

ANTIGENICIDAD DE LA REGION VARIABLE DE LA SUBUNIDAD
RECOMBINANTE *EcPv200L* DE LA MSP-1 DE *Plasmodium vivax*

DIANA MARCELA ECHEVERRY MUÑOZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYAN
2009

ANTIGENICIDAD DE LA REGION VARIABLE DE LA SUBUNIDAD
RECOMBINANTE *EcPv200L* DE LA MSP-1 DE *Plasmodium vivax*

DIANA MARCELA ECHEVERRY MUÑOZ

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Sócrates Herrera Valencia

Director Instituto de Inmunología del Valle

Universidad del Valle

Asesor

M. Sc. Patricia Eugenia Vélez Varela

Profesora Departamento de Biología

Universidad del Cauca

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYAN
2009

Nota de aceptación:

MD SOCRATES HERRERA VALENCIA
Director

MSc. PATRICIA EUGENIA VELEZ
Asesora

MSc. NILZA VELAZCO PALOMINO
Jurados

MSc. NELSON ROJAS MARTINEZ
Jurados

Fecha de sustentación, Popayán 24 Marzo de 2009

Trabajo de grado enmarcado en la línea de énfasis de Biología Molecular y Celular del programa de Biología de la Universidad del Cauca, con el apoyo del:

- Instituto de Inmunología del Valle – Universidad del Valle
- Centro Internacional de Vacunas – Cali Colombia
- Universidad del Cauca

A mis padres y mis hermanos:

*“Vivimos en el mundo cuando amamos, solo una vida vivida para los demás merece la
pena ser vivida”*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la
voluntad”*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mis hermanos por el apoyo y comprensión durante esta etapa de mi vida y por brindarme las herramientas necesarias para mi formación espiritual y profesional.

Al Dr. Sócrates Herrera Valencia y la Dra. Myriam Arévalo por haberme aceptado en su grupo de investigación, por todo su apoyo, orientación y comprensión durante la realización de este trabajo. Igualmente agradezco al Instituto de Inmunología del Valle y al Centro Internacional de Vacunas el haberme brindado la oportunidad de participar en sus proyectos con la realización de éste trabajo.

A Augusto Valderrama, Elizabet Ampudia, Liliana Soto, Juana Vergara, Nora Céspedes quienes me aportaron su conocimiento y su experiencia para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Diego Alejandro Álvarez, Isabel Cristina Rodríguez, Cristian Hernández y Alejandra Tobon quienes estuvieron apoyándome durante este largo trabajo e hicieron que los momentos difíciles fueran llevaderos.

A mis compañeros de estudio Maria Fernanda González, Andrea Coronell, Eliana Henao, Alvarito Lora y Clara Muñoz con quienes compartí durante la universidad y fueron amigos incondicionales.

A Soraya Paredes, Nazly Sánchez y a Tí que fueron mi apoyo y mi familia durante mi estadía en Popayán. Con quienes aprendí y compartí muchos momentos de la vida.

A los profesores Patricia Eugenia Vélez, Nelson Rojas y Nilza Velazco por las revisiones y aportes al anteproyecto y al documento.

CONTENIDO

	pag.
RESUMEN	16
INTRODUCCION	17
1 OBJETIVOS	19
1.1 Objetivo General	19
1.2 Objetivo Específicos	19
2 MARCO TEORICO	20
2.1 GENERALIDADES DE LA MALARIA	20
2.1.1 Epidemiología de la malaria	20
2.1.2 Epidemiología en Colombia	21
2.1.3 Ciclo de vida del parásito de la malaria	22
2.2 GENERALIDADES DE LA INVASIÓN DEL GLÓBULO ROJO	24
2.3 ASPECTOS CLINICOS Y RESPUESTA INMUNE CONTRA LA MALARIA	25
2.4 VACUNAS ANTIMALARICAS	25
2.4.1 Candidatos a vacunas	27
❖ Antígenos eritrocíticos	27
2.5 LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO- 1 (MSP-1)	27
2.6 MSP-1 DE <i>P. vivax</i> (<i>PvMSP-1</i>)	29
2.6.1 Región N-Terminal de la proteína <i>MSP-1</i> de <i>P. vivax</i>	31

3	MATERIALES Y METODOS	33
3.1	DISEÑO DE LOS SUBFRAGMENTOS	33
3.2	AMPLIFICACIÓN DEL SUBFRAGMENTOS EcPv200L-2 POR PCR	33
3.2.1	Diseño de oligonucleótidos para PCR	33
3.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
3.3	CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN	34
3.3.1	Ligación de los subfragmentos en pcDNA3.1/V5-His-TOPO	34
3.3.2	Doble digestión del subfragmentos EcPv200L-2	34
3.3.3	Electroforesis en Gel de agarosa	35
3.3.4	Purificación de Insertos y Vectores	35
3.3.5	Ligación del inserto <i>EcPv200L-2</i> en pET-24a(+)	35
3.3.6	Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes	36
3.3.7	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	36
3.3.8	Miniprep	36
3.4	VERIFICACIÓN Y MARCOS DE LECTURA	37
3.4.1	Análisis enzimas de restricción	37
3.4.2	PCR	37
3.4.3	Secuenciación	37
3.5	EXPRESIÓN DEL SUBFRAGMENTO EcPv200L-2	37
3.5.1	Expresión en bacterias <i>E. coli</i>	37
❖	Determinación de Expresión	37

• Inducción de la Expresión	38
❖ Expresión a mediana escala en bacterias <i>E. coli</i>	38
• Fermentación e inducción de expresión	38
Extracción proteica	38
3.5.2 Expresión en células de mamífero (HEK 293-F)	39
❖ Transfección de células HEK 293-F	39
❖ Lisis de las células HEK 293-F	39
3.5.3 Gel de Acrilamida	40
3.5.4 Inmunoblot	40
3.6 PURIFICACION	41
3.7 DETERMINACIÓN DE ANTIGENICIDAD	41
3.7.1 Sueros	41
3.7.2 ELISA	42
4 RESULTADOS	43
4.1 DISEÑO Y AMPLIFICACIÓN DE LOS SUBFRAGMENTOS DE <i>EcPv200L</i> POR PCR	43
4.2 CLONACIÓN Y ANALISIS DE LOS SUBFRAGMENTOS <i>EcPv200L</i>	43
4.2.1 Clonación de los subfragmentos <i>EcPv200L</i> en el vector de expresión eucariótica pcDNA3.1/V5-His-TOPO	43
4.2.2 Clonación del subfragmento <i>EcPv200L-2</i> en el vector de expresión procariótica pET24a(+)	47
4.3 Expresión del subfragmento <i>EcPv200L-2</i> como proteína recombinante en <i>E. coli</i>	50

4.4	Expresión del subfragmento EcPv200L-2 como proteína recombinante en células HEK 293-F	53
4.5	Reconocimiento de la proteína recombinante EcPv200L-2 por sueros de individuos de área endémica.	54
4.6	Reconocimiento de la proteína recombinante EcPv200L-2 por sueros de ratones inmunizados con la proteína completa EcPv200L	55
5	DISCUSION	57
6	CONCLUSIONES	60
7	PRESPECTIVAS	61
	BIBLIOGRAFIA	62

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Los oligonucleótidos de cada uno de los subfragmentos.	33
Tabla 2. Fragmentos esperados al digerir con PvuII y BamHI los clones recombinantes de cada subfragmento.	44
Tabla 3. Fragmentos esperados al digerir con NdeI y XhoI los clones recombinantes.	45
Tabla 4. Fragmentos esperados al digerir con PvuII los clones recombinantes con el plásmido pET24a(+).	49
Tabla 5. Viabilidad de las células transfectadas con pcDNA3.1/EcPv200L-2.	53

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Distribución Global de la Malaria	20
Figura 2. Riesgo de Adquirir Malaria en Colombia	22
Figura 3. Ciclo de vida del parásito <i>Plasmodium</i> en el mosquito <i>Anopheles</i> sp. y en el hospedero vertebrado.	23
Figura 4. A. Estructura del merozoíto y antígenos identificados. B. Pasos involucrados en el proceso de invasión del glóbulo rojo	24
Figura 5. Vías para el desarrollo de una vacuna para malaria.	26
Figura 6. Fragmentos generados de los clivajes de MSP-1 de <i>P. falciparum</i> .	28
Figura 7. Representación de la MSP-1 de <i>Plasmodium falciparum</i> .	29
Figura 8. Descripción inicial de los bloques de PvMSP-1	30
Figura 9. El gen <i>Pv200L</i> fragmentado y la localización en <i>PvMSP-1</i>	31
Figura 10. Perfil de variabilidad del fragmento EcPv200L del antígeno <i>PvMSP-1</i> y estructura por bloques	32
Figura 11. Amplificación de los subfragmento <i>EcPv200L</i>	43
Figura 12. ADN plasmídico a partir de clones recombinantes en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO.	44
Figura 13. Doble digestión del subfragmento <i>EcPv200L</i> con las enzimas de restricción PvuII y BamHI	45

Figura 14. Doble digestión del subfragmento <i>EcPv200L</i> con las enzimas de restricción NdeI y XhoI	46
Figura 15. Amplificación de los subfragmentos <i>EcPv200L</i> en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO con cada uno de los oligonucleótidos	47
Figura 16. Doble digestión con las enzimas de restricción XhoI y NdeI.	48
Figura 17. Extracción de DNA plasmídico de clones recombinantes <i>EcPv200L-2</i> .	48
Figura 18. Digestión con la enzima de restricción PvuII de clones recombinantes <i>EcPv200L-2</i>	49
Figura 19. Amplificación del subfragmento <i>EcPv200L-2</i> en el plásmido pET24(a)+.	50
Figura 20. Expresión de <i>EcPv200L-2</i> en bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.	50
Figura 21. Reconocimiento de las colas de histidina de la proteína <i>EcPv200L-2</i> expresada en <i>E. coli</i>	51
Figura 22. Purificación de la proteína <i>EcPv200L-2</i> tras pasos por IMAC	52
Figura 23. Reconocimiento de la proteína <i>EcPv200L-2</i> con anti- <i>EcPv200L</i>	52
Figura 24. Expresión de <i>EcPv200L-2</i> en células HEK 293-F.	53
Figura 25. Reconocimiento de la proteína <i>EcPv200L-2</i> con anti- <i>EcPv200L</i> expresado en células HEK293-F	54
Figura 26. Respuesta humoral contra la <i>EcPv200L-2</i> en individuos de área endémica	55
Figura 27. Respuesta humoral contra la <i>EcPv200L-2</i> en ratones BALB/c inmunizados con la proteína <i>EcPv200L</i>	56

ANEXOS

	pag.
Anexo 1. Mapa plásmidos pcDNA3.1 y pET24a(+)	70
Anexo 2. Carta comité de ética humana	71
Anexo 3. Carta comite de ética animal.	72
Anexo 4. Secuencias nucleotídicas de los subfragmentos en el plásmido pcDNA3.1	73
Anexo 4. Secuencia nucleotídica del subfragmentos EcPv200L-2 en el plásmido pET24a (+).	76

INDICE DE ABREVIATURAS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

IPTG: Isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside

LB: Medio Luria Bertani

MSP-1: Proteína de superficie del merozoíto 1

PvMSP-1: Proteína de superficie del merozoíto -1 de *P. vivax*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida –SDS

TA: Temperatura ambiente

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

La proteína de membrana de merozoíto # 1 (MSP-1) de *Plasmodium* es una proteína de superficie que se expresa sobre la membrana del merozoíto durante la esquizogonia tardía y se considera un candidato para el desarrollo de una vacuna por sus propiedades inmunogénicas y su posible papel como ligando para la invasión del parásito al glóbulo rojo. La proteína MSP-1 de *P. vivax* presenta un fragmento homólogo a la secuencia de la proteína Pf190L de *P. falciparum*, el cual ha sido denominado fragmento Pv200L. Este fragmento se considera como subunidad potencial para el desarrollo de una vacuna ya que es altamente antigénico e inmunogénico, e induce una protección parcial contra la infección por estadios sanguíneos de *P. vivax* en primates no humanos.

En estudios preliminares adelantados en el Instituto de Inmunología del Valle (Cali), se determinó que la subunidad Pv200L, expresada como proteína recombinante (*EcPv200L*) en *E. coli*, era reconocida por anticuerpos presentes en el suero del 70% de los individuos infectados por *P. vivax* y más del 50% de los individuos previamente expuestos a este parásito. Este alto reconocimiento por los sueros de los individuos podría corresponder a una respuesta inmunológica temprana después de una infección natural. La inmunización de ratones BALB/c y de primates *Aotus*, con *EcPv200L* formulada en adyuvante de Freund, logró inducir anticuerpos IgG que reconocen la proteína nativa presente en la superficie de los esquizontes de *P. vivax* (Valderrama *et al.*, 2005).

En la actualidad se vienen realizando estudios más exhaustivos en fase preclínica de la subunidad *EcPv200L*, utilizando la subunidad recombinante producida bajo estándares de calidad compatibles con material grado clínico, la cual se está evaluando para determinar su seguridad, inmunogenicidad y eficacia protectora en el modelo de primates *Aotus* cuando se formula en adyuvantes de uso permitido en humanos. Parte de estos estudios están dirigidos a la caracterización de la respuesta inmune y a la identificación de las subregiones de la *EcPv200L* con mayor actividad inmunogénica que pudieran representar potenciales epítopes en células B, T o CTL. Debido al gran tamaño y al polimorfismo de la Pv200L (1062pb); esta se ha dividido arbitrariamente para su estudio, en tres fragmentos menores que contienen regiones conservadas, semiconservadas y variables, que están siendo expresadas como proteínas recombinantes. Para este estudio se propuso la expresión como proteína recombinante de la región variable y ha sido evaluada su antigenicidad preliminarmente usando sueros de ratones BALB/c previamente inmunizados con la proteína recombinante completa (*EcPv200L*) y usando sueros de humanos expuesto a la infección natural en áreas endémicas.

INTRODUCCION

La malaria origina una alta mortalidad en países en desarrollo (WOH, 2002). Es probable que en el año 2020, el número de individuos afectados por malaria sea el doble de los casos que se presentan hoy en día sino se realizan programas de control eficaces (Rasti *et al.*, 2004). Durante los últimos 20 años, el índice de mortalidad por malaria ha aumentado debido a los precarios sistemas de salud, a la resistencia a los medicamentos antimaláricos y a los insecticidas, al cambio climático, a la migración y al desplazamiento de la población y a la falta de otras alternativas como vacunas eficaces contra la malaria (Phillips, 2001).

El *Plasmodium vivax* es uno de los parásitos de la malaria responsables del 40-50% de los casos en Latinoamérica y suroeste de Asia (Dutta, *et al.*, 2001). Aunque la infección con este parásito es generalmente menos fatal que las infecciones con *P. falciparum*, se ha reportado que esta especie presenta resistencia a la cloroquina en varias zonas endémicas (Rieckmann *et al.*, 1989; Baird, 2004), lo que podría afectar la dinámica de la transmisión y causaría un impacto negativo para el control de la malaria. Como complemento en la lucha contra la malaria actualmente se plantea el desarrollo de vacunas que buscan reducir la morbilidad y mortalidad producida por la malaria, sin embargo, su desarrollo ha sido complicado por la compleja biología del parásito, por la ecología del vector y por el polimorfismo de los diferentes antígenos (Good *et al.*, 1998; Richie *et al.*, 2002).

En los diferentes estadios de desarrollo del parásito se han identificado antígenos que se han seleccionados como candidatos a vacuna. Entre los más destacados se encuentran en el estadio pre-eritrocítico: la proteína de circumsporozoito (CS), la proteína superficial del esporozoito SSP2, denominada proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP), el antígeno del estadio hepático 1 (LSA-1) y el antígeno del estadio hepático 3 (LSA-3); y en el estadio eritrocítico asexual: la proteína de Superficie del Merozoito 1 (MSP-1), el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1), el antígeno de unión al eritrocito (EBA-175), la proteína de superficie del merozoito 2 y 3 (MSP-2, MSP-3), proteínas de las roptrías (RAP1, RAP2 y RAP3) y la proteína de enlace al Duffy (DBP) (ver marco teórico).

La proteína MSP-1, que se expresa en la superficie del merozoito (estadio asexual sanguíneo), y se considera un buen candidato líder para el desarrollo de una vacuna por sus propiedades inmunogénicas. En la MSP-1 de *P. vivax* se ha logrado identificar un fragmento Pv200L como una subunidad altamente antigénica e inmunogénica que induce

protección parcial en primates sometidos a reto infeccioso de estadios sanguíneos (trofozoitos) de *P. vivax*. La Pv200L está localizada hacia la región N-Terminal de la MSP-1 de *P. vivax* (354 aa, 254 pb-1308 pb), y contienen secuencias de aminoácidos de alta homología con los de la subunidad Pf190L de *P. falciparum* que contienen secuencias que ha demostrado que interactúan con la espectrina de los eritrocitos (Herrera *et al.*, 1993).

Estudios preliminares han demostrado que la subunidad Pv200L, expresada como proteína recombinante (*EcPv200L*) en *E. coli*, es reconocida por mas del 70% de los individuos infectados por *P. vivax* y mas del 50% de los individuos previamente expuestos. La inmunización de ratones BALB/c y primates *Aotus* con *EcPv200L*, formulada en adyuvante de Freund, logra inducir anticuerpos IgG que reconocen la proteína nativa sobre la superficie de esquizontes de *P. vivax* (Valderrama *et al.*, 2005) por lo que ha llevado a establecer una línea de investigación en el Centro Internacional de Vacunas de Cali, que incluye nuevas pruebas en fase preclínica en primates no humanos, utilizando la subunidad Pv200L.

El presente estudio se basó en la caracterización de la respuesta inmune específica para identificar subregiones de la Pv200L, con mayor actividad inmunogénica (inmunodominancia) que pudieran representar potenciales epítopes B para el desarrollo de una vacuna. Inicialmente se diseñó la producción de tres subfragmentos de menor tamaño que la Pv200L, para ser producidas como proteínas recombinantes en un sistema procariótico y la evaluación preliminar de su antigenicidad: El fragmento 1 ubicado en la posición 1 pb – 378 pb, el fragmento 2 ubicado en la posición 379 pb- 684 pb y el fragmento 3 ubicado entre la posición 684 pb- 1059 pb de la Pv200L. Sin embargo, debido a la envergadura de dicho proyecto, a las limitaciones de tiempo, costo y a la complejidad de las técnicas se decidió clonar los tres subfragmentos, pero sólo expresar el fragmento 2, el cual se trabajó tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos. Enfocados en estos dos modelos, este trabajo expresó la región variable de la Pv200L como proteína recombinante y fue evaluada su antigenicidad usando sueros de ratones BALB/c previamente inmunizados con la proteína recombinante completa (*EcPv200L*) y con sueros de humanos de áreas endémica.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Estudiar la capacidad antigénica de la región variable de la proteína *EcPv200L*.

1.2 Objetivo Específicos

- Determinar la expresión de la región variable de la proteína *EcPv200L* (*EcPv200L-2*) en un sistema procariótico y eucariótico.
- Determinar la antigenicidad de la región variable de la proteína *EcPv200L* luego de inmunización experimental de ratones con la proteína completa *EcPv200L*.
- Determinar la antigenicidad de la región variable de la proteína *EcPv200L* luego de infección natural con *Plasmodium vivax* en individuos de áreas endémicas.

2 MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DE LA MALARIA

2.1.1 Epidemiología de la malaria. La malaria es una enfermedad febril causada por un parásito intracelular obligado, perteneciente al género *Plasmodium*, dentro del cual cuatro especies: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, y *P. ovale* afectan al humano. El *P. falciparum* es la especie más abundante y virulenta, y es responsable de más del 95% de las muertes de malaria en todo el mundo (Jones *et al.*, 1994), mientras que *P. vivax*, la segunda especie con mayor importancia mundial causa cada año alrededor de 80 millones de casos, aproximadamente 15% en África y 85% en el resto del mundo (WHO, 2002).

Como se indica en la Figura 1, la malaria es endémica en más de 100 países en los que ocurren entre 300 y 500 millones de casos clínicos y 0.5 a 3 millones de muertes cada año (Ferreira *et al.*, 2004). La enfermedad afecta principalmente las regiones tropicales en vía de desarrollo de África, Asia y América latina, generando un gran impacto sobre el capital humano y el desarrollo económico de estas áreas (Heggenhougen *et al.*, 2007). En donde las medidas de control son interrumpidas por estructuras sanitarias inadecuadas, las malas condiciones económicas, la resistencia a los medicamentos antimaláricos y a los insecticidas (DTT), el cambio del comportamiento del vector, a los cambios climáticos y al aumento de la migración de la población (Phillips, 2001).

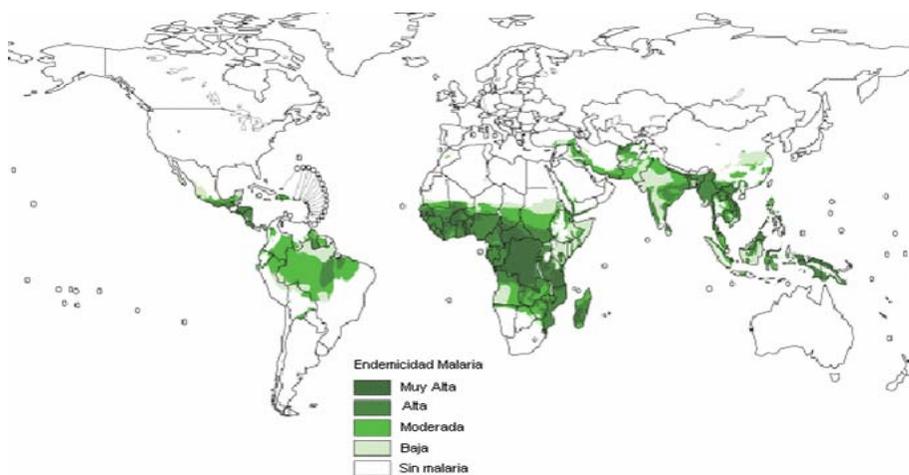


Figura 1. Distribución Global de la Malaria. Tomado de WHO: http://mosquito.who.int/cmc_upload/0/000/016/101/Malaria2005_map.pdf

2.1.2 Epidemiología en Colombia. Colombia aporta el mayor número de casos en América Latina, después de Brasil (586.000 vs 105.000 en el año 2000, respectivamente), de acuerdo a reportes oficiales de la OMS del año 2001, ocupa el 6° lugar en incidencia (Número de casos x cada 100.000 habitantes) en el continente después de Belice, Ecuador, Bolivia, Guatemala y Brasil, en orden descendente (PAHO, 2001; RBM, 2001).

La malaria en Colombia representa un grave problema de salud en el 85% del territorio rural, situado por debajo de los 1600 m.s.n.m con condiciones climáticas (Temperatura 17-24°C, humedad relativa mayor de 50%, pluviosidad hasta de 2000 mm/año), geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad (INS-MSN. 2002). El potencial de transmisión epidémica se ha incrementado a expensas de un aumento en la vulnerabilidad producida por migraciones y desplazamiento de susceptibles, por la receptividad del medio debido a cambios climáticos y a las alteraciones medioambientales derivadas de los cultivos de uso ilícitos entre otros. Igualmente, la falta de regularidad y sostenibilidad de las actividades de vigilancia y control de vectores en los departamentos en alto riesgo y la persistencia de modelos verticales, puntuales y costosos en crisis explican parte de la problemática (PAHO, 2001; INS-MSN. 2002).

En la actualidad cerca de 30 millones de habitantes se encuentran en zonas con algún riesgo de adquirir la enfermedad (ver figura 2), siendo las áreas más afectadas: Amazonía, Orinoquía y el Pacífico (INS-MSN. 2002, 2007). El comportamiento de la morbilidad por malaria en Colombia en las últimas tres décadas ha mantenido una tendencia ascendente, registrándose en los años noventa promedios anuales de 150.000 a 160.000 casos de malaria. Desde 1974, los casos de malaria producidos por *P. vivax* son los que predominan en el país (75%), aun cuando en regiones como la Costa Pacífica la relación favorece al *P. falciparum*. También se ha tenido ocurrencia de casos por *P. malariae* la cual se ha logrado investigar en diversos trabajos de investigación presentando una de 9.1% de casos de *P. malariae*. La mortalidad por malaria ha tenido una tendencia marcadamente descendente en el país, registrándose en la última década un promedio anual de 130 a 150 muertes anuales. Sin embargo, es un evento sub-registrado en el territorio principalmente en la costa pacífica (INS-MSN. 2007).

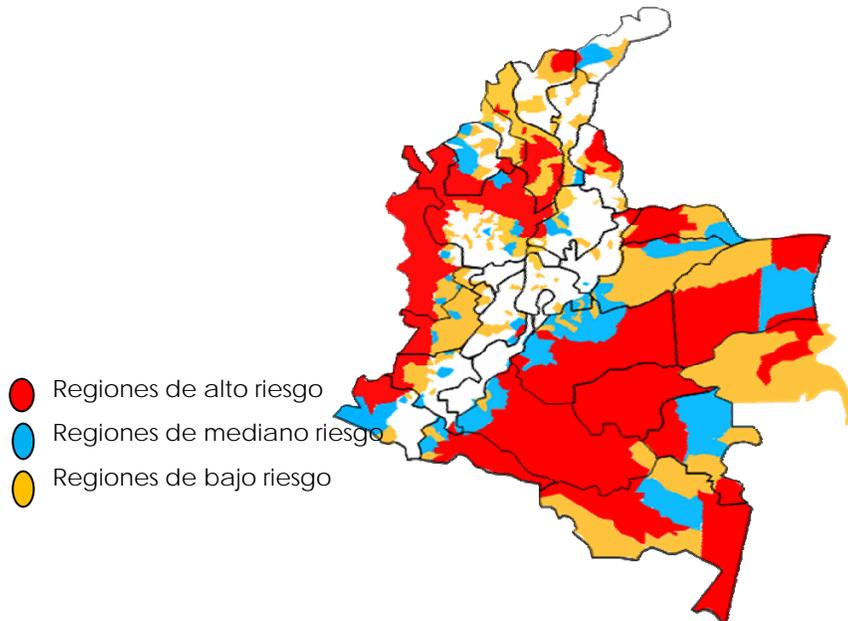


Figura 2. Riesgo de Adquirir Malaria en Colombia. Tomado de: Boletín Epidemiológico Semanal, SIVIGILA, INS-MSN, 2004.

2.1.3 Ciclo de vida del parásito de la malaria. El parásito de la malaria presenta dos fases en el ciclo de vida; la primera fase se lleva a cabo dentro del mosquito *Anopheles* donde se reproduce sexualmente; y la segunda fase ocurre en el hospedero vertebrado donde el parásito se reproduce asexualmente (Phillips, 2001) (Figura 3).

En el ciclo de vida en el hospedero vertebrado, el esporozoito al ser inyectado en el torrente sanguíneo por la picadura del *Anopheles* hembra; es llevado al hígado en donde penetran a los hepatocitos (fase exoeritrocítica). En este lugar se replican asexualmente y aproximadamente entre 6-12 días, se presenta una liberación de merozoítos e invaden los eritrocitos (fase eritrocítica). Los merozoítos extraeritrocíticos interactúan con la membrana del glóbulo rojo (RBC) reorientando su región apical (Aikawa *et al.*, 1978; Dvorak *et al.*, 1975), con el fin de expandir sus organelas apicales (roptrías y los micronemas) y formar una unión con los glóbulos rojos (RBC). Posteriormente el parásito es internalizado en forma de vacuola por la invaginación de RBC (Mahanty *et al.*, 2003). El parásito adopta una forma en anillo vacuolado, unicelular llamado trofozoito. Este se alimenta con la hemoglobina del eritrocito, la cual se metaboliza para originar un compuesto de proteína, la globina y un ácido ferrihémico, la hematina. El trofozoito crece

hasta que el núcleo del eritrocito empieza a dividirse y se convierte en un esquizonte maduro. Después realiza una esquizogonia eritrocítica formando el merozoíto, rompiendo la célula infectada y liberándose en el torrente sanguíneo del hospedero para invadir nuevas células. Estos merozoítos pueden dividirse en las formas sexuales del parásito llamadas gametocitos, la cual son tomadas por el mosquito al picar un hospedero infectado para iniciar el ciclo sexual del *Plasmodium* (Phillips, 2001).

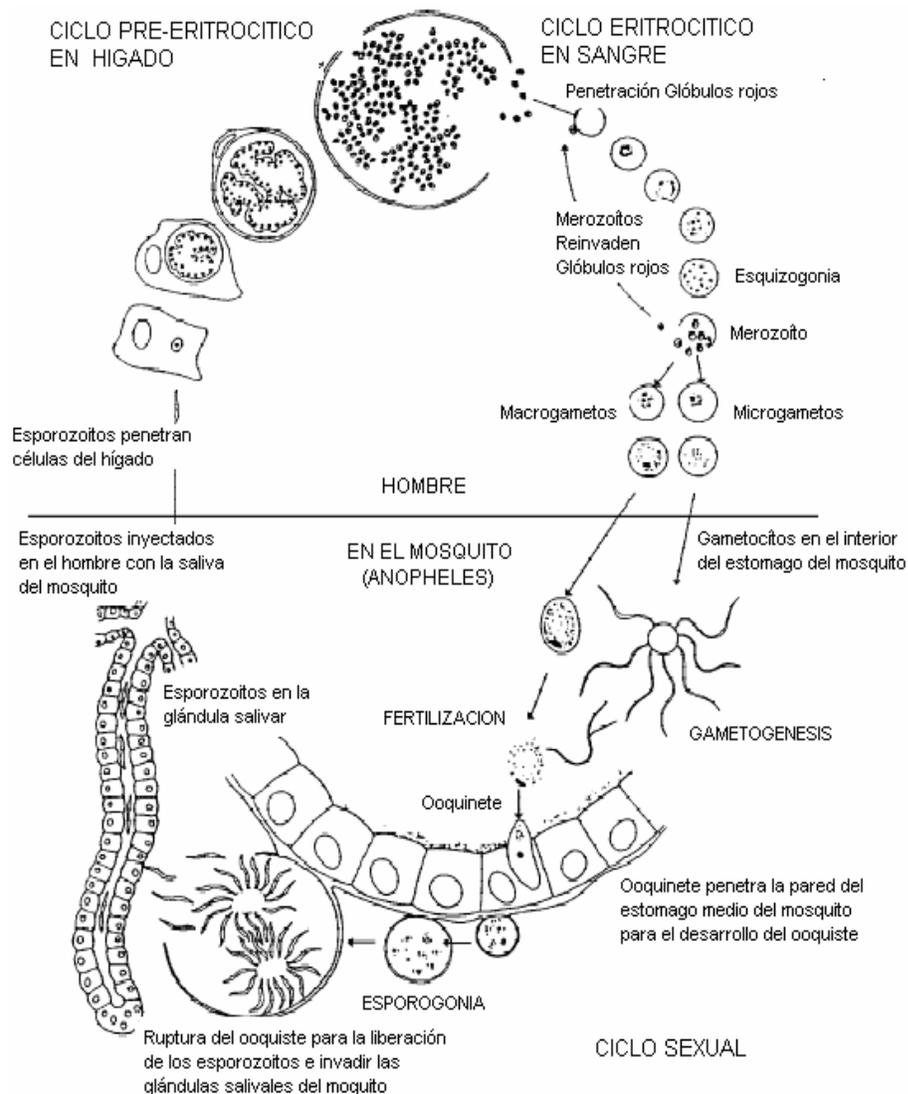


Figura 3. Ciclo de vida del parásito *Plasmodium* en el mosquito *Anopheles* sp. y en el hospedero vertebrado. Modificado de: Simonetti, 1996.

2.2 GENERALIDADES DE LA INVASIÓN DEL GLÓBULO ROJO

La invasión ocurre cuando el merozoíto entra en contacto al azar con la superficie del glóbulo rojo, mientras su región apical es yuxtapuesta a la membrana del glóbulo para empezar la interacción. Una vez orientado el merozoíto, este libera los contenidos de sus roptrías y micronemas originando una estrecha unión entre la membrana del glóbulo rojo y su superficie. En este momento la membrana del eritrocito se invagina formando una vacuola parasitófora y el extremo apical del merozoíto se mantiene en contacto con la base naciente de la vacuola mientras que la estrecha unión se desplaza hacia la parte posterior del merozoíto al tiempo en que este se introduce al glóbulo rojo hasta fusionarse en la parte terminal del merozoíto (Blackman, 2000; Cowman *et al.*, 2000) (Figura 4).

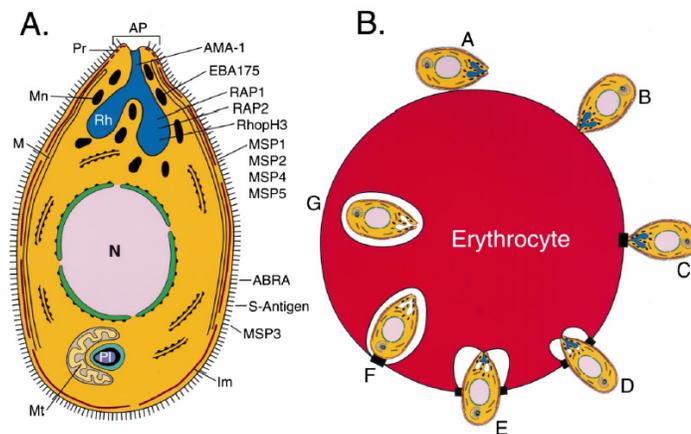


Figura 4. A. Estructura del merozoíto y antígenos identificados. B. Pasos involucrados en el proceso de invasión del glóbulo rojo. Tomado de: Cowman *et al.* 2000

Durante la interacción inicial del merozoíto con la superficie de la membrana del glóbulo rojo se han identificado proteínas de superficie del parásito que están involucradas en esta interacción; entre estas la Proteína de Superficie del Merozoíto-1 (MSP-1), que interacciona con la espectrina de la membrana del eritrocito; Antígeno de Membrana Apical-1 (AMA-1), proteína que se encuentra hacia la superficie apical de merozoíto, su función no es bien conocida; RAP 1,2,3 involucradas en el proceso de invasión. Tanto la inducción de respuesta protectora (MSP-1, AMA-1) como el bloqueo de la invasión del merozoíto *in vitro* (RAP 1,2) hacen que estos antígenos sean considerados como importantes candidatos para el desarrollo de vacunas. (Cowman *et al.*, 2000; Cowman *et al.* 2002)

2.3 ASPECTOS CLINICOS Y RESPUESTA INMUNE CONTRA LA MALARIA

Los síntomas de la enfermedad aparecen entre el 10-16 día después de la liberación del merozoíto al torrente sanguíneo presentando paroxismos con episodios de escalofríos, fiebre y sudoración intensa. Se puede presentar malaria complicada y severa la cual depende de la biología de la especie que infecta; en el caso de infecciones con *P. falciparum* se presenta anemia severa, insuficiencia renal aguda como consecuencia de elevadas concentraciones de nitrógeno ureico y creatinina; daño a los capilares pulmonares produciendo el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), edema pulmonar, y disfunción cerebral. Estas patologías causadas por el desarrollo de estructuras complejas conocidas como "Knobs" que le proveen al parásito la capacidad de adherirse al endotelio de la microcirculación de órganos vitales como cerebro, hígado, pulmón y riñón (Ahvazi, 1994; Lou *et al.*, 2001; Beeson & Brown, 2002). Para infecciones con *P. vivax* las complicaciones más frecuentes son la ruptura esplénica, la glomerulonefritis y anemia crónica (Oh *et al.*, 2001). Además esta especie es agente causal de la malaria recidivante por la formación de hipnozoitos que son formas hepáticas latentes (Krotosky, 1989).

La severidad de la enfermedad está estrechamente asociada a la capacidad inmunológica del individuo, afectando especialmente individuos de menor edad, mujeres en embarazo e individuos no inmunes. En áreas de baja endemicidad se puede observar manifestaciones severas en adultos que desarrollan una inmunidad natural lentamente (Mendis *et al.*, 2001). En cambio individuos que viven en área endémica alta desarrollan altos niveles de inmunidad. Esta inmunidad protectora es el resultado de una sucesión de infecciones en un tiempo corto, en donde la intensidad de transmisión es relativamente alta como en África para el *P. falciparum* o en Papua Nueva Guinea (PNG) para *P. vivax*. En PNG se produce una alta inmunidad hacia esta especie a una edad entre los 10 y los 15 años (Cattani *et al.*, 1986).

2.4 VACUNAS ANTIMALARICAS

Una estrategia para el control de la malaria, basada en la efectividad de la respuesta inmune y la adquisición de inmunidad clínica, consiste en el desarrollo de vacunas que reduzcan la morbi-mortalidad y la incidencia de la enfermedad (Jones *et al.*, 1994). El diseño de una vacuna antimalárica es muy complejo debido al ciclo de vida del parásito, al polimorfismo

de los diferentes antígenos y a la ecología del vector (Good *et al.*, 1998; Richie *et al.*, 2002). A pesar de estos obstáculos existen evidencias que soportan la viabilidad de una vacuna como es: el desarrollo de un tipo de inmunidad en individuos que habitan áreas endémicas (Bull *et al.*, 1998); la inmunidad protectora inducida por antígenos definidos probados en diferentes modelos animales (Kumar *et al.*, 2002); y la reducción de la densidad del parásito en ensayos realizados con una vacuna recombinante en la etapa asexual (Genton *et al.*, 2002; Saul *et al.*, 1999).

Las investigaciones para el desarrollo de una vacuna se centran en tres vías diferentes: vacunas contra el estadio pre-eritrocítico, que protegen contra los esporozoítos o impiden la invasión de estos a los hepatocitos; Las vacunas eritrocíticas o contra los estadios sanguíneos, inhiben la multiplicación del parásito en los glóbulos rojos, impidiendo o atenuando el desarrollo del parásito durante la infección sanguínea, y por último, las vacunas del estadio sexual del parásito, que tratan de prevenir el desarrollo de formas sexuales una vez ingeridas por el mosquito rompiendo así el ciclo biológico del parásito (Jones *et al.*, 1994) (Figura 5).

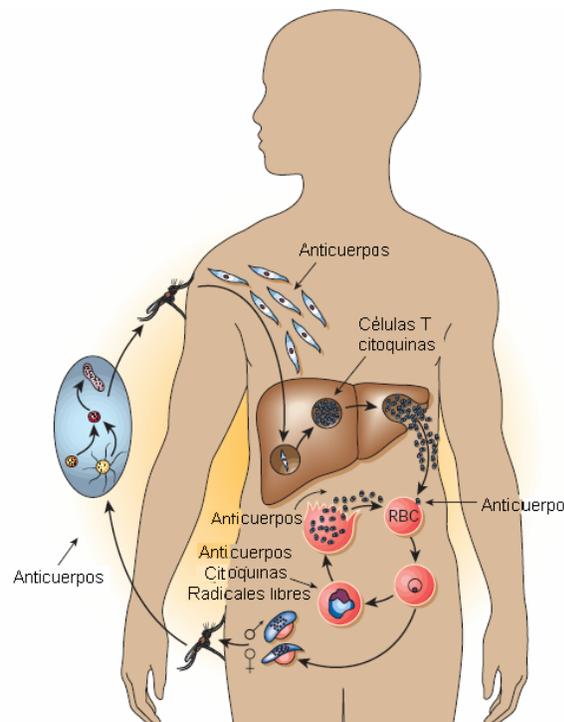


Figura 5. Vías para el desarrollo de una vacuna para malaria. Modificado de: Richie & Saul, 2002.

2.4.1 Candidatos a Vacunas. Existe una variedad de antígenos identificados en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular. Estos candidatos se dividen en: candidatos pre-eritrocíticos, candidatos eritrocíticos y candidatos bloqueadores de la transmisión (Jones *et al.*, 1994).

❖ **Antígenos eritrocíticos.** Durante el estadio del merozoíto se han identificado proteínas de superficie que han sido estudiadas tanto en *P. vivax* y en *P. falciparum* como son: la proteína de superficie del merozoíto -1 (MSP-1), que ayuda en la interacción del merozoíto con la superficie del eritrocito (Angov *et al.*, 2003; Takala *et al.*, 2002); y el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1), proteína importante en el crecimiento del parásito y en la invasión de los eritrocitos (Mahanty *et al.*, 2003). En *P. vivax* existe un antígeno que no está presente en las otras especies de *Plasmodium*, la proteína de enlace al Duffy (DBP), proteína que se une al receptor Duffy del grupo sanguíneo para la invasión de los reticulocitos (Michon *et al.*, 2000).

Existen otros candidatos estudiados en *P. falciparum* como la proteína de superficie del merozoíto 2 (MSP-2), que presenta una región central repetitiva y dos regiones N y C-Terminal conservada; la proteína de superficie del merozoíto 3 (MSP-3), proteína integral de la membrana que presenta una región N-Terminal variable y una región C-Terminal conservada (Huber *et al.*, 1997); y el antígeno de unión al eritrocito (EBA-175-), proteína que interviene en la unión del merozoíto con los receptores específicos de los eritrocitos y se caracteriza por presentar epítopes reconocidos por las células B (Sim *et al.*, 1990). Otras proteínas de bajo peso molecular han sido identificadas dentro de las roptrías y han sido implicadas en el proceso de invasión, entre ellas están: RAP1, RAP2 y RAP3. La capacidad de algunas de estas proteínas de inducir una respuesta inmune ha llevado a considerarlas como potenciales candidatos a vacunas (Cowman *et al.*, 2000). Existen otros candidatos a vacunas que se expresan en la superficie de los eritrocitos infectados como son: RESA (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen), proteína que se caracteriza por presentar secuencias repetidas en tandem y la proteína SERA.

2.5 LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DEL MEROZOÍTO- 1 (MSP-1)

La proteína MSP-1 es un antígeno potencial candidato a vacuna por su inmunidad protectora, y es sintetizada como un precursor de alto peso molecular (180-230 KDa) con algunas variaciones de tamaño y secuencia de aminoácidos. Esta proteína fue descubierta

por Holder y Freeman en 1982 y está presente en la superficie del parásito *Plasmodium* que se expresa durante la esquizogonia sanguínea empezando a ser detectable en el esquizonte tardío, y se deposita en la membrana del merozoíto como un complejo proteico derivado de un proceso proteolítico asociado con otras moléculas como MSP-6, MSP-7 y MSRP1-5 (Mello, *et. al.*, 2002); la cual juega un papel muy importante en la invasión del eritrocito (Holder, 1994; Takala *et al.*, 2002).

En el estado eritrocítico del parásito, la MSP1 es mediada por un único gen la cual es secretada como un precursor de 195 KDa y anclada en la membrana del esquizonte en desarrollo por la vía glicosil-fosfatidil-inositol a través de su dominio de anclaje GPI. Antes del rompimiento del esquizonte la proteína es clivada por proteasas en cuatro fragmentos de 83, 28–30, 38–45 y 42 kDa respectivamente (Figura 6). Este complejo de proteínas permanece estable por acción de fuerzas débiles y anclado a la superficie del merozoíto gracias al fragmento de 42 kDa (Blakman, 1990). Cuando se inicia la invasión a un nuevo eritrocito, el fragmento de 42 kDa es nuevamente clivado para producir dos segmentos, uno de 33-kDa (MSP-133) y otro de 19-kDa, segmento C-Terminal (MSP-119), involucrado en la invasión del eritrocito pues permanece anclado a la membrana del merozoíto, una vez que todo el complejo molecular se desestabiliza y es desechado al exterior de la célula (Blakman, 1990, Angov *et al.*, 2003).

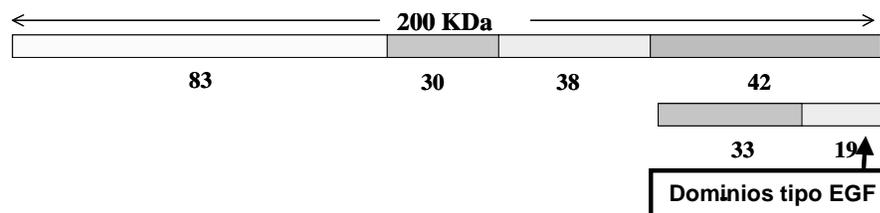


Figura 6. Fragmentos generados de los clivajes de MSP-1 de *P. falciparum*. Tomado de: Valderrama *et al.*, 2005.

El análisis de secuencias alélicas de MSP-1 de varios aislados de *P. falciparum* en poblaciones naturales reveló que las variaciones de los genes es básicamente dimórfica conteniendo cinco bloques conservados inter-espaciados, cinco bloques semiconservados y siete bloques variables (Figura 7). La diversidad alélica de *PfMSP-1* es generada por una recombinación intragénica entre diferentes alelos parentales durante la fase sexual que ocurre en el mosquito *Anopheles* (Tanabe *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 1998).

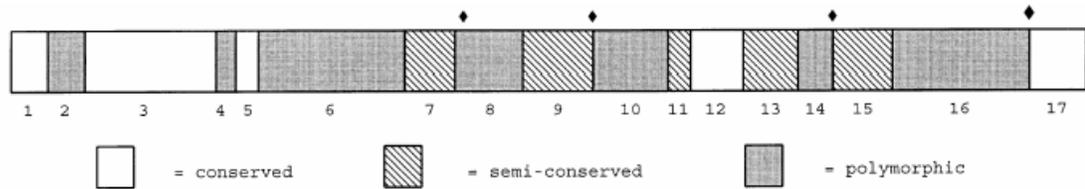


Figura 7. Representación de la MSP-1 de *Plasmodium falciparum*. Tomado de: Jennings *et al.*, 1998.

El fragmento MSP-1 19, que se encuentra ubicado en el extremo C-Terminal (bloque 17) presenta dos dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) asociados fuertemente a funciones de unión ligando-receptor (Blackman *et al.*, 1991; Calvo *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1999). Cada uno de los dominios contiene tres puentes disulfuro que ayuda al ensamblaje definido de algunos epítopes discontinuos y 6 residuos de cisteínas altamente conservadas (Farley & Long, 1995; Angov *et al.*, 2003).

La proteína MSP-1 está comprometida en la unión del parásito y la espectrina del glóbulo rojo. En investigaciones *in vitro* con *P. falciparum* se demostró que al bloquear los sitios de unión de *PfMSP-1* a la espectrina del eritrocito se indujo un bloqueo en el desarrollo del esquizonte, mostrando un papel funcional por parte del fragmento 190L (Herrera *et al.*, 1993). No sólo la *MSP-1* juega un papel importante en la unión al eritrocito sino que también interacciona con otras proteínas como la *MSRP* 1-5 (Merozoite Surface Related Protein 1-5), proveniente del parásito durante el desarrollo del esquizonte (Mello *et al.*, 2002). Estos hallazgos muestran que la proteína *MSP-1* es esencial para el parásito y es un candidato blanco para el desarrollo de vacunas.

2.6 MSP-1 DE *Plasmodium vivax* (*PvMSP-1*)

La *PvMSP-1* es una proteína que proviene de un gen único llamado *Pv200* y fue descrito por Del Portillo y colaboradores (1991), del cual existen dos grupos alélicos diferentes y divergentes entre sí denominados Belem y Salvador I (Figtree *et al.*, 2000). Este gen codifica 1726 aminoácidos y al igual que *PfMSP-1* de *P. falciparum* presenta una organización tipo mosaico con regiones variables y regiones conservadas, sustituciones que aumentan el grado de dimorfismo en bloques conservados y variables, y recombinaciones alélicas como mecanismo para la generación de nuevos alelos (Puntaporntip *et al.*, 2002).

El papel funcional y biológico de PvMSP-1, no está claro aun, pero se ha encontrado que esta proteína contiene regiones de unión de alta afinidad con regiones de la superficie de los eritrocitos, denominadas HBRs (High Binding Activity Regions) de las cuales se han identificado dos, la región HBRI localizada entre los aminoácidos 280-719 y la región HBRII entre los aminoácidos 1060-1599 con un grado de identidad de más del 25% entre estas regiones (Rodríguez *et al.*, 2002).

Alineamientos realizados con PvMSP-1 y MSP-1 de otras especies de *Plasmodium* demostraron que se mantenían bloques conservados, secuencias de anclaje, una región N-Terminal de péptido señal, dominios EGF en la región C-Terminal ricos en cisteínas y otras regiones que aun se desconoce su función (Del Portillo *et al.*, 1991; Puntaporntip *et al.*, 2002). También la secuencia aminoacídica de la MSP-1 de *P. vivax* fue alineada con la MSP-1 de *P. falciparum* y *P. yoelii* encontrando niveles de identidad de 35.6% y 34.3%, respectivamente. El análisis de las secuencias reveló la existencia de 7 bloques con más del 50% de identidad entre las tres especies denominados ICB y tres conservados entre *P. vivax* y *P. falciparum*, denominados CB (Figura 8) (Del Portillo *et al.*, 1991).

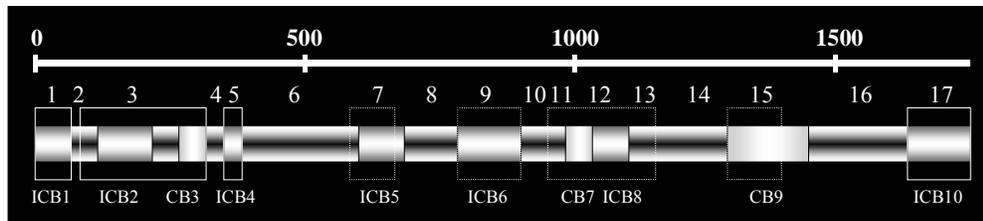


Figura 8. Descripción inicial de los bloques de PvMSP-1. ICB: Bloques conservados inter-especies (ICB), CB: Bloques conservados entre *P. vivax* y *P. falciparum*. Modificado de: Del Portillo *et al.* 1991.

Más recientemente, Putaporntip y colaboradores (2002), realizando un análisis del polimorfismo de la PvMSP-1 usando 40 secuencias nucleotídicas (31 alelos diferentes) originarias de diversas regiones geográficas del planeta, demostró que el gen tiene una organización tipo mosaico con una gran heterogeneidad en la frecuencia de recombinación alélica. Estos autores encontraron un total de 13 bloques, 7 conservados con niveles considerables de sustituciones nucleotídicas sinónimas y 6 bloques variables compuestos por un número limitado de repeticiones muy cortas ubicadas en tandem. Al igual que en *P.*

falciparum (*PfMSP-1*) el bloque dos, es el más variable con tres sub-bloques internos: a, b y c (Puntaporntip *et al.*, 2002).

2.6.1 Región N-Terminal de la proteína *MSP-1* de *P. vivax*. Dentro de la proteína *MSP-1* de *P. vivax* se ha logrado identificar un fragmento llamado *Pv200L* como una subunidad altamente antigénica e inmunogénica que induce protección parcial contra los estadios sanguíneos de *P. vivax* (Egan *et al.*, 2000). La *Pv200L* está localizada hacia la región N-Terminal de la *MSP-1* de *P. vivax* y está compuesta por un fragmento de alta homología con la subunidad *Pf190L* de *P. falciparum* y una región de alta capacidad de unión a los reticulocitos (Figura 9) (Valderrama *et al.*, 2005).

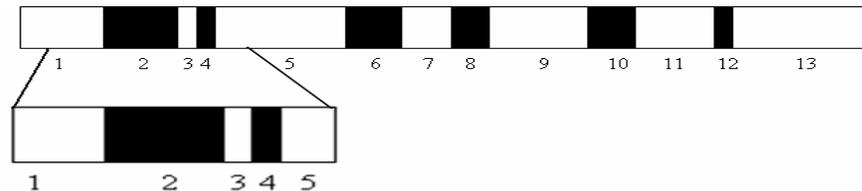


Figura 9. El gen *Pv200L* fragmentado y la localización en *PvMSP-1*. Tomado de: Valderrama, 2004.

La expresión del fragmento *Pv200L* como una proteína recombinante en *E. coli*, demostró su capacidad inmunogénica y antigénica, ya que se determinó que en sueros de individuos de áreas endémicas se presentaban altos niveles de IgG inducidos naturalmente contra la *EcPv200L*. Observando que tanto pacientes con infección activa de *P. vivax* como pacientes previamente expuestos a la infección con *P. vivax* presentaban anticuerpos contra la proteína recombinante. Esta respuesta de anticuerpos en pacientes infectados podría corresponder a una respuesta inmunológica temprana después de una infección natural. En estudios posteriores en ratones BALB/c y en monos *Aotus* se determinó que la *EcPv200L* es inmunogénica e induce títulos altos de anticuerpos IgG ($> 10^6$) inusuales en estos modelos experimentales (Valderrama *et al.*, 2005).

Estudios desarrollados por Putaporntip y colaboradores (2002) han demostrado que el perfil de variabilidad del antígeno *PvMSP-1* es de tipo mosaico, conformada por bloques de alta variabilidad seguidos por bloques conservados. En la Figura 10 se muestra los bloques que

conforman el fragmento *Pv200L* y la variabilidad de estos en aislados secuenciados de Colombia, Brasil y Tailandia (Zuñiga, 2006).

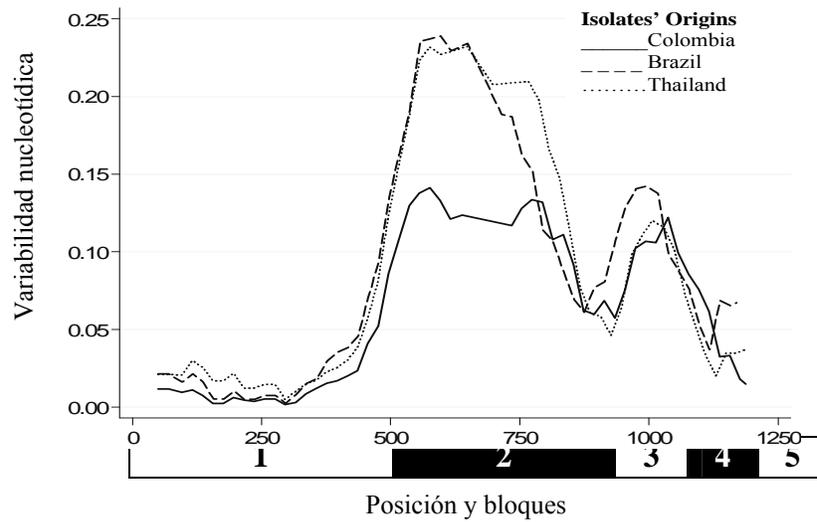


Figura 10. Perfil de variabilidad del fragmento EcPv200L del antígeno *PvMSP-1* y estructura por bloques. Tomado de: Zuñiga, 2006.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 DISEÑO DE LOS SUBFRAGMENTOS

Basados en las características de polimorfismo descritas anteriormente (Figura 10), se consideró que la secuencia de la *EcPv200L* podía dividirse en tres subfragmentos aleatoriamente así: *EcPv200L-1*, conformada por el bloque conservado 1 (1 pb -378 pb); *EcPv200L-2*, conformada por el bloque variable 2 (379 pb- 684 pb); y *EcPv200L-3*, que contiene los bloques 3, 4 y 5 (684 pb- 1059 pb).

3.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS SUBFRAGMENTOS *EcPv200L* POR PCR

3.2.1 Diseño de oligonucleótidos para PCR. Se diseñaron oligonucleótidos para PCR basados en el gen sintético *200l* por análisis bioinformático. Los oligonucleótidos diseñados que se muestran en la Tabla 1 se alinearon por medio del programa BLASTn del servidor NCBI para determinar su especificidad y fueron analizados con la herramienta PrimerSelect del paquete de ADNstar para determinar la temperatura de anillaje y la formación de posibles estructuras secundarias.

Tabla 1. Los oligonucleótidos de cada uno de los subfragmentos.

Subfragmento	Oligonucleótidos
EcPv200L-1	FB1: 5'-gcatatgATCACCATCTTCCCGTCTG-3'
	RB1: 5'-gctcgagTTTGTTcTTGGTGATGAAA-3'
EcPv200L-2	FB2: 5'-gcatatgGAAACCATCTCTAACATCA-3'
	RB2: 5'-gctcgagTTCCAGCTGGTTGGTGATG-3'
EcPv200L-3	FB3: 5'-gcatatgGAAGCTCAGAAACTGATCG-3'
	RB3: 5'-gctcgagGTGCGGGTAGGTTTCTTTC-3'

3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica de PCR siguió las recomendaciones generales descritas por la casa comercial productora de la enzima ADN polimerasa® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los subfragmentos se amplificaron en 25 µl de reacción en una mezcla de 100 µM de dNTPs (Invitrogen™), 100 ng de cada oligonucleótido, 0.75 U de ADN polimerasa, 2.5 µl de tampón 10X y 0.95 µl de 5 mM

MgCl₂. Las reacciones de PCR se realizaron con un equipo PTC-100™ (MJ-Reserach, Inc - Programmable Thermal Controller) programado así: 1 precalentamiento a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificación: denaturación: 30 segundos a 94°C, anillamiento: 1 minuto a 55°C y amplificación: 1 minuto a 72°C y un ciclo de finalización con 5 minutos a 72°C. Los tubos de PCR se mantuvieron a 4°C hasta que se realizaron los análisis por electroforesis en gel de agarosa.

3.3 CLONACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN

3.3.1 Ligación de los subfragmentos en pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Una vez amplificado los subfragmentos por PCR fueron ligados al vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) de mamíferos. Este vector presenta un sitio de clonación múltiple para productos de PCR, un origen de replicación pUC que permite la clonación en células de *E. coli* y un promotor de citomegalovirus para expresar proteínas en células de mamíferos, presentando en su región terminal un epítotope C-Terminal V5 y una serie de colas de histidinas para su identificación (Anexo1).

Las reacciones de ligación en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO fueron realizadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, 2004). La mezcla se usó para transformar bacterias *E. coli* TOP10 competentes (Invitrogen). A partir de este punto una vez clonados los tres subfragmentos el proyecto se enfocó en el fragmento EcPv200L-2 por inconvenientes presentados en las técnicas aplicadas.

3.3.2 Doble digestión del subfragmento EcPv200L-2. Los productos ligados en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO fueron sometidos a digestión con 1U de cada una de las enzimas de restricción NdeI y XhoI (Promega, Madison, WI), en un volumen final de reacción de 60 µl. A la mezcla de reacción se adicionaron 6 µl tampón 10X (Promega) y 0.2 µg BSA-acetilada, dejando reaccionar 3 horas a 37°C. El producto de digestión se sometió a análisis por electroforesis en gel de agarosa. Es importante recalcar, que el subfragmento no poseían un sitio NdeI ni XhoI, estos sitios fueron incluidos en los oligonucleótidos sentido y antisentido. Para la realización de este trabajo se hicieron aproximadamente 70 numeros de digestión para la optimización de la clonación.

3.3.3 Electroforesis en Gel de agarosa. Un total de 5-10µl del producto de las reacciones de amplificación por PCR o de la doble digestión se usaron para la evaluación en gel de agarosa al 1.2% (p/v), utilizando el tampón TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 1mM) y Bromuro de Etidio (0.5µg/ml). Las muestras se sometieron a electroforesis con voltaje constante (80V) con una fuente de poder Power-Pac 300 (Bio-Rad, Hercules, CA), durante 1 hora y mezcladas con tampón de carga tipo IV (Azul de Bromofenol 0.25%, Xylene Cianole FF 0.25% y Glicerol al 30%). El marcador de peso molecular usado fue 1Kb DNA ladder (Invitrogen).

3.3.4 Purificación de Insertos y Vectores. Siempre que fue necesario, el inserto y los vectores fueron sometidos a purificación usando el kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) para la clonación. En resumen, el inserto o vector se sometió a electroforesis en agarosa al 1.2%(p/v). Fueron extraídas del gel la banda de tamaño de 306pb correspondiente al subfragmento *EcPv200L-2*, y la banda de 5310pb correspondiente al vector pET-24a(+). Cada fragmento de gel con la banda se calentó durante 15 minutos a 55°C en el tampón GS1, la mezcla se depositó en una columna “Quick gel extraction™” y se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm (revoluciones por minuto). Posteriormente se lavó con 500 µl de tampón GS1, luego con 700 µl de tampón W9, dejándolo en la columna por 5 minutos y se centrifugó a las mismas condiciones. El ADN se eluyó con 50 µl de agua estéril y se cuantificó usando el espectrofotómetro Smart-Spec plus (Biorad, Hercules, CA). El material recolectado se congeló a -20°C hasta ser utilizado nuevamente.

3.3.5 Ligación del inserto *EcPv200L-2* en pET-24a(+). Realizada la doble digestión de acuerdo a lo explicado en el numeral 3.3.2, y la purificación del subfragmento a partir del plásmido pcDNA3.1 explicado en el numeral 3.3.4, el subfragmento fue ligado en el vector de expresión en procariontes pET24a(+). Este vector presenta un sitio de clonación múltiple formado por enzimas de restricción, un origen de replicación Ori, la expresión en procarionte está regido por un promotor T7, seguido por un operón *lac*, y confiere una serie de colas de histidina para la identificación de la proteína (Anexo 1).

Para la ligación del inserto, el vector de expresión pET-24a(+) fue previamente abierto usando las enzimas de restricción XhoI y NdeI (Promega) y purificado a partir de un gel de agarosa al 1.2% (p/v). El inserto fue ligado al vector usando 1 unidad de ADN ligasa T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA), cocientes molares 3:1 inserto:vector. Para

transformar bacterias *E. coli* competentes BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen®) se hicieron ligaciones de 1 hora a temperatura ambiente y de 18 horas a 4°C y a 16°C.

3.3.6 Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes. Se incubaron bacterias *E. coli* TOP10 o BL21 (DE3) pLysS en medio sólido Luria Bertani (LB) durante 16 horas. Se tomó una unidad formadora de colonias (UFC) y se cultivo en el medio líquido LB a 37°C a 250 rpm. Se tomaron 2.5 ml del cultivo anterior y se sembró en 50 ml de medio líquido LB hasta alcanzar un OD₆₃₀ de 0.6, luego las bacterias se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml y centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El paquete de bacterias se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 100 mM y se dejaron durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a las mismas condiciones y se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ a 100 mM con 20% de glicerol estéril. Las células se congelaron (-70°C) hasta su uso. La eficiencia de las células fue de 1×10^7 UFC- µg de DNA plasmídico.

3.3.7 Transformación de bacterias *E. coli* competentes. Las bacterias *E. coli* competentes preparadas en el laboratorio (TOP10) o comerciales BL21(DE3)pLysS (Invitrogen®) se transformaron por choque térmico. Se depositaron 1-5 µl de la mezcla de ligación en 50 µl de bacterias competentes descongeladas. Luego de 30 minutos en hielo, las bacterias se sometieron a choque térmico durante 30 S – 1 min a 42°C, trasladándolas inmediatamente a hielo durante 5 minutos. Las bacterias transformadas se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación constante (300 rpm) en el medio LB sin antibióticos y posteriormente se sembraron en medio agar LB con antibióticos para la selección de las bacterias con el inserto. Para las bacterias competentes *E.coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con los insertos en pET-24a(+) se seleccionaron en cajas de agar LB enriquecido con Kanamicina (100 µl/ml) y para las bacterias competentes TOP 10 con los insertos en pcDNA3.1/V5-His-TOPO la selección se realizó en cajas de agar LB suplementado con Ampicilina (100 µl/ml). Los clones positivos se procesaron por miniprep para la extracción del DNA plasmídico y verificar la clonación y el marco de lectura.

3.3.8 Miniprep. Para la extracción de ADN plasmídico de los clones recombinantes, se sembró 1 UFC en medio líquido LB enriquecido con antibiótico y se incubó durante 16 horas a 37°C a 300 rpm. Luego este cultivo se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 10000 rpm por 30 S a 4°C. El paquete de bacterias se resuspendió en 100 µl de la solución I (50 mM glucosa, 25 mM tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH: 8.0) y en 200 µl de la solución II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Luego se adicionaron 150 µl de la

solución III (AcK 5 M, Ácido acético glacial 3 M) se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se mezcló con 2 volúmenes de etanol y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. El producto obtenido se lavó con etanol al 70%. El DNA se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se guardó a -20°C.

3.4 VERIFICACIÓN Y MARCOS DE LECTURA

3.4.1 Análisis enzimas de restricción. En todos los casos para verificar la presencia del inserto en los vectores y para verificar la presencia del inserto correcto se realizó una doble digestión con las enzimas PvuII y BamHI; y con las enzimas NdeI y XhoI. Se utilizó 1U de cada enzima de restricción en un volumen final de 20 µl de reacción. A la mezcla de reacción se adicionaron 6 µl tampón 10X (Promega) y 0.2 µg BSA-acetilada, dejando reaccionar durante 3 hora a 4°C. El producto de la digestión se sometió a un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

3.4.2 PCR. Para verificar la presencia de alguna contaminación en los clones recombinantes, cada clon fue sometido a una amplificación con cada uno de los oligonucleótidos diseñados para cada subfragmento. El producto de PCR se sometió a un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

3.4.3 Secuenciación. Para verificar el marco de lectura y la ligación del inserto en el plásmido pcDNA3.1 en la dirección correcta, se realizó secuenciación en ambas direcciones en un secuenciador ABI Prism 3100 – Avant (Applied Biosystem, Foster City, CA) usando el kit BigDye terminador v3.1. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores T7 sentido y BGH antisentido.

3.5 EXPRESIÓN DEL SUBFRAGMENTO EcPv200L-2

3.5.1 Expresión en bacterias *E. coli*

❖ **Determinación de Expresión.** Para la determinación de la expresión de la proteína EcPv200L-2 se inocularon 3ml de LB suplementado con 30 µg/ml de Kanamicina con 1 UFC de cada uno de los clones recombinantes en pET-24a(+) en BL21 (DE3). Se incubó

durante 15 horas durante la noche (O/N) a 37°C en una incubadora con agitación a 250 rpm. Posteriormente se inocularon 25 ml de LB con Kanamicina (30 ug/ml) con 250 µl del cultivo O/N y se incubó a 37°C – 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD) entre 0,600-1,000 a 600 nm. Esta densidad se alcanzó aproximadamente a las 3 horas. Una vez alcanzada la OD, se removieron 2 ml de cada cultivo y se centrifugaron a máxima velocidad (10.000 rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el paquete de bacterias en 150 µl de buffer Laemmli 2x (0.06 M tris-HCl, 5% SDS, 0.7 M 2-mercaptoetanol, con 1 M DTT a 50 mM por cada unidad (1,000) de absorbancia; esta solución se calentó a 65°C durante 10 min). Luego se incubó durante 5 min a 95°C, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se guardó a -20°C. Este último cultivo se usó como control de la expresión sin inducción y se usó para inducir la expresión del subfragmento de EcPv200L-2 con IPTG (isopropil β-D-1-thiogalactopyranoside).

- **Inducción de la Expresión.** Para la inducción de la expresión del subfragmentos EcPv200L-2 se adicionaron 20 µl de 1 M IPTG, para obtener una concentración final de 1 mM IPTG, esta mezcla se incubó en una incubadora con agitación a 37°C y 250 rpm durante 3 horas. Después de este tiempo se realizaron las lecturas de absorbancia y se procedió a procesar las muestras como se indicó anteriormente. Las alícuotas procesadas se almacenaron a -20°C hasta su evaluación por Inmunoblot.

❖ **Expresión a mediana escala en bacterias *E. coli***

- **Fermentación e inducción de expresión.** Para la inducción de la expresión de la proteína EcPv200L-2 se siguieron las recomendaciones descritas en el manual The QIAexpressionist™ de Qiagen (Valencia, CA) y el procedimiento operativo estándar (POE) ML-01-POE-002 “Inducción de expresión y extracción de proteína recombinante EcPv200L”, del Instituto de Inmunología del Valle. Inicialmente se inoculó 1 UFC en 50 ml de medio líquido LB suplementado con Kanamicina (30 µg/ml) y se incubaron (37°C – 250 rpm) durante 16-18 horas (“toda la noche”). Se Adicionó el precultivo a 2 L de medio LB líquido sin antibiótico y se incubó a 37°C – 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de OD₆₃₀ de 0.6. Luego se adicionaron 2 mM IPTG y se incubaron bajo las mismas condiciones durante 2 horas más.

Extracción proteica. El producto de la fermentación se recuperó por centrifugación a 5000 rpm a 4°C durante 20 minutos. La pasta celular obtenida se sometió a digestión de las

paredes celulares de acuerdo a las recomendaciones descritas en el manual The QIAexpressionist™ de Qiagen y en el POE ML-01-POE-002. En resumen, se adicionaron 5 ml de buffer A (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, imidazol 10 mM, GuHCl 8 M, pH:8) y 5 ml de buffer B (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Imidazol 10 mM, Urea 8 M, pH:8) por cada 2 mg de pasta celular a disolver. Esta mezcla se agitó durante 2 a 4 horas hasta que las bacterias se disolvieron completamente. Este material fue considerado como la fuente primaria de proteína recombinante.

3.5.2 Expresión en células de mamífero (HEK 293-F)

❖ **Transfección de células HEK 293-F.** Para expresar el subfragmento EcPv200L-2 como una proteína recombinante en un sistema eucariótico, se transfectaron las células embrionarias de riñón humano (HEK 293-F). Estas células se caracterizan por estar inmortalizadas con un adenovirus tipo 5. Mediante un complejo liposomal se introduce el DNA plasmídico a la célula en donde la interacción con la membrana celular permite su absorción por endocitosis y después su liberación en el citoplasma.

Para la transfección de las células se utilizaron placas de seis pozos que contenían OPTI-MEM I Reduced Serum médium (GIBCO/Invitrogen) con 3 a 4 ug de ADN, al cual se le adicionó lipofectamina 2000 (GIBCO/Invitrogen) y se incubó durante 45 min. Una vez formado el complejo liposomal se adicionaron aproximadamente 2×10^6 células en 200 μ l de OPTI-MEM I (GIBCO/Invitrogen), y se incubaron a 37°C. Posteriormente a las 48 horas post-transfección las células se centrifugaron a 100 rpm durante 4 min y se resuspendieron en 1 ml de medio Dulbecco's Eagle's modificado, conteniendo 10% de suero fetal bovino y Gentamicina (300 μ g/ml), para seleccionar únicamente las células transfectadas y resistentes a el antibiótico. A las 24 horas de permanecer en el medio selectivo se centrifugaron las células para luego lisarlas en el amortiguador de lisis y el sobrenadante del cultivo se guardó a -20°C para el análisis proteico.

❖ **Lisis de las células HEK-293F.** Las células transfectadas guardadas en el paso anterior fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en amortiguador de lisis (50 mM tris, pH7.8/ 150 mM de NaCl/ 1% triton 100x/ inhibidor de proteasas) durante 10 min a 37°C. Luego fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C, tanto el sobrenadante

como el precipitado resultado de la lisis fueron guardados a -20°C para su respectivo análisis.

3.5.3 Gel de Acrilamida. Las muestras producto de la lisis celular tanto para las obtenidas en el sistema procariótico como las del sistema eucariótico, fueron analizadas con electroforesis de gel de acrilamida (SDS-Page) con el fin de determinar la homogeneidad de las poblaciones proteicas y el peso molecular aproximado de la proteína EcPV200L-2. Las condiciones estándar para ello fueron geles de 15% en condiciones desnaturalizadas, la corrida en el gel se realizó a 80V durante 20 min y a 100V durante 2,5 hrs, de cada muestra se tomaron 5 μl y se incubaron a 95°C durante 10 min; y posteriormente se realizó una tinción con Azul de Coomassie y una tinción con plata a los geles cuando fue necesario. Este procedimiento se realizó varias veces hasta obtener una corrida adecuada de las muestras. Como control de la corrida electroforetica se utilizó la proteína EcPv200L (5 μg).

3.5.4 Inmunoblot. Para determinar la expresión proteica del subfragmentos *EcPv200L-2* se realizó un análisis de Inmunoblot utilizando anticuerpos dirigidos contra las colas de histidinas, proporcionadas por el plásmido pET24a(+) y anticuerpos específicos para la EcPv200L obtenidos a partir de monos *Aotus* inmunizados con la proteína EcPv200L. Las muestras se corrieron en un gel SDS-Page y la electrotransferencia se realizó en una membrana de PVDF con un voltaje de 30V durante 18 horas. El sistema de transferencia se ensambló de la siguiente manera: una espuma, un papel de filtro, un gel de SDS-page, una membrana de PVDF, un papel filtro y una espuma, en buffer de electrotransferencia. Como control de la prueba se utilizó la proteína EcPv200L (5 μg).

Para realizar la prueba de Inmunoblot se utilizaron 50 ml de la solución de bloqueo (TBS 1x/Tween 20/BSA) durante 2 hrs y la membrana se lavó con 50 ml de la solución de lavado (Tween 20/TBS 1x) durante 5 min. Luego se incubó durante 1,30 hr con anticuerpos anti-His de ratón o con sueros de monos *Aotus* inmunizados con la proteína EcPv200L diluido en solución de anticuerpo (TBS1x/Tween 20/BSA) en una proporción de 1:3000 y 1:2000 respectivamente. Nuevamente la membrana se lavó durante 3-8 min en la solución de lavado, se incubó con anti-ratón IgG (1:20.000) o anti-human (1:10.000) respectivamente, diluido en solución de anticuerpo y la membrana se lavó nuevamente durante 3-8 min. Por último se reveló lo obtenido con una pastilla de substrato (BCIP/NBT Sigma Phast) diluida en 10 ml de agua tipo I, hasta obtener la intensidad deseada.

3.6 PURIFICACIÓN

La separación y purificación de la proteína EcPv200L-2, de las proteínas de la bacteria *E.coli*, se realizó por cromatografía de afinidad con ion inmovilizado (Níquel) (IMAC). La muestra de la pasta celular obtenida en la extracción proteica, fue diluida en una proporción de 1:5 en el buffer A (2 M GuHCl/2 M Urea/25 mM Imidazol/PBS 1X/pH 7,4) filtrado a través de filtros Sartorius 0.8 – 0.45 µm. El volumen final obtenido (± 150 ml) fue pasado a través de una columna de 1,6x10 (5ml) rellena con agarosa Ni-NTA (Qiagen®), lo que corresponde a una carga de 5 volúmenes de columna (CV), previa equilibración con 5 CV del buffer A. Posteriormente las proteínas no unidas o unidas débilmente se lavaron con 5 CV del buffer A. La elusión se realizó con 5 CV del buffer B (2 M GuHCl, 2 M Urea, 300 mM Imidazol, PBS 1X/pH 7,4). La proteína eluida fue fraccionada en volúmenes de 5 ml y analizada posteriormente en un gel de poliacrilamida (SDS-Page).

3.7 DETERMINACIÓN DE ANTIGENICIDAD

La proteína recombinante EcPv200L-2 purificada fue usada para determinar el nivel de reconocimiento por anticuerpos presentes en los sueros de ratones BALB/c previamente inmunizados con la proteína completa EcPv200L con dosis de 50ug y el nivel de reconocimiento por anticuerpos presentes en los sueros de individuos de áreas endémicas infectados por *P. vivax* en el momento de tomar la muestra.

3.7.1 Sueros. Se utilizaron sueros de individuos de área endémica evaluados previamente por ELISAs. Los sueros obtenidos de 73 pacientes de área endémica que se usaron para este proyecto provienen del proyecto “Identificación de la actividad bloqueadora de la transmisión (TBA) en una área endémica para malaria por *P. vivax* en Colombia (Estudio A1)”, ejecutado por el Instituto de Inmunología del Valle; revisado y aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, el día 15 de abril de 2005; Acta No. 060 del 2005. El uso de estos sueros para el presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, el día 13 de noviembre del 2007; Acta No. 021-07 (Anexo 2).

Los 7 sueros de ratones BALB/C previamente inmunizados con la proteína completa EcPv200L que se usaron provienen del proyecto “Antigenicidad e inmunogenicidad del extremo N-terminal de la proteína de superficie del merozoíto (MSP-1) de *Plasmodium vivax*”. Aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle, el día 20 de mayo de 2003, acta No. 22. El uso de estos sueros para el presente proyecto fue avalado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle el día 19 de febrero del 2008; Acta No. 01 de 2008 (Anexo 3).

3.7.2 ELISA. Para determinar el reconocimiento de los anticuerpos de ratones y los anticuerpos de individuos de áreas endémicas contra la proteína EcPv200L-2 se realizaron ELISAs de acuerdo al POE Procedimiento para la realización de ELISAs SE-01-POE-001 del Instituto de Inmunología del Valle (IDIV), y se preparó el antígeno de acuerdo al IOE Instructivo para preparación del antígeno para ELISA SE-01-IOE-001, del IDIV. Placas de 96 pozos fueron incubadas durante toda la noche con el antígeno EcPv200L-2 resuspendido en PBS1x. Una vez terminada la incubación se procedió a bloquear las placas con solución de bloqueo (PBS1x, Tween 20 0.05%, leche 5%) durante 2h, luego fueron lavadas con PBS1x/ Tween 20 0.05% y flanqueadas con los sueros problemas diluidos 1:200 en solución de anticuerpos (PBS1x, Tween 20 0.05%, leche 2.5%). Nuevamente fueron lavadas e incubadas con el conjugado anti-human marcado con fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en solución de anticuerpos. Las muestras fueron reveladas con el sustrato para-nitrofenil fosfato (p-NPP) (Sigma, St. Louis, MO) durante 45min y analizadas en un Espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (MRX dynex).

En el ensayo con los sueros de individuos de área endémica se uso como control sueros de individuos que nunca habían tenido malaria y no habían estado expuestos a parásitos del género *Plasmodium* spp. El punto de corte para determinar positivos y negativos se definió como el promedio de las densidades ópticas de los controles negativos internos en cada ensayo más 3 veces la desviación estándar (SD) correspondiente. Respondedor positivo se definió como aquellos en los que la barra de error de Y (± 1 SD) no cruzara el punto de corte de 1.

4 RESULTADOS

4.1 DISEÑO Y AMPLIFICACIÓN DE LOS SUBFRAGMENTOS *EcPv200L* MEDIANTE PCR

Una vez decididos los subfragmentos *EcPv200L* se utilizaron los oligonucleótidos descritos previamente para la amplificación de los mismos. Los productos de PCR obtenidos para cada subfragmento fueron los esperados. Fragmentos de 392pb para el subfragmento *EcPv200L-1*, de 320pb para el subfragmento *EcPv200L-2* y de 389pb para el subfragmento *EcPv200L-3*, como se observa en la Figura 11. Los pesos moleculares fueron analizados con un fotodocumentador GBox con el software GenSnap.

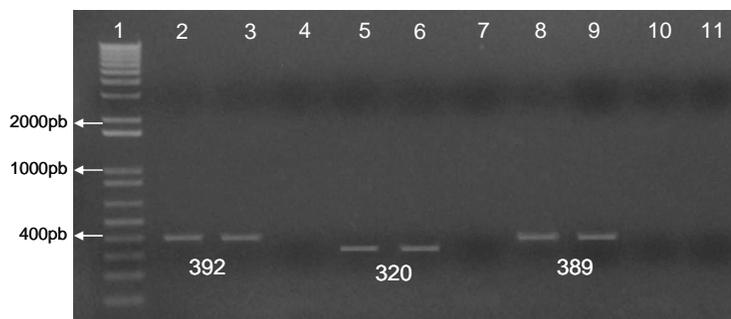


Figura 11. Amplificación de los subfragmento *EcPv200L*. Líneas 1) MWM; 2 y 3) *EcPv200L-1* (392pb); 5 y 6) *EcPv200L-2* (320pb); 8 y 9) *EcPv200L-3* (389pb); 4,7, 10 y 11) Controles de reacción.

4.2 CLONACIÓN Y ANALISIS DE LOS SUBFRAGMENTOS *EcPv200L*

4.2.1 Clonación de los subfragmentos *EcPv200L* en el vector de expresión eucariótica pcDNA3.1/V5-His-TOPO. La ligación de los fragmentos con el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO fue positiva. Se obtuvo un promedio de 20 unidades formadoras de colonia (UFC) de clones recombinantes para cada subfragmento y para el control positivo (PUC). En cada caso se seleccionó una UFC para análisis por miniprep como se observa en la Figura 12. Para el subfragmento *EcPv200L-1* se observó un tamaño de 5915 pb, para el subfragmento *EcPv200L-2* de 5843 pb y para el subfragmento *EcPv200L-3* de 5898 pb.

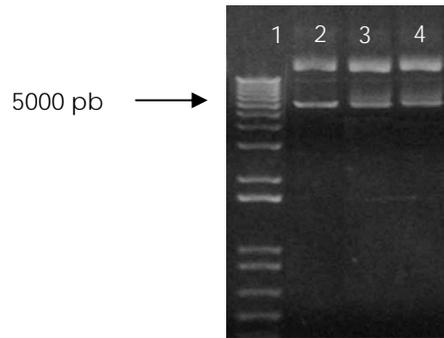


Figura 12. ADN plasmídico a partir de clonos recombinantes en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Líneas: 1) MWM, 2) EcPv200L-1; 3) EcPv200L-2; 4) EcPv200L-3.

El análisis RFLP de los plásmidos recombinantes de cada uno de los subfragmentos realizada con las enzimas de restricción PvuII y BamHI demostró la presencia de los fragmentos esperados y su inserción en la dirección correcta.

Tabla 2. Fragmentos esperados al digerir con PvuII y BamHI los clonos recombinantes de cada subfragmento.

Muestras	Fragmentos esperados (inserto en dirección correcta)			Fragmentos esperados (inserto en la dirección incorrecta)		
	Enzimas			Enzimas		
	PvuII + BamHI	PvuII	BamHI	PvuII + BamHI	PvuII	BamHI
pcDNA3.1 + Subfragmento EcPv200L-1	207pb 627pb 1071pb 1097pb 2912pb	627pb 1071pb 1097pb 3119pb	5615pb	Igual	Igual	Igual
pcDNA3.1 + Subfragmento EcPv200L-2 *	339pb 424pb 1071pb 1097pb 2911pb	424pb 1071pb 1097pb 3251pb	5843pb	45 pb 717 pb 1071pb 1097pb 2911pb	717 pb 1071pb 1097pb 2956pb	5843 pb
pcDNA3.1 + Subfragmento EcPv200L-3	832pb 1071pb 1097pb 2911pb	1071pb 1097pb 3354pb	5912pb	Igual	Igual	Igual
* La enzima PvuII corta al inserto en el extremo Terminal (por tanto se puede observar si el inserto entró en dirección correcta)						

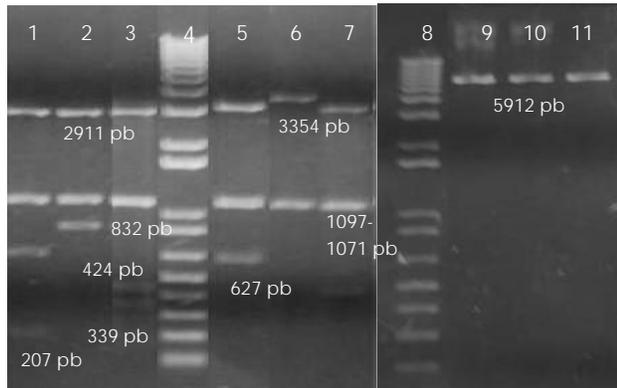


Figura 13. Doble digestión del subfragmento *EcPv200L* con las enzimas de restricción *PvuII* y *BamHI*. Líneas: Doble digestión *PvuII* y *BamHI* 1) *EcPv200L-1*; 2) *EcPv200L-3* y 3) *EcPv200L-2*. Digestión con *PvuII*: 5) *EcPv200L-1*; 5) *EcPv200L-3* y 7) *EcPv200L-2*. Digestión con *BamHI*: 9) *EcPv200L-1*; 10) *EcPv200L-3* y 11) *EcPv200L-2*. 4 y 8) MWM.

Con el fin de confirmar que la inserción de los subfragmentos 1 y 3 se había realizado en la dirección correcta los plásmidos recombinantes fueron sometidos a una segunda digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. En la Tabla 3 se observa los posibles fragmentos esperados al ser digeridos.

Tabla 3. Fragmentos esperados al digerir con *NdeI* y *XhoI* los clones recombinantes

Muestras	Fragmentos esperados (si el inserto está en correcta dirección)			Fragmentos esperados (si el inserto no está en correcta dirección)		
	Enzimas			Enzimas		
	NdeI+ Soy	NdeI	XhoI	NdeI+ XhoI	NdeI	XhoI
pcDNA3.1 + Bloque 1	39pb 391pb 470pb 5014pb	468pb 5445pb	39pb 5913pb	39pb 391pb 470pb 5014pb.	860pb 5053pb	431pb 5482pb
pcDNA3.1 + Bloque 3	39pb 389pb 468pb 5014pb	468pb 5403pb	39pb 5871pb	39pb 389pb 468pb 5014pb	553pb 857pb	428pb 5482pb

De acuerdo a la Figura 14 la doble digestión con NdeI y XhoI produjo las bandas esperadas para cada uno de los subfragmentos, confirmando la correcta dirección de los subfragmentos en el plásmido.

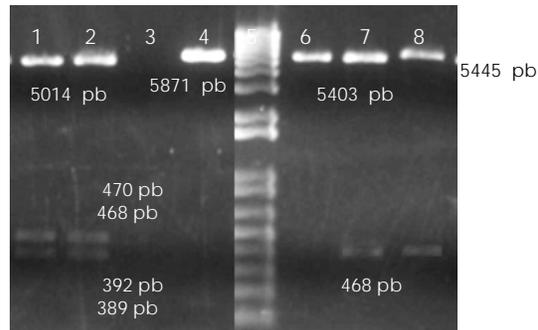


Figura 14. Doble digestión del subfragmento *EcPv200L* con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. Líneas: Doble digestión NdeI y XhoI 1) *EcPv200L-3* y 2) *EcPv200L-1*. Digestión con XhoI: 4) *EcPv200L-3* y 6) *EcPv200L-1*. Digestión con NdeI: 7) *EcPv200L-3* y 8) *EcPv200L-1*. 5) MWM. 3) control de reacción.

Una vez confirmada la clonación de los tres subfragmentos en el plásmido pcDNA3.1 en dirección correcta, se realizó PCR para identificar posibles contaminaciones. Cada clon recombinante fue evaluado con pares de oligonucleótidos correspondientes a los tres subfragmentos, encontrándose que ninguno de los clones recombinantes estaba contaminado; cada uno amplificó específicamente con el par de oligonucleótidos correspondiente (Figura 15). Posteriormente se procedió a su secuenciación, la cual confirmó la presencia del fragmento correspondiente en el marco de lectura adecuado (Anexo 4).

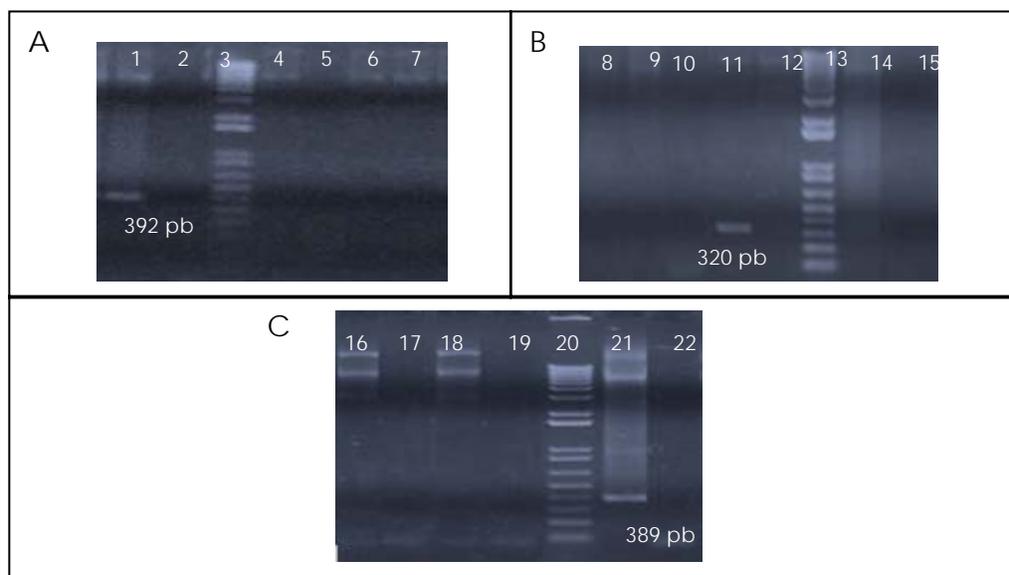


Figura 15. Amplificación de los subfragmentos *EcPv200L* en el plásmido pcDNA3.1/V5-His-TOPO con cada uno de los oligonucleótidos. **A.** Amplificación del subfragmento *EcPv200L-1*. Líneas 1) oligonucleótidos subfragmento 1; 4) oligonucleótidos subfragmento 2, 6) oligonucleótidos subfragmento 3. **B.** Amplificación del subfragmento *EcPv200L-2*. Líneas: 9) oligonucleótidos subfragmento 1; 11) oligonucleótidos subfragmento 2; 14) oligonucleótidos subfragmento 3. **C.** Amplificación del subfragmento *EcPv200L-3*. Líneas: 16) oligonucleótidos subfragmento 1; 18) oligonucleótidos subfragmento 2; 21) oligonucleótidos subfragmento 3. 2, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 19 y 22) Controles de reacción; 3, 13 y 20) MWM.

4.2.2 Clonación del subfragmento *EcPv200L-2* en vector de expresión pET24a(+).

Tanto el plásmido pET24a(+) como el plásmido pcDNA3.1 recombinante conteniendo el subfragmento *EcPv200L-2*, fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* con el fin de liberar el fragmento y generar extremos cohesivos (Figura 16). Los fragmentos fueron purificados, ligados con el plásmido pET24a(+) y transformados como se explica en la metodología. La transformación con el producto de ligación a 16°C (plásmido pET24a(+)) con *EcPv200L-2*) fue negativa, para la ligación a 4°C fue positiva. Se obtuvieron un promedio de 15 UFC de clones recombinantes y 50 UFC para el control positivo (PUC). Se seleccionaron UFC para análisis por miniprep de cada uno de los subfragmentos como se observa en la Figura 17 y posteriormente los ADN plasmídicos se analizaron por RFLP y PCR.

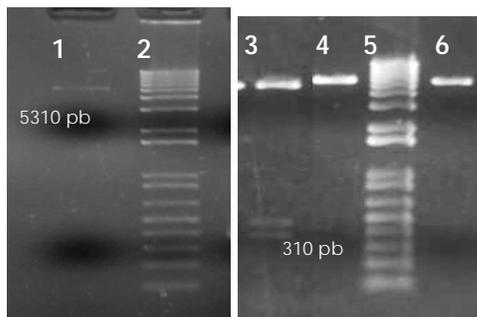


Figura 16. Doble digestión con las enzimas de restricción XhoI y NdeI. Líneas: 1) Plásmido pET24(a)+; 3) subfragmento *EcPv200L-2*; 2y5) MWM; 4y6) control de reacción.

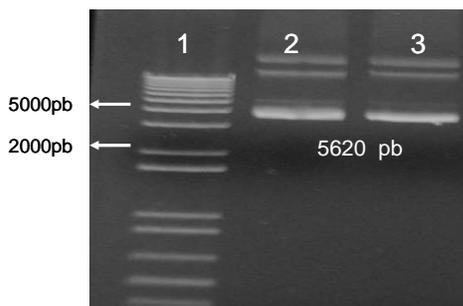


Figura 17. Extracción de DNA plasmídico de clones recombinantes *EcPv200L-2*. Líneas: 1) MWM; y 2y3) Clonos recombinantes.

Es importante recalcar que aunque los controles indicaron que la transformación funcionó adecuadamente, la transformación con los productos *EcPv200L-1* y *EcPv200L-3* fue repetidamente negativa.

Los ADN plasmídicos de los clones recombinante pET24a(+) conteniendo *EcPv200L-2* fueron analizados con la enzima de restricción PvuII encontrándose los subfragmentos esperados (Tabla 4 y Figura 18).

Tabla 4. Fragmentos esperados al digerir con PvuII los clones recombinantes con el plásmido pET24a(+)

Muestra	Enzima de restricción PvuII	
	Fragmentos esperados si el inserto está en correcta dirección	Fragmentos esperados si el inserto no está en correcta dirección
pET24a(+) + Bloque 2	93 pb 999 pb 1736 pb 2722 pb	93 pb 999 pb 1446 pb 3019 pb
pET24a(+)	999 pb 4218 pb	—————

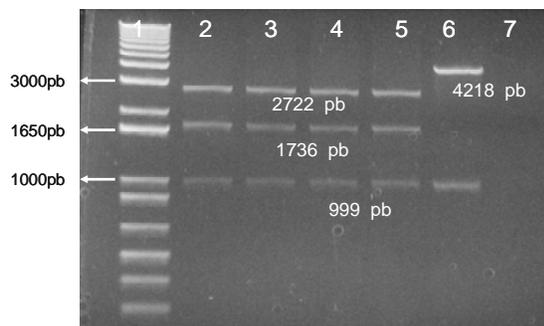


Figura 18. Digestión con la enzima de restricción PvuII de clones recombinantes EcPv200L-2. Líneas: 1) MWM; 2-5) subfragmento *EcPv200L-2* en el Plásmido pET24(a)+; 6) Plásmido pET24(a)+; 7) control de reacción.

Una vez más, confirmada la clonación del sub-fragmento en el plásmido pET24(a)+ en correcta dirección, se realizó PCR para identificar potenciales contaminaciones. Como se observa en la Figura 19, ninguno de los clones recombinantes presentó contaminación por cuanto solo amplificó el subfragmento *EcPv200L-2* de 306 pb. Posteriormente se procedió a su secuenciación, la cual confirmó la presencia del subfragmento *EcPv200L-2* en el plásmido pET24a(+)

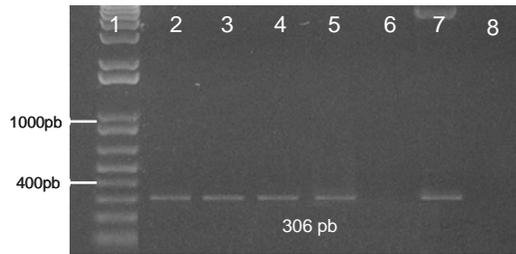


Figura 19. Amplificación del sub-fragmento *EcPv200L-2* en el plásmido pET24(a)+. Líneas 1) MWM; 2-5) *EcPv200L-2* (306pb); 7) Control positivo; y 6 y 8) Control de reacción.

4.3 EXPRESIÓN DEL SUBFRAGMENTO *EcPv200L-2* COMO PROTEÍNA RECOMBINANTE EN *E. coli*.

La expresión del subfragmento se llevó a cabo utilizando bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS durante 2h con IPTG 1mM. Mini preparaciones proteicas de 5 ml fueron sometidas a extracción proteica por lisis desnaturante con Urea 8M y fueron analizadas por SDS- PAGE (Figura 20). Como se esperaba, los clones recombinantes (pET24a(+)-*EcPv200L-2*) generaron la expresión de *EcPv200L-2* originando una banda aproximada de 15-20kDa (Líneas: 3 y 5 de la Figura 20), lo cual solo ocurrió con bacterias transformadas.

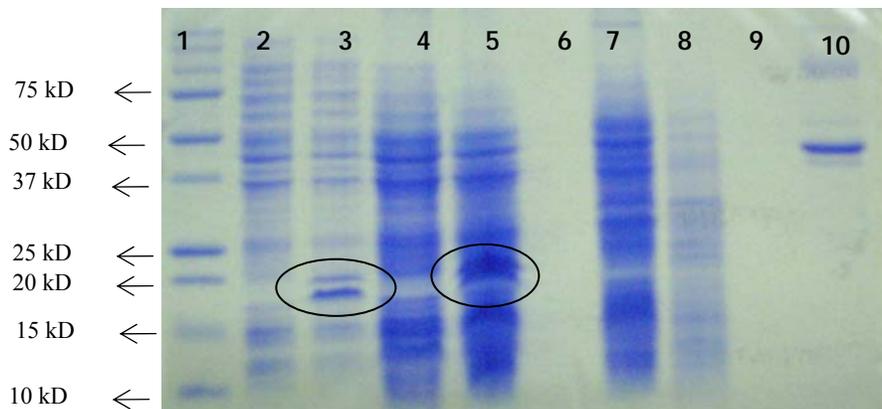


Figura 20. Expresión de *EcPv200L-2* en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Líneas: 1) MWM. Con Inducción IPTG: 3) BL21 + *EcPv200L-2* NR, 5) BL21 + *EcPv200L-2* R; 8) BL21 NR. Sin Inducción: 2) BL21 + *EcPv200L-2* NR; 4) BL21 + *EcPv200L-2* R y 7) BL21 NR. 10) Control positivo *EcPv200L* (5µg). NR: condiciones no reducidas, R: reducidas.

El perfil de expresión fue confirmado por Inmunoblot usando un anticuerpo comercial dirigido contra la cola de histidinas de las proteínas recombinantes como se puede observar en la Figura 21. En el ensayo se evidenció un reconocimiento positivo de una banda entre 15 y 20kDa, peso esperado para la proteína recombinante EcPv200L-2. Compuesto por 11 KDa correspondientes a la cadena polipeptídica y 5-8 KDa que provee la cola de histidinas. Es importante mencionar que a pesar de observar contaminantes en las preparaciones proteicas, estas fueron reconocidas por los anticuerpos anti/his, sin intervenir en la identificación de la proteína EcPv200L-2.

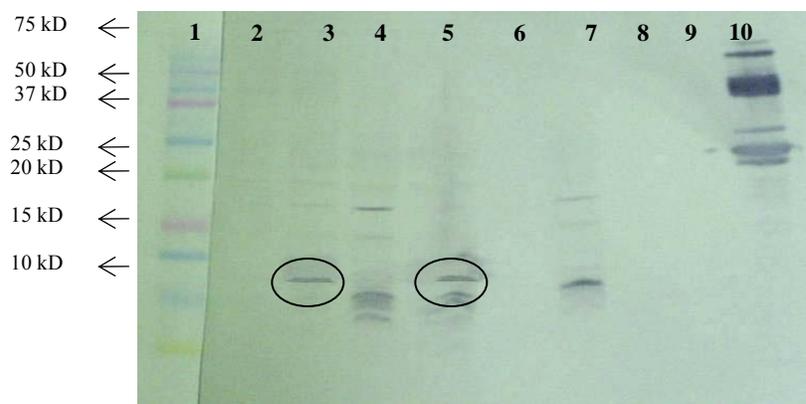


Figura 21. Reconocimiento de las colas de histidina de la proteína EcPv200L-2 expresada en *E.coli*. Líneas: 1) MWM. Con Inducción IPTG: 3) BL21 + EcPv200L-2 NR, 5) BL21 + EcPv200L-2 R; 8) BL21 NR. Sin Inducción: 2) BL21 + EcPv200L-2 NR; 4) BL21 + EcPv200L-2 R y 7) BL21 NR; 10) Control positivo EcPv200L (5µg). NR: condiciones no reducidas; R: condiciones reducidas.

Una vez identificada la proteína se procedió a expresarla a mediana escala y a purificarla para obtener proteína suficiente para realizar estudios de antigenicidad. Para esto se purificó la proteína en una columna de níquel diluida en 5ml de buffer de elución; recolectando la proteína en fracciones de 1ml de muestras como se observa en la Figura 22a. Después de confirmar por SDS-PAGE que las muestras fueron centrifugadas en tubos conteniendo un filtro (millipore, Bedford, MA) (Figura 22b). La cuantificación se realizó por espectrofotometría realizando una curva de calibración con una proteína de peso molecular similar a la proteína EcPv200L-2.

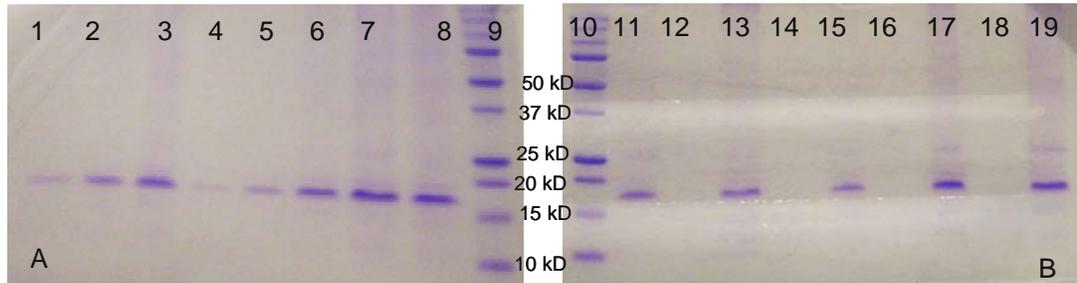


Figura 22. Purificación de la proteína EcPv200L-2 tras pasos por IMAC. A. muestras recolectadas. Líneas: 1) MWM. 2-9) Fracciones recolectas por intervalos de 1ml. B. EcPv200L-2 concentrado (10 μ g). Líneas: 1) MWM; 2,4,6,8 y 9) EcPv200L-2. Gel de poliacrilamida al 15% tenido con azul de Coomasie.

Nuevamente se confirmó por Inmunoblot la expresión usando un anticuerpo policlonal (Anti-EcPv200L), inducido por inmunización en primates del genero *Aotus* con la proteína recombinante EcPv200L formulada en adyuvante Montanide. Como se observa en la Figura 23, los anticuerpos reconocieron la proteína EcPv200L-2 (línea 2) y reconocieron el control positivo de la prueba (EcPv200L).

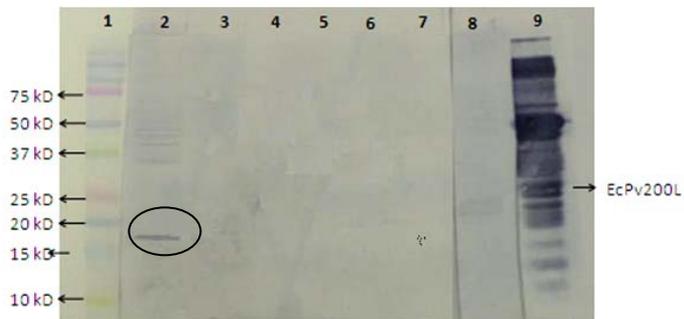


Figura 23. Reconocimiento de la proteína EcPv200L-2 con anti-EcPv200L. Líneas: 1) MWM. 2) EcPv200L-2; 10) Control positivo EcPv200L (5 μ g).

4.4 EXPRESIÓN DEL SUBFRAGMENTO EcPv200L-2 COMO PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CÉLULAS HEK 293-F

Se transfectaron 4×10^6 células HEK 293-F con el plásmido recombinante pcDNA3.1-EcPv200L-2. La transfección se realizó con liposomas a razón de 8 μg de plásmido por cada 2×10^6 células. En la Tabla 5 la viabilidad celular 48 horas después fue del 60% en un total de $1,2 \times 10^6$ células/ml. Luego de 24 horas en medio selectivo con gentamicina la viabilidad celular fue de 19% en un total de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Como control se utilizaron células HEK 293-F sin transfectar en una concentración de 2×10^6 células/ml.

Tabla 5. Viabilidad de las células transfectadas con pcDNA3.1/EcPv200L-2

No. de células transfectadas	% viabilidad 48h post-transfección	% viabilidad 24h post- siembra en medio selectivo (Gentamicina)
4×10^6 células	60 % ($1,2 \times 10^6$ células/ml)	19% ($0,5 \times 10^6$ células/ml)

El análisis electroforético de las células transfectadas y los controles lisados mostró que solo las células transfectadas con pcDNA3.1/EcPv200L-2 generaron la expresión de EcPv200L-2, observando una banda aproximada de 15-20kDa peso esperado para la proteína recombinante (Figura 24).

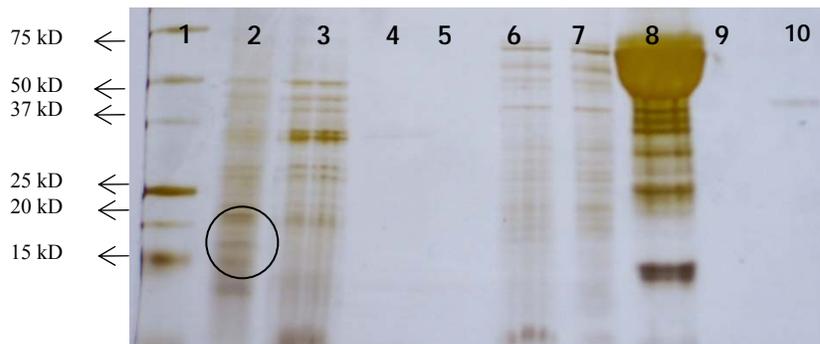


Figura 24. Expresión de EcPv200L-2 en células 293 HEK293-F. Líneas: 1) MWM, 2) 293 Transfectadas – P lisis, 3) 293 Transfectadas – SN lisis, 4) 293 Transfectadas – SN cultivo, 6) 293 normal - P lisis, 7) 293 normal – SN lisis, 8) 293 normal – SN cultivo, 10) EcPv200L 5 μg . SN: sobrenadante y P: precipitado

La expresión de EcPv200L-2 se confirmó por Inmunoblot, utilizando el mismo esquema general de siembra de muestras descrito en la sección anterior. Tanto para el ensayo realizado con Anti-His monoclonal (1:3000) y el ensayo con Anti-EcPv200L policlonal (1:2000), se observó una reacción positiva en las células transfectadas al nivel de 15-20 kDa confirmando que la banda identificada en el gel teñido con plata es el subfragmento EcPv200L (EcPv200L-2) (Figura 25).



Figura 25. Reconocimiento de la proteína EcPv200L-2 con anti-EcPv200L expresado en células HEK 293-F. Líneas: 1) MWM, 2) 293 Transfectadas – P lisis, 3) 293 Transfectadas – SN lisis, 4) 293 Transfectadas – SN cultivo, 6) 293 normal - P lisis, 7) 293 normal – SN lisis, 8) 293 normal – SN cultivo, 10) EcPv200L 5 µg

4.5 RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *EcPv200L-2* POR SUEROS DE INDIVIDUOS DE ÁREA ENDÉMICA.

La proteína EcPv200L-2 es reconocida por el 87.6% de los sueros de los individuos de área endémica, observando la presencia de anticuerpos tipo IgG presentes en 64 sueros, de 73 sueros evaluados. El 12.3% de los sueros no presentaron anticuerpos contra la EcPv200L-2. En la Figura 24 se puede observar los sueros que presentaron reconocimiento a partir de una dilución 1:200.

Los sueros que presentaron una densidad óptica mayor al punto de corte (1) fueron titulados con el fin de observar hasta que dilución se obtendría una respuesta mínima de los anticuerpos hacia la proteína. El 50% de los sueros presentó un intervalo de dilución entre

1:200- 1:500, el 30% de los sueros presentó un intervalo entre 1:1000 – 1:3000 y el 6.8% presentó un intervalo entre 1:4000 – 1:8000.

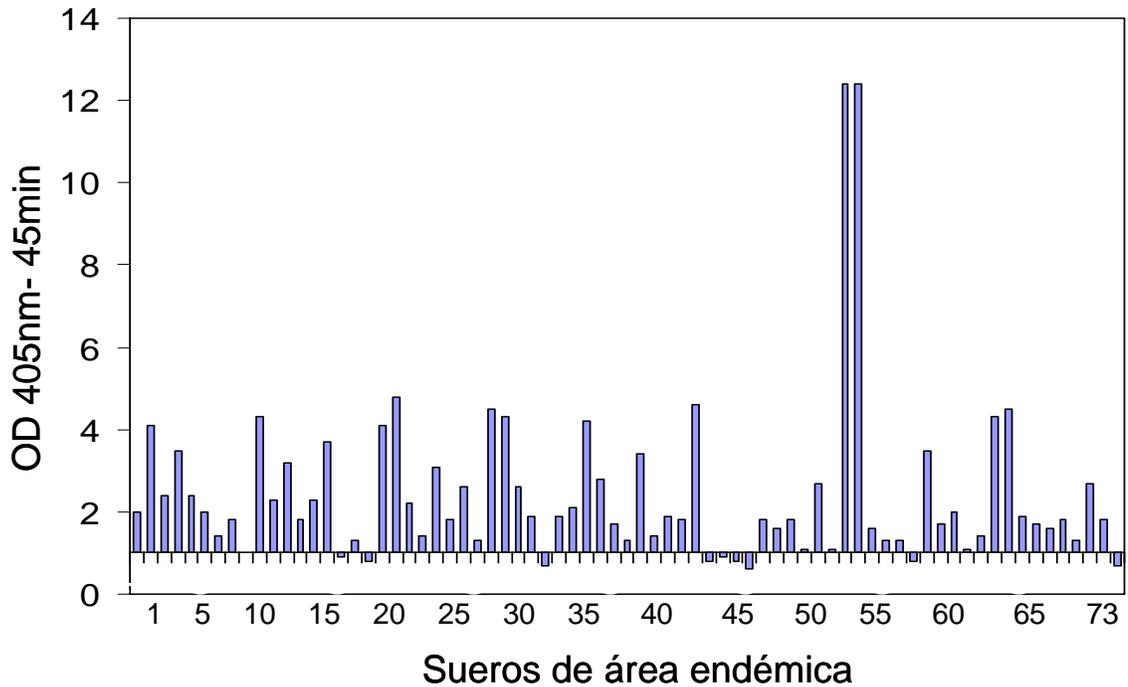


Figura 26. Respuesta humoral contra la EcPv200L-2 en individuos de área endémica. Dilución 1:200.

4.6 RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *EcPv200L-2* POR SUEROS RATÓN INMUNIZADOS CON LA PROTEÍNA COMPLETA *EcPv200L*

La proteína recombinante *EcPv200L-2* también fue reconocida por anticuerpos IgG de sueros de ratones BALB/c inmunizados con la proteína completa *EcPv200L*. Como se observa en la Figura 27, la intensidad de la respuesta en términos de densidad óptica (OD) fue aumentando recíprocamente al número de inmunizaciones realizadas con la proteína completa; exceptuando dos de los siete ratones que presentaron una mayor intensidad de reacción en la segunda inmunización que en la tercera.

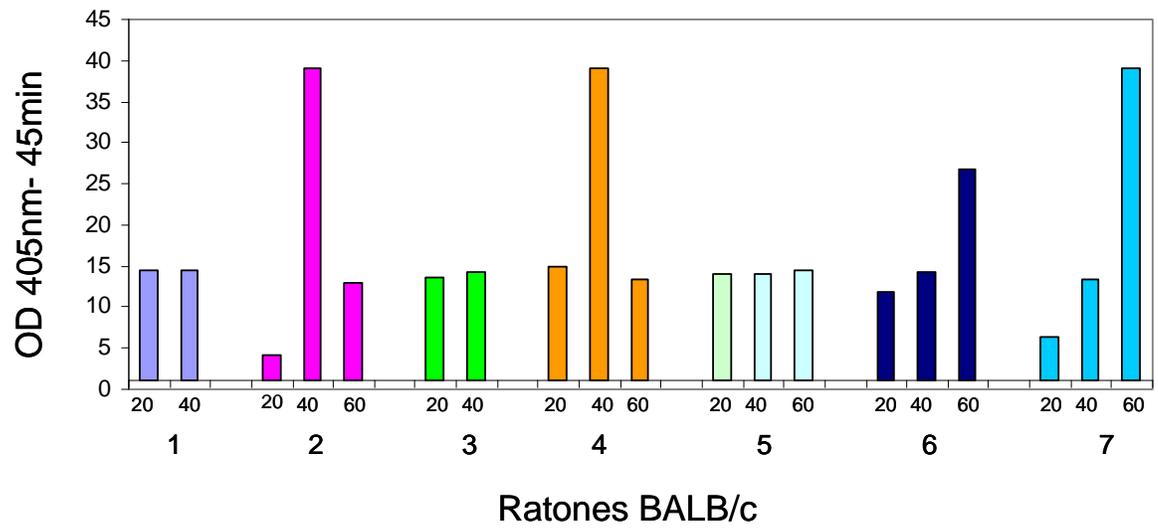


Figura 27. Respuesta humoral contra la EcPv200L-2 en ratones BALB/c inmunizados con la proteína EcPv200L. Dilución 1:200.

5 DISCUSIÓN

El presente estudio permitió el clonaje de un subfragmento “polimorfo” de la región 200L de la proteína MSP-1 de *P. vivax* y su utilización para la evaluación parcial y preliminar de la respuesta inmune inducida por el parásito en condiciones naturales y por la vacuna EcPv200L en condiciones experimentales (Valderrama *et al.*, 2005).

La clonación en el plásmido pcDNA3.1 de los tres subfragmentos de la EcPv200L definidos arbitrariamente fue facilitado gracias a que este plásmido posee timidinas 3' terminales en el sitio de inserción del fragmento que representan sitios compatibles para las adeninas generadas por la polimerasa en los extremos 3' del producto amplificado. La clonación en este plásmido permitió un sub-clonaje dirigido que generó los extremos cohesivos específicos (XhoI y NdeI) en el inserto y garantizó la entrada de los insertos en marco de lectura con el plásmido pET24a(+). Una digestión directa sobre el producto de PCR no es adecuada a causa de la posición marginal que estos sitios de corte ocupaban en el fragmento amplificado; la eficiencia de las enzimas pueden estar afectadas ya que un sitio de corte que esté demasiado cerca del extremo de una molécula de DNA puede ser cortado ineficientemente o no cortado por falta de nucleótidos alrededor del sitio de reconocimiento que tienen las enzimas de restricción (Promega, 1996). Así la inserción del fragmento de interés, como en el caso del subfragmento EcPv200L-2 en un plásmido, aseguró una digestión eficiente que generó extremos cohesivos XhoI y NdeI para la inserción en el plásmido de expresión pET24a(+).

La clonación de los otros dos subfragmentos EcPv200L-1 y EcPv200L-3 en el plásmido pET24a(+) fue negativa. A pesar de que la digestión doble con NdeI y XhoI de los clones recombinantes fue adecuada, generando los fragmentos esperados (datos no mostrados), no se obtuvo una ligación con el plásmido pET24a(+). Esto podría explicarse a varias razones: 1) La imposibilidad de formar extremos cohesivos adecuados en el plásmido o del inserto, por la ineficiencia de las enzimas de restricción; 2) La ineficiencia de la enzima de ligación (DNAligasa T4) por su inestabilidad, 3) impureza provenientes del gel de agarosa, y 4) la exposición de los DNA a luz ultravioleta (Gründemann & Schoming, 1996).

La proteína EcPv200L-2 expresada en *E. coli* fue producida gracias a que el plásmido pET24a(+) presenta un promotor T7 que sintetiza largos acumulados de mRNA en presencia de un inductor el IPTG. Sin embargo una producción alta de mRNA podría destruir y matar las células, por lo que este sistema estuvo bajo la sobre-expresión de una

lizosima T7 proporcionada por las cepas de *E.coli* usadas para inhibir los niveles basales de T7 RNA polimerasa (Baneyx, 1999). Teniendo en cuenta que la proteína recombinante EcPv200L-2 no presenta residuos de cisteínas y que la proteína EcPv200L no evidencia una importancia en su conformación tridimensional o que contenga un dominio funcional conservado, la proteína EcPv200L-2 fue eluída adecuadamente usando métodos desnaturalizantes de acuerdo al comportamiento de expresión presentado por la proteína EcPv200L de *P. vivax* (Valderrama *et al.* 2005).

La baja expresión de la proteína EcPv200L-2 en las células HEK 293_F se puede explicar por: 1) el bajo porcentaje de células transfectadas, 2) la producción masiva de mRNA ocupando la mayoría de los ribosomas de la célula impidiendo la producción normal de proteínas esenciales, y 3) por la toxicidad de la proteína al permanecer en el citoplasma de la célula por no presentar una secuencia señal secretora que la lleve al medio exterior (Huang *et al.*, 2005). La baja producción de la proteína evidenció que este modelo es altamente costoso y menos eficiente comparado con la producción de proteína recombinante en *E. coli*, resaltando el hecho de que a pesar de que en este modelo de expresión le confiere a las proteínas modificaciones post- transcripcionales y post-traduccionales y un plegamiento correcto, no es necesario para la expresión de la proteína en cuestión, ya que esta no evidencia características importantes en su conformación tridimensional mencionadas anteriormente.

La identidad de la proteína recombinante EcPv200L-2 expresada en los dos modelos fue demostrada por el reconocimiento específico que se observó de la proteína purificada por los sueros de ratones y de monos inmunizados con la EcPv200L. Particularmente el reconocimiento de estos sueros confirmó que la proteína EcPv200L-2 expresada en células HEK 293_F no evidenció plegamientos en su estructura al reconocer epítopes lineales.

Los resultados del estudio serológico llevado a cabo usando la proteína EcPv200L-2 indicaron un reconocimiento por anticuerpos de tipo IgG del 87,6% de los sueros de individuos evaluados en este estudio. Esta proporción de individuos amplia respuesta fue similar a lo reportado por Valderrama y colaboradores (2005) donde el 70% de los individuos infectados respondieron contra la proteína EcPv200L. Además, Soares y colaboradores (1999) reportaron que individuos infectados (60%), respondieron a anticuerpos contra la región N-terminal.

El 50% de los sueros de áreas endémicas de Colombia analizados en este estudio presentaron títulos de anticuerpos de hasta 1:200, el 30% presentó títulos entre 1:1000 y 1:3000 y el 6,8% presentó títulos hasta de 1:8000. Estos resultados posiblemente sean por el tiempo de exposición que presenta el individuo en áreas endémicas hacia la infección con *P. vivax*; incrementando anticuerpos tipo IgG contra la región N-Terminal naturalmente. La mayoría de los individuos que adquirirían mayor número de anticuerpos contra la EcPv200L-2 habían sido expuestos repetidas veces a la infección con *Plasmodium*, independientemente de la edad de los individuos. Un estudio que evidencia lo anterior fue realizado por Nogueira y colaboradores (2006) en donde individuos de área endémica adquieren naturalmente anticuerpos tipo IgG contra la N-terminal entre más tiempo de exposición e infección. Otra posibilidad de que la mayoría de los sueros presentaran una titulación hasta 1:200 es debido a la variabilidad genética que presenta el bloque 2 (EcPv200L-2) de la PvMSP-1 como consecuencia de la recombinación intragénica (Putaporntip, *et.al.*, 2002). Esta variabilidad le confiere al parásito una vía de escape al sistema inmune. Sin embargo el reconocimiento de anticuerpos IgG de los sueros confirma la existencia y la conservación de epítopes B lineales en EcPv200L-2 que ayuden al desarrollo de una vacuna recombinante.

Los resultados del presente trabajo proporcionan una evidencia de que la región variable de la MSP-1 de *P. vivax* (EcPv200L-2) expresada como proteína recombinante en *E. coli* es antigénica al presentar epítopes B conservados, que son reconocidos por anticuerpos de sueros de modelos animales que han sido inmunizados con la proteína EcPv200L y por anticuerpos adquiridos naturalmente de individuos de área endémica, respuesta asociada al número de exposiciones a la infección. Sin embargo es importante realizar estudios para evaluar la expresión de múltiples aislados para identificar posibles secuencia de aminoácidos conservadas de importancia inmunológica por el nivel de variabilidad que presenta EcPv200L-2.

6 CONCLUSIONES

- El modelo de expresión en *E.coli* y purificación que se realizó en este trabajo permitió obtener proteína recombinante con un grado de pureza suficiente y aceptable para realizar ensayos de antigenicidad.
- La baja expresión de proteína EcPv200L-2 en células HEK 293_F evidenció que este modelo es altamente costoso y menos eficiente comparado con la producción de proteína recombinante en *E.coli*; especialmente cuando la proteína a expresar no presenta una conformación tridimensional importante.
- El reconocimiento de sueros de monos inmunizados con la proteína EcPv200L expresada en células HEK 293_F evidenció que la proteína no presentó plegamientos en su estructura.
- El reconocimiento por sueros policlonales de ratones y monos inmunizados con la proteína EcPv200L hacia la proteína purificada EcPv200L-2 expresada en *E. coli* sugiere la identidad de la proteína.
- El reconocimiento de anticuerpos IgG de los sueros de individuos de área endémica adquiridos naturalmente hacia la proteína EcPv200L-2 confirma la existencia y la conservación de epítopes B lineales presentes en la región variable de la MSP-1 de *P. vivax*.
- La antigenicidad de la proteína EcPv200L-2 observada en este estudio confirma la importancia inmunológica de la proteína EcPv200L y su caracterización para identificar regiones potenciales para el desarrollo de una vacuna más eficaz.

7 PERSPECTIVAS

Debido a la gran importancia inmunológica que presenta la proteína EcPv200L al poseer niveles altos de antigenicidad, inmunogenicidad y eficacia protectora en animales; la caracterización de su respuesta inmune conduciría a la localización de subregiones de mayor actividad inmunogénica. Por lo que es necesaria la expresión de los demás subfragmentos, con el fin de realizar estudios comparativos e identificar regiones que represente potenciales epítopes B, T y CTL para el desarrollo de una vacuna más efectiva. Se propone dar continuidad a este trabajo, mediante la clonación y el análisis de los subfragmentos 1-3.

Se espera producir varios documentos para su publicación en revistas internacionales para la divulgación de los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J. & Rabbage, J. 1978. **Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite.** J. Cell Biol. 77, 72-82.

Ahvazi, B. 1994. **Mechanisms of Modulation of Immune Responses During Blood-Stage Malaria.** Institute of Parasitology. McGill University, Montreal.

Angov, E., B. M. Aufiero, A. M. Turgeon, M. Van Handenhove, C. F. Ockenhouse, K. E. Kester, D. S. Walsh, J. S. McBride, M. C. Dubois, J. Cohen, J. D. Haynes, K. H. Eckels, D. G. Heppner, W. R. Ballou, C. L. Diggs, & J. A. Lyon. 2003. **Development and pre-clinical analysis of a *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1(42) malaria vaccine.** Mol Biochem Parasitol **128**:195-204

Baird, K. 2004. **MINIREVIEW Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 4075–4083

Beeson, J. , & Brown, G.. 2002. **Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation.** Cell Mol Life Sci 59:258-71

Baneyx, F. 1999. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** Curr Opin Biotechnol. 10:411-421.

Blackman, M. J., H. G. Heidrich, S. Donachie, J. S. McBride, & A. A. Holder. 1990. **A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.** J Exp Med 172:379-82.

Bull, P. C., Lowe, B. S., Kortok, M., Molyneux, C. S., Newbold, C. I. & Marsh, K. 1998. **Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria.** Nat. Med. 4, 358-360.

Cattani, J., Tulloch, J., Vrbova, H., Jolley, D., Gibson, F., Moir, J., Heywood, P., Alpers, M., Stevenson, A. & Clancy, R. 1986. **The epidemiology of malaria in a population surrounding Madang Papua New Guinea.** Am J Trop Med Hyg 35: 3–15.

Calvo, P. A., T. M. Daly, & C. A. Long. 1996. ***Plasmodium yoelii*: the role of the individual epidermal growth factor-like domains of the merozoite surface protein-1 in protection from malaria.** Exp Parasitol 82:54-64.

Cowman, A., Baldi, D., Healer, J., Mills, K., O'Donnell, R., Reeda, M., Triglia, T., Wickhama, M. & Crabb, B. 2000. **Minireview: Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells.** FEBS Letters 476 (2000) 84-88

Cowman, A. F., D. L. Baldi, M. Duraisingh, J. Healer, K. E. Mills, R. A. O'Donnell, J. Thompson, T. Triglia, M. E. Wickham, & B. S. Crabb. 2002. **Functional analysis of *Plasmodium falciparum* merozoite antigens: implications for erythrocyte invasion and vaccine development.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357:25-33. 2.

Del Portillo, H. A., S. Longacre, E. Khouri, & P. H. David. 1991. **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** Proc Natl Acad Sci U S A 88:4030-4.

Dutta, S., L. A. Ware, A. Barbosa, C. F. Ockenhouse, & D. E. Lanar. 2001. **Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*.** Infect Immun. 69:5464-70.

Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C. & Shiroishi, T. 1975. **Invasion of erythrocytes by malaria merozoites.** Science 187, 748-750.

Egan, A.F., Blackman, M. Kaslow, D. 2000. **Vaccine Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 in Malaria-Naive, -Exposed,**

and/or -Rechallenged *Aotus vociferans* Monkeys. Infection and Immunity, 68(3),1418-1427.

Ferreira, M., Nunes, M. & Wunderlich, G. 2004. **MINIREVIEWS: Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites.** CLIN. DIAGN. LAB. IMMUNOL. 6 (11): 987-995.

Ferreira, M. U., O. Kaneko, M. Kimura, Q. Liu, F. Kawamoto, & K. Tanabe. 1998. **Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in natural *Plasmodium falciparum* populations: a brief overview.** Mem Inst Oswaldo Cruz 93:631-8.

Figtree, M., C. J. Pasay, R. Slade, Q. Cheng, N. Cloonan, J. Walker, & A. Saul. 2000. ***Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes.** Mol Biochem Parasitol 108:53-66.

Genton, B., I. Betuela, I. Felger, F. Al-Yaman, R. F. Anders, A. Saul, L. Rare, M. Baisor, K. Lorry, G. V. Brown, D. Pye, D. O. Irving, T. A. Smith, H. P. Beck, & M. P. Alpers. 2002. **A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea.** J Infect Dis 185:820-7.

Good, M. F., Kaslow, D. C. & Miller, L. H., 1998. **Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine.** Annu. Rev. Immunol. 16, 57-87

Grundemann, D., & Schomig, E. 1996. Protection of DNA during preparative agarosa del electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. Biotechniques 21:898-903.

Herrera, S., W. Rudin, M. Herrera, P. Clavijo, L. Mancilla, C. de Plata, H. Matile, & U. Certa. 1993. **A conserved region of the MSP-1 surface protein of *Plasmodium falciparum* contains a recognition sequence for erythrocyte spectrin.** Embo J 12:1607-14.

Hoffman, S. L., R. Edelman, J. P. Bryan, I. Schneider, J. Davis, M. Sedegah, D. Gordan, P. Church, M. Gross, C. Silverman, M. Hollingdale, D. Clyde, M. Szein, G. Losonsky, S. Paparello, & T. R. Jones. 1994. **Safety, immunogenicity, and efficacy of a malaria sporozoite vaccine administered with monophosphoryl lipid A, cell wall skeleton of Mycobacteria and squalane as adjuvant.** Am. J. Trop. Med. Hyg. in press.

Holder, A. A., & R. R. Freeman. 1982. **Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody.** J Exp Med 156:1528-38.

Holder, A. A., J. A. Guevara Patino, C. Uthaipibull, S. E. Syed, I. T. Ling, T. Scott-Finnigan, & M. J. Blackman. 1999. **Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria.** Parasitological 41:409-14.

Huber, W., Felger, I., Matile, H., Lipps, H.J., Steiger, S., & Beck, H.P. 1997. **Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3.** Mol. Biochem. Parasitol. 87: 231–234.

INS-MSN. 2002. **Situación de las enfermedades transmisibles objeto de vigilancia intensificada en salud pública.** Boletín Epidemiológico Semanal - SIVIGILA Semana epidemiológica 52.

INS-MSN. 2007. **Protocolo de malaria.** Boletín Epidemiológico Semanal - SIVIGILA.

INVITROGEN. pcDNA3.1V5-His TOPO TA Expression Kit. 2004. 19P.

Jones, T. & Hoffman, S. 1994. **Malaria Vaccine Development.** Clinical Microbiology Reviews. 303-310.

Krotoski, W. A. 1989. **The hypnozoite and malarial relapse.** Prog Clin Parasitol 1:1-19.

Kumar N. 2002. **Guest Editor for a Thematic issue; Malaria: progress, problems and plans in the genomic era.** Int J Parasitol 32:1537-1538.

Levitus, G., F. Mertens, K. Kirchgatter, S. G. Oliveira, and H. A. del Portillo. 1997. ***Plasmodium vivax*: epitope mapping of monoclonal antibodies against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1.** Behring Inst Mitt:107-11.

Lou, J., Lucas, R. & Grau, G. 2001. **Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans.** Clinical Microbiology Reviews. 14(4): 810–820.

Mahanty, S. Saul, A. & Miller, L. 2003. **Review: Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria Vaccines.** The Journal of Experimental Biology, 206: 3781-3788.

Mello, K., T. M. Daly, J. Morrissey, A. B. Vaidya, C. A. Long, & L. W. Bergman. 2002. **A multigene family that interacts with the amino terminus of Plasmodium MSP-1 identified using the yeast two-hybrid system.** Eukaryot Cell 1 :915-25

Mendis, K., Sina, B., Marchesini, P. & Carter, R. 2001. **The Neglected burden of Plasmodium vivax malaria.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 64(1, 2): 97–106.

Michon P, Fraser T, & Adams J. 2000. **Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein.** Infection and immunity. 68(6):3164-71.

Morgan, W. D., B. Birdsall, T. A. Frenkiel, M. G. Gradwell, P. A. Burghaus, S. E. Syed, C. Uthaipibull, A. A. Holder, & J. Feeney. 1999. **Solution structure of an EGF module pair from the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1.** J Mol Biol 289:113-22.

NOVAGEN. **pET system manual.** 11 ed. Estados Unidos. 2006.

Oh, M., Shin, H., Shin, D., Kim, U., Lee, S., Kim, N., Choi, M., Chai, J. & Choe, K. 2001. **Clinical features of *Vivax malaria***. Am. J. Trop. Med. Hyg., 65(2):143–146

PAHO. 2001. **Informe de la situación de los Programas Regionales de Malaria en las Américas**. Especial CD43/INF/1. Pan American Health organization.

Phililips, R. 2001. **Current Status of Malaria and Potencial for Control**. Clin. Microbiol. Rev., 14:208-226.

Putaporntip, C., S. Jongwutiwes, S. Seethamchai, H. Kanbara, & K. Tanabe. 2000. **Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax***. Mol Biochem Parasitol 109:111-9.

Putaporntip, C., S. Jongwutiwes, N. Sakihama, M. U. Ferreira, W. G. Kho, A. Kaneko, H. Kanbara, T. Hattori, & K. Tanabe. 2002. **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus**. Proc Natl Acad Sci USA., 99:16348-53.

Rasti, N., Wahlgren, M. & Chen, Q. 2004. **Molecular aspects of malaria pathogenesis**. Immun. Med. Microbiol., 41:9-26.

RBM, W. A. 2001. Malaria cases, deaths and burden. Compilation of selected country, regional and global information. World Health Organization & Roll Back malaria.

Rieckmann, H., D. R. Davis, & D. C. Hutton. 1989. ***Plasmodium vivax* resistance to chloroquine?**. Lancet ii:1183–1184.

Richie, T. L. & Saul, A. 2002. **Progress and challenges for malaria vaccines**. Nature 415, 694-701.

Rodriguez, L. E., M. Urquiza, M. Ocampo, H. Curtidor, J. Suarez, J. Garcia, R. Vera, A. Puentes, R. Lopez, M. Pinto, Z. Rivera, & M. E. Patarroyo. 2002. ***Plasmodium vivax* MSP-**

1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. *Vaccine* 20:1331-9.

Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C.M., Reed, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., Kemp, R., Allworth, A., Anders, R.F., Brown, G.V., Pye, D., Schoofs, P., Irving, D.O., Dyer, S.L., Woodrow, G.C., Briggs, W.R.S., Reber, R., & Sturchler, D. 1999. **Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant.** *Vaccine*, 17(23), 3145-3159.

Sim, B. K. L., P. A. Orlando, J. D. Haynes, F. W. Klotz, J. M. Carter, D. Camus, M. E. Zegans, & J. D. Chulay. 1990. **Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion.** *J. Cell Biol.* 111:1877-1884.

Simonetti, A.. 1996. **The Biology of Malarial Parasite in the Mosquito – A Review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 91(5): 519-541.

Soares, I., Gomes Da Cunha, M., Silva, M., Souza, J., Del Portillo, F., & Rodrigues, M. 1999. **Longevity of naturally acquired antibody responses to the n- and c-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1.** *Trop. Med. Hyg.*, 60(3),357–363.

Soares, I. S., S. G. Oliveira, J. M. Souza, & M. M. Rodrigues. 1999. **Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil.** *Acta Trop* 72:13-24.

Soares, I., Levitus, L., Souza, J., Del Portillo, F., & Rodrigues, M. 1997. **Acquired Immune Responses to the N- and C-Terminal regions of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Individuals Exposed to Malaria.** *Infect. Immun.* 65(5),1606-1614.

Takala, S., O. Branch, A. A. Escalante, S. Kariuki, J. Wootton, & A. A. Lal. 2002. **Evidence for intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*: identification of a**

novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo Bay Area Cohort Project XIV. *Mol Biochem Parasitol* 125:163-71.

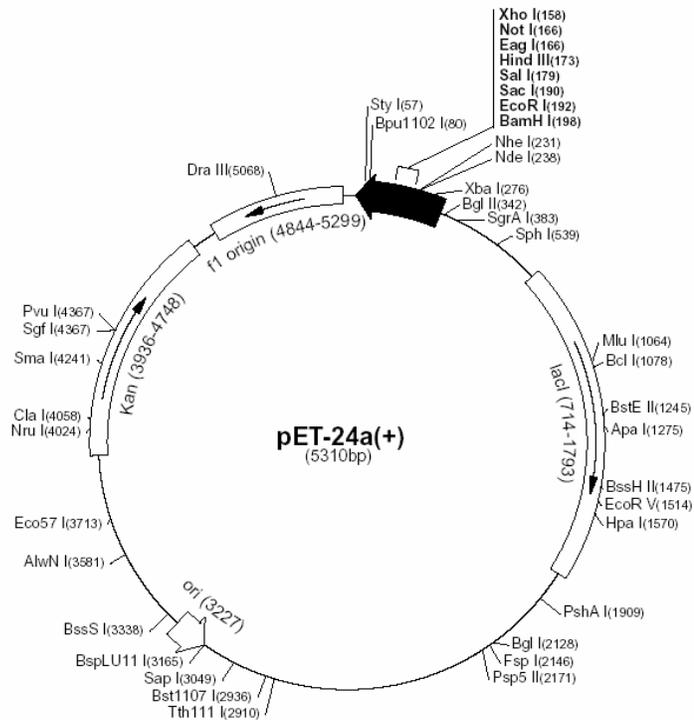
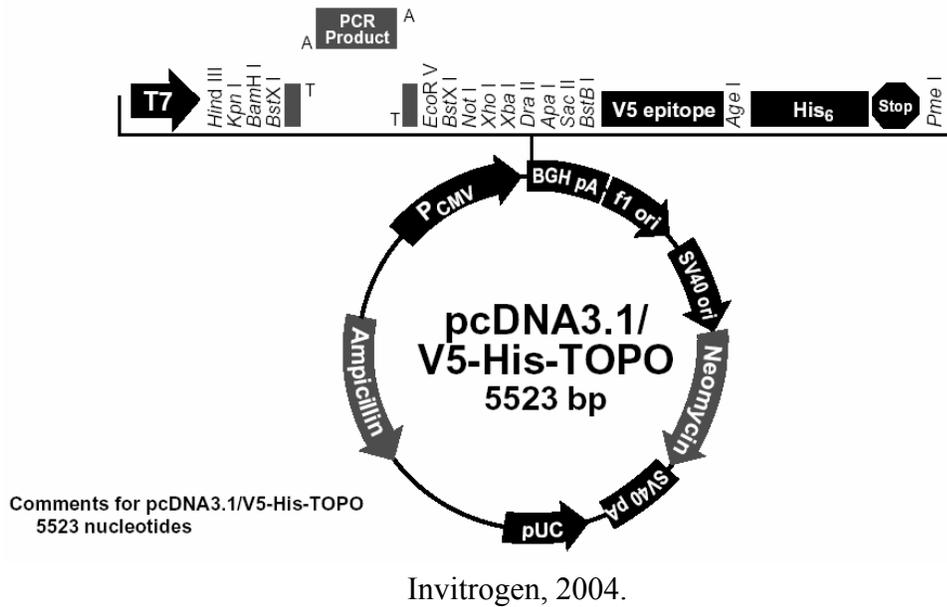
Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. & Scaife J. 1987. **Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *J Mol Biol.* 195:273–87.

Valderrama, A., Quintero, G., Gomez, A., Castellanos, A., Perez, Y., Mendez, F., Arevalo-Herrera, M. & Herrera S. 2005. **Antigenicity, emmunogenicity, and protective of *Plasmodium vivax* MSP1 Pv200L: a potential malaria vaccine subunit.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73:16-24.

WHO. 2002. **World Health Report 2002.** Worl Health Organization.

Zuñiga, Evelyn. **Polimorfismo del Fragmento Pv200L del Gen msp-1 de *P. vivax* en Aislados Clínicos de la Costa Pacifica Colombiana.** Santiago de Cali, 2005. Trabajo de grado (Biologa). Universidad del Valle de Colombia. Facultad de Educación. Área de Biología.

Anexo 1. Mapa plásmidos pcDNA3.1 y pET24a(+)



Anexo 2. Carta Comité de Ética Humana

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 021-07

Proyecto: **ANTIGENICIDAD DE TRES SUBFRAGMENTOS DE LA SUBUNIDAD RECOMBINANTE ECPV200L DE LA MSP-1 DE PLASMODIUM VIVAX**

Sometido por: **DR. SÓCRATES HERRERA**

Código Interno: **208-07**

Fecha en que fue sometido:

31

10

2007

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica** que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

- | | | | |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Resumen del proyecto | <input checked="" type="checkbox"/> | Protocolo de investigación |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Formato de consentimiento informado | <input checked="" type="checkbox"/> | Instrumento de recolección de datos |
| <input type="checkbox"/> | Folleto del investigador (si aplica) | <input checked="" type="checkbox"/> | Cartas de las instituciones participantes |
| <input type="checkbox"/> | Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

- SIN RIESGO RIESGO MÍNIMO RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
- Lesiones a sujetos humanos.

Anexo 3. Carta Comité de Ética Animal



Vicedecanato de Investigaciones

Facultad de Salud – Comité Ética Animal

APROBACION Y CERTIFICACION INSTITUCIONAL DEL PROYECTO

TITULO **“Antigenicidad de tres sufragmentos de la subunidad recombinante ECPv200L de la MSP-1 de plasmodium vivax”**

Dr. Sócrates Herrera Valencia

1. Certifico que el proyecto arriba mencionado fue revisado y aprobado por el Comité de Evaluación Ética en Animales de Experimentación de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle de acuerdo con los requerimientos de la Ley 84 de 1989 y (Resolución No. 8430 de 1993) del Ministerio de Salud sobre Protección de Animales y con esa garantía de cumplimiento, se aprobó en los Aspectos Éticos.

ACTA No. 01
de 2008

PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA
(FUNCIONARIO AUTORIZADO POR LA UNIVERSIDAD DEL VALLE)

FIRMA

ADOLFO CONTRERAS
RENOFO.

FECHA: 19 02 2008

Dirección: Vicedecanato de Investigaciones Decanato de Facultad de Salud

Teléfono: 518 56 80 – 518 56 87

ESPACIO PARA LA ENTIDAD AUSPICIADORA

II. Todas las partes de ésta garantía están de acuerdo con los requerimientos para la Protección de Animales:

FIRMA: _____

FECHA:

Anexo 4. Secuencia nucleotídica de los subfragmentos en el plásmido pcDNA3.1

```

#plasmido+_B1 TGT GGT GGA ATT GCC CTT GCA --T ATG ATC ACC ATC [210]
#secuencia    TGT GGT GGA ATT GCC CTT GCA --T ATG ATC ACC ATC [210]
#plasmido+_B1 TTC CCG TCT GTT CTG ACC TCT AAg ATC CGT AAC TTC [240]
#secuencia    TTC CCG TCT GTT CTG ACC TCT AAg ATC CGT AAC TTC [240]
#plasmido+_B1 GTT GGT AAA TCT CTG GAA CTG CAG ATC CCG GGT CAC [270]
#secuencia    GTT GGT AAA TCT CTG GAA CTG CAG ATC CCG GGT CAC [270]
#plasmido+_B1 ACC GAC CTG CTG CAC CTG ATC CGT GAA CTG GCT TTC [300]
#secuencia    ACC GAC CTG CTG CAC CTG ATC CGT GAA CTG GCT TTC [300]
#plasmido+_B1 GAA CCG CAC GGT ATC AAA TAC CTG GTT GAA TCT TAC [330]
#secuencia    GAA CCG CAC GGT ATC AAA TAC CTG GTT GAA TCT TAC [330]
#plasmido+_B1 GAA GAA TTC AAC CAG CTG ATG CAC GTT ATC AAC TTC [360]
#secuencia    GAA GAA TTC AAC CAG CTG ATG CAC GTT ATC AAC TTC [360]
#plasmido+_B1 CAC TAC GAC CTG CTG CGT GCT AAA CTG CAC GAC ATG [390]
#secuencia    CAC TAC GAC CTG CTG CGT GCT AAA CTG CAC GAC ATG [390]
#plasmido+_B1 TGC GCT CAC GAC TAC TGC AAA ATC CCG GAA CAC CTG [420]
#secuencia    TGC GCT CAC GAC TAC TGC AAA ATC CCG GAA CAC CTG [420]
#plasmido+_B1 AAA ATC TCT GAC AAA GAA CTG GAC ATG CTG AAg AAA [450]
#secuencia    AAA ATC TCT GAC AAA GAA CTG GAC ATG CTG AAg AAA [450]
#plasmido+_B1 GTT GTT CTG GGT TAC CGT AAA CCG CTG GAC AAC ATC [480]
#secuencia    GTT GTT CTG GGT TAC CGT AAA CCG CTG GAC AAC ATC [480]
#plasmido+_B1 AAA GAC GAC ATC GGT AAA CTG GAA GCT TTC ATC ACC [510]
#secuencia    AAA GAC GAC ATC GGT AAA CTG GAA GCT TTC ATC ACC [510]
#plasmido+_B1 AAg AAC AAA ctc gag AAG GGC AAT TCT GCA GAT [540]
#secuencia    CCG CAC ctc gag AAG GGC AAT TCT GCA GAT [540]

```

Subfragmento EcPv200L-1 en el plásmido pcDNA3.1. Negrilla codón de iniciación,
Subrayado secuencia del plásmido

```

#plásmido+_B2 TGT GGT GGA ATT GCC CTT GCA --T ATG GAA [210]
#secuencia      TG? GGC GGA ATT GCC CTT GCA GAT ATG GAA [210]
#plásmido+_B2 ACC ATC TCT AAC ATC AAC AAA CTG ATC TCT [240]
#secuencia      ACC ATC TCT AAC ATC AAC AAA CTG ATC TCT [240]
#plásmido+_B2 GAC GAA AAC GCT AAA CGT GGT TCT CAG TCT [270]
#secuencia      GAC GAA AAC GCT AAA CGT GGT TCT CAG TCT [270]
#plásmido+_B2 ACC AAC ACC ACC AAC GGT ACC GGT GCT CAG [300]
#secuencia      ACC AAC ACC ACC AAC GGT ACC GGT GCT CA? [300]
#plásmido+_B2 AAC AAC GCT GCT CAG GGT TCT ACC GGT AAC [330]
#secuencia      AAC AAC GCT GCT CAG GGT TCT ACC GGT AAC [330]
#plásmido+_B2 ACC GAA ACC GGT ACC CAG TCT TCT GCT TCT [360]
#secuencia      ACC GAA ACC GGT ACC CAG TCT TCT GCT TCT [360]
#plásmido+_B2 TCT AAC ACC CTG TCT GGT GGT GCT GGT ACC [390]
#secuencia      TCT AAC ACC CTG TCT GGT GGT GCT GGT ACC [390]
#plásmido+_B2 ACC GTT GTT GGT ACC TCT TCT CCG GCT CCG [420]
#secuencia      ACC GTT GTT GGT ACC TCT TCT CCG GCT CCG [420]
#plásmido+_B2 GCT GCT CCG TCT TCT ACC AAC GCT AAC TAC [450]
#secuencia      GCT GCT CCG TCT TCT ACC AAC GCT AAC TAC [450]
#plásmido+_B2 GAA GCT AAG AAA ATC ATC TAC CAG GCT ATC [480]
#secuencia      GAA GCT AAG AAA ATC ATC TAC CAG GCT ATC [480]
#plásmido+_B2 TAC AAC GGT ATC TTC TAC ACC AAC CAG CTG [510]
#secuencia      TAC AAC GGT ATC TTC TAC ACC AAC CAG CTG [510]
#plásmido+_B2 GAA CTC G-A GCA A-G GGC AAT TCT GCA GAT [540]
#secuencia      GAA CTC GGA GCA AAG GGC AAT TCT GCA GAT [540]

```

Subfragmento EcPv200L-2 en el plásmido pcDNA3.1. Negrilla codón de iniciación,
Subrayado secuencia del plásmido

```

#plásmido+_B3 TGT GGT GGA ATT GCC CTT GCA --T ATG GAA GCT CAG [210]
#secuencia      TGT GGT GGA ATT GCC CTT GCA --T ATG GAA GCT CAG [210]
#plásmido+_B3 AAA CTG ATC GAA GTT CTG Gag AAA CGT GTT AAA GTT [240]
#secuencia      AAA CTG ATC GAA GTT CTG Gag AAA CGT GTT AAA GTT [240]
#plásmido+_B3 CTG AAA GAA CAC AAA GGT ATC AAA GCT CTG CTG GAA [270]
#secuencia      CTG AAA GAA CAC AAA GGT ATC AAA GCT CTG CTG GAA [270]
#plásmido+_B3 CAG GTT GAA GCT GAA AAg AAg AAA CTG CCG AAA GAC [300]
#secuencia      CAG GTT GAA GCT GAA AAg AAg AAA CTG CCG AAA GAC [300]
#plásmido+_B3 AAC ACC ACC AAC ACC CCG CTG ACC GAC GAA CAG CAG [330]
#secuencia      AAC ACC ACC AAC ACC CCG CTG ACC GAC GAA CAG CAG [330]
#plásmido+_B3 AAA GCT GCT CAG AAg AAA ATC GCT GAC CTG GAA TCT [360]
#secuencia      AAA GCT GCT CAG AAg AAA ATC GCT GAC CTG GAA TCT [360]
#plásmido+_B3 CAG ATC GTT GCT ATC GCT AAA ACC GTT AAC TTC GAC [390]
#secuencia      CAG ATC GTT GCT ATC GCT AAA ACC GTT AAC TTC GAC [390]
#plásmido+_B3 CTG GAC GGT CTG TTC ACC GAC GCT GAA GAA CTG GAA [420]
#secuencia      CTG GAC GGT CTG TTC ACC GAC GCT GAA GAA CTG GAA [420]
#plásmido+_B3 TAC TAC CTG CGT GAA AAg GCT AAA ATG GCT GGT ACC [450]
#secuencia      TAC TAC CTG CGT GAA AAg GCT AAA ATG GCT GGT ACC [450]
#plásmido+_B3 CTG ATC ATC CCG GAA TCT ACC AAA TCT GCT GGT ACC [480]
#secuencia      CTG ATC ATC CCG GAA TCT ACC AAA TCT GCT GGT ACC [480]
#plásmido+_B3 CCG GGT AAA ACC GTT CCG ACC CTG AAA GAA ACC TAC [510]
#secuencia      CCG GGT AAA ACC GTT CCG ACC CTG AAA GAA ACC TAC [510]
#plásmido+_B3 CCG CAC ctc gag AAG GGC AAT TCT GCA GAT [540]
#secuencia      CCG CAC ctc gag AAG GGC AAT TCT GCA GAT [540]

```

Subfragmento EcPv200L-3 en el plásmido pcDNA3.1. Negrilla codón de iniciación,
Subrayado secuencia del plásmido

Anexo 5. Secuencia nucleotídica del subfragmentos EcPv200L-2 en el plásmido pET24a (+).

```

#pv200          AAA GGA GAT ATA CAT ATG GAA ACC ATC TCT [ 90]
#pet24_Ecpv200L-2 AAA GGA GAT ATA CAT ATG GAA ACC ATC TCT [ 90]
#pv200          AAC ATC AAC AAA CTG ATC TCT GAC GAA AAC [120]
#pet24_Ecpv200L-2 AAC ATC AAC AAA CTG ATC TCT GAC GAA AAC [120]
#pv200          GCT AAA CGT GGT TCT CAG TCT ACC AAC ACC [150]
#pet24_Ecpv200L-2 GCT AAA CGT GGT TCT CAG TCT ACC AAC ACC [150]
#pv200          ACC AAC GGT ACC GGT GCT CAG AAC AAC GCT [180]
#pet24_Ecpv200L-2 ACC AAC GGT ACC GGT GCT CAG AAC AAC GCT [180]
#pv200          GCT CAG GGT TCT ACC GGT AAC ACC GAA ACC [210]
#pet24_Ecpv200L-2 GCT CAG GGT TCT ACC GGT AAC ACC GAA ACC [210]
#pv200          GGT ACC CAG TCA TCT GCT TCT TCT AAC ACC [240]
#pet24_Ecpv200L-2 GGT ACC CAG TCT TCT GCT TCT TCT AAC ACC [240]
#pv200          CTG TCT GGT GGT GCT GGT ACC ACC GTT GTT [270]
#pet24_Ecpv200L-2 CTG TCT GGT GGT GCT GGT ACC ACC GTT GTT [270]
#pv200          GGT ACC TCT TCT CCG GCT CCG GCT GCT CCG [300]
#pet24_Ecpv200L-2 GGT ACC TCT TCT CCG GCT CCG GCT GCT CCG [300]
#pv200          TCT TCT ACC AAC GCT AAC TAC GAA GCT AAG [330]
#pet24_Ecpv200L-2 TCT TCT ACC AAC GCT AAC TAC GAA GCT AAG [330]
#pv200          AAA ATC ATC TAC CAG GCT ATC TAC AAC GGT [360]
#pet24_Ecpv200L-2 AAA ATC ATC TAC CAG GCT ATC TAC AAC GGT [360]
#pv200          ATC TTC TAC ACC AAC CAG CTG GAA CTC GAG [390]
#pet24_Ecpv200L-2 ATC TTC TAC ACC AAC CAG CTG GAA CTC GAG [390]
#pv200          CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG GCT [420]
#pet24_Ecpv200L-2 CAC CAC CAC CAC C-- --- --- --- --- [420]

```

Subfragmento EcPv200L-2 en el plásmido pET24a(+). Negrilla codón de iniciación,
Subrayado secuencia del plásmido