han desarrollado vías alternativas para conseguir la invasión eritrocitaria en tales individuos (Cavasini, et al., 2007, Kasehagen, et al., 2007, Menard, et al., 2013, Ryan, et al., 2006).

En este sentido, los análisis realizados en diversos pacientes infectados con *P. vivax* demostraron títulos de anticuerpos contra la proteína PvDBP con capacidad protectora frente a futuras reinfecciones (Fraser, et al., 1997, King, et al., 2008), los cuales aumentan con el número de exposiciones del paciente al patógeno (Michon, et al., 1998).

Es por esta necesidad de invadir los eritrocitos vía unión PvDBP-DARC, que dicha proteína del parásito *P. vivax*, es un excelente componente vacunal contra la fase eritrocitaria de la malaria. Tal candidato vacunal por lo tanto deberá ser capaz de inducir altos títulos de anticuerpos, así como de activar respuestas inmunes humorales y celulares.

## 2.4 PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE ANTÍGENOS CONTRA LA MALARIA EN SISTEMAS PROCARIOTAS

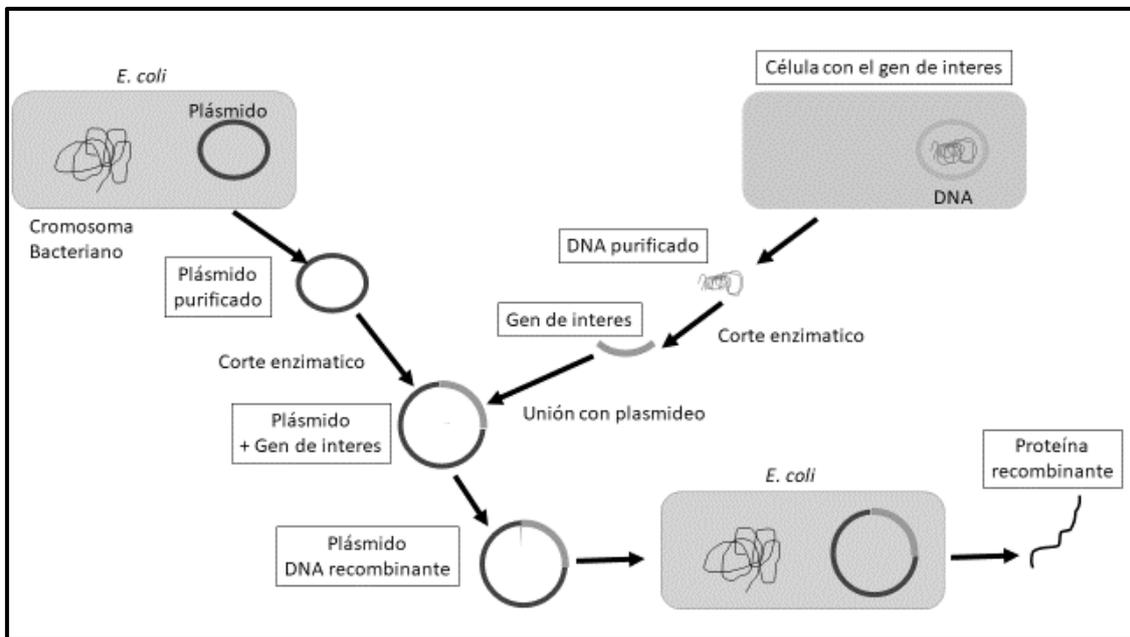
Históricamente, los primeros candidatos vacunales que fueron capaces de brindar protección contra la malaria estuvieron formulados a partir de esporozoítos vivos atenuados por irradiación UV (Collins y Contacos, 1972, Nussenzweig, et al., 1967, Rieckmann, et al., 1979). Posteriormente, con el mayor conocimiento de la genómica, proteómica y bioinformática, el desarrollo de nuevos candidatos ha aumentado. Estos pueden utilizar para sus composiciones elementos moleculares característicos de los patógenos, los cuales podrán ser presentados al sistema inmune en forma de proteínas, glicoproteínas, péptidos sintéticos o vectores recombinantes (proteínas recombinantes, levaduras, plásmidos bacterianos, bacterias recombinantes y partículas como virus (VLP) o vectores virales recombinantes) (Groot y Rappuoli, 2004). De esta forma pueden estimular diversos tipos de reacciones inmunes. Los principales tipos de vacunas utilizados en la actualidad son mostrados en la **Figura 7**.



**Figura 7.- Principales tipos de vacunas estudiados.** Las vacunas pueden ser obtenidas naturalmente de los microorganismos o de forma artificial como productos recombinantes.

FUENTE: Adaptado (Quiroz, 2017).

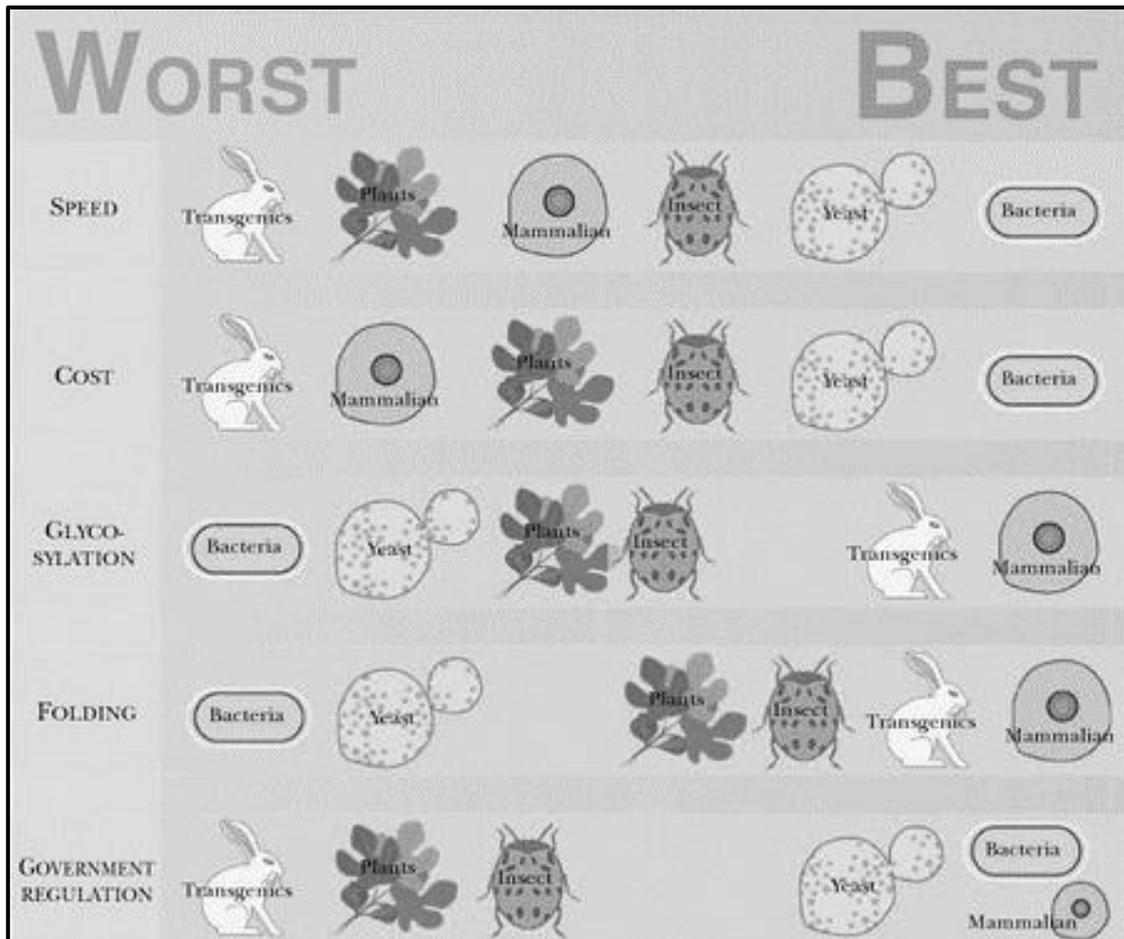
Se denomina proteína recombinante, a aquellas proteínas producidas naturalmente en un organismo donador, que, como resultado de la ingeniería genética, son producidas en organismos receptores, diferentes al de su procedencia. El esquema del desarrollo de tal técnica puede ser observado en la **Figura 8**.



**Figura 8. Síntesis de una proteína recombinante**

Los principales sistemas heterólogos utilizados en la actualidad están constituidos por bacterias, levaduras, hongos filamentosos, insectos, células de mamífero y plantas, además de animales y plantas transgénicas (Demain y Vaishnav, 2009).

La selección del sistema a ser utilizado deberá tomar en cuenta el tipo de proteína a ser sintetizada, la velocidad de producción, los costos, la calidad y funcionalidad de la proteína a ser purificada, estos análisis pueden ser observados en la **Figura 9**. Así, por ejemplo, genes clonados en plásmidos multicopias, usualmente, producen mayor cantidad de proteínas, pero son más inestables. Una posible solución a este hecho, es la integración del gen de interés en el cromosoma de la célula hospedera (Clark y Pazdernik, 2016).



**Figura 9 Comparación de la expresión de proteínas recombinantes en los diversos sistemas heterólogos.**

FUENTE: (Clark y Pazdernik, 2016)

La bacteria *Escherichia coli*, especialmente la cepa BL21 (DE3), o algunas de sus variantes, son los principales organismos a ser utilizados en la producción heteróloga de altas concentraciones de proteínas (Clark y Pazdernik, 2016, Consortium, et al., 2008). Una de estas variantes es la SHuffle T7 Express lysY, la cual posee como características:

- La capacidad de formar puentes de disulfuro en el citoplasma, permitiendo de esta forma la expresión de proteínas en su forma nativa de una manera más eficiente.
- Deficiencia de proteasa y endonucleasa tipo I, lo que aumenta la eficiencia del proceso.
- Resistencia al fago T1, la delección del gen responsable de la síntesis del receptor utilizado por dicho fago altamente virulento no afecta la transformación ni las características de crecimiento bacteriano.

#### **2.4.1 CONSTRUCCIÓN DE SISTEMAS PROCARIOTAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA**

En la actualidad, las proteínas recombinantes sintetizadas a partir del DNA recombinantes son muy utilizadas en las diversas industrias, como las farmacológicas, agrícolas, químicas, textiles, forestales, entre otras.

A pesar que la industria de la fermentación microbiana comenzó a inicios de los años 1900, con la producción anaeróbica a larga escala de acetona y butanol, seguida de la producción aeróbica de ácido cítrico, fue solo años después del descubrimiento del DNA recombinante, en los inicios de los años 1971, que la biotecnología moderna apareció, y con ella la producción de compuestos recombinantes como la insulina, albumina, hormona del crecimiento, etc. Estos compuestos en la actualidad son altamente comercializados gracias a sus valiosos aportes en la salud pública (Clark y Pazdernik, 2016).

La construcción de sistemas procariotas, como ya fue mencionado, comúnmente utiliza a la bacteria *E. coli*, denominada vector de expresión, como receptora de un plásmido foráneo. Los plásmidos contienen en su estructura un promotor que posibilita la expresión del gen de interés y regiones de origen de replicación, que son especiales para cada sistema. Así mismo, tales vectores usualmente poseen genes reporteros y genes de resistencia a algún antibiótico (Clark y Pazdernik, 2016).

El primer paso para la construcción de un sistema heterólogo es la identificación del gen de interés, así como su purificación y posterior multiplicación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Esta técnica inicialmente descrita por Kary Mullis, tiene como finalidad amplificar millones de veces una secuencia de DNA de interés. Para tal fin, son construidas dos pequeñas secuencias de oligonucleótidos denominados primers, los cuales deberán ser complementarios a la secuencia de DNA que limita la región de interés.

El PCR comprende básicamente 3 etapas:

- Desnaturalización. - en esta primera etapa, las hebras del DNA sufren una desnaturalización al ser sometidas aproximadamente a 95 °C durante 5 minutos.
- Hibridación. - en esta etapa la temperatura es disminuida a 35- 60 °C, lo que permite la unión de cada nucleótido del DNA molde con su correspondiente base complementaria libre ubicada en el cebador elegido.
- Extensión.- la temperatura es elevada hasta 72 °C, temperatura óptima de funcionamiento de la enzima *Taq* DNA polimerasa, la cual a partir de los cebadores agregará en sentido 5' a 3' los desoxirribonucleótidos complementarios al DNA molde (Mullis, et al., 1986).

## **Inserción de los insertos en los vectores de clonaje.**

Después de obtenerse numerosas copias de la región de interés, ahora llamadas insertos, estos son adicionados a otra molécula de DNA de dos hebras, denominada vector de clonaje. Esta última estructura, inserto + vector, es llamado de DNA recombinante (Brown, 2016).

La formación de tal DNA recombinante, usualmente necesita como primer paso la digestión de los insertos portadores de la región diana y de los vectores de clonaje con las mismas enzimas de restricción, con la finalidad de obtener extremos equivalentes entre estas dos moléculas, y de esta forma garantizar un correcto anclaje entre ellas. Finalmente, estas dos moléculas digeridas son unidas por la acción de la enzima ADN ligasa a través de enlaces covalentes.

## **Transformación de las bacterias hospederas**

Posteriormente, los DNA recombinantes recién formados son introducidos dentro de bacterias *E. coli* calcio competentes a través de la técnica de choque térmico (Krebs, et al., 2017) por mecanismos aún desconocidos, aunque se cree, que esta captura se da a través de los poros que atraviesan la membrana interna y externa bacteriana. Tal captura del DNA recombinante por parte de bacterias silvestres es muy inusual, posiblemente debido a la repulsión electrostática que existe entre las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana bacteriana con la carga negativa de las moléculas de DNA. Para evitar este fenómeno las bacterias que serán transformadas, son pre tratadas con soluciones de cloruro de calcio, ya que tal solución interrumpe la fluidez de la membrana bacteriana y permite la estabilización de los fósforos cargados. Adicionalmente, se sabe que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  forman enlaces con tales fósforos cargados negativamente lo que facilita el ingreso de los DNA foráneos. Finalmente, las bacterias son tratadas con choque térmico con la finalidad de provocar un desequilibrio térmico entre el interior y exterior de la célula, y de esta forma facilitar el ingreso del DNA recombinante.

## **Expresión de las proteínas recombinantes**

Finalmente, las bacterias que incorporaron o no el plásmido foráneo, son sembradas en medios de cultivos que seleccionan solo aquellas bacterias transformadas y se escoge posteriormente, aquel sistema heterólogo ideal, es decir aquel que fabrique altas concentraciones de proteínas recombinantes solubles de forma estable, sin toxicidad para la bacteria y fácilmente purificadas.

## **Purificación de proteínas**

La purificación de proteínas ha evolucionado de la mano con el descubrimiento y el estudio de nuevas proteínas desde hace más de 200 años. El primer relato de la purificación de proteínas se dio en 1789 cuando Antoine Fourcroy purificó por primera vez albúmina. Sin embargo, estas macromoléculas solo fueron descritas cuanto a su composición básica y algunas propiedades en 1893 por Gerhardus Johannes Mulder (Whitford, 2005).

Desde su descubrimiento las técnicas de purificación de proteínas han evolucionado y en la actualidad son muy diversas, siendo las más comunes la filtración, centrifugación, electroforesis y la cromatografía (Scopes, 1994). Una etapa común en todas estas técnicas es la extracción de las proteínas intracelulares por medio de la lisis celular, la cual es más desafiante en bacterias y en hongos en comparación con las células animales por la presencia de la pared celular en los dos primeros organismos (Tan y Yiap, 2009).

La cromatografía desarrollada en 1903 por el botánico Mikhail Tswett (Ettre y Sakodynskii, 1993) es actualmente la técnica de purificación más atrayente y utilizada. Para el desarrollo de esta técnica se deben tomar en cuenta básicamente dos rasgos: la naturaleza de la matriz de la columna de cromatografía a ser empleada y los grupos funcionales presentes en la macromolécula a ser purificada que influenciarán en la fijación de la molécula a la columna cromatográfica (Scopes, 1994).

Las técnicas de purificación son muy variables, las de uso más amplio son aquellas que se aplican de acuerdo a la naturaleza de las proteínas y a la preservación de su actividad biológica (Scopes, 2001). Las aplicaciones de las principales técnicas de acuerdo al tipo de proteína a ser purificada pueden ser observadas en la **Tabla 2**.

**Tabla 2 Técnicas de purificación de acuerdo a la naturaleza de las proteínas.**

| <b>Tipo proteína</b>                                   | <b>Localización</b>   | <b>Características</b>   | <b>Técnica aconsejable</b>   |
|--|---|--|--|
| <b>Extracelulares solubles</b>                         | Medio extracelular<br>Sangre o medio de cultivo   | No necesita lisis celular<br>Proteína alba diluida.<br>Posible unión con otras proteínas | Adsorción batch seguida por precipitación y columna de cromatografía   |
| <b>Intracelulares (Citoplasmáticas)</b>                | Citoplasma  | Mayormente enzimas   | Necesita de diversos tratamientos antes de la utilización de la columna de cromatografía                       |
| <b>Asociadas a membrana</b>                            | Membrana celular  | Pueden ser proteínas de membrana constitutivas o periféricas                             | Columnas hidrofóbicas, separación de fracciones solubles. Posible uso de gradientes de pH, EDTA o detergentes. |
| <b>Insolubles</b>                                      | Generalmente estructurales  | Unión con otras moléculas celulares  | Purificación nativa muy difícil.   |
| <b>Recombinantes insolubles (Cuerpos de inclusión)</b> | La mayoría proteínas recombinantes  | Agregados moleculares.<br>En su forma nativa son insolubles.                             | Paso inicial centrifugación,   |
| <b>Recombinantes solubles</b>                          | Pueden ser proteínas recombinantes que no forman cuerpos de inclusión.<br>Pudiendo alocarse en los espacios intracelulares o extracelulares | Pueden ser producidos en altas concentraciones   | Columnas cromatográficas.  |

FUENTE: Adaptado (Scopes, 2001).

Como puede ser observado en la Tabla 2, las proteínas recombinantes pueden ser purificadas de forma nativa, para preservar sus conformaciones estructurales (secundarias, terciarias o cuaternarias) y así mantener sus funciones biológicas, aunque esta técnica suele ser más complicada de desarrollar. En este contexto, las principales técnicas de purificación nativa son aquellas basadas en la producción de proteínas marcadas con colas de seis histidinas (His-tag) (Arnau, et al., 2006) y eluidas de las columnas cargadas con iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ) por gradientes de imidazol o pH (Consortium, et al., 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIALES UTILIZADOS**

##### **3.1.1 MATERIALES BIOLÓGICOS:**

- Bacterias *Escherichia coli* M15 transformadas con el plásmido pQE-32-DBP-II portador de la secuencia para la síntesis de la región II de la proteína DBP del parásito *P. vivax* (PvDBP-II). Este material fue gentilmente cedido por la doctora Marisa Cristina da Fonseca Casteluber.
- Bacterias *E. coli* SHuffle® T7 Express lysY (New England Biolabs)
- Suero de ratones linaje BALB/c inmunizados con adenovirus recombinante AdHDBP-II.

##### **3.1.2 MATERIAL PARA EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS:**

- PureYield™ Plasmid Miniprep System – Promega
- His Gravi Trap kit (GE Healthcare)
- Micro BCA™ Protein Assay Kit- Thermo Scientific
- Pierce ECL Western Blotting Substrate- - Thermo Scientific

### 3.1.3 REACTIVOS

- **Medios de cultivo:**

LB sólido y líquido

Medio SOB, SOC

- **Antibióticos**

Ampicilina y kanamicina (Sigma)

- **Reactivos y tampones**

Tampón de lisis celular

1 M CaCl<sub>2</sub>

Tampón de congelamiento (CaCl<sub>2</sub> 0,1 M /10% glicerol)

Enzimas de restricción Sall y HindIII.

10 M Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)

1 M β-mercaptoetanol

0,02 g/mL DNAsa

0,2 g/mL de lisozima.

Tampón de lavado (buffer fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM)

Tampón de elución (buffer fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10-250 mM)

Buffer fosfato Salino (PBS)

Solución de resuspensión del pellet (Tris HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10mM, glicerol 10% + inhibidor de proteasas + DNAsa)

- **Reactivos para Western Blot**

Geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Tampón de muestra 6X (20% (v/v) de glicerol; 20% (p/v) SDS; 0,375 M Tris pH 8,8; 0,75 M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,25% (v/v) de azul de bromofenol)

Tampón de corrida 10X

Colorantes Coomassie azul brillante G y Rojo Ponceau

Solución descolorante

Tampón de transferencia

PBS-T (137 mM, NaCl, 2,7 mM, KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% Tween 20).

Tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en PBS-T)

### **3.1.4 EQUIPAMIENTOS**

- Microcentrífuga y centrifuga
- Espectrofotómetro
- Sonicador
- Lectores de placas de Elisa
- Incubadora refrigerada con agitación orbital
- Congeladoras (-20 y  $-70^\circ\text{C}$ )
- Cámaras electroforéticas
- Fotodocumentador Chemidoc Biorad MP-Biorad.

## 3.2 METODOLOGÍA UTILIZADA

### 3.2.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios de inmunología aplicada (LIA) dentro del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología (MIP) del Centro de Ciencias Biológicas (CCB) de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC), en Florianópolis, Brasil.

#### **Purificación de los plásmidos pQE-32-DBP-II portador de la secuencia PvDBP-II**

La purificación de los plásmidos conteniendo la secuencia de la región PvDBP-II fue realizada con el *kit pureyield plasmid miniprep system* – Promega según indicaciones del fabricante con algunas modificaciones.

A partir de bacterias *E. coli* M15 transformadas con el plásmido pQE-32-DBP-II, portador de la secuencia de PvDBP-II, se prepararon pre-inóculos de 5 mL de medio Luria-Bertani líquido (LB) (1 g triptona bacteriológica, 0.5 g extracto de levadura, 1 NaCl, H<sub>2</sub>O csp 100 mL pH 7.5) en presencia de 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) y 30 µg/mL de kanamicina (Sigma), en incubadoras a 37 °C durante 16 horas y movimiento constante (130 rpm). Después de este tiempo, 1,5 mL de estos pre-inóculos fueron centrifugados a 11500 rpm, y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en agua Milli-q y lisados con Buffer de lisis celular (distribuido con el Kit). Finalmente, este último lisado fue nuevamente centrifugado y los plásmidos fueron recuperados de las columnas de sílica con 30 µL del tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.5) y almacenados a -20 °C hasta su uso.

## **Transformación de las bacterias *E. coli* M15 y SHuffle® T7 Express lysY con el plásmido pQE-32-DBP-II**

La transformación de las bacterias *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY (New England Biolabs) calcio competentes se realizó mediante la técnica de choque térmico, como fue descrito anteriormente (Sambrook y Russell, 2006).

Las bacterias M15 y SHuffle T7 Express lysY nativas fueron colocadas en placas con medio LB con agar sin antibióticos y cultivadas durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, una colonia de cada bacteria fue resuspendida en 5 mL de LB líquido sin antibióticos y cultivada durante 16 h en agitación a 130 rpm y 37 °C. Pasado este tiempo 300 µL de estos nuevos pre-inóculos fueron resuspendidos en 100 mL de medio LB líquido, de forma separada, hasta obtener una densidad óptica de 0,4-0,5 (mid-log) a 600 nm ( $O.D_{600}$ ) y centrifugados a 4 °C a una velocidad de 5000 rpm por 5 minutos. Los pellets resultantes fueron resuspendidos dos veces en  $CaCl_2$  0,1 M a 4 °C por 20 min y congelados a -80 °C durante por lo menos 24 h en tampón de congelamiento ( $CaCl_2$  0,1 M /10% glicerol).

Posteriormente, fueron adicionados 5 µL de la solución con el plásmido pQE-32-DBP-II a las bacterias *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY calcio competentes descongeladas, las cuales fueron incubadas en baño de hielo, y subsecuentemente en baño María a 42 °C. Estos nuevos productos resultantes fueron sembrados en medio de cultivo SOC durante 1 h, centrifugados y cultivados nuevamente por 16 h a 37 °C en medio LB sólido conteniendo los antibióticos específicos.

Finalmente, a partir de cada nueva colonia, fueron extraídos los plásmidos con el *kit pureyield plasmid miniprep system* –Promega, como anteriormente fue descrito. Estos plásmidos fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción HindIII y SalI durante 5 h a 37 °C, los productos fueron separados en gel Agarosa al 1% en presencia de Gelred para su visualización con luz UV de 320 nm y fotografiados en el fotodocumentador Chemidoc Biorad MP.

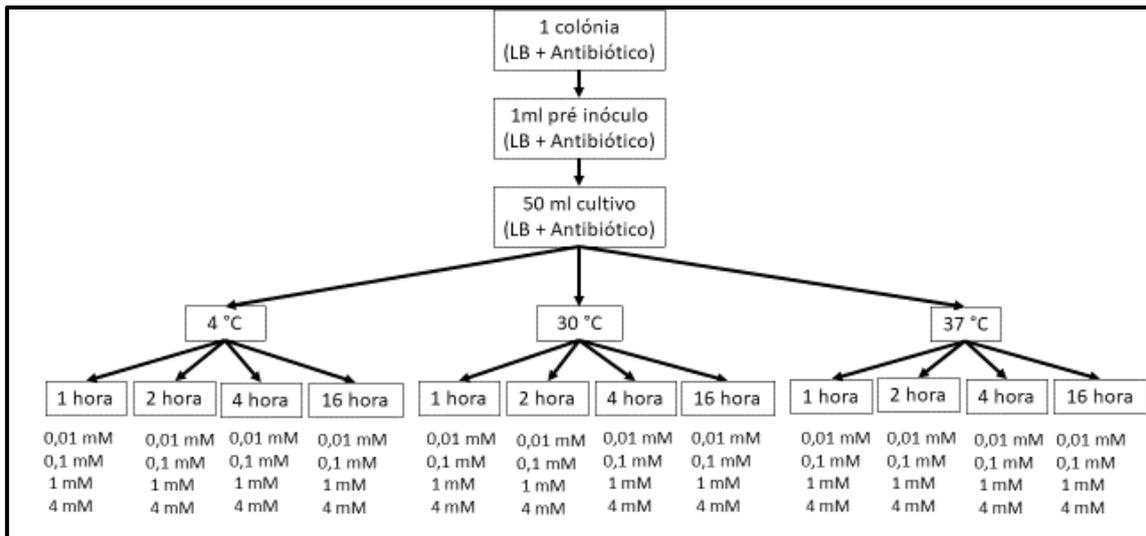
### **3.2.2 EXPRESIÓN DE LA REGIÓN DBP-II DEL PARÁSITO *P. vivax* (PvDBP-II)**

La expresión de las proteínas fue realizada conforme el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). (Sambrook y Russell, 2001)

Una colonia de cada bacteria transformada con el plásmido pQE-32-DBP-II fue resuspendida en 5 mL de medio LB en presencia de ampicilina (Sigma) y kanamicina (Sigma) e incubada en agitación durante 16h a 37 °C y 130 rpm. Pasado este tiempo, 2,5 mL de estos pre inóculos fueron adicionados a 250 mL de medio LB y cultivado a 37 °C y 130 rpm hasta obtener una OD<sub>600</sub> de 0,6-0,8. Después de alcanzada esta medida, los cultivos bacterianos fueron inducidos con Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante diferentes tiempos, luego fueron centrifugados y las proteínas expresadas en las fracciones solubles e insolubles fueron evaluadas en geles de SDS-PAGE al 12% y por Western Blot, estas dos últimas técnicas serán descritas en el punto 3.2.5.

### **3.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXPRESIÓN**

Posteriormente, con el fin de determinar las mejores condiciones de producción de las proteínas de interés, fueron evaluadas alícuotas bacterianas de 50 mL a diferentes temperaturas (4 °C, 30 °C y 37 °C), tiempos de cultivo (1, 2, 4 y 16 h) y concentraciones de IPTG (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM y 4 mM), como puede observarse en la **Figura 10**.



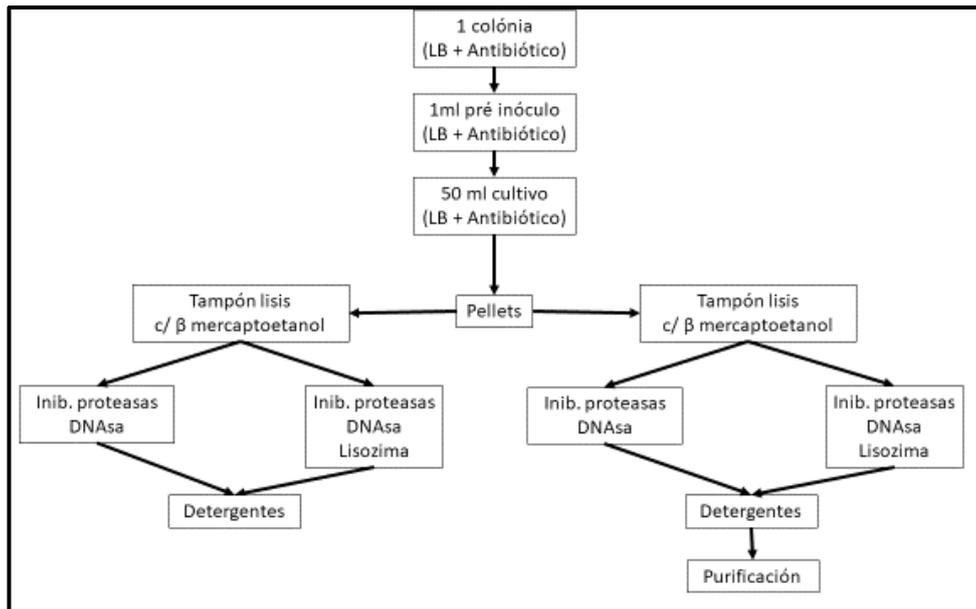
**Figura 10. Optimización del proceso de expresión de las proteínas bacterianas.** Evaluación de la Temperatura (4°C, 30°C y 37°C), Tiempo (1, 2 4 y 16 h) y concentración de IPTG (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM y 4 mM) óptimos para el crecimiento bacteriano.

### 3.2.4 PURIFICACIÓN DE PvDBP-II

La purificación de la proteína de interés se realizó por captura con iones metálicos inmovilizados-IMAC (por sus siglas en Inglés) con el *kit his gravitrap-GE* según indicaciones del fabricante con algunas modificaciones (Sambrook y Russell, 2006).

Brevemente, después de observarse la presencia de la proteína PvDBP-II en la fracción insoluble, los pellets fueron resuspendidos en solución de resuspensión (Tris HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol 10% + inhibidor de proteasas + DNAsa), y fue evaluada la eficiencia de la purificación en presencia y en ausencia de 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, inhibidor de proteínas, DNAsa y lisozima.

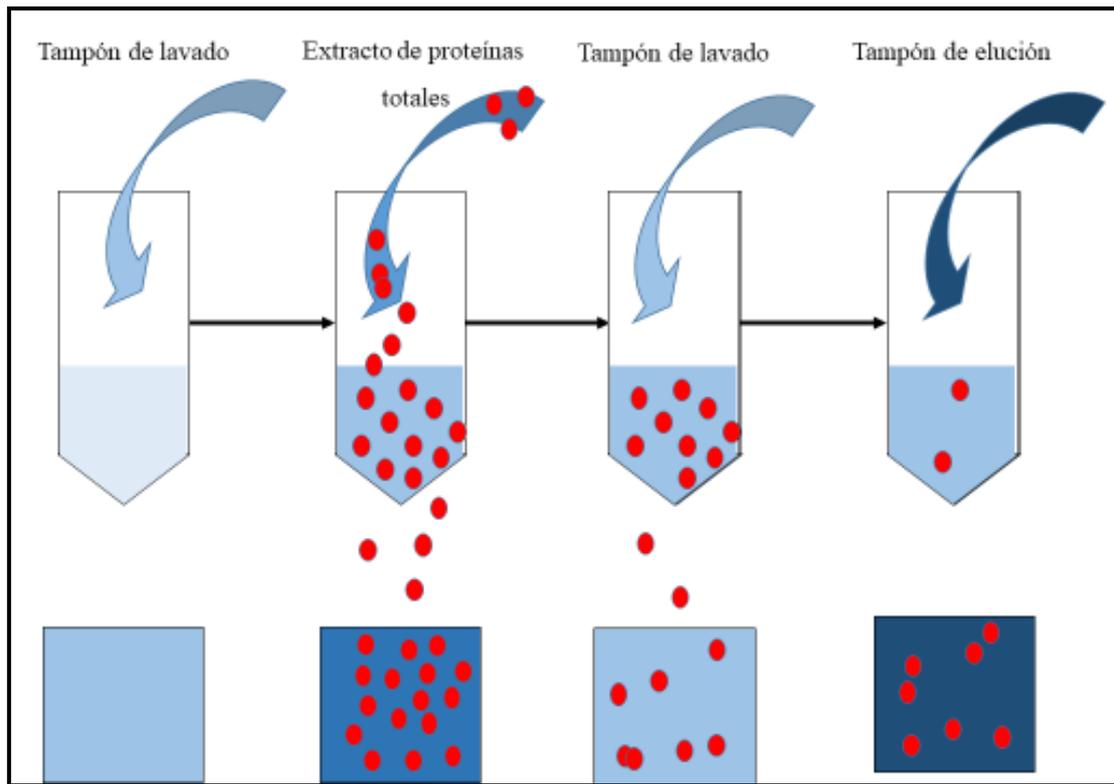
Posteriormente, se verificó la eficiencia de la adición de diversos detergentes a dicho tampón con la finalidad de extraer las proteínas de los cuerpos de inclusión. En la Figura 11 puede observarse los diversos procesos ensayados en el presente trabajo.



**Figura 11. Procesos de purificación de proteínas bacterianas seguidos en el presente trabajo.** Después de obtenerse las mejores condiciones de crecimiento bacteriano, las proteínas contenidas en los pellets obtenidos por centrifugación fueron extraídas por tampones de lisis en presencia y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, inhibidor de proteasas, DNAsa y lisozima.

### Purificación de PvDBP-II

Para la purificación de PvDBP-II, alícuotas de 5 mL de la mezcla anterior fueron aplicadas e incubadas por 30 minutos en columnas de Ni-Sefarosa equilibradas previamente con 10 mL tampón de lavado (20 mM buffer fosfato, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol). Al culminar este período las columnas fueron lavadas dos veces con 10 mL del tampón de lavado y el producto fue eluído con tampón de elución basado en gradiente de imidazol (50-250 mM). El esquema de tal procedimiento es presentado en la **Figura 12**.



**Figura 12. Purificación de la proteína PvDBP-II por captura con iones metálicos inmovilizados-IMAC (por sus siglas en Inglés).** (A) Activación de la columna. (B) Aplicación de la muestra. (C) Lavado de la columna. (D) Elución de las proteínas.

El proceso de purificación por captura con iones metálicos inmovilizados puede ser dividido en cuatro etapas en general:

- Activación de la columna. – Durante esta primera etapa la fase estacionaria, portadora de los metales de transición inmovilizados, es equilibrada a condiciones que promuevan la unión entre la proteína y su ligando. Tales condiciones incluyen temperaturas y pH que promuevan la absorción de los solutos sin ocasionar la desnaturalización de los mismos, bajas concentraciones de sales y de imidazol, entre otros.
- Aplicación de la muestra. –Durante esta etapa los solutos, disueltos en la fase móvil, son unidos con los iones metálicos divalentes presentes en la fase estacionaria. Tal unión estará influenciada por diversas condiciones como el pH, concentración de sales, concentración de urea, imidazol, entre otros.

- Lavado de la columna. – Durante esta etapa la columna es lavada con un buffer de lavado que romperá únicamente las interacciones no específicas entre las proteínas y la matriz, y no aquellas específicas.
- Recuperación de las proteínas. – Durante esta última etapa las proteínas de interés son recuperadas utilizando un buffer que contiene una molécula que compite con estas proteínas en su interacción con la matriz.

### **3.2.5 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS POR SDS-PAGE Y WESTERN BLOT**

La evaluación de la presencia y concentración de las proteínas diana en las fracciones solubles e insolubles bacterianas, así como en los lisados y las diversas fracciones obtenidos después del proceso de purificación de las proteínas en columna con Ni<sup>2+</sup>, se realizó a partir de alícuotas de estas con aproximadamente 5 µg de proteínas total, calculados según el método clásico de Bradford (Bradford, 1976) y el *kit Micro BCA™ Protein Assay Kit- Thermo Scientific*, por análisis de geles de SDS-PAGE y por Western Blot.

Las alícuotas fueron mezcladas con tampón de muestra 6x (20% (v/v) de glicerol; 20% (p/v) SDS; 0,375 M Tris pH 8,8; 0,75 M de β-mercaptoetanol y 0,25% de solución de azul de bromofenol) y calentadas a 99 °C durante 10 minutos. Después de este período, las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

Posteriormente, las proteínas presentes en las diversas muestras fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 12% y las bandas proteicas presentes fueron evaluadas por comparación contra un marcador de peso molecular.

Para la visualización de estas proteínas en los geles, estos fueron tratados durante 15 minutos con solución de fijación (metanol/ácido acético/agua 40:10:50), luego se tiñeron con una solución de Coomassie azul (Coomassie azul brillante R-250 0,2% p/v en solución de fijación) durante 4 h en agitación constante y finalmente fueron descolorados durante 16 h con la solución de fijación.

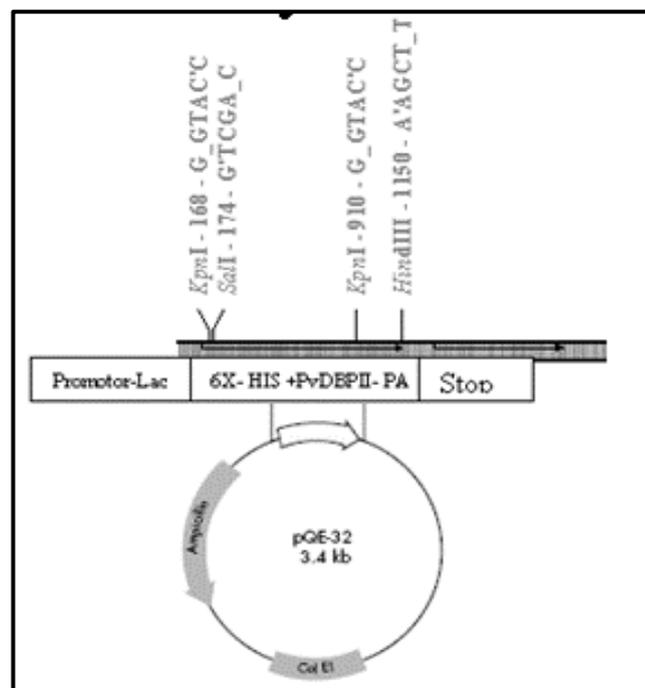
Paralelamente, las bandas proteicas presentes en un segundo gel de SDS-PAGE al 12% fueron transferidas en presencia de tampón de transferencia (25 mM de Tris Base y 192 mM de glicina disueltos en 100 mL de una solución acuosa al 20% de metanol (v/v)) a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot Transfer Medium* (Bio-RAD).

Esta membrana de nitrocelulosa fue posteriormente bloqueada a 4 °C por 16 h con tampón de bloqueo (PBS-T (137 mM, NaCl, 2,7 mM, KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% Tween 20) con 5% de leche desnatada). Después de este procedimiento la membrana fue lavada 3 veces por 5 minutos con PBS-T, y enseguida fue incubada a temperatura ambiente por 90 minutos sobre agitación constante con los anticuerpos primarios (Anti-polyHistidine- (1:1000) -Sigma Aldrich, sueros de pacientes humanos con malaria vivax (1:1000), donados por la doctora Marisa Cristina da Fonseca Casteluber, y suero de ratones BALB/c previamente inmunizados con 50 µL de adenovirus genéticamente modificado para la expresión de las proteínas PvDBP) diluidos en PBS-T (enriquecido con 5% BSA y 0,05% Azida de sodio). Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces por 5 minutos con PBS-T e incubada por 1h con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Ig GAM anti ratones (Sigma) e Ig GAM antihumano (Sigma), todos diluidos 1:5000 en PBS-T con 2% de leche desnatada). Culminada esta última incubación, las membranas fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia utilizando el sustrato SuperSignal™ Western Blot Enhancer-Thermo Scientific y visualizadas en el Fotodocumentador Chemidoc Biorad MP.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS *E. coli*

En la presente investigación, las proteínas recombinantes expresadas en las bacterias *E. coli* fueron aquellas correspondientes a las variantes genéticas (nucleótidos 919-1985) descritas por Sousa et al (2006), las cuales codifican la secuencia de aminoácidos polimórficos 221-551 de la región II de PvDBP cepa Salvador-I (Gene Bank M61095-1). Estas secuencias fueron confirmadas, clonadas en plásmidos de expresión pQE-32 como se muestra en la **Figura 13**, y empleadas para la transformación de las bacterias *E. coli* M15 por la doctora Casteluber durante sus estudios de doctorado en la UFMG.



**Figura 13.** Plásmido pQE-32-DBP-II utilizado en el presente trabajo.

FUENTE: (Casteluber, 2010).

Los plásmidos portadores de la secuencia de interés fueron extraídos de las bacterias *E. coli* M15 y utilizados para la transformación de nuevas bacterias *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY. Esta última bacteria fue utilizada por poseer una modificación genética que le permite formar proteínas con puentes de azufre en el citoplasma (Nozach, et al., 2013).

Inmediatamente después de realizar la transformación, las bacterias fueron colocadas en medios de selección en presencia de ampicilina y kanamicina. Luego se verificó la presencia de las secuencias de interés (aproximadamente 1000 kb) a través de digestión enzimática con las enzimas HindIII y SalI en Buffer Multicore, como puede observarse en la **Figura 14**.



**Figura 14. Verificación de la eficiencia y calidad de la transformación de las bacterias SHuffle® T7 Express lysY.** (Izquierda) Digestión del plásmido pQE-32-DBP-II con las enzimas de restricción HindIII y SalI. La imagen muestra la fotografía de un gel de agarosa 1% en presencia de Gelred. Colonias bacterianas transformadas provenientes de las placas MT y PA. Marcador de peso molecular 1 kb Promega Corp Ltda. (Derecha). Cultivos de las bacterias *E. coli* transformadas con los plásmidos pQE-32-DBP-II en medio LB agar con antibióticos de selección (Ampicilina y kanamicina).

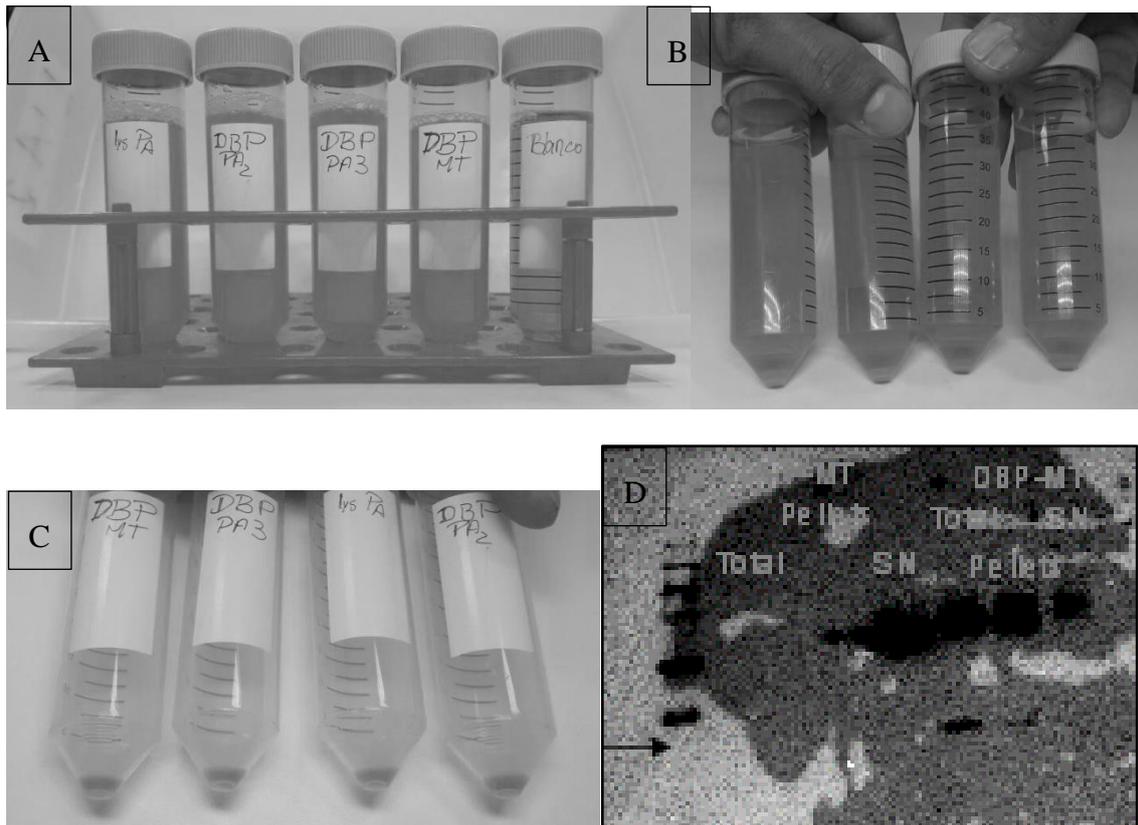
## **4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PvDBP-II**

### **4.2.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXPRESIÓN DE PvDBP-II**

#### **Evaluación de la capacidad productora de las fracciones bacterianas obtenidas**

Las síntesis de las proteínas recombinantes en los sistemas procariotas se llevaron a cabo solo a partir de aquellas colonias bacterianas que presentaron el fragmento de DNA recombinante. A partir de estas colonias se realizaron inicialmente pre-inóculos y después cultivos bacterianos en 50 mL de LB líquido. Posteriormente, tales cultivos fueron inducidos por 4 h con 0,1 mM de IPTG y centrifugados a 10000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente se evaluó la capacidad productora de las proteínas recombinantes tanto del sobrenadante como del pellet. Este procedimiento se puede observar en la **Figura 15**.

Como puede observarse en la Figura 15D, aquellas colonias que no fueron inducidas con IPTG no presentaron la banda de aproximadamente 40 kDa. Este inductor se caracteriza por inhibir a la proteína Lac represora lo que permite la transcripción de los genes responsables por las proteínas recombinantes (Hannig y Makrides, 1998, Sørensen y Mortensen, 2005).



**Figura 15. Evaluación de la presencia de las proteínas recombinantes PvDBP-II en cultivos de *E. coli*.** **A** Cultivos de *E. coli* inducidos por 4h con 0,1 mM IPTG a 37 °C. **B** División del cultivo de *E. coli* en fase líquida (Sobrenadante), sólida (Pellet). **C** Pellet obtenido de los cultivos que presentaron las mayores concentraciones de proteína. **D** Western Blot de dos colonias de *E. coli* transformadas e inducidas con 0,1 mM de IPTG. Anticuerpo primario (1:1000 sueros de pacientes infectados con malaria vivax). Anticuerpo secundario (1:5000 Ig GAM antihumano conjugado con peroxidasa (Sigma)). Total: Pellets + SN, Fracción soluble SN) y Fracción insoluble (Pellets).

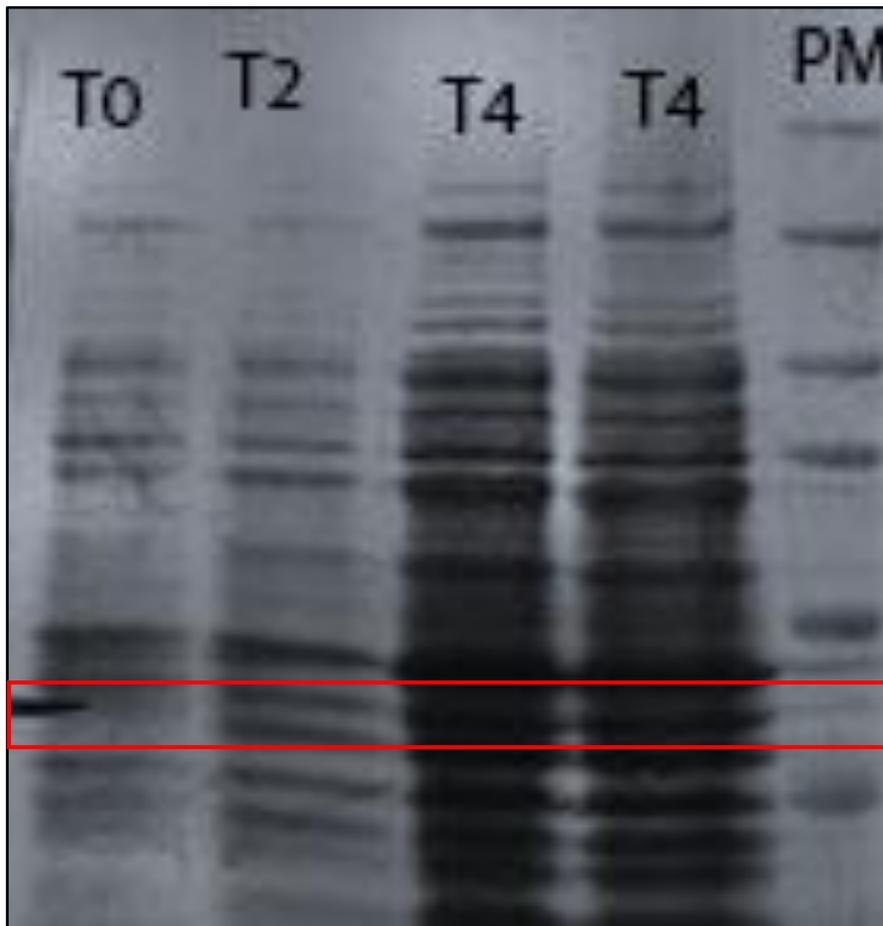
### Optimización de la temperatura en el proceso de producción heteróloga

Después de encontrarse que la mayor cantidad de proteínas se ubican en la fracción insoluble (probablemente integrando los cuerpos de inclusión en el pellet), se evaluó el crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas: 4, 30 y 37 °C. Esta evaluación demostró que la bacteria no creció a 4 °C después de 24 h y que la diferencia entre el crecimiento a 30 y 37 °C no fue significativamente diferente, por lo que se decidió continuar los futuros ensayos a 37 °C.

## Optimización del tiempo de producción

A continuación, para aumentar la eficiencia del proceso, se evaluaron cuatro tiempos: 1, 2, 4 y 16 h. Se observó que, después de 16 h, la cantidad de bacterias disminuyó probablemente debido a una acción tóxica por parte de la proteína sintetizada. Estas comparaciones fueron realizadas por inspección directa de la turbidez alcanzada y por análisis en gel SDS-PAGE de las proteínas sintetizadas como puede ser observado en la

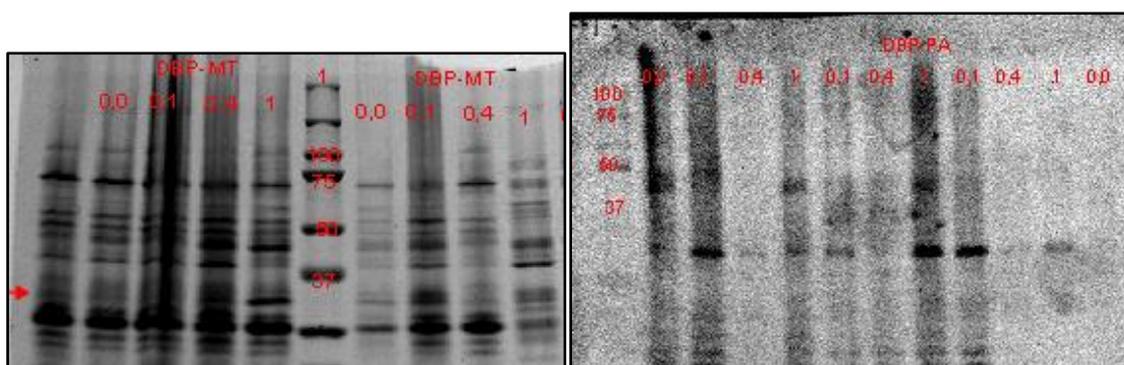
**Figura 16.**



**Figura 16. Optimización del tiempo de cultivo de *E. coli*.** La imagen muestra la fotografía de un gel de SDS-PAGE al 12% con alícuotas de cultivos bacterianos inducidos por cuatro diferentes tiempos (T0: tiempo cero, T2: 2 h y T4:4 h) con 0,1 mM a 37 °C. Se muestra la banda de interés de aproximadamente 40 kDa.

## Optimización de la concentración de IPTG

Finalmente, después de haberse determinado que las mejores condiciones de producción de las proteínas heterólogas son la temperatura de 37 °C y el tiempo de 4 h, se procedió a evaluar cuatro diferentes concentraciones de IPTG (0,01 mM, 0,1 mM, 0,4 mM y 1 mM). Los resultados de este experimento son presentados en la **Figura 17**.



**Figura 17. Determinación de la concentración óptima de IPTG mediante ensayos por SDS-PAGE y Western Blot.** (Izquierda) La imagen muestra la fotografía de un gel de SDS-PAGE al 12% con alícuotas de cultivo bacteriano inducidos por 4h con cuatro concentraciones de IPTG (0,01 mM, 0,1 mM, 0,4 mM y 1 mM) a 37 °C, la banda de interés (aproximadamente 40 kDa). (Derecha). Proteínas presentes en estas alícuotas, extraídas con tampón de muestra y evaluadas por Western Blot. Como anticuerpos primarios fueron utilizadas diluciones de 1:1000 de sueros de pacientes infectados con *P. vivax* y como secundarios 1:1000 Ig GAM antihumano conjugado con peroxidasa (Sigma).

Tal como se puede observar en la Figura 17, aquellas alícuotas inducidas con 1 mM de IPTG expresaron mayor cantidad de la proteína PvDBP-II en comparación con aquellas inducidas con las otras concentraciones.

Finalmente, se puede concluir que las mejores condiciones para la expresión de las proteínas PvDBP-II en las bacterias *E. coli* SHuffle® T7 Express lysY, son cultivos a 37 °C, con una inducción por cuatro horas con 1 mM de IPTG.

## 4.2.2 OPTIMIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE PvDBP-II

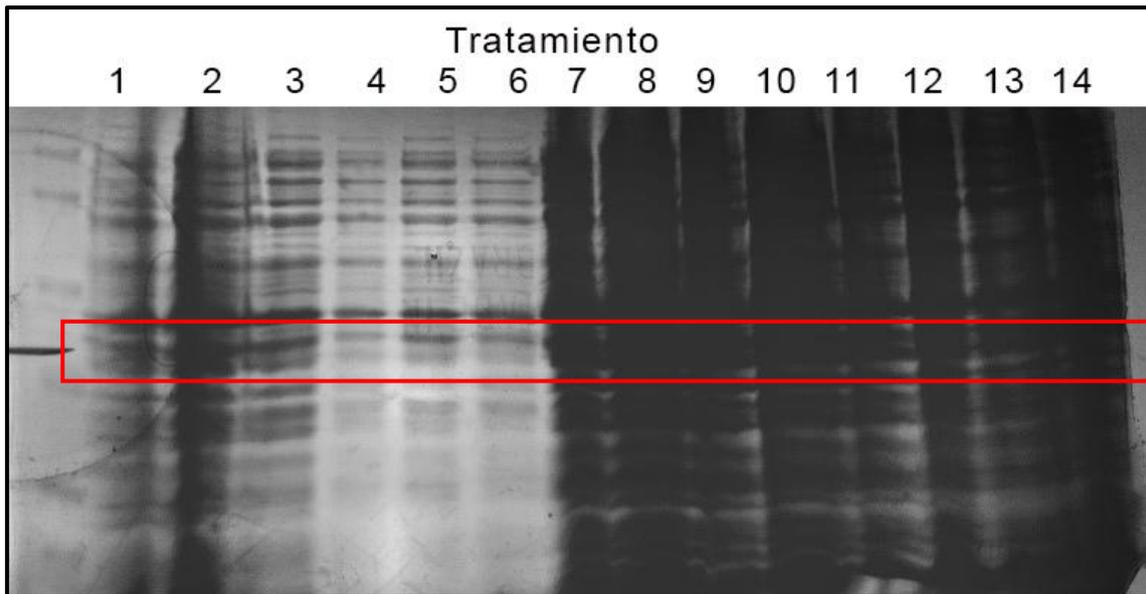
### Optimización de extracción de PvDBP-II

Las purificaciones realizadas en la presente investigación se efectuaron con el kit *Gravity-flow purification*, según recomendaciones del fabricante con varias modificaciones enfocadas a disgregar los cuerpos de inclusión y solubilizar la proteína recombinante PvDBP-II

De esta forma, enfocado en obtener la mayor cantidad de proteínas purificadas, se procedió a buscar el mejor protocolo de extracción nativa de estas macromoléculas a partir de los cultivos de *E. coli*.

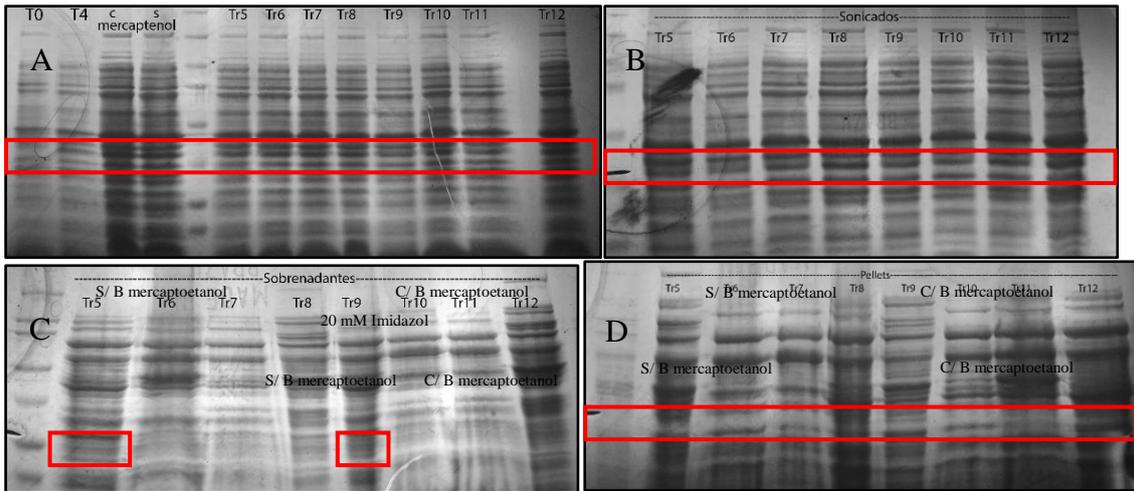
Como primer paso se evaluó la eficiencia de la purificación en presencia del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol con la finalidad de prevenir posibles agregados proteicos ocasionados por la actividad oxidativa del aire. Posteriormente, las proteínas presentes de las diversas alícuotas fueron purificadas por medio de columnas de captura por iones metálicos inmovilizados (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography* – IMAC) con  $\text{Ni}^{2+}$ . Los resultados de este ensayo pueden ser observados en la **Figura 18**.

Como puede observarse en la **Figura 18**, las columnas con las proteínas totales extraídas por estos primeros cuatro tratamientos con  $\beta$ -mercaptoetanol no mostraron ninguna diferencia entre ellos, a pesar que varios trabajos previos han descrito la eficiencia de esta molécula reductora en la purificación de proteínas (Chang y Swartz, 1993, Fischer, et al., 1993).



**Figura 18. Análisis de las proteínas presentes en las bacterias transformadas.** La imagen muestra la fotografía de un gel de SDS-PAGE al 12% con los pellets resuspendidos en solución de resuspensión (Tris HCl 20mM, NaCl 300 mM, imidazol 10mM, glicerol 10% + inhibidor de proteasas + DNAsa) y sonicados por 4 minutos en intensidad máxima con pausas de 45 segundos. Sin  $\beta$ -mercaptoetanol (Líneas 1 y 2 (Fracción insoluble y soluble), Líneas 5 y 6 (Fracción insoluble), Líneas 9 y 10 (Fracción soluble) y Línea 13 (sin sonicar)). Con  $\beta$ -mercaptoetanol (Líneas 3 y 4 (Fracción insoluble y soluble), 7, 8 (Fracción insoluble), 11 y 12 (Fracción soluble) y 14 (sin sonicar)). Líneas 2, 4, 6, 8, 10 12 y 14 con 0,2 g/mL de lisozima.

La falta de una banda bien definida y la presencia del background en esta Figura 18, podría indicar la persistencia de los cuerpos de inclusión. Por esta razón, se evaluaron cuatro nuevos tratamientos, tres de ellos basados en el uso de detergentes y el cuarto en el aumento del tiempo de sonicación. Los resultados de estas nuevas evaluaciones son presentados en la **Figura 19**.

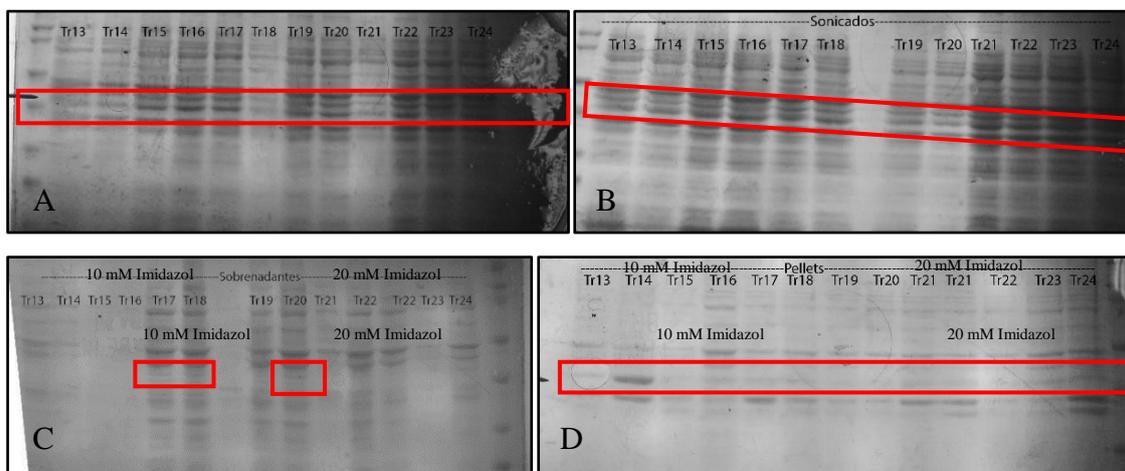


**Figura 19. Evaluación del efecto de diversos detergentes durante la purificación proteica.** La imagen muestra la fotografía de un gel de SDS-PAGE al 12% con los pellets resuspendidos en solución resuspensión (Tris HCl 20mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol 10% + inhibidor de proteasas + DNAsa) y sonicados por 4 minutos a intensidad máxima con pausas de 45 segundos. Alícuotas obtenidas de los tratamientos sin  $\beta$ -mercaptoetanol Tr 5-8 (Tr 5: 2% Colato; Tr 6: 2% Triton X100, Tr 7: 2% Tween 20; Tr8: Sonicado 3 minutos: 30:30); Con  $\beta$ -mercaptoetanol Tr 9-12 (Tr 9: 2% Colato; Tr 10: Triton X100, Tr 11: 2% Tween 20; Tr12: Sonicado 3 minutos: 30:30). **(A)** (Fracción insoluble y soluble), **(B)** (Fracción insoluble y soluble sonicadas 4 minutos 45:30) **(C)** (Fracción soluble) **(D)** (Fracción insoluble).

Los cuerpos de inclusión en bacterias *E. coli* han sido descritos como agregados citoplasmáticos de proteínas amieloides recombinantes y otras moléculas con capacidad de alterar fuertemente su crecimiento (Rinas, et al., 2017). Son diversos los estudios que respaldan el uso de detergentes con la finalidad de disgregar los cuerpos de inclusión, y de esta forma liberar las proteínas recombinantes de interés (Khan, et al., 1998, Lilie, et al., 1998, Rinas, et al., 2017, Singh y Panda, 2005). En esta misma línea, como puede ser observado en la Figura 19, la incorporación de 2 por ciento del detergente colato (líneas Tr5 y Tr9) al protocolo de extracción clarificó las bandas, especialmente la correspondiente de la proteína PvDBP-II, así como permitió su solubilidad. Este detergente iónico, al igual que el deoxicolato (DOC), ya demostró ser un importante componente en la purificación de proteínas recombinantes en diversos estudios (Kozasa y Gilman, 1995).

Una vez determinado que 2 por ciento del detergente colato mejora el desempeño de la extracción, se evaluó aumentar a 4 por ciento la concentración de dicho detergente, así

como la concentración de imidazol a 20 mM en la solución de resuspensión. Los resultados de dichas evaluaciones pueden ser observados en la **Figura 20**.



**Figura 20. Optimización de la concentración de colato en la purificación de la proteína PvDBP-II.** Sin  $\beta$ -mercaptoetanol Tr 13-18 (Imidazol 10 mM: Tr 13: 2% colato; Tr 14: 4% colato, Tr 15: Sonicado 5 minutos 20:30; imidazol 20 mM Tr 16: 2% colato; Tr 17: 4% colato, Tr 18: Sonicado 5 minutos 20:30); Con  $\beta$ -mercaptoetanol Tr 19-24 (Imidazol 10 mM: Tr 19: 2% colato; Tr 20: 4% colato, Tr 21: Sonicado 5 minutos 20:30; imidazol 20 mM Tr 22: 2% colato; Tr 23: 4% colato, Tr 24: Sonicado 5 minutos 20:30) (A) (Fracción insoluble y soluble), (B) (Fracción insoluble y soluble sonicadas 4 minutos 45:30) (C) (Fracción soluble) (D) (Fracción insoluble).

Finalmente, tomando en cuenta las mejoras observadas al aumentar a 4 por ciento la concentración de colato y a 20 mM la de imidazol se concluyó que el mejor tratamiento de purificación de las proteínas a partir de los cuerpos de inclusión fue el tratamiento 17 (tr17), que consiste en la resuspensión del pellet en solución de resuspensión optimizada (Tris HCl 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10%, 50  $\mu$ M de inhibidor de proteasas, 0,04 mg/mL de DNAsa, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mg/mL de lisozima, 4% de colato) sin  $\beta$ -mercaptoetanol por 30 minutos, seguida de seis ciclos de 30 segundos de sonicación a 80 por ciento con 30 segundos de intervalo .

Este tratamiento de purificación, tr17, fue utilizado posteriormente en la extracción de las proteínas PvDBP-II a partir de las bacterias *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY. La comparación de tales extracciones puede ser observada en la **Figura 21**.



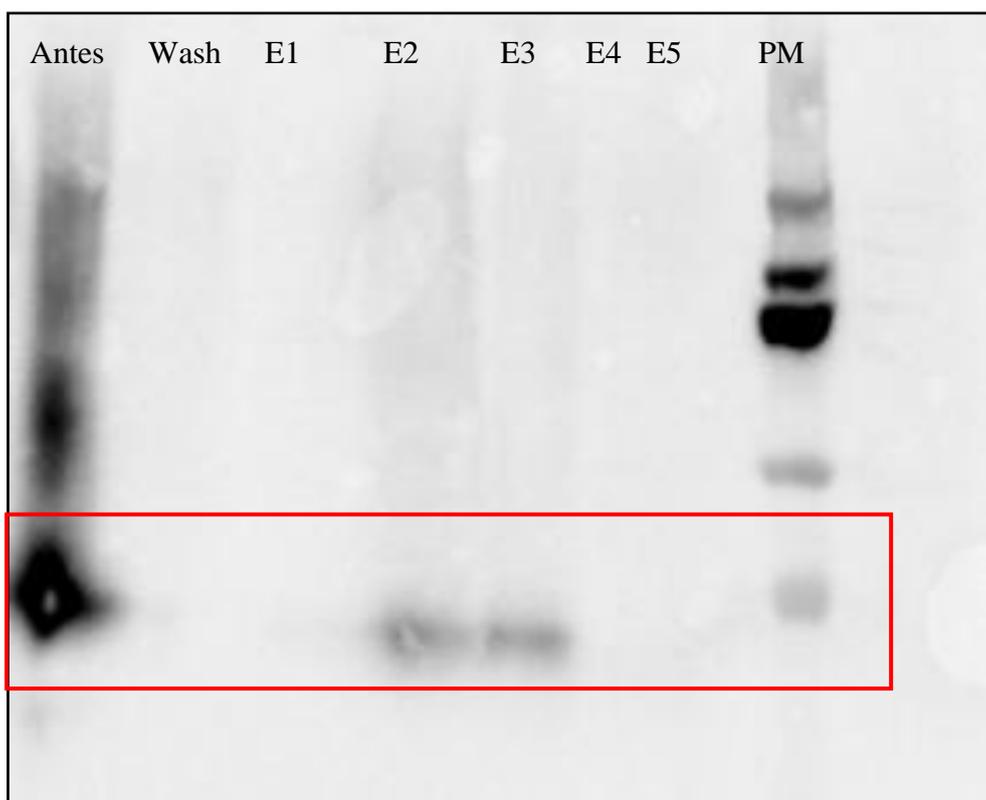
**Figura 21. Purificación de la proteína PvDBP-II a partir de cultivos de *E. coli* M15 y SHuffle T7 Express lysY.** (Superior) Purificación de PvDBP-II a partir del inóculo bacteriano M15. (Inferior). A. Purificación PvDBP-II a partir del inóculo bacteriano SHuffle T7 Express lysY. T0: tiempo cero, T4:4 h inducción con IPTG, Tratamiento: 0,02g/mL de DNAsa, 0,2 mg/mL de lisozima, 50 mM de inhibidor de proteasas, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2% de colato por 30 minutos. Sonicado: seis ciclos a 80% de potencia por 30 segundos, Sobrenadante y pellet: centrifugados a 8000 g por 10 minutos a 4°C.

Como puede ser observado en la Figura 21, la técnica utilizada tuvo un bajo rendimiento en las dos extracciones. La dificultad de extraer esta proteína PvDBP ya fue descrita por otros autores, los cuales realizaron la purificación utilizando urea en lugar de imidazol (Valizadeh, et al., 2014). La úrea es un fuerte agente caotrópico utilizado en la purificación de proteínas de forma desnaturante (Schlager, et al., 2012), por lo cual no fue utilizado en el presente estudio.

Por otro lado, la presencia de los cuerpos de inclusión facilitó la extracción de la proteína PvDBP-II, aunque de forma desventajosa ya que imposibilitó su purificación nativa, como fue explicado anteriormente (Khan, et al., 1998).

### **Purificación de las PvDBP-II**

Finalmente, después de comprobarse por SDS-PAGE al 12% la presencia de una proteína de aproximadamente de 40 kDa en las diversas fracciones obtenidas de los cultivos de la *E. coli* SHuffle T7 Express lysY, estas proteínas fueron analizadas por Western Blot en cuanto a su poder de reactividad en presencia de suero de ratones linaje BALB/c inmunizados con adenovirus recombinante portador de la proteína PvDBP-II (AdHDBP). Este análisis puede ser observado en la **Figura 22**.



**Figura 22.- Evaluación de la capacidad de reconocimiento de las proteínas PvDBP-II de los anticuerpos presentes en el suero de ratones linaje BALB/c inmunizados con adenovirus recombinante portador de la proteína PvDBP-II (AdHDBP). Antes:** sonicado, Wash: tampón de lavado, E1- E5: tampón de elución.

Como puede observarse en la Figura 22, los anticuerpos presentes en los sueros de los animales inmunizados reconocieron las proteínas PvDBP-II provenientes de los eluentes, lo que indica que esta proteína puede ser utilizada en la formulación de nuevos candidatos vacunales. Sin embargo, la baja tonalidad de las bandas presentes en los eluentes, E2 y E3, en comparación con la observada por la banda formada por la alícuota de la fracción denominada “Antes” (alícuota antes de la aplicación en la columna), indica que el procedimiento posee una baja eficiencia, por lo cual deberá ser mejorada en posteriores experimentos.

## V. CONCLUSIONES

1. Las bacterias *E. coli* SHuffle T7 Express lysY transformadas con el plásmido pQE32-DBP-II tienen la capacidad de sintetizar de forma correcta la proteína recombinante PvDBP-II.
2. La proteína PvDBP-II posee una producción más eficiente a 37 °C durante cuatro horas y con una inducción de 1 mM de IPTG.
3. Las proteínas PvDBP-II forman cuerpos de inclusión por lo que su purificación nativa es muy compleja y debe ser realizada en presencia de colato al 4 por ciento e imidazol 20 mM.
4. La técnica de purificación nativa por inmovilización iónica en columnas por afinidad con Ni<sup>2+</sup> (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography – IMAC*) demostró ser adecuada, aunque poco eficiente.
5. Las proteínas recombinantes sintetizadas en el presente trabajo fueron reconocidas por los anticuerpos sintetizados en los ratones inmunizados con adenovirus humanos recombinantes portadores de PvDBP-II.

## VI. RECOMENDACIONES.

- Para poder aumentar la eficiencia de la purificación, sería recomendable evaluar nuevos métodos de elución de las proteínas a partir de las columnas de captura por iones metálicos inmovilizados. Tales métodos podrían estar basados en gradientes de pH, aumentar el tiempo de contacto entre la solución rica en proteínas y la columna, entre otros.
- Las proteínas PvDBP-II podrían ser evaluadas en su capacidad de reactividad frente a anticuerpos presentes en los sueros de pacientes humanos con malaria causada por *P. vivax*.
- Deberá cuantificarse la proteína purificada si se desea realizar la formulación de un candidato vacunal.
- Las proteínas PvDBP-II purificadas en el presente trabajo pueden ser utilizadas en una formulación vacunal con distribución dosis-refuerzo heteróloga u homóloga.
- Se recomienda analizar las proteínas PvDBP-II purificadas en diferentes formulaciones con diversos adyuvantes que puedan modificar el tipo de respuesta inmune alcanzada.
- Realizar estudios en animales para determinar la capacidad protectora de la proteína, cuando estos son desafiados con el parásito.
- Realizar la producción de la proteína PvDBP-II en otros tipos de *E. coli*, hongos, levaduras, plantas, insectos para hacer un estudio comparativo y así obtener el mejor productor heterólogo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, JH, et al. 1992. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89(15): 7085-7089
- Ampudia, E, et al. 1996. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. Mol Biochem Parasitol. 78(1–2): 269-272
- Arévalo-Herrera, M, et al. 2014. *Plasmodium vivax* Sporozoite Challenge in Malaria-Naïve and Semi-Immune Colombian Volunteers. PLoS ONE. 9(6): e99754
- Armistead, JS, et al. 2014. Antibodies to a Single, Conserved Epitope in Anopheles APN1 Inhibit Universal Transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria. Infect Immun. 82(2): 818-829
- Arnau, J, et al. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. Protein Expression and Purification. 48(1): 1-13
- Baird, JK. 2009. Resistance to Therapies for Infection by *Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Rev. 22(3): 508-534

- Baird, JK. 2013. Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute *Plasmodium vivax* Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(1): 36-57.
- Batchelor, JD, et al. 2014. Red Blood Cell Invasion by *Plasmodium vivax*: Structural Basis for DBP Engagement of DARC. *PLoS Pathog*. 10(1): e1003869
- Baum, J, et al. 2003. Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Genetics*. 163(1327 - 1336
- Bauza, K, et al. 2014. Efficacy of a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Using ChAd63 and Modified Vaccinia Ankara Expressing Thrombospondin-Related Anonymous Protein as Assessed with Transgenic *Plasmodium berghei* Parasites. *Infection and Immunity*. 82(3): 1277-1286
- Bennett, JW, et al. 2016. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(2): e0004423
- Birkett, AJ, et al. 2013. Malaria vaccine R&D in the Decade of Vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities. *Vaccine*. 31, Supplement 2(B233-B243)
- Block H, et al. 2009. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification (Second Edition)*. Academic Press. 440-468.
- Bouillet, LÉM, et al. 2011. Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. *Infection and Immunity*. 79(9): 3642-3652

- Bradford, M. 1976. a rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(248-254)
- Bresolin, ITL, et al. 2009. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Química Nova*. 32(1288-1296)
- Brown, TA. 2016. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*: Wiley.
- Carter, R y Mendis, KN. 2002. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 564-594
- Casteluber, MCDF. 2010. Desenvolvimento e análise funcional de uma vacina contra *Plasmodium vivax*, baseada na Proteína de Ligação ao antígeno Duffy (DBP) do parasito, administrada na forma de proteínas e adenovírus recombinantes mediante protocolos dose – reforço: Doctor. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cavasini, C, et al. 2007. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 6(1): 167
- Chang, JY y Swartz, JR. 1993. Single-Step Solubilization and Folding of IGF-1 Aggregates from *Escherichia coli*. *Protein Folding*. American Chemical Society. 178-188
- Chitnis, C, et al. 1996. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med*. 184(1531 - 1536)

- Chitnis, C y Miller, L. 1994. Identification of the erythrocytes binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med.* 180(497 - 506
- Cisse, M, et al. 2015. Characterizing the insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in Mali. *Malaria Journal.* 14(1): 327
- Clark, DP y Pazdernik, NJ. 2016. Chapter 10 - Recombinant Proteins. *Biotechnology (Second Edition).* Boston. Academic Cell. 335-363
- Cole-Tobian, J, et al. 2002. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the Duffy binding protein. *J Infect Dis.* 186(531 - 539
- Collins, WE y Contacos, PG. 1972. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat New Biol.* 236(67): 176-177
- Consortium, SG, et al. 2008. Protein production and purification. *Nat Meth.* 5(2): 135-146
- Corradin, G, et al. 2012. Chapter 5 - Malaria Vaccine Development Using Synthetic Peptides as a Technical Platform. *Advances in Immunology.* Academic Press. 107-149
- Cowman, AF y Crabb, BS. 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 124(4): 755-766
- Dabiré, KR, et al. 2008. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar J.* 7(188).

- De Cassan, SC, et al. 2015. Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium Vivax*. *Front Immunol.* 6 (348)
- De Sousa, TN, et al. 2014. The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109(5): 608-617
- Demain, AL y Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 27(3): 297-306
- Devi, YS, et al. 2007. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. *Vaccine.* 25(28): 5166-5174
- Doerig, C, et al. 2015. Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nat Rev Micro.* 13(3): 160-172
- Doolan, DL y Martinez-Alier, N. 2006. Immune Response to Pre-Erythrocytic Stages of Malaria Parasites. *Curr. Mol. Med.* 6(2): 169-185
- Ettre, LS y Sakodynskii, KI. 1993. M. S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903–1910). *Chromatographia.* 35(5): 329-338.
- Fischer, B, et al. 1993. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering.* 41(1): 3-13
- Fraser, T, et al. 1997. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun.* 65(7): 2772-7

- Gama, BE, et al. 2011. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(159-166)
- Groot, ASD y Rappuoli, R. 2004. Genome-derived vaccines. Expert Review of Vaccines. 3(1): 59-76
- Hamilton Fairley, BN. 1947. Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. Trans R Soc Trop Med Hyg. 40(5): 621-676
- Hannig, G y Makrides, SC. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology. 16(2): 54-60
- Hay, SI, et al. 2010. Developing Global Maps of the Dominant Anopheles Vectors of Human Malaria. PLoS Medicine. 7(2): e1000209
- Herrera, S, et al. 2011. Phase I Safety and Immunogenicity Trial of *Plasmodium vivax* CS Derived Long Synthetic Peptides Adjuvanted with Montanide ISA 720 or Montanide ISA 51. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 84(Suppl 2): 12-20
- Hill, AVS. 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. Nat Rev Immunol. 6(1): 21-32
- Hisaeda, H, et al. 2000. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. Infect Immun. 68(6618 - 6623)

- Hisaeda, H, et al. 2005. Malaria: immune evasion by parasites. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37(4): 700-706
- Horuk, R, et al. 1993. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*. 261(5125): 1182-1184
- Howell, DPG, et al. 2006. Disguising itself-insights into *Plasmodium falciparum* binding and immune evasion from the DBL crystal structure. *Mol Biochem Parasitol*. 148(1): 1-9
- Kano, FS, et al. 2012. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 17(8): 989-1000
- Kantele, A y Jokiranta, TS. 2011. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis*. 52(11): 1356-1362
- Kasehagen, LJ, et al. 2007. Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygotes. *PLoS ONE*. 2(3): e336
- Khan, RH, et al. 1998. Solubilization of Recombinant Ovine Growth Hormone with Retention of Native-like Secondary Structure and Its Refolding from the Inclusion Bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 14(5): 722-728
- King, CL, et al. 2008. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(24): 8363-8368

- Kozasa, T y Gilman, AG. 1995. Purification of Recombinant G Proteins from Sf9 Cells by Hexahistidine Tagging of Associated Subunits: CHARACTERIZATION OF  $\alpha$  AND INHIBITION OF ADENYLYL CYCLASE BY  $\alpha$ z. *Journal of Biological Chemistry*. 270(4): 1734-1741
- Krebs, JE, et al. 2017. *Lewin's GENES XII*: Jones & Bartlett Learning.
- Krotoski, WA, et al. 1982. Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted *Plasmodium vivax* Infection\*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(6): 1291-1293
- Lilie, H, et al. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 9(5): 497-501
- Lumsden, JM, et al. 2011. Evaluation of the safety and immunogenicity in rhesus monkeys of a recombinant malaria vaccine for *Plasmodium vivax* with a synthetic toll-like receptor 4 agonist formulated in an emulsion. *Infection and Immunity*. 79(9): 3492-3500
- Malaria Vaccine Funders Group. 2013. *The Malaria Vaccine Technology Roadmap*.
- Malkin, EM, et al. 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 23(24): 3131-3138
- Markus, M. 2011. Malaria: Origin of the Term “Hypnozoite”. *J. Hist. Biol.* 44(4): 781-786

- Mathias, DK, et al. 2012. Expression, Immunogenicity, Histopathology, and Potency of a Mosquito-Based Malaria Transmission-Blocking Recombinant Vaccine. *Infect Immun.* 80(4): 1606-1614
- Menard, D, et al. 2013. Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals a Common Duplication of the Duffy Binding Protein Gene in Malagasy *Plasmodium vivax* Strains. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(11): e2489
- Menard, R, et al. 2013. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Micro.* 11(10): 701-712
- Michon, P, et al. 2000. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun.* 68(3164 - 3171
- Michon, PA, et al. 1998. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *Am J Trop Med Hyg.* 59(
- Miller, LH, et al. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy blood group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 295(6): 302-304
- MINSA-DGE. 2016. Casos de malaria por departamentos Perú 2016. Ministerio de Salud- Dirección general de Epidemiología.
- Moreno, A, et al. 2008. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. *Vaccine.* 26(34): 4338-4344
- Mueller, I, et al. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases.* 9(9): 555-566

- Mueller, I, et al. 2015. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*. 33(52): 7489-7495
- Mullis, K, et al. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51(263-273)
- Nozach, H, et al. 2013. High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*. 12(1): 37
- Ntumngia, FB y Adams, JH. 2012. Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Clin Vaccine Immunol*. 19(1): 30-36
- Nussenzweig, RS, et al. 1967. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*. 216(5111): 160-162
- Oliveira-Ferreira, J, et al. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 9(115).
- OMS. 2014. World Malaria Report.
- OMS. 2016. Action and Investment to defeat Malaria 2016-2030. For a Malaria-Free World
- Pradel, G y Frevert, U. 2001. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology*. 33(5): 1154-1165

- Preiser, P, et al. 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* 2(12): 1461-1477
- Price, RN, et al. 2009. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 22(5): 430-435  
10.1097/QCO.0b013e32832f14c1
- Quiroz, CG. 2017. AVALIAÇÃO, EM MODELOS DE PRIMATAS E MURINOS, DE CANDIDATOS VACINAIS BASEADOS EM ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DE *Plasmodium vivax* PhD. Florianopolis, Santa Catarina. UFSC. 141
- Rieckmann, KH, et al. 1979. Current considerations in vaccination of humans against malaria: Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ.* 57(261-265)
- Rinas, U, et al. 2017. Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in Biochemical Sciences.*
- Rosenberg, R, et al. 1990. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84(2): 209-212.
- Ryan, JR, et al. 2006. Evidence for transmission of *Plasmodium Vivax* among a Duffy Antigen Negative Population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 75(4): 575-581.
- Sachs, J y Malaney, P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 415(6872): 680-685

- Sambrook, J y Russell, DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. 1
- Sambrook, J y Russell, DW. 2006. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. Cold Spring Harbor Protocols. 2006(1): pdb.prot3932
- Sambrook, J y Russell, DW. 2006. Purification of Histidine-tagged Proteins by Immobilized Ni<sup>2+</sup> Absorption Chromatography. Cold Spring Harbor Protocols. 2006(1): pdb.prot4088
- Schlager, B., Straessle, A., & Hafen, E. 2012. Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression. BMC Biotechnology, 12: 95.
- Scopes, RK. 1994. The Protein Purification Laboratory. Protein Purification: Principles and Practice. New York, NY. Springer New York. 1-21
- Scopes, RK. 1994. Separation by Adsorption I: General Principles. Protein Purification: Principles and Practice. New York, NY. Springer New York. 102-145.
- Scopes, RK. 2001. Strategies for Protein Purification. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc.
- Severini, C y Menegon, M. 2015. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against *Plasmodium* that we risk losing. J Glob Antimicrob Resist. 3(2): 58-63
- Sidjanski, S y Vanderberg, JP. 1997. Delayed Migration of *Plasmodium* Sporozoites from the Mosquito Bite Site to the Blood. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57(4): 426-429

- Singh, S, et al. 2003. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. *Biochem J.* 374(193 - 198
- Singh, SK, et al. 2006. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature.* 439(7077): 741-744
- Singh, SM y Panda, AK. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 99(4): 303-310
- Sinka, ME, et al. 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors.* 5(1): 69
- Sørensen, HP y Mortensen, KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology.* 115(2): 113-128
- Souza-Silva, FA, et al. 2010. Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 82(2): 185-193
- Sturm, A, et al. 2006. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science.* 313(5791): 1287
- Tan, SC y Yiap, BC. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2009(574398

- Tjitra, E, et al. 2008. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. PLoS Med. 5(6): e128
- Tsuboi, T, et al. 1994. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding-protein. Infect Immun. 62(5581 - 5586
- Valizadeh, V, et al. 2014. Optimized Method for Purification of Expressed Plasmodium Vivax Duffy Binding Protein-II (PvDBP-II): Implication for Vivax Malaria Vaccine Development. Vaccine Research. 1(2): 1-6
- Vanbuskirk, KM, et al. 2004. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101(44): 15754-15759
- Vanloubbeeck, Y, et al. 2013. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. Vaccine. 31(52): 6216-6224.
- Vicentin, EC, et al. 2014. Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 Expressed in *Pichia pastoris* Yeast. Infect Immun. 82(3): 1296-1307
- Wertheimer, SP y Barnwell, JW. 1989. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. Exp Parasitol. 69(3): 340-350
- Whitford, D. 2005. Proteins: Structure and Function: London, UK. John Wiley & Sons.

- WHO. 2016. The World Malaria Report 2016. Geneva. World Health Organization.
- Wu, Y, et al. 2008. Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. PLoS ONE. 3(7): e2636
- Xainli, J, et al. 2000. The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. Mol Biochem Parasitol. 111(2): 253-260
- Zakeri, S, et al. 2011. Antibody Responses and Avidity of Naturally Acquired Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (PvDBP) Antibodies in Individuals from an Area with Unstable Malaria Transmission. Am J Trop Med Hyg. 84(6): 944-950
- Zeeshan, M, et al. 2013. Presence of Memory T Cells and Naturally Acquired Antibodies in *Plasmodium vivax* Malaria-Exposed Individuals Against a Group of Tryptophan-Rich Antigens With Conserved Sequences. Int J Infect Dis. 207(1): 175-185
- Zeeshan, M, et al. 2015. CD4+ T Cell Response Correlates with Naturally Acquired Antibodies against *Plasmodium vivax* Tryptophan-Rich Antigens. Infect Immun. 83(5): 2018-2029
- Zeeshan, M, et al. 2015. Host-Parasite interaction: Selective pv-Fam-A family proteins of *Plasmodium vivax* bind to a restricted number of human erythrocyte receptors. Int J Infect Dis. 211(7): 1111-1120
- Zimmerman, PA, et al. 2013. Chapter Two - Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to *Plasmodium vivax*. Adv Parasitol. Academic Press. 27-76