
Producción de proteínas candidatas a dianas terapéuticas frente a la malaria

Production of candidate proteins as therapeutic
targets against malaria

JOSÉ CEBRIÁN CARMONA
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

TUTORES:
FEDERICO GARCÍA MAROTO
JOSÉ ANTONIO GARRIDO CÁRDENAS



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

RESUMEN.

La malaria es una de las enfermedades infecciosas más importantes de la historia de la humanidad. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado su erradicación como uno de los objetivos de desarrollo del milenio. Esta enfermedad es producida por protozoos parásitos del género *Plasmodium*, destacando dos especies de este género: *Plasmodium falciparum* por su alta tasa de mortalidad y *Plasmodium vivax* por su elevada distribución geográfica y su aumento en el número de los casos en los últimos años. Son muchos los investigadores que durante décadas han intentado desarrollar una vacuna efectiva sin conseguir los resultados esperados. La particular biología del parásito dificulta enormemente alcanzar este objetivo. Durante 30 años se ha trabajado en el desarrollo de la vacuna RTS/S, diseñada contra *P. falciparum*, responsable de un elevado número de muertes en niños africanos. En 2016 la OMS aprobó su aplicación en niños pequeños mediante la implementación de planes piloto en diversos países africanos. Sin embargo, dicha vacuna sólo muestra protección parcial en niños pequeños y en la actualidad no hay ninguna recomendación por parte de la OMS para su uso a gran escala fuera de los planes pilotos puestos en marcha en África. Son muchas las proteínas con poder inmunogénico que se han seleccionado para el desarrollo de posibles vacunas. Una de ellas es la proteína CyRPA, que juega un papel fundamental en la invasión de los glóbulos rojos por los merozoitos (o por las formas sanguíneas del parásito). En el presente trabajo hemos aislado, secuenciado y clonado el gen que codifica dicha proteína en *P. vivax*, la especie más extendida en la región de las Américas. Los aislados pertenecen a muestras sanguíneas de pacientes procedentes del sur de México

ABSTRACT.

Malaria is one of the most important infectious diseases in the history of mankind. For this reason, the World Health Organization (WHO) has classified its eradication as one of the millennium development goals. This disease is caused by parasitic protozoa of the genus *Plasmodium*, highlighting two species of this genus: *Plasmodium falciparum* for its high mortality rate and *Plasmodium vivax* for its high geographical distribution and its increase in the number of cases in recent years. Many researchers have tried for decades to develop an effective vaccine without achieving the expected results. The particular biology of the parasite makes it extremely difficult to achieve this goal. For 30 years, work has been done on the development of the RTS / S vaccine, designed against *P. falciparum*, responsible for a high number of deaths in African children. In 2016, the WHO approved its application in young children through the implementation of pilot plans in various African countries. However, this vaccine shows only partial protection in young children and there is currently no recommendation by the WHO for its use on a large scale outside of pilots launched in Africa. There are many proteins with immunogenic power that have been selected for the development of possible vaccines. One of them is the CyRPA protein, which plays a fundamental role in the invasion of red blood cells by merozoites (or by the blood forms of the parasite). In the present work we have isolated, sequenced and cloned the gene that encodes said protein in *P. vivax*, the most widespread species in the region of the Americas. The isolates belong to blood samples from patients received southern Mexico

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Malaria.	5
1.1.1 Conceptos generales. Plasmodium.....	5
1.1.2 Especies del género Plasmodium.	5
1.1.3 Ciclo de vida de Plasmodium.	6
1.2 Lucha contra la malaria.....	8
1.2.1 Principales estrategias frente a la malaria.	8
1.3 Vacunas.	10
1.3.1 Vacunas preeritrocíticas.	10
1.3.2 Vacunas eritrocíticas.....	11
1.4 Plasmodium vivax.	12
1.4.1 Conceptos generales.....	12
1.4.2 Vacunas desarrolladas contra Plasmodium vivax.	12
1.5 CyRPA.	13
OBJETIVOS.	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1 Material.	15
3.1.1 Muestras de partida.....	15
3.1.2 Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR.	15
3.1.3 Secuencia optimizada.	15
3.1.4 Vector pET-9a(+).	15
3.1.5 Células BL21(DE3).	15
3.2 Metodología.	15
3.2.1 Obtención del gen CyRPA.....	15
3.2.2 Análisis genético.....	16
3.2.3 Expresión de la proteína CyRPA en células procariontas.	17
RESULTADOS.	19
4.1 Obtención del gen <i>cyrpa</i>.	19
4.1.1 Identificación de Plasmodium vivax en las muestras biológicas.....	19
4.1.2 Aislamiento del gen <i>cyrpa</i>	20
4.2. Análisis de los polimorfismos entre secuencias.	21
4.2.1 Variación de los nucleótidos y aminoácidos de las secuencias obtenidas.....	21
4.2.2 Construcción de un árbol filogenético.....	22
4.3 Expresión de la proteína CyRPA en células procariontas.	23
4.3.1 Optimización de la secuencia <i>pvcyrpa</i>	23
4.2 Expresión de CyRPA en pET 9(+).	29
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.	34

INTRODUCCIÓN.

1.1 Malaria.

1.1.1 Conceptos generales. *Plasmodium*.

La malaria es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo, causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium*. Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud, en 2018, se estima que hubo 228 millones de casos de malaria en todo el mundo. La Región de África fue la principal afectada con el 93% de los casos, tras esta aparece Asia Sud-oriental con el 3,4% de los casos y el Mediterráneo Oriental con el 2,1%. Seis países concentraban más de la mitad de todos los casos de malaria que se dan en el mundo: Nigeria (25%), la República Democrática del Congo (12%), Uganda (5%) y Costa de Marfil, Mozambique y Níger (4% cada uno).

A nivel mundial, la red de eliminación se está ampliando, con más países avanzando hacia el objetivo de cero casos autóctonos: en 2018, 49 países reportaron menos de 10000 de estos casos, frente a 46 países en 2017 y 40 países en 2010. El número de países con menos de 100 casos autóctonos, -un fuerte indicador de que la eliminación está cerca-, aumentó de 17 países en 2010 a 25 países en 2017 y 27 países en 2018.

Debido a la gravedad de esta enfermedad, la OMS ha catalogado la lucha contra la malaria como primordial. Para conseguir erradicar esta enfermedad, el plan principal es la *Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030* (GTS) realizada en mayo de 2015 por la Asamblea Mundial de la Salud. El principal objetivo de la misma es acelerar el camino hacia la eliminación de la malaria, para conseguirlo, proporciona un marco para la formulación de programas a medida. Dos de las principales vías de esta estrategia son: aumentar la importancia del uso de datos de vigilancia para adoptar decisiones, así como, la necesidad de una cobertura universal de intervenciones antimaláricas o antipalúdicas para los grupos de riesgo (niños, mujeres embarazadas). Se señalan áreas en las que las soluciones innovadoras serán esenciales para cumplir los objetivos y, por último, se resumen los costos estimados de la ejecución de la estrategia.

Todas estas iniciativas han mejorado la situación de la enfermedad en algunos países, sin embargo, la aparición de resistencias a los medicamentos e insecticidas tradicionales, así como los casos reportados en países asiáticos de una malaria zoonótica nos dejan (o muestran) un horizonte (o un panorama) nada alentador¹.

1.1.2 Especies del género *Plasmodium*.

Hay numerosas especies dentro del género *Plasmodium* que afectan tanto a vertebrados como reptiles, aves y roedores, entre otros. Sin embargo, solo 6 especies afectan a humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisi* y *P. knowlesi*. Esta última era propia de simios, sin embargo, en los últimos años se recogieron numerosos casos de humanos infectados, por lo que es considerada como una especie más que infecta a humanos. Las dos especies con mayor mortalidad y morbilidad causantes de esta enfermedad son:

Plasmodium falciparum produce la forma más grave de la enfermedad. La mayor parte de los casos se registran en África, afectando en gran medida a niños menores de 5 años y a mujeres embarazadas. Es la especie con mayor índice de mortalidad y morbilidad en humanos².

Plasmodium vivax es la especie que posee una mayor distribución geográfica de todas las que producen malaria. Esta especie se encuentra distribuida en África, centro y sur de América, Asia,

Oriente Medio y Pacífico Occidental. La enfermedad producida es más leve, pero se ha agravado estos últimos años, siendo mortal en un elevado número de casos³.

1.1.3 Ciclo de vida de *Plasmodium*.

Plasmodium es un protozoo perteneciente al filum *Apicomplexa*, donde se incluyen organismos que poseen un complejo apical, orgánulo fundamental para la invasión de la célula hospedadora⁴. Su ciclo de vida es complejo con diferentes formas morfológicas y dos hospedadores. El hospedador definitivo, que actúa como vector, es un mosquito del género *Anopheles*, mientras que como hospedador intermediario actuará un vertebrado⁵.

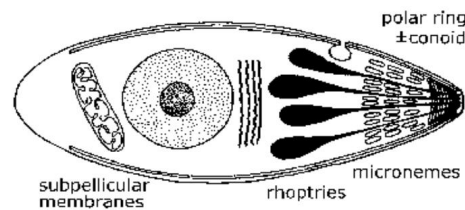


Figura 1. Muestra el complejo apical, un orgánulo fundamental para la penetración del parásito en la célula hospedadora formado por roptrías, micronemas y gránulos densos.

Existen dos fases muy bien diferenciadas. Una primera fase en el mosquito, que se conoce como ciclo esporogónico, y en la que se divide por reproducción sexual. Y una segunda fase en el hospedador intermediario (humano), llamada fase esquizogónica en la que se divide por reproducción asexual. En la fase del hospedador intermediario, observamos dos ciclos, el ciclo hepático o exoeritrocítico y el ciclo eritrocítico.

El ciclo comienza cuando el mosquito se alimenta de la sangre del hospedador vertebrado, inyectando a su vez esporozoítos que llegan al hígado, invaden los hepatocitos y se transforman en esquizontes. Tras esto, se transforman en merozoítos (esta fase invasiva del parásito se caracteriza porque se encuentra dotado de un orgánulo secretor que le permite invadir los eritrocitos).

Una vez que ha invadido el eritrocito, el parásito se encuentra en una vacuola parasitófora, donde puede elegir dos vías de desarrollo: 1) Crecer y diferenciarse en esquizontes que sean capaces de producir nuevos merozoítos, y estos a su vez invadan nuevos eritrocitos; o 2) producir formas sexuales: gametocitos macho y hembra.

Cuando un mosquito susceptible vuelve a alimentarse de la sangre de dicho hospedador, tomará los gametocitos. Una vez que ha ocurrido esto, tiene lugar otra etapa del parásito en la que se diferencian gametos macho y hembra, que al fecundarse originan un cigoto.

Estos cigotos se transforman en oocinetos móviles que invaden el epitelio intestinal del mosquito hasta alcanzar la lámina basal. En este lugar se transforman en ooquistes y producen miles de esporozoítos. Estos se liberan a la hemolinfa y se distribuyen por todo el cuerpo del mosquito e invaden las glándulas salivares, lugar desde donde son inoculados en el hospedador cuando el mosquito se está alimentando y de esta manera se reinicia el ciclo.

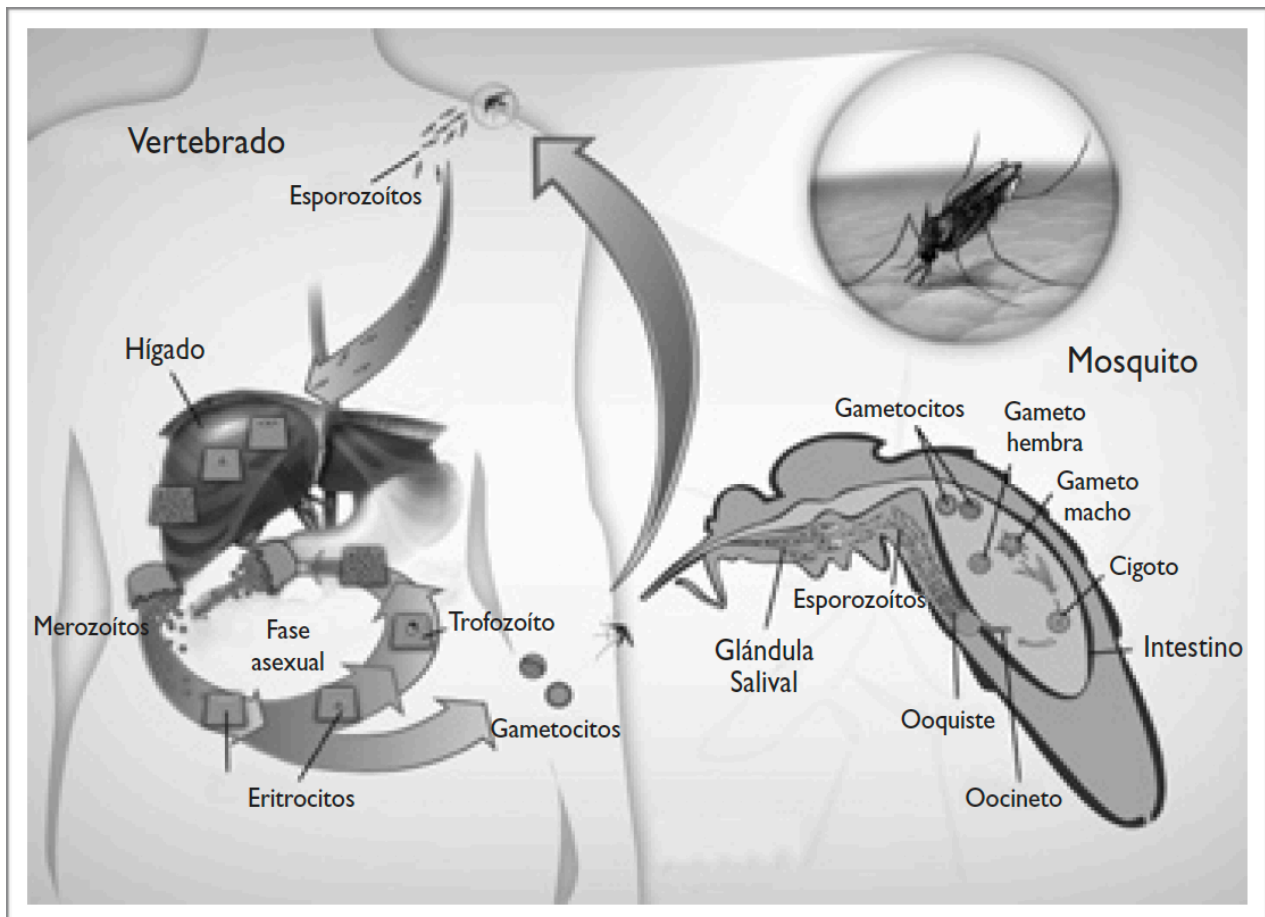


Figura 2. Ciclo de vida del protozoo parásito *Plasmodium*. Imagen recuperada del artículo científico: Castro, I., & del Carmen Rodríguez, M. (2009). Análisis proteómico de *Plasmodium*, el agente causal de la malaria. *salud pública de méxico*, 51.

1.2 Lucha contra la malaria.

1.2.1 Principales estrategias frente a la malaria.

En las últimas décadas se han desarrollado estrategias que han dado muy buenos resultados en la lucha contra la malaria

Mosquiteras tratadas con insecticida.

Entre los años 2016 y 2018, se han entregado más de 578 millones de mosquiteros tratadas con insecticida (MTI), la gran mayoría de ellas son mosquiteras tratadas con insecticida de larga duración (MILD). En numerosas zonas endémicas donde se ha generalizado el uso de mosquiteras ha descendido el número de casos de malaria de forma muy considerable.

Fumigación de interiores con insecticidas de acción residual.

El uso de mosquiteras junto con las estrategias denominadas FIAR (fumigación de interiores con insecticidas de acción residual) han dado unos resultados muy buenos en la reducción de la transmisión de la malaria. Esta estrategia consiste en esparcir con insecticida las diferentes viviendas varias veces al año.

Terapia combinada basada en artemisinina

Se estima que 3,000 millones de tratamientos de terapia combinada basada en artemisinina (TCA) fueron adquiridos por los países durante el período 2010-2018. Los derivados de la artemisinina provienen originalmente de una planta que se ha usado desde la antigüedad en China como medicina tradicional para la fiebre y la malaria. Estos fármacos actúan rápidamente y apenas poseen efectos secundarios. Los derivados de la artemisinina eliminan los parásitos de malaria de la sangre más efectivamente que los fármacos del tratamiento estándar. En las zonas en las que los *Plasmodium* son más resistentes a los fármacos existentes, tales como el Sudeste asiático, los derivados de la artemisinina no son mejores para la depuración sostenida del parásito que el tratamiento estándar con quinina o mefloquina. El tratamiento de combinación usando un derivado de la artemisinina junto con el fármaco antipalúdico de acción prolongada mefloquina mejora la depuración sostenida de los parásitos, pero la mefloquina se asocia con efectos adversos. Hay pocos estudios acerca del tratamiento de combinación con fármacos antipalúdicos de acción prolongada que sean más seguros que la mefloquina. No hay ningún indicio proveniente de ensayos de que cualquiera de los diversos derivados de la artemisinina sea mejor que los otros. Por lo que el uso combinado de ambos parece ser el mejor tratamiento frente a la enfermedad actualmente⁶.

Tratamiento con primaquina.

Las personas infectadas por *P. vivax*, pueden seguir un tratamiento con cloroquina para las fases sanguíneas y después con primaquina para la eliminación de los estadios hepáticos, y por lo tanto para actuar contra los hipnozoitos, formas predominantes latentes del parásito⁷. Tiene un grave problema, la primaquina puede destruir los eritrocitos de los pacientes con una deficiencia enzimática genética (deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa [G6PD]) por lo que los médicos evitan administrar primaquina en las áreas geográficas donde habitualmente los pacientes presentan esta deficiencia.

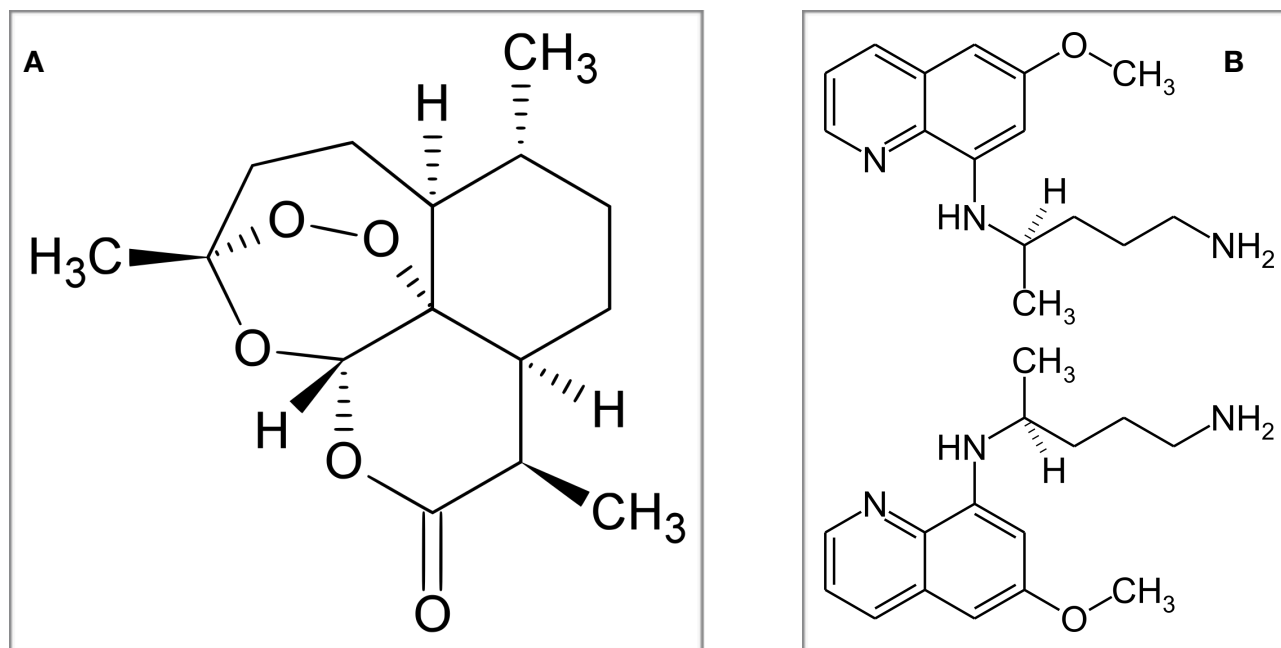


Figura 3. A, estructura química de la artemisina. B, estructura química de la primaquina.

1.2.2 Principales inconvenientes en la lucha frente a la malaria.

A pesar de que la malaria es una de las enfermedades infecciosas más importante a lo largo de la historia, no se ha conseguido desarrollar una vacuna eficaz contra esta. La dificultad de realizar una vacuna contra esta enfermedad se debe a numerosos factores entre los que cabe destacar los siguientes:

Gran variabilidad antigénica en los diferentes estadios que tiene el protozoo parásito, así como al elevado polimorfismo de sus proteínas. De hecho, en este aspecto se centra uno de los análisis realizados en este trabajo, en el que se estudia el polimorfismo de una de las proteínas que podría considerarse una candidata para el desarrollo de una posible vacuna.

Plasmodium, como otros muchos parásitos, posee una elevada capacidad para camuflarse en el interior del hospedador, alterando su metabolismo y desarrollando numerosas estrategias para evadir la respuesta inmune por parte del hospedador, lo que dificulta la búsqueda de una vacuna efectiva^{8,9}.

A todo lo anterior, se suman las dificultades que plantea el cultivo in vitro e in vivo del parásito lo que hace muy difícil el desarrollo de una vacuna¹⁰.

1.3 Vacunas.

El progreso en biología molecular, genómica y proteómica de parásitos ha proporcionado importantes avances en la búsqueda de vacunas eficaces contra la malaria. Actualmente se están desarrollando numerosas vacunas, algunas se encuentran en etapas muy avanzadas de ensayos clínicos. En 2011 se introdujo el concepto de vacunas que interrumpen la transmisión de la malaria (VIMT)¹¹. Éstas están enfocadas para actuar en las distintas etapas del ciclo de vida del parásito e incluyen:

La vacuna de transmisión son aquellas que interrumpen el ciclo de vida del parásito, induciendo anticuerpos que previenen su maduración en el mosquito (fase sexual), impidiendo la formación de esporozoítos infecciosos en las glándulas salivales del anopheles^{12,13}.

Vacunas preeritrocíticas las cuales pretenden actuar sobre los esporozoítos, para prevenir la invasión de las células hepáticas¹⁴.

Vacunas eritrocíticas que actúan contra los merozoítos, bloqueando la invasión de eritrocitos y reduciendo las formas sanguíneas o hemáticas¹⁵.

Actualmente, aunque el desarrollo está en marcha para todas las etapas, todos los esfuerzos para encontrar vacunas se centran en las vacunas preeritrocíticas y las eritrocíticas.

1.3.1 Vacunas preeritrocíticas.

Las vacunas preeritrocíticas pretenden generar una respuesta humoral/celular al inducir anticuerpos capaces de evitar que los esporozoítos invadan las células hepáticas y generen linfocitos T que puedan eliminar los hepatocitos ya infectados. Este momento es importante porque el número de esporozoítos en esta fase es mínimo en comparación con los merozoítos liberados.

El uso de vectores virales recombinantes que interrumpen la síntesis de proteínas de los parásitos que dañan la inmunidad natural es una de las estrategias que mayor fuerza está cogiendo en los últimos años. Una de las vacunas que se encuentra en pruebas piloto en África frente a la malaria es de este tipo: la vacuna RTS,S/AS01B¹⁶. Se conoce comercialmente como Mosquirix.

RTS, S se basa en el principal antígeno de superficie del esporozoíto de *Plasmodium falciparum*, la proteína circunsporozoíto (CSP). Actúa como antígeno de la cepa NF54.7¹⁸. La inducción de anticuerpos anti-CSP es importante para la protección; sin embargo, no está claro cómo funcionan estos anticuerpos protectores¹⁷. Tras más de 30 años de experimentación, se comenzó a aplicar a gran escala, inmunizando a más de 360.000 niños de las regiones de Malawi, Ghana y Kenia.

El componente RTS, S se basa en un gran segmento del CSP (Aminoácidos 207 a 395 del CSP de la cepa NF54 de *P. falciparum*)¹⁹. Los dos componentes de la proteína RTS y S se expresan en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* manipuladas genéticamente y luego se fusionan espontáneamente en partículas similares a virus que muestran secuencias de CSP y S en su superficie¹⁹. El sistema adyuvante AS01 contiene los inmunoestimulantes QS-21 y MPL, y está formulado como adyuvante a base de liposomas. La combinación de la RTS,S y del AS01 permite que la vacuna produzca una fuerte reacción inmunitaria²⁰.

Su efectividad es mínima en comparación con otras vacunas no parasitarias utilizadas en la actualidad, por ejemplo, la triple vírica. La vacuna preeritrocítica RTS,S (Mosquirix) es la más avanzada, a pesar de que su eficacia no parece superar el 30%²¹. Otra alternativa son las vacunas con esporozoítos atenuados cuya eficacia parece ser mayor y existen algunas en fases muy avanzadas.

El interés de utilizar esporozoítos completos reside en que estos inducen una gran cantidad de anticuerpos contra múltiples antígenos, lo que da lugar a una fuerte respuesta humoral y celular. Los diferentes tipos de vacuna que existen son:

PfSPZ (*Plasmodium falciparum* sporozoite), atenuados por radiación.

PfSPZ-GA1, es una vacuna atenuada por la delección de los genes que codifican para las proteínas b9 y slarp^{22,23}.

PfSPZ-CVac, atenuados in vivo mediante la administración concomitante de un fármaco antipalúdico, la cloroquina. Se trata de una terapia combinada²⁴. Aunque en los últimos meses se ha comprobado que su administración junto con pirimetamina puede dar mejores resultados²⁵.

1.3.2 Vacunas eritrocíticas.

Las vacunas en etapas de sangre o eritrocíticas pueden funcionar como una alternativa a las vacunas preeritrocíticas. El problema que tienen este tipo de vacunas es que son mucho más complejas que las anteriores, debido a que la gran mayoría de proteínas candidatas a ser utilizadas como vacunas no poseen poder antigénico. Además, existen numerosos antígenos polimórficos¹⁵.

El objetivo de estas vacunas consiste en obtener proteínas del complejo apical, o bien, de la superficie del merozoito. Estas proteínas normalmente, se encuentran involucradas en la invasión del eritrocito²⁶. Se han estudiado diversas proteínas, entre las que destacan: MSP1 (Merozoite Surface Protein 1), es una proteína de membrana que media la interacción parásito-hospedador, MSP2, MSP3, (Merozoite Surface Protein) son proteínas de la superficie del merozoito. También cabe destacar la proteína RESA, (Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen) que es un antígeno de superficie de eritrocitos infectados con *Plasmodium*, esta posee una característica fundamental, cuando es observada al microscopio, su aspecto recuerda al de un anillo, se trata de una forma morfológica del ciclo de vida del protozoo parásito²⁷.

Otras proteínas candidatas como posibles vacunas:

- AMA-1 (Apical Merozoite Antigen 1), es una proteína que participa en el proceso de reorientación apical del parásito y posterior formación del tight junctione invasion.
- RBP-1 (Reticulocyte Binding Protein)
- RAP-2 (Rhoptry-Associated Protein)
- MSP-9
- MSP-10²⁸.

1.4 *Plasmodium vivax*.

1.4.1 *Conceptos generales.*

Aproximadamente el 10% de las infecciones provocadas por esta especie se dan en el África subsahariana. A pesar de que en esta región, es donde hay una mayor mortalidad producida por *P. falciparum*, cuando salimos de ella, más del 50% de los casos de malaria son producidos por *P. vivax*. Su mayor influencia se encuentra en regiones de Medio Oriente, algunas regiones de Asia y el Pacífico Occidental y sobre todo, en Sudamérica²⁹. *P. vivax* proviene de una especie que infecta macacos en el Sud-oeste asiático hace 45,680 a 81,607 años³⁰.

1.4.2 *Vacunas desarrolladas contra Plasmodium vivax.*

La búsqueda de vacunas que puedan prevenir la infección ocasionada por *P. vivax* es compleja, pero ha aumentado de manera considerable en los últimos años. Esto ha dado lugar a la aparición de muchos proyectos de futuras vacunas contra el protozoo parásito *P. vivax*.

Vacunas preeritrocíticas:

En *P. vivax*, 2 antígenos han sido evaluados como candidatos a vacuna preeritrocítica:

1. CSP (Circumsporozoite Surface Protein), conocida como CSP.PvS25 Esta vacuna se encuentra en fase de desarrollo. La vacuna PvS25H, se trata de una proteína recombinante que deriva del antígeno de superficie (PvS25) de los oocinetos de *Plasmodium vivax*³¹. Su posible efectividad, se debe, a que el parásito no es capaz de expresar el antígeno PvS25 en humanos, por lo que no estará sujeto a cambios que puedan producirse por presión de la selección inmune en el huésped intermediario^{32,33,34,35}.
2. SSP2 (Sporozoite Surface Protein 2) mejor conocida como TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein). SSP2 es una proteína de superficie del esporozoito que media la adhesión del parásito a las células del huésped y la invasión celular a los hepatocitos.

Vacunas eritrocíticas:

Vacuna DBP (antígeno duffy): DBP (Duffy Binding Protein), es importante en la interacción de los merozoítos con el antígeno Duffy de los reticulocitos, es la única vacuna relacionada con *P. vivax* que se encuentra en fase de desarrollo clínico. La presencia de polimorfismos en genes o en proteínas que se expresan en la superficie de los eritrocitos está totalmente relacionado con la capacidad que poseen los humanos ha obtener una resistencia innata a la infección por *P. vivax*. Duffy es un antígeno de superficie de los eritrocitos. La condición homocigótica recesiva para el antígeno Duffy va a dar lugar a resistencia a la infección³⁶.

Este antígeno es funcional y conservado. Pertenece a la familia de proteínas de unión al eritrocito, EBP.

El rol de esta proteína está relacionado con la invasión de los reticulocitos por merozoítos de *P. vivax*. El merozoito se pega a la superficie de la célula. La DBP es localizada en las vesículas secretoras de *Plasmodium vivax*. Tras una reordenación del merozoito, se libera la DBP³⁷. Esta vacuna va dirigida a la interacción entre la proteína de unión al antígeno Duffy de *P. vivax* (DBP) y el antígeno eritrocitario humano Duffy.

La obtención de una vacuna de una sola etapa es algo que parece imposible a día de hoy, por ello el futuro está en la combinación de varias vacunas de diferentes etapas, que sean capaces de actuar contra varias formas morfológicas del parásito, estas vacunas se denominan vacunas multiestado.

1.5 CyRPA.

Durante la infección y la enfermedad de la sangre (etapa eritrocítica), la invasión de merozoitos de *Plasmodium* requiere interacciones múltiples entre los ligandos de proteínas y los receptores de eritrocitos. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna que utilice una proteína de merozoito para reducir la gravedad de la enfermedad es esencial para reducir la transmisión en las regiones afectadas.

En *P. falciparum*, el antígeno protector rico en cisteína (CyRPA) forma un complejo con otras proteínas y es esencial en los eventos moleculares secuenciales que conducen a la invasión de eritrocitos humanos por merozoitos³⁸. CyRPA es capaz de unirse a una proteína del homólogo de unión a reticulocitos 5 (PfRH5) y la proteína que interactúa con RH5 (PfRipr). El complejo PfRH5 / PfRIPR / CyRPA es altamente inmunogénico, lo que convierte a estas proteínas en componentes prometedores de la vacuna contra etapas sanguíneas³⁹.

En *P. falciparum*, los anticuerpos específicos anti-CyRPA inhibieron sustancialmente la invasión de eritrocitos mediante cultivo in vitro de merozoitos y modelo de ratón in vivo NOD-scid IL2Rγnull injertado con eritrocitos humanos⁴⁰. Estudios recientes han demostrado la alta inmunogenicidad de PfCyRPA administrado en virosomas, en ratones y conejos inmunizados. Además, la IgG de conejo inmunizado redujo el desarrollo de parásitos al 77% en un modelo de ratón infectado por *P. falciparum*⁴¹.

En otras especies de *Plasmodium* como *P. knowlesi* y *P. vivax*, RH5 no está presente en su genoma. En *P. knowlesi*, RIPR y CyRPA no parecen formar un complejo entre sí, sino que RIPR forman un nuevo complejo proteico trimérico con otras moléculas, mientras que CyRPA como proteína única es esencial para la invasión de merozoitos.

En el estudio dirigido por Knuepfer también mostró que el receptor de eritrocitos basigin (BSG) no es esencial para la invasión de eritrocitos en *P. knowlesi*, como se demostró anteriormente para *P. falciparum*^{39,42}. En *P. falciparum*, la secuencia de la proteína CyRPA estaba altamente conservada entre las cepas de parásitos globales, y no se detectaron anticuerpos anti-CyRPA específicos en individuos expuestos de Ghana³⁹.

En *P. vivax*, el gen *cyrpa* se encuentra en el cromosoma 5, que codifica una proteína de unión al eritrocito. Los anticuerpos anti-receptor de BSG causaron una tasa de inhibición del crecimiento diferente en los aislados de campo y sugirieron que el BSG podría ser un receptor alternativo para invadir merozoitos a CyRPA⁴². En los niños pequeños, CyRPA y otros antígenos de merozoitos indujeron niveles elevados de anticuerpos IgG contra *P. vivax* de forma natural y se asociaron fuertemente con la protección contra la malaria clínica⁴³.

Al igual que *P. falciparum*, *P. vivax*-CyRPA parece estar expuesto al sistema inmunológico. En esta investigación, se estudió la diversidad genética de *Plasmodium vivax* CYRPA obtenida de pacientes sintomáticos del sur de México y se comparó con la presente en aislamientos de otros sitios geográficos.

OBJETIVOS.

La malaria es una de las enfermedades que ha provocado más muertes a lo largo de la historia de la humanidad. Por ello, el interés en la búsqueda del desarrollo de una vacuna efectiva no cesa. El principal objetivo de esta búsqueda es la utilización de estas proteínas como vacunas en un futuro. En este trabajo se marcaron una serie de objetivos:

- Extracción del gen *cyrpa* de muestras sanguíneas de pacientes del sur de México.
- Secuenciación del gen *cyrpa* y análisis de polimorfismos
- Clonación del gen *cyrpa* en un plásmido para su utilización en la transformación de células procariotas.
- Expresión de la proteína CyRPA en células procariotas.

Estos han sido los principales objetivos de este estudio, el cual es un trabajo de investigación a largo plazo. Tras estos pasos, los siguientes serán la utilización del gen *cyrpa* para transformar células eucariotas (células de mosquito), y poder comparar la expresión de ambos sistemas, tanto procariota como eucariota.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material.

3.1.1 Muestras de partida.

Se partió de 10 muestras de sangre seca fijada en papel de filtro tomada de pacientes de origen mexicano de diferentes regiones del sur de México. En estos pacientes, un primer diagnóstico de malaria fue llevado a cabo a partir de la visualización al microscopio de los parásitos en sangre.

3.1.2 Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR.

Para llevar a cabo las diferentes reacciones de PCR se utilizaron una serie de oligonucleótidos de los cuales tres de ellos se encontraban previamente descritos en bibliografía⁴⁴, mientras que el resto fueron diseñados en nuestro laboratorio. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía IDT (*Integrated DNA Technologies*).

3.1.3 Secuencia optimizada.

Para llevar a cabo la expresión del gen *cyrpa* en un sistema heterólogo (*E. coli*) se llevó a cabo su síntesis química, que fue realizada por la compañía BioBasic. En la síntesis del gen se incluyó una cola de seis histidinas para facilitar la detección y purificación de la proteína.

3.1.4 Vector pET-9a(+).

El vector pET-9a(+) fue utilizado para clonar la secuencia sintética del gen *cyrpa*. Con esta construcción, posteriormente, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3).

3.1.5 Células BL21(DE3).

Esta cepa de *E. coli* se caracteriza por poseer un profago (DE3) que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor lacUV5, inducible por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Esto es fundamental ya que BL21 carece de la T7 RNA polimerasa, y en la construcción que hemos llevado a cabo hemos puesto al gen *cyrpa* bajo el control de un promotor T7.

3.2 Metodología.

3.2.1 Obtención del gen CyRPA.

3.2.1.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante un método basado en el Kit-GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoFisher Scientific) a partir de, aproximadamente, 1 cm² de la sección de filtro que contiene la muestra de sangre seca. Este material, tras introducirlo en un tubo de microcentrífuga y agregarle 200 μL del tampón 1xPBS, se deja incubar unos 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregan 20 μL de la solución de proteinasa K y se procede a mezclar. A la mezcla anterior, se le adiciona 400 μL de solución de lisis, agitando hasta conseguir una suspensión uniforme.

Se incuban las muestras a 56 °C durante 10 minutos y se centrifuga a 3000 rpm 30 segundos. Se adiciona 200 µL de etanol (96-100%). En este momento, se traspasa la mezcla a la columna de centrifugación y se centrifuga a 6.000 x g durante 1 minuto a 20 °C. Se desecha el tubo de recolección y se repite la operación adicionando 500 µL de tampón de lavado WBI (con etanol agregado). Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto, se vuelve a desechar el eluato, se adicionan 500 µL del tampón de lavado II y se centrifuga a máxima potencia (14.000 rpm) durante 1 minuto. Se transfiere la columna a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL.

Para finalizar, se agregan 50 µL de tampón de elución al centro de la membrana de la columna para eluir el ADN genómico. Se incubaba durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto. Para el almacenamiento de ADN se requiere de una temperatura de -20 °C.

3.2.1.2 Diseño de cebadores.

Los cebadores se diseñaron utilizando herramientas de biología molecular. Una vez diseñados en el laboratorio, se comprobaron las diferentes características que estos tenían mediante la herramienta Primer designing tool, perteneciente al NCBI. Las características que este programa analiza y que son utilizadas para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos con respecto a la secuencia que se desea amplificar son: la longitud de la cadena, tanto del cebador forward, como del reverse; la Tm o temperatura de meelting, que es la temperatura de funcionamiento óptima de los cebadores; el porcentaje de GC, cuyos valores para ambos cebadores deben ser similares; y, por último, el self complementary y el self 3' complementary, valores que nos indican la probabilidad de que se dé el fenómeno conocido como *primers dimer*, consistente en la unión de los cebadores entre sí.

3.2.1.3 Técnica de PCR y secuenciación del ADN.

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar de forma específica el fragmento del gen diana. Para ello, se utilizó un fluorocromo inespecífico que permite detectar la síntesis de ADN de doble cadena. El fluorocromo utilizado fue SYBRGreen. El equipo en el que se realizaron las reacciones de PCR fue el termociclador MyGo Pro.

Tras las reacciones de PCR, se llevaron a cabo la secuenciación de los productos de PCR, la secuenciación se llevó a cabo utilizando el método de Sanger, de terminación de cadena o de dideoxinucleótidos. Se utilizó el kit comercial Byg Dye ® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). En las diferentes reacciones de secuenciación que se realizaron se emplearon entre 40-50 ng de los productos de PCR. El kit seguía un protocolo en el que se utilizaban 2 µL de Byg Dye Terminator, 3 µL de Sequencing Buffer, 1,6 µL de un cebador de concentración 2 µM, y agua hasta completar los 20 µL finales de la reacción.

3.2.2 Análisis genético.

Se analizó un conjunto de secuencias que comprendía solo la región codificante (exón-1 y exón-2). Éstas fueron utilizadas para estimar los parámetros de diversidad genética y el polimorfismo de aminoácidos.

Además de las secuencias obtenidas por nuestro grupo de investigación, se utilizaron otras secuencias del gen *cyrpa* de *P. vivax* que fueron recuperadas de PlasmoDB (<https://plasmodb.org>). Se identificaron cambios de nucleótidos y haplotipos. Para buscar similitudes genéticas entre los haplotipos del sur de México y a nivel mundial, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud utilizando el método bootstrap y 1000 repeticiones en MEGA v6 (Tamura et al., 2013). Se evaluaron los parámetros de diversidad genética para parásitos del sur de México. La distribución de la diversidad de nucleótidos a través de la secuencia de *pvcyrpa* se analizó mediante un análisis de

fragmentos de ADN de 100 nucleótidos y superposición de 25 unidades, utilizando dnaSP v6 (Rozas et al., 2017). A partir de estos datos, se calculó el número de haplotipos (H).

3.2.3 Expresión de la proteína CyRPA en células procariotas.

*3.2.3.1 Elaboración de la construcción de expresión y optimización del gen *cyrpa*.*

La secuencia del gen *cyrpa* fue optimizada, y su síntesis química fue llevada a cabo por la compañía BioBasic. Esto se realizó para que la secuencia tuviera un uso de codones adecuado a *E.coli*.

*3.2.3.2 Transformación de *E.coli* con el vector de expresión.*

Se llevó a cabo la transformación de las células competentes BL21 (DE3) con el vector de expresión pET-9a(+) conteniendo la secuencia del gen *cyrpa*. La cepa empleada contenía además tres genes que codifican tRNAs raros para evitar un bajo nivel de expresión debido a la limitación por el uso de codones. Estos genes se localizan en dos plásmidos adicionales, un plásmido que contiene el gen de resistencia a la streptomicina (STRP) y otro al cloroanfenicol (CFN). El vector pET-9a (+) por otro lado, posee el gen de resistencia a la kanamicina (KAN) que permite la selección de las bacterias transformadas con el gen de interés.

Se transformaron las células BL21 (DE3) y se llevaron a cabo cultivos a partir de varias colonias correspondientes a clones transformantes independientes. En concreto, 3 clones fueron seleccionados y utilizados para realizar stocks en glicerol al 10%, y se procedió a su almacenamiento a -70 °C.

3.2.3.3 Experimento de inducción.

A continuación, se procedió a realizar el experimento de inducción empleando cultivos obtenidos a partir de los tres clones transformantes ya que es habitual que existan diferencias en los niveles de expresión de diferentes clones.

Para ello, se realizaron inóculos iniciales a partir de los stocks de -70°C en medio líquido LB conteniendo los tres antibióticos de selección (CFN, STRP y KAN). Posteriormente se realizó el reinóculo en el mismo medio, cultivándose hasta alcanzar una OD600 de aproximadamente 0,6, momento en que se añadió el inductor IPTG a concentración 1 mM, prolongándose la incubación durante 3, 6 y 24 horas más, tomando muestras a cada tiempo de inducción, así como los controles correspondientes sin inducir.

3.2.3.4 Electroforesis de proteínas.

Se realizó una electroforesis de proteínas, denominada electroforesis vertical. Se llevó a cabo para comprobar que la inducción había tenido resultados positivos, y se trató de comparar la expresión diferencial de proteínas en diferentes muestras, esperando una banda diferente en los patrones de expresión de las muestras inducidas y las no inducidas. El protocolo realizado fue el siguiente:

Se sigue un protocolo en el que se utilizan 2mL de SB (simple buffer) y 100µL de β-mercaptoetanol.

El buffer de electroforesis tiene un volumen de 500mL (50mL de buffer x10 + 450mL H₂O_d).

Se procede al montaje del gel, su carga y se deja correr (200V durante 35min).

Se revela con azul de Comassie y en agitación muy lenta durante al menos 1h, sin embargo, se recomiendan dichas condiciones durante 24 horas.

3.2.3.5 Test para comprobar la presencia del plásmido.

Se realizó este ensayo en el que se prepararon placas de petri con diferentes medios de cultivo (LB, LB + Kanamicina, LB + IPTG, LB + IPTG + Kanamicina). Se realizan varios inóculos, en función de los clones que se posean, 3 en este caso, y se inoculan 5 mL de medio LB con antibióticos (CFN, STRP y KAN). Dicho inóculo se deja O/N, 24 h a 37°C.

Tras esto, se reinoculan 5 mL de LB sin antibióticos a partir del inóculo realizado. Esto se incuba a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0,6. Se plaquea y se cultiva a 37°C durante 24 h.

3.2.3.6 Western blot.

Esta técnica se utilizó para identificar la proteína CyRPA dentro de la compleja matriz de proteínas. Mediante una electroforesis vertical (2.2.3.5), se separan las proteínas en un patrón de bandas en función de su peso molecular. Tras esto se transfieren a una membrana adsorbente para poder buscar la proteína de interés enfrentándola con anticuerpos específicos. La detección final se realiza por quimioluminiscencia.

El protocolo para realizar el western blot fue el siguiente: se lavó en TBS la membrana durante 5 minutos. Posteriormente, se incubó en 20 mL de blocking buffer durante 1 hora. Se diluye el anticuerpo y se incuba durante 2 horas. Tras esto, se lava la membrana en TBST durante 5 minutos 5 veces y por último se lava una vez más con TBS durante 5 minutos.

La detección se realizó con el reactivo luminol cubriendo por completo toda la membrana.

RESULTADOS.

4.1 Obtención del gen *cyrpa*.

4.1.1 Identificación de *Plasmodium vivax* en las muestras biológicas.

El primer paso de cara a la obtención del gen *cyrpa*, fue la extracción de ADN total a partir de 10 muestras de sangre seca fijadas en papel secante de pacientes procedentes del sur de México infectados con malaria, presumiblemente por *P. vivax*. En todos los casos se obtuvieron unas concentraciones de ADN total entre 0,1 y 0,37 ng/ μ L.

Posteriormente, sobre este ADN se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los cebadores UNR (reverse) y PLF (forward)⁴⁵ (con el objetivo de amplificar un fragmento de ADN específico del género *Plasmodium* (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

CEBADORES	SECUENCIAS	ESPECIFICIDAD
Reverse (UNR)	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal
Forward (PLF)	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	<i>Plasmodium</i>
Reverse (VIR)	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	<i>Plasmodium vivax</i>

Los productos de amplificación de esta primera reacción de PCR fueron reamplificados, en una nueva reacción de PCR, utilizando los cebadores PLF y VIR, específico de *Plasmodium vivax* (Tabla 1). El resultado positivo de esta reacción indica la existencia de material genético de *P. vivax* en las diferentes muestras. Se obtuvo producto de amplificación en todas las muestras. Los productos fueron purificados y sus concentraciones medidas mediante técnicas fluorométricas (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de los productos de amplificación obtenidos en la PCR.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)
1	32,6	6	42,4
2	39,6	7	37,1
3	33,9	8	37,6
4	39,3	9	35,4
5	38,8	10	36,9

Tras esto, los productos de amplificación de PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger y se enfrentaron a la base de datos del NCBI para comprobar que las secuencias pertenecían a la especie *P. vivax*. Así, se comprobó que, en efecto, la secuencia correspondía al ADN codificante del ARN ribosómico de *P. vivax*.

4.1.2 Aislamiento del gen *cyrpa*.

La secuencia del gen *cyrpa* de diferentes especies del género *Plasmodium*, -(*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*)-, fueron obtenidas de las bases de datos GenBank o PlasmoDB. Éstas fueron utilizadas para generar un alineamiento e identificar regiones conservadas en el gen, a partir de las cuales se diseñaron dos cebadores específicos flanqueantes del gen *cyrpa*, CYRPA_F1 y CYRPA_R1, que nos permitieron la amplificación del gen, mediante PCR. Posteriormente, 7 cebadores adicionales fueron diseñados para secuenciar la región codificante del gen *cyrpa* (Tabla 3).

En la figura 4 se muestra una representación de la disposición de los cebadores en la secuencia de nucleótidos del gen *cyrpa*, y en la tabla 3, la secuencia de dichos cebadores.

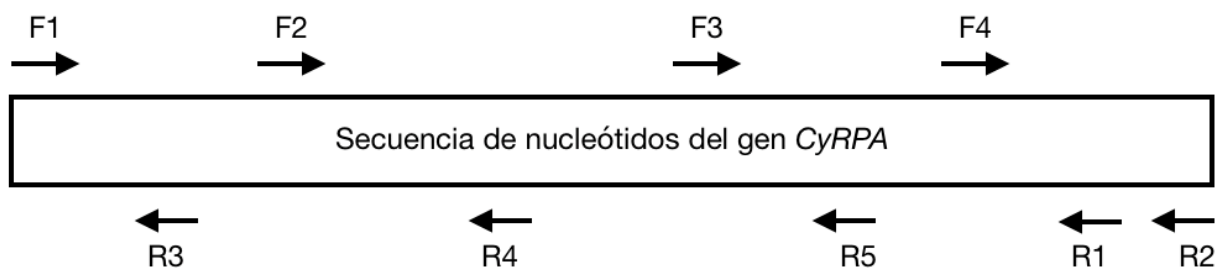


Figura 4. Disposición de los cebadores diseñados en la secuencia del gen *cyrpa*.

Tabla 3. Cebadores diseñados y utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *cyrpa*.

CEBADOR	SECUENCIA
CYRPA_R1	AGTTGGGATGTGCTACTGGAG
CYRPA_F1	TAAGTCTGCTTTCCTCTCTTGG-G
CYRPA_R2	AGACTGGAAAGACGCAACGG
CYRPA_F2	TTGGAGGGACTTGTCCGGTT
CYRPA_R3	TGCTCTGTGTAGTAGAGG
CYRPA_F3	TTTTTCTCCCCTTGGGAGGCTAC
CYRPA_R4	GTGGAAAGAAGTGTGTGGAGGT
CYRPA_F4	TATGGGACTTTTGATGGTTG
CYRPA_R5	AACTGACTGGTATGAGTCC

4.2. Análisis de los polimorfismos entre secuencias.

4.2.1 Variación de los nucleótidos y aminoácidos de las secuencias obtenidas.

Se obtuvieron secuencias de buena calidad en 7 de las 10 muestras de partida. En las tres restantes no fue así debido, probablemente, a la baja calidad del material de partida. Estas 7 secuencias del gen *cyrpa* fueron depositadas en la base de datos del GenBank (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias y número de acceso en la base de datos GenBank.

SECUENCIA	ACCESION NUMBER	SECUENCIA	ACCESION NUMBER
CyRPA_M1	MW010262	CyRPA_M8	MW010266
CyRPA_M5	MW010263	CyRPA_M9	MW010267
CyRPA_M6	MW010264	CyRPA_M10	MW010268
CyRPA_M7	MW010265		

Se analizaron los polimorfismos que existían en las diferentes secuencias comparándolas con la secuencia del genoma de referencia Sal I (PlasmoDB) y otras secuencias depositadas en las bases de datos GenBank y PlasmoDB. La secuencia Sal I y las siete secuencias de este estudio presentaban los codones 14-17 (CTC TTC TCC TTC) en el extremo 5', que estaban ausentes en todas las demás secuencias, por lo que se decidió no incluir estos codones en el análisis genético. Así, las secuencias codificantes completas obtenidas en este estudio y otras 15 con un origen geográfico similar, y que fueron obtenidas de PlasmoDB, conformaron el que llamamos “grupo del sur de México” (SMX). Las 22 secuencias codificantes son el resultado de la presencia de dos exones en el gen, y pudimos observar que presentaban dos cambios de nucleótidos sinónimos y 21 no sinónimos, dando lugar a 9 haplotipos diferentes (Tabla 5).

Tabla 5. Variación de genes y aminoácidos entre los diferentes haplotipos del sur de México.

Haplotype	Exon-1										Exon-2														
	69	82	91	93	95	126	127	129	132	139	Codon number / amino acid														
	Ala	Asn	Lys	Glu	Asn	Lys	Gly	Ile	Arg	Thr	Asn	Asp	Asp	Asp	Lys	Val	Leu ¹	Glu	Glu	Pro	Ser	-	Asp	Thr	
N											Nucleotides														
1	5+1	gcg	aac	aag	gaa	aat	aaa	gaa	atc	cgg	acc	aac	gac	gac	Gac	aaa	gtc	cta	gaa	gag	cag	agc	-	gat	acg
2	2+3	g.t	gaa
3	3+1	.g.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	..c	...	gg.	.c.	.g	a..	g..	a..	-
4	2+0	.g.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	..c	...	gg.	.c.	.g	a..	g..	a..	-	t..	...
5	0+1	.g.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	gg.	.c.	g..	a..	-
6	0+1	.g.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	..c	...	gg.	.c.	g..	a..	-
7	1+0	.g.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	..cc.	.g	a..	g..	a..	-g.
8	1+0	.g.	.g.	.c.	a..	c..	g..	.g.	.g.	..c	.a.	gg.	.c.	.g	a..	g..	-
9	1+0	.g.	g..	.g.	.g.	..c	...	gg.	a..	.t	.c	.t.	a..	g.t	gaa
		Gly	Ser	Thr	Lys	His	Glu	Gly	Ser	*	Asn	Gly	Ala	Glu	Asn	Glu	Ile	*	Asp	Val	Thr	Gly	Glu	Tyr	Arg

Adicionalmente, se compararon estas secuencias con otras más de 50 de diferentes regiones, y se pudo observar que la mayoría de las mutaciones presentes en el gen que codifica *pvcyrpa* en los parásitos del sur de México fueron comunes en parásitos de otras regiones.

4.2.2 Construcción de un árbol filogenético.

Para buscar similitudes genéticas entre los haplotipos del grupo SMX y otros a nivel mundial, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximal Likelihood, ML) mediante el método de Bootstrap (Figura 5). Además de las 22 secuencias del grupo SMX, se incluyeron las de los genomas de referencia Sal I, Belem y PvP01. El árbol filogenético de *pvcyrpa* dio lugar a dos grupos principales, A y B, presentados en dos clados con un soporte estadístico bastante alto (88% y 78%). Como se observa en la Figura 5, ambos clados aparecen separados de la muestra 760A del grupo SMX y de las secuencias de referencia Sal I, Belem y PvP01.

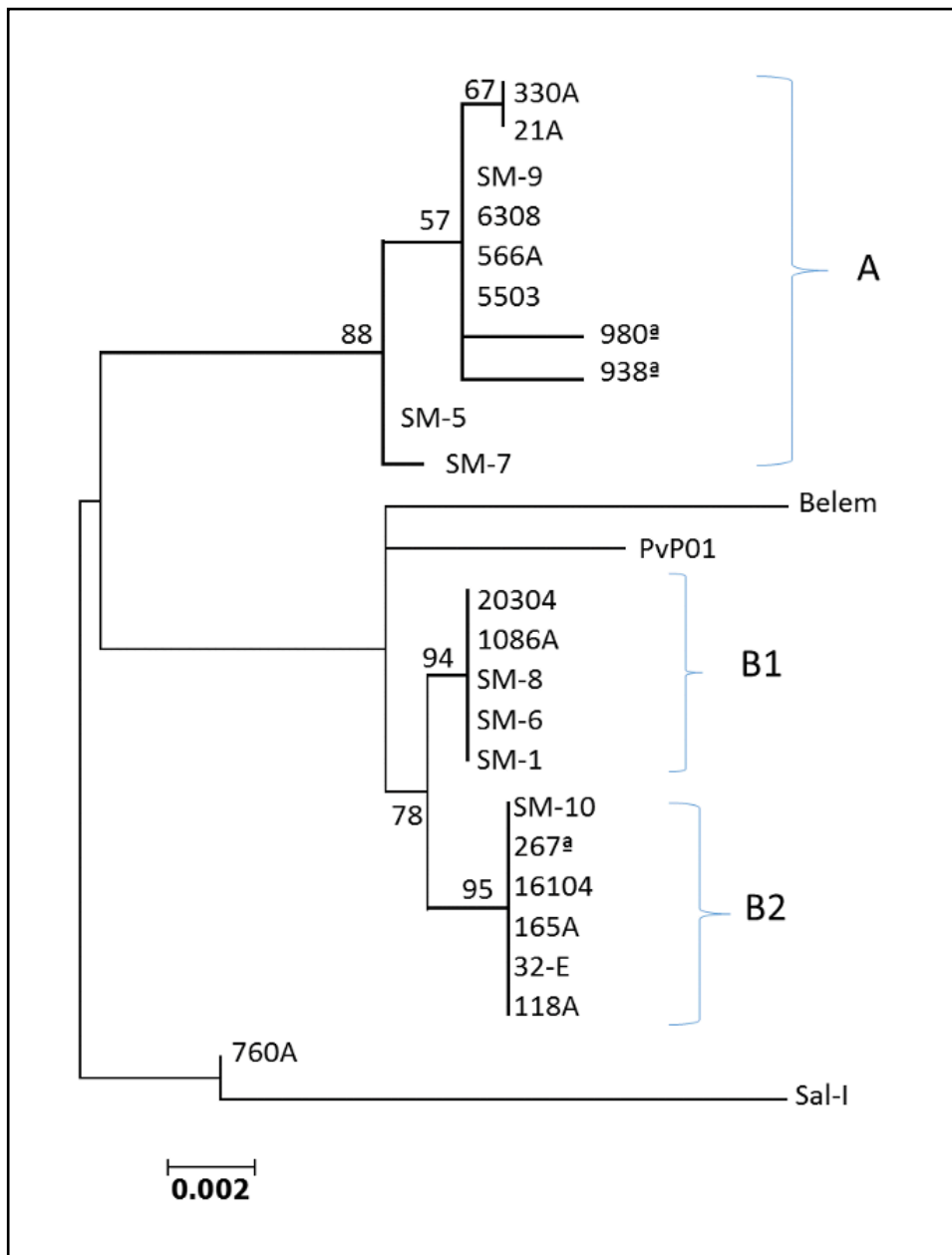


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML), por el método de Bootstrap, del gen *cyrpa* de *P. vivax* de 22 parásitos de México del Sur y 3 secuencias de referencia, Sal I (XM_001615090.1), Belem y PvP01 (PlasmoDB). Se indica Bootstrap por encima del 50%. Las secuencias utilizadas fueron obtenidas en este estudio y de PlasmoDB.

4.3 Expresión de la proteína CyRPA en células procariotas.

4.3.1 Optimización de la secuencia *pvcyrpa*.

Tras obtener la secuencia del gen *pvcyrpa* y realizar los diferentes análisis, el siguiente paso fue la expresión heteróloga de dicho gen en células procariotas, ya que este gen pertenece a un organismo eucariota.

Para realizar la expresión de la proteína en *Escherichia coli* se partió de la secuencia codificante del gen *pvcyrpa*. Se encargó su síntesis química a la compañía BioBasic, así como la optimización de la misma, teniendo en cuenta el uso de codones de *E. coli*. En la Figura 6 se muestra la secuencia *pvcyrpa* original, es decir, la que se obtuvo en este estudio, y por otro lado, la secuencia optimizada para su expresión en células procariotas. Se ajustaron una serie de parámetros para conseguir esto, entre los que se incluyen los siguientes:

- A. El sesgo de uso de codones se ajustó para adaptarse al perfil de expresión más alto de *E. coli*. El CAI (Índice de adaptación de codones) se actualizó de 0.42 a 0.95 (un CAI de 0,8 a 1,0 se considera bueno para una expresión alta).
- B. El contenido medio de GC se ajustó del 43,2% al 47,7% y se eliminaron los picos desfavorables.
- C. Se eliminaron las regiones repetidas en las secuencias originales para evitar estructuras de horquilla en el ARNm y facilitar el proceso de síntesis de la proteína.
- D. Se modificaron los motivos no deseados que incluían sitios de restricción internos correspondientes a las enzimas a utilizar en la subclonación y elementos reguladores en cis negativo.
- E. La secuencia completa se ajustó para aumentar la eficiencia de traducción y prolongar la vida media del ARNm.

4.3.1.1 Optimización del uso de codones.

Rarely Used (0)										Frequently Used (1)											
Secuencia original										Secuencia optimizada											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	ATA	GTC	ACC	AAA	ATT	GCA	ATT	TTC	CTC	TTC	1	ATC	GTT	ACC	AAA	ATC	GCG	ATC	TTC	CTG	TTC
11	TTC	TTC	CTC	TTC	TCC	TTC	CTA	AGG	TGC	CTA	11	TTC	TTT	CTG	TTC	TCC	TTC	CTG	CGC	TGC	CTG
21	AGC	ACC	AAC	ACA	CAG	AGC	AAA	AAC	ATA	ATC	21	AGC	ACC	AAC	ACC	CAG	TCC	AAA	AAC	ATC	ATC
31	ATC	CTG	AAC	GAC	GAA	ATA	ACA	ACC	ATC	AAA	31	ATC	CTG	AAC	GAC	GAA	ATC	ACC	ACC	ATC	AAA
41	AGT	CCC	ATA	CAC	TGC	ATC	ACG	GAC	ATT	TAT	41	AGC	CCG	ATC	CAC	TGT	ATC	ACC	GAC	ATC	TAC
51	TTC	CTC	TTC	CGA	AAT	GAA	CTA	TAC	AAA	ACT	51	TTC	CTG	TTC	CGC	AAC	GAA	CTG	TAC	AAA	ACC
61	TGC	ATA	CAG	CAC	GTC	ATC	AAG	GGG	AGA	ACA	61	TGC	ATC	CAG	CAC	GTT	ATC	AAA	GGC	CGT	ACC
71	GAA	ATC	CAT	GTC	CTC	GTG	CAG	AAG	AAA	ATC	71	GAA	ATC	CAC	GTT	CTG	GTT	CAG	AAA	AAG	ATC
81	AAC	AGC	ACT	TGG	GAA	ACA	CAA	ACG	ACG	CTC	81	AAC	TCC	ACC	TGG	GAA	ACC	CAG	ACC	ACC	CTG
91	TTT	AAA	GAT	CAT	ATG	TGG	TTC	GAA	CTC	CCA	91	TTT	AAG	GAT	CAC	ATG	TGG	TTC	GAA	CTG	CCG
101	TCC	GTT	TTT	AAT	TTC	ATT	CAT	AAC	GAC	GAA	101	TCC	GTG	TTC	AAC	TTC	ATC	CAC	AAC	GAC	GAA
111	ATT	ATT	ATT	GTA	ATT	TGC	AGA	TAT	AAA	CAA	111	ATC	ATC	ATC	GTT	ATC	TGC	CGT	TAC	AAA	CAG
121	AAG	TCA	AAA	AGG	GAA	GGA	ACC	AGC	TGT	GAG	121	AAA	TCC	AAA	CGC	GAA	GGT	ACC	AGC	TGC	GAA
131	CGC	TGG	AAC	AGC	GTC	ACG	GGG	ACC	ATT	TAC	131	CGT	TGG	AAC	TCT	GTG	ACC	GGC	ACC	ATC	TAC
141	AAA	AAG	GAG	GGC	GTT	CAA	ATA	GGT	AAA	GAA	141	AAA	AAA	GAA	GGT	GTT	CAG	ATC	GGC	AAA	GAA
151	GCT	TTT	GCC	AAC	AAA	AAT	TTG	GAC	TCA	TAC	151	GCG	TTC	GCT	AAC	AAA	AAC	CTG	GAC	TCC	TAC
161	CAG	TCA	GTT	CCC	CTA	ACA	GTT	AAA	GAC	AAA	161	CAG	TCT	GTA	CCG	CTG	ACC	GTT	AAA	GAC	AAA
171	AAA	TTT	TTA	CTC	ATT	TGC	GGA	ATA	CTT	TCC	171	AAA	TTT	CTG	CTG	ATC	TGC	GGT	ATC	CTG	AGC
181	TAC	GAA	TAT	GAA	ACT	CGC	AAC	AAG	GAT	AAT	181	TAC	GAA	TAT	GAA	ACC	GCT	AAC	AAA	GAC	AAC
191	TTC	ATT	TCT	TGC	GTG	GCC	AGT	GAA	GAC	AAG	191	TTC	ATC	TCT	TGT	GTT	GCG	TCT	GAA	GAT	AAA
201	GGA	AGA	ACA	TGG	GGA	ACC	AAA	ATC	CTG	ATA	201	GGT	CGT	ACC	TGG	GGC	ACC	AAA	ATC	CTG	ATC
211	AAC	TAC	GAA	GAG	CTC	CAG	AAA	GGA	ATC	CCC	211	AAC	TAC	GAA	GAA	CTG	CAG	AAA	GGT	ATC	CCG
221	TAC	TTC	TAC	CTG	CGG	CCC	ATC	ATT	TTT	GGC	221	TAC	TTC	TAC	CTG	CGT	CCG	ATC	ATC	TTC	GGT
231	GAC	GAA	TTC	GGG	TTC	TAC	TTC	TAC	TCC	CGA	231	GAC	GAA	TTC	GGC	TTC	TAC	TTC	TAC	TCC	CGT
241	ATA	AGC	ACC	AAC	AAC	ACG	GCC	CGG	GGG	GGC	241	ATC	AGC	ACC	AAC	AAC	ACC	GCA	CGT	GGC	GGC
251	AAC	TAC	ATG	ACG	TGC	ACC	CTA	GAA	GAG	CCG	251	AAC	TAC	ATG	ACT	TGC	ACC	CTG	GAA	GAA	CCG
261	AAC	GAA	AGC	AAG	AAA	TAT	AAA	TTC	AAA	TGC	261	AAC	GAA	TCT	AAA	AAA	TAC	AAA	TTC	AAA	TGC
271	AAA	CAC	GTC	AGT	CTC	ATT	AAA	CCG	GAC	AAG	271	AAA	CAC	GTT	TCT	CTG	ATC	AAA	CCG	GAC	AAA
281	TCC	CTC	CAA	AAC	GTC	ACT	AAG	CTA	AAC	GGA	281	AGC	CTG	CAG	AAC	GTG	ACC	AAA	CTG	AAA	GGT
291	TAC	TAC	ATA	ACC	AGC	TAC	GTC	AAA	AAG	GAC	291	TAC	TAC	ATC	ACC	TCT	TAC	GTG	AAA	AAA	GAC
301	AAT	TTC	AAT	GAG	TGC	TAC	CTC	TAC	TAC	ACA	301	AAC	TTC	AAC	GAA	TGC	TAC	CTG	TAC	TAC	ACC
311	GAG	CAA	AAC	GCC	ATC	GTG	GTG	AAA	CCA	AAG	311	GAA	CAG	AAC	GCG	ATC	GTT	GTT	AAA	CCG	AAA
321	GTG	CAA	AAT	GAT	GAC	CTT	AAC	GGG	TGC	TAC	321	GTG	CAG	AAC	GAC	GAC	CTG	AAC	GGT	TGC	TAC
331	GGA	GGC	TCC	TTT	GTA	AAA	CTG	GAT	GAG	TCC	331	GGT	GGC	TCC	TTC	GTG	AAA	CTG	GAT	GAA	TCT
341	AAG	GCG	CTC	TTC	ATC	TAT	TCC	ACT	GGC	TAC	341	AAA	GCG	CTG	TTC	ATC	TAC	TCC	ACC	GGC	TAC
351	GGC	GTT	CAG	AAC	ATA	CAC	ACG	CTT	TAC	TAT	351	GGC	GTT	CAG	AAC	ATC	CAC	ACC	CTG	TAC	TAC
361	ACG	AGG	TAC	GAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	361	ACC	CGT	TAC	GAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC
371	TGA										371	TAA									

Figura 6. Optimización de la secuencia del gen *pvcyrpa*. En azul y verde codones poco frecuentes en procariontas, en rojo codones frecuentes. A la izquierda aparece la secuencia original, a la derecha la secuencia optimizada.

La secuencia optimizada da lugar a una proteína que incluía una secuencia adicional de 6 histidinas en el extremo carboxilo. Esto se hizo para facilitar la purificación de la proteína mediante una columna de purificación que contenga una resina complementaria a esta cola de histidina.

4.3.1.2 Distribución de frecuencia relativa de los codones.

La distribución de frecuencia relativa de los codones muestra la frecuencia de cada codón individual y en este gráfico de radar se muestra la idoneidad del perfil del uso de codones entre la secuencia original (izquierda) u optimizada (derecha), mostradas ambas en rojo, y el hospedador bacteriano (se muestra en azul). Una mejor coincidencia de curvas significa que la secuencia será más adecuada en el proceso de traducción.

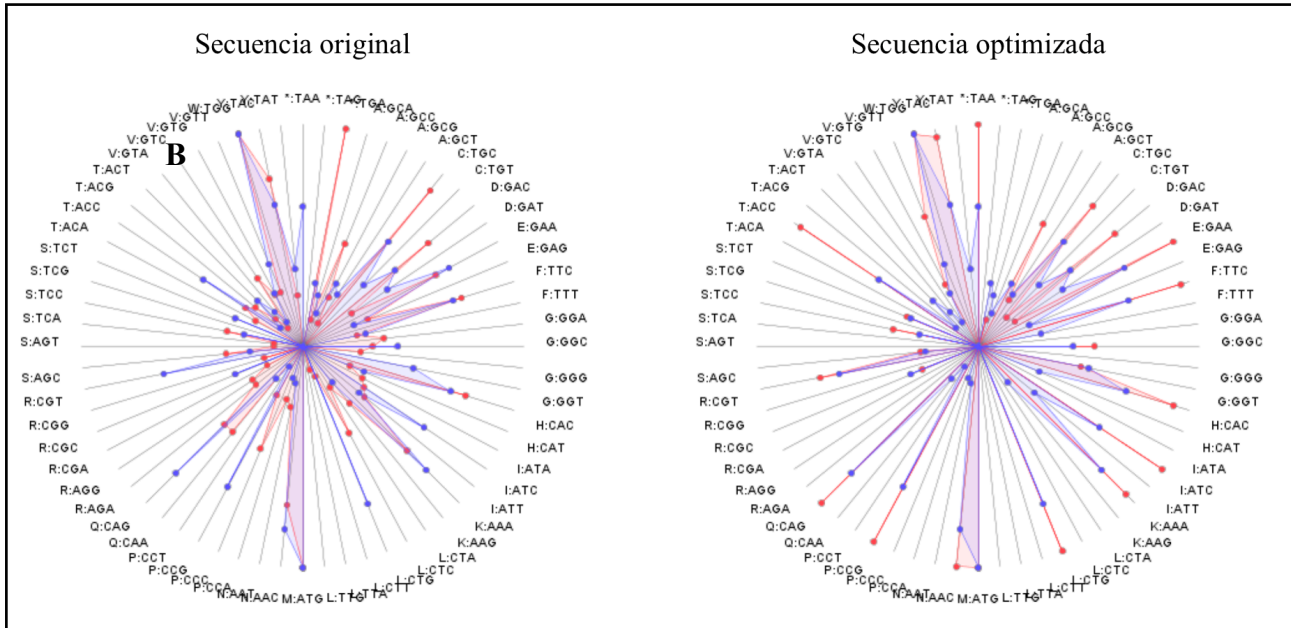
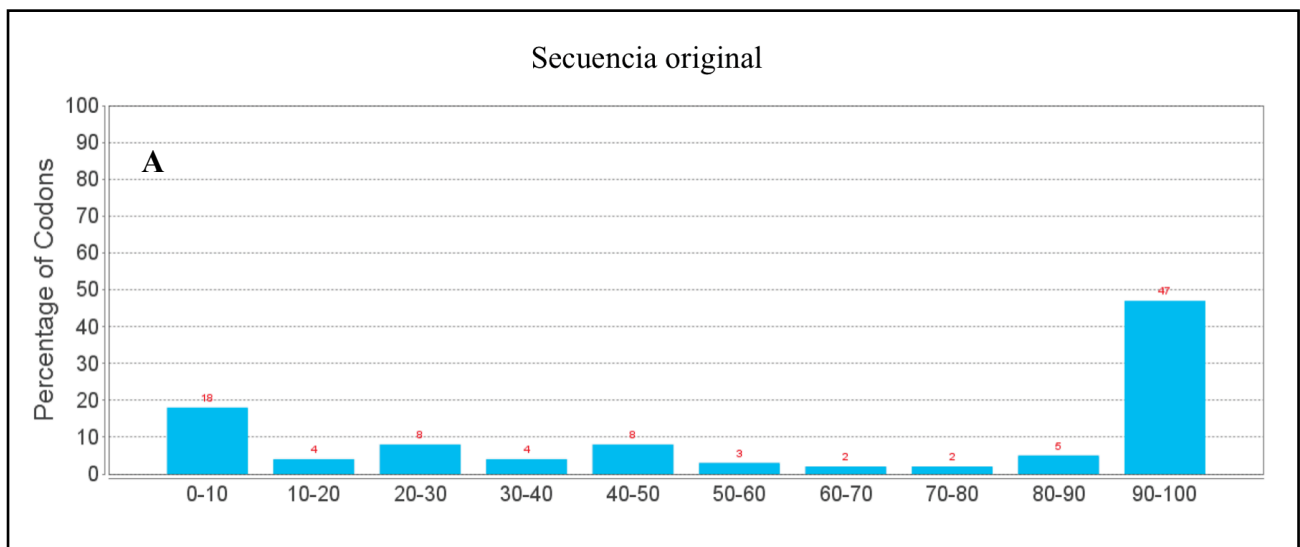


Figura 7. Gráfico radar-plot en el que se muestran los codones más frecuentes utilizados por las células procariotas (azul), mientras que con el color rojo los codones de la secuencia original a la izquierda (rojo) y la secuencia optimizada a la derecha (rojo).

Como se observa en la Figura 7, la secuencia optimizada posee una elevada coincidencia entre las diferentes curvas azul y roja, lo que nos sugiere que la secuencia posee una elevada cantidad de codones de uso frecuente en células procariotas, mientras que esto no ocurre en la secuencia original.

Se realizó una gráfica de barras en la que se muestra de una forma más clara la gráfica radar-plot anterior. En la siguiente gráfica se muestra el porcentaje de distribución de los codones. Un mayor número de codones con alto porcentaje, significa que será mayor la frecuencia con la que se usen estos codones.



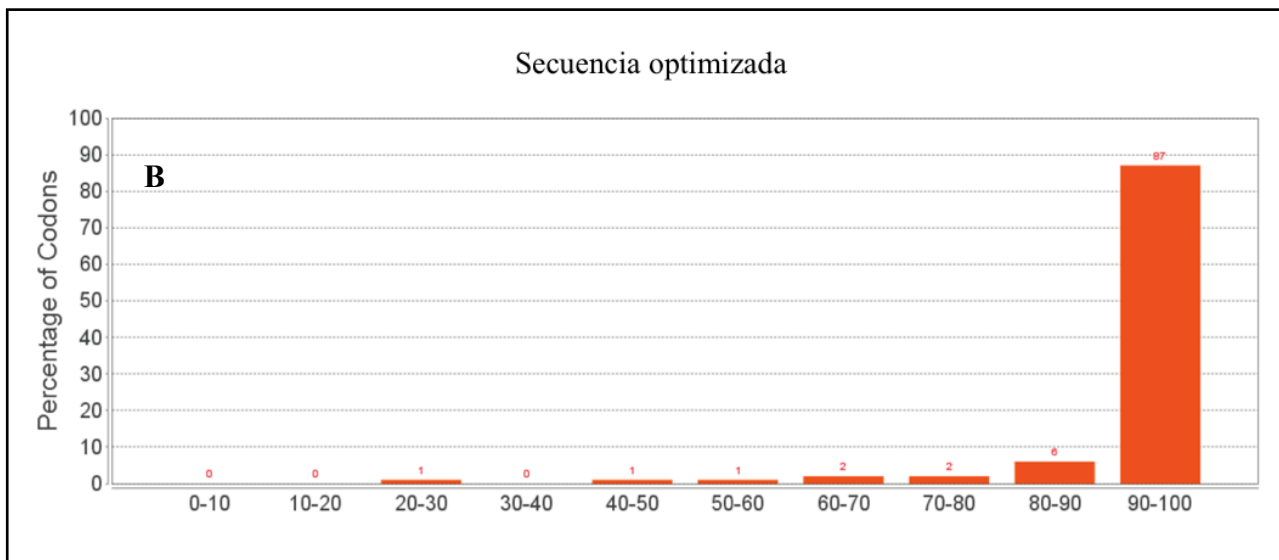
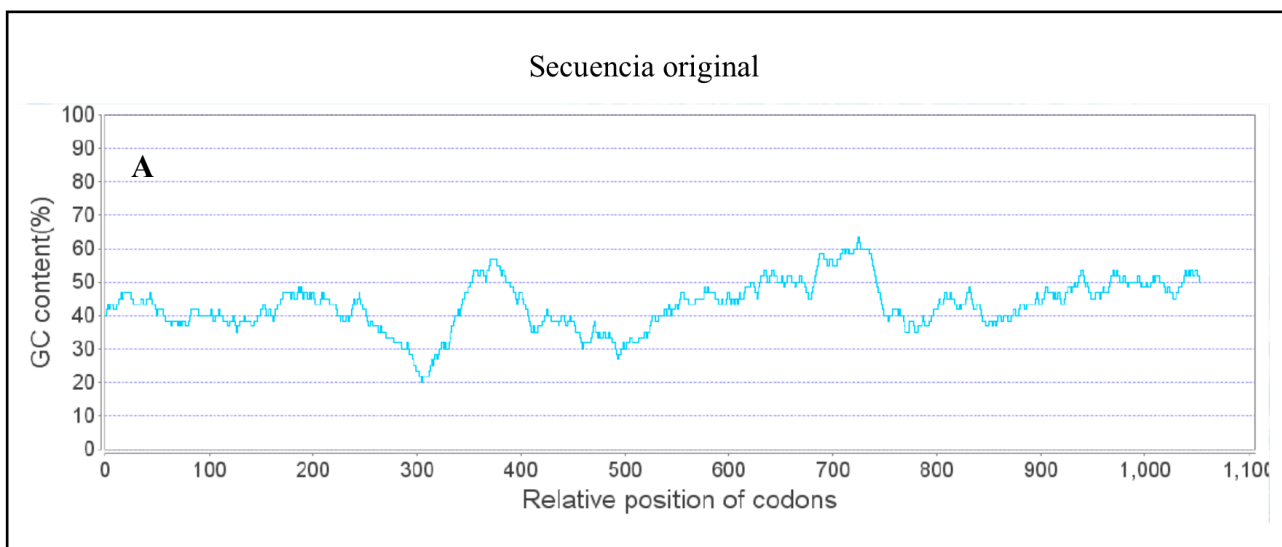


Figura 8. Gráficos que muestran la distribución de los porcentajes de codones en las distintas franjas de frecuencia de uso de codones, para las secuencias originales y optimizada. En el eje Y se observa el porcentaje de codones, mientras que en el eje X se encuentra la frecuencia de uso de codón. A, secuencia original. B, secuencia optimizada.

Como se observa en las gráficas de la Figura 8, en la secuencia optimizada el porcentaje de codones que aparecen con una frecuencia de uso de codón del 90-100% es del 87%, mientras que en la secuencia original es del 47%, por otro lado, se ha conseguido disminuir el porcentaje de codones que se encontraban en el rango de frecuencia del uso de codón 0-10%, ya que se ha pasado del 18% del porcentaje de codones al 0% en la secuencia optimizada.

4.3.1.3 Ajuste del porcentaje de CG.

El porcentaje de G+C es uno de los parámetros de optimización fundamentales. Un porcentaje ideal se encuentra entre el 30-70%, mientras que uno perfecto se encontraría entre 40-60% de GC. Además, se deben evitar los picos de %GC desfavorables.



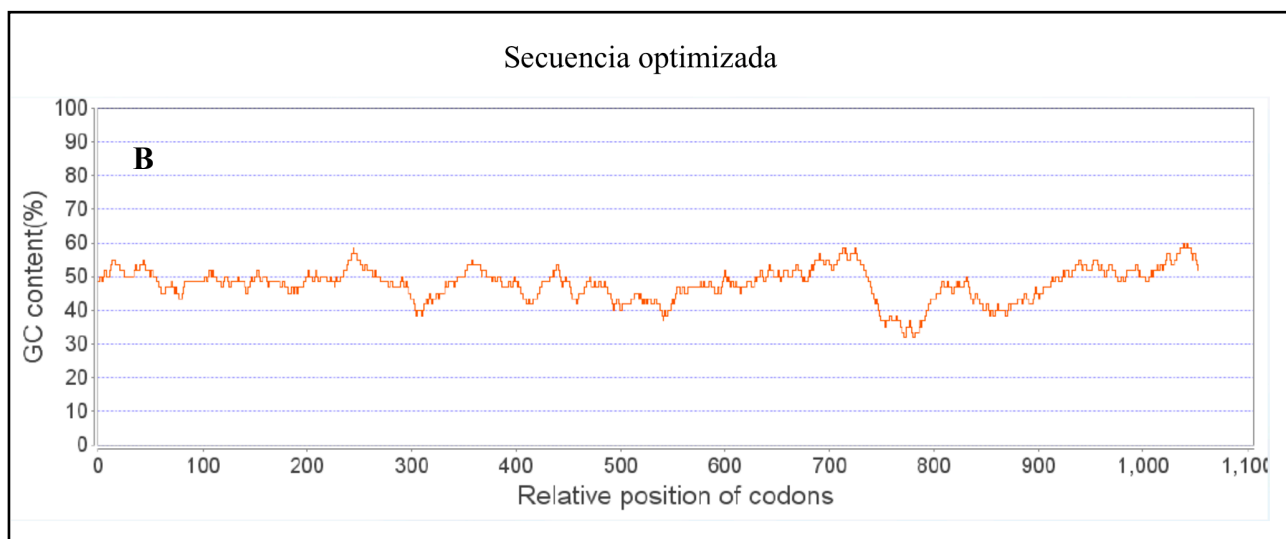


Figura 9. Gráficos que muestran el porcentaje de GC a lo largo de la secuencia original y la secuencia optimizada. A, secuencia original. B, secuencia optimizada.

Como se puede observar en la Figura 9, existen notables diferencias entre los porcentajes de GC entre la secuencia original y la optimizada. En la secuencia original el porcentaje de GC se encontraba en 43,2% y existían algunos picos de GC muy desfavorables, por ejemplo, en la posición 300, 380 o 730. Por otro lado, la secuencia optimizada posee un porcentaje de GC del 47,7%, y presenta menos variación que la anterior.

4.3.1.4 Eliminación de las secuencias repetidas y de los motivos de secuencia no deseados.

Se han modificado aquellas secuencias que se encontraban repetidas, en concreto 3. Esta modificación se ha realizado permitiendo que el mismo aminoácido sea codificado por otro triplete de nucleótidos, evitando así la repetición de secuencias. Se ha realizado el mismo proceso para eliminar motivos de secuencia que no eran de interés, como una diana para la enzima de restricción *NdeI* en la posición 279 - 285 pb, o un RBS (sitio de unión al ribosoma) en la posición 424 - 430 pb.

4.3.1.5 Alineamiento entre la secuencia optimizada y la secuencia original.

Una vez realizados todos estos cambios se obtuvo la secuencia optimizada. Posteriormente se realizó un alineamiento entre esta secuencia y la original (Figura 10). Además, se comprobó que la proteína resultante era la misma en ambos casos a pesar de los cambios realizados.

Protein	I V T K I A I F L F F F L F S F L R C L S T N T Q S K N I I
Original 1	ATAGTCACCAAAATGCAATTTTCCTCTTCTTTCTTCTCTTCTCCTTAAGGTGCCTAAGCACCAACACACAGAGCAAAAAACATAATC
Optimized	ATCGTT ACCAAA ATCGGAT CTTCTCTGT TCTTCT TTTCTGT TCTCCTT CTGCGCTGCCTG AGCACCA ACCAGTCC AAAA ATCATC
Protein	I L N D E I T T I K S P I H C I T D I Y F L F R N E L Y K T
Original 91	ATCCTGAACGACGAAATAACAACCATCAAAAGTCCCATACACTGCATCAGGACATTTATTTCTTCTCCGAAATGAACATATACAAACT
Optimized	ATCCTGAACGACGAA ATCACC ACCATCAAA AGCCGATCC TGTATACC GAC ATCTACTTCCTG TT CCGAACGA CTGTACAAA ACC
Protein	C I Q H V I K G R T E I H V L V Q K K I N S T W E T Q T T L
Original 181	TGCATACAGCACGTCAATCAAGGGGAGAAGAAATCCATGTCCCTCGTGCAGAGAAAATCAACAGCACTTGGGAACACAAACGACGCTC
Optimized	TGC ATCC AGCAC GTATCA AAAGGCGTACC GAAAT CACGTTCTGGTT CAG AAAA AGATCA ACCCTGGGAA ACCAGACCACCTG
Protein	F K D H M W F E L P S V F N F I H N D E I I I V I C R Y K Q
Original 271	TTTAAAGATCATATGTGGTTCGAACTCCCATCCGTTTTTAAATTTTCAATCATAACGACGAAATTATTATTGTAATTTGCAGATATAACAA
Optimized	TTCAAGGATCAC ATGTGGTTCGAA CTGCGCTCCGTTC AACCTTCA TC CCAC ACAGCA ATCATCATCGTTAT CG CGTTAC AA ACAG
Protein	K S K R E G T S C E R W N S V T G T I Y K K E G V Q I G K E
Original 361	AAGTCAAAAAGGAAGGAACAGCTGTGAGCGTGGAACAGCGTCACGGGGACCATTACAAAAAGGAGGGCGTTCAAATAGTAAAGAA
Optimized	AAATCC AAA CGG AA AGGTACCAGCTCG GA ACCTT GA ACTCTGTG AC CGGCC ACC ATCT ACAAA AAAG AG GTGTT CAG ATCGG CA AGAA
Protein	A F A N K N L D S Y Q S V P L T V K D K K F L L I C G I L S
Original 451	GCTTTTGCCAAACAAAATTTGGACTCATACCAGTCAGTTCGCCCTAACAGTTAAAGACAAAAATTTTACTCATTTCGCGAATCACTTTCC
Optimized	GCGTTC GC TAA CAAA AACTG GA CTCC TACCAG TCTGT ACC CGTG AC CGTT AAAGACAAAA ATCC TG TGAT CG CGG TAT CTTG AG CG
Protein	Y E Y E T A N K D N F I S C V A S E D K G R T W G T K I L I
Original 541	TACGAATATGAAACTGCGAACAAAGGATAATTTTCAATTTCTTGGCTGGCCAGTGAAGACAAGGAAGAACATGGGAAACAAAATCCTGATA
Optimized	TACGAATATGAA ACCGCT A ACAAG CA ACTTCA T CTTGTGT GC CTGAA GATA AGGTCGT AC CTGG GCACAAAAT CTCT GA TC
Protein	N Y E E L Q K G I P Y F Y L R P I I F G D E F G F Y F Y S R
Original 631	AACTACGAAGAGTCCAGAAAGGAATCCCTACTTCTACCTGCGGCCATCATTTTGGGCGAGAAATTCGGGTTCTACTTCTACTCCCGA
Optimized	AACTACGA GA ACTG CGA AA AGGTAT CC CGT ACTTCTAC CTCG T CCGATCATCT T CGGT GACGAAT TCGG CTTCTACTTCTACT CCGT
Protein	I S T N N T A R G G N Y M T C T L E E P N E S K K Y K F K C
Original 721	ATAAGCACCAACACACGGCCCGGGGGCAACTACATGACGTGCACCTAGAAGAGCCGAACGAAAGCAAGAAATATAAATCAAATGC
Optimized	ATCAG CA CAAC AA ACCG CA CGTGG CGCA ACTACAT ACT TGCACC T GGAA GA ACCG AA CAATCT AAAA ATA CA AAATCAA ATGC
Protein	K H V S L I K P D K S L Q N V T K L N G Y Y I T S Y V K K D
Original 811	AAACACGTGCTCATTAACCGGACAAAGTCCCTCCAAAACGTCACTAAGCTAAACGGATACTACATAACAGCTACGTCAAAAAGGAC
Optimized	AAACAC GT T CTCTG ATCA AA CCGGAC AAAAG CT GCAG A ACGTG AC CAACTG A ACGGT TACTAC ATCAC T CTTAC GT GAAA AGAC
Protein	N F N E C Y L Y Y T E Q N A I V V K P K V Q N D D L N G C Y
Original 901	AATTTCAATGAGTGCTACCTCTACTACAGAGCAAAACGCCATCGTGGTGAACCAAGGTGCAAAATGATGACCTTAACGGGTGCTAC
Optimized	AACTTCA AC GAA T GCTAC CT TACTAC CC GAA CA AGCG AT CGTTG TT AAACCG AA AGTG C AGAAC GC GACCTG A ACGGT TGCTAC
Protein	G G S F V K L D E S K A L F I Y S T G Y G V Q N I H T L Y Y
Original 991	GGAGGCTCCTTTGTAAAACGGATGAGTCCAAGGCGCTCTTCATCTATTCCACTGGCTACGGCGTTTCAGAACATACACAGCTTTACTAT
Optimized	GGTGG CT CTTCG TGA AACTG GA TGA CT AAAG CG CTT CA CTACT CC ACCG CTACGG CTTC AGAAC ATCC AC ACCG T TACTAC
Protein	T R Y D H H H H H *
Original 1081	ACGAGGTACGACCACCACCACCACCTGA
Optimized	ACCG T TAC GACCACCACCACC ACTAA

3' Flanking

Figura 10. Alineamiento entre la secuencia original y la secuencia optimizada.

4.2 Expresión de CyRPA en pET9(+).

Una vez que se obtuvo la secuencia optimizada del gen *pvcyrpa*, ésta se clonó en un vector de expresión procariota pET-9a(+) empleando los sitios de clonación *NdeI* y *BamHI*. La construcción resultante posee la secuencia codificante de *cyrpa* bajo el control del promotor del fago T7 (Figura 11).

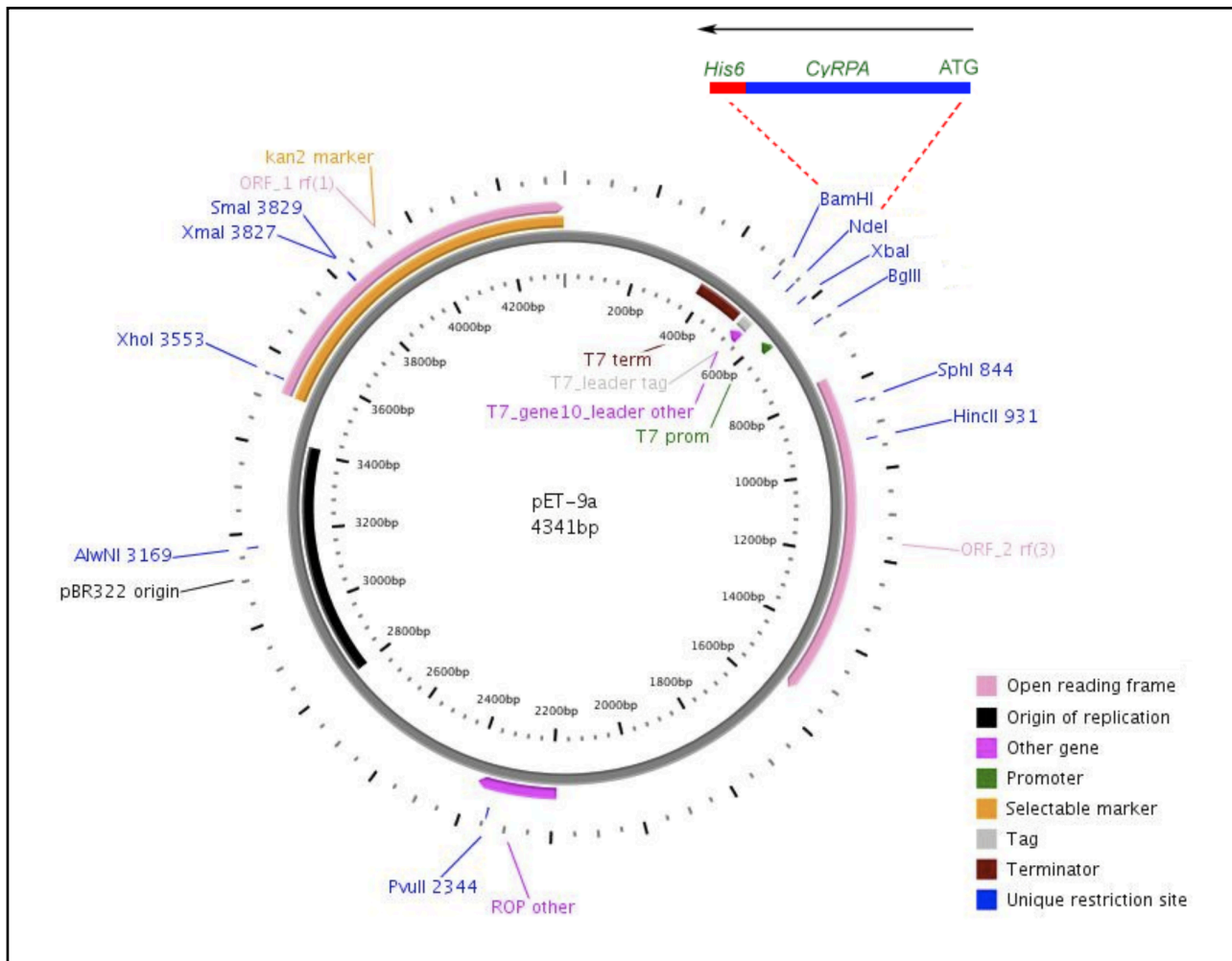


Figura 11. Vector de expresión con el gen *pvcyrpa* clonado en los sitios *BamHI* y *NdeI* del plásmido pET-9a.

Como se observa en la Figura 11, el gen que codifica para la proteína CyRPA se encuentra entre las dianas de las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI*, que son las utilizadas para clonar el gen en este vector. Una vez que se ha clonado, se procedió a la transformación de las células competentes BL21(DE3). Esta cepa contiene el gen de la polimerasa T7 bajo el control de un promotor Lac inducible por IPTG (isopropil-tiogalactósido).

La cepa empleada contenía además tres genes que codifican para tRNAs raros para evitar un bajo nivel de expresión debido a la limitación por el uso de codones. Estos genes se localizan en dos plásmidos adicionales, un plásmido que contiene el gen de resistencia a la streptomicina (STRP) y otro al cloranfenicol (CFN). El vector pET-9a (+) por otro lado, posee el gen de resistencia a kanamicina (KAN) que permite la selección de las bacterias transformadas con el plásmido de expresión.

Una vez que se transformaron las células competentes BL21(DE3), se procedió a realizar el experimento de inducción. En este experimento se induce la síntesis de la proteína CyRPA con IPTG, que como se ha comentado anteriormente, induce al promotor Lac, bajo cuyo control se encuentra el gen de la polimerasa de T7, que lleva a cabo la transcripción del gen *cyrpa*.

Para comprobar si el experimento de inducción había funcionado, se realizó una electroforesis de proteínas (Figura 12), en la que se analizaron los extractos obtenidos a partir de dos clones transformantes diferentes (A y B) inducidos a diferentes tiempos (3h, 6h y durante toda la noche). Como control negativo se incluyó el extracto de células no inducidas.

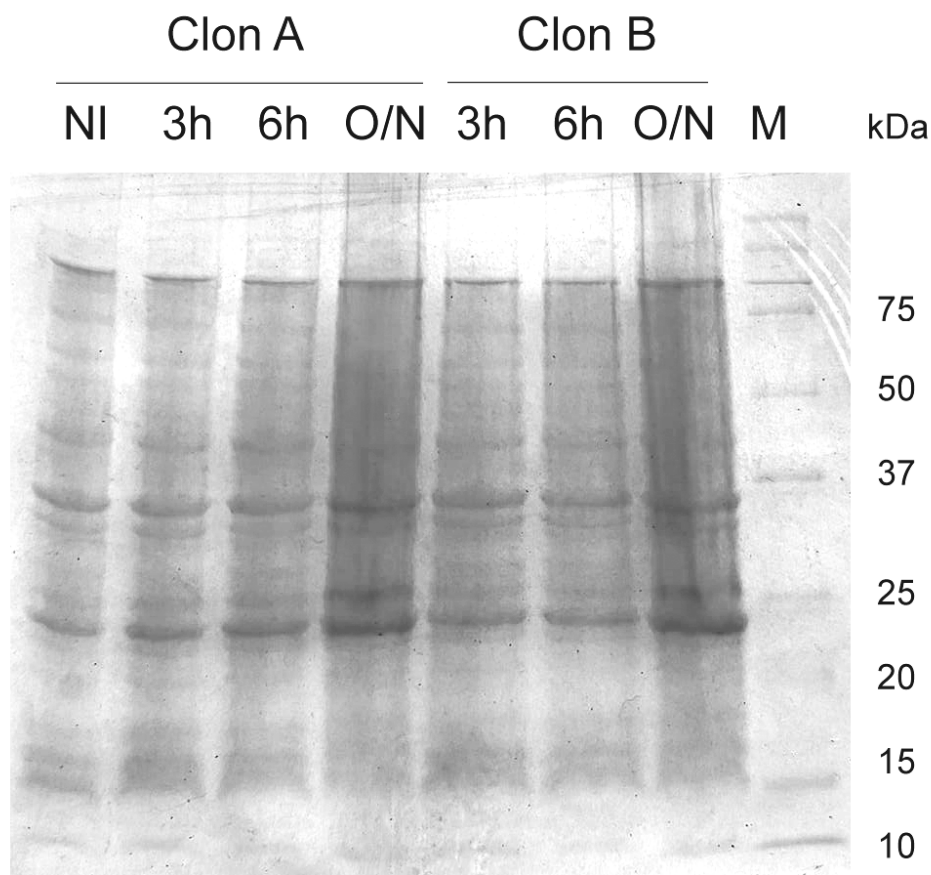


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.. Ver explicación en el texto. NI: muestra no inducida. M: marcador. Se indican los pesos moleculares de los marcadores en kDa.

Como se observa en la Figura 12, no se aprecian diferencias en la composición de los extractos inducidos frente a la muestra no inducida, no apreciándose la esperada aparición de una banda adicional de alrededor de 42 kDa correspondiente a la proteína CyRPA. Esto indica que el nivel de expresión no es suficiente como para poder visualizar la proteína de interés. Experimentos adicionales en los que se modificó la concentración del inductor IPTG también resultaron negativos. Una de las posibles causas de estos resultados es que la proteína CyRPA resulte tóxica para la bacteria, algo que se ha visto que ocurre a veces en estos sistemas de expresión. En estos casos es frecuente que la bacteria tienda a eliminar el plásmido a medida que se va multiplicando, debido también a la degradación del antibiótico de selección, lo que se conoce como inestabilidad del plásmido de

expresión, de manera que en el momento de realizar la inducción de los cultivos, estos contendrían predominantemente células sin plásmido, o con un reducido número de copias.

Para comprobar si este era el caso se realizó un experimento de estabilidad de plásmido mediante el que se determina qué proporción de las células mantienen dicho plásmido y la capacidad de expresar la proteína de interés. Para ello, el cultivo bacteriano que se va a inducir (crecido hasta $OD_{600} = 0,6$) se plaquea en los siguientes medios: LB ; LB + KANAMICINA; LB + IPTG; LB + IPTG + KANAMICINA

En el experimento se emplearon tres clones diferentes (C, E y F) procedentes de la transformación inicial de BL21(DE3) con el plásmido de expresión. En cada placa se sembró una misma dilución de dos cultivos (clones C, E y F), se incubó durante 24 horas a 37°C y se contabilizó el número de colonias que crecieron en cada medio de cultivo (Tabla 6 y Figura 13).

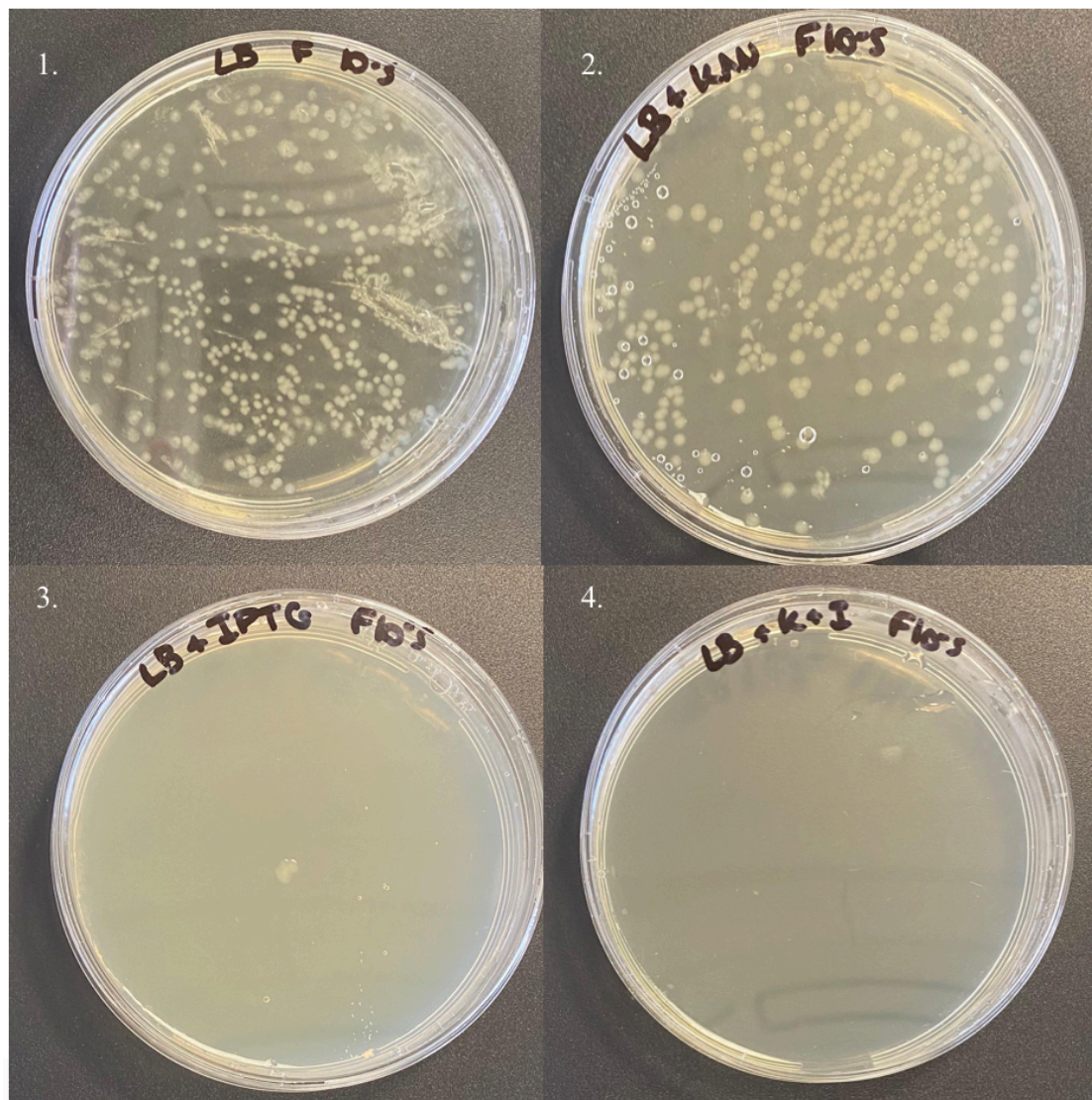


Figura 13. Placas de petri correspondientes al ensayo de estabilidad del plásmido de expresión. Véase explicación en el texto.

Tabla 6. Determinación del número de colonias obtenido en cada uno de los medios empleados en el ensayo de estabilidad del plásmido de expresión para cada uno de los clones empleados. Ver explicación en el texto.

DILUCIÓN 10 ⁻⁵	LB	LB + KANAMICINA	LB + IPTG	LB + KANAMICINA + IPTG
CLON C	296	253	0	0
CLON E	390	312	1	0
CLON F	390	340	1	0

Los resultados de este ensayo nos confirman la presencia del vector pET9a (+) en las células BL21(DE3) debido a que son capaces de crecer tanto en LB como en LB + Kanamicina, ya que la resistencia a este antibiótico es proporcionada por el vector pET9a (+) como se comentó anteriormente. Por otro lado, cuando se añade IPTG al medio se detiene por completo el crecimiento de las células, lo que nos sugiere nuevamente que la gran mayoría de las células mantienen un alto número de copias del plásmido de expresión y que el inductor IPTG está funcionando de manera correcta, induciendo la producción de la polimerasa de T7 y presumiblemente también la transcripción del gen *cyrpa*, ya que la célula detiene su crecimiento debido a la expresión del gen heterólogo.

Por lo tanto, se plantearon varias hipótesis que pudieran explicar el resultado negativo de la electroforesis de proteínas. Una de ellas es que el nivel de expresión sea bajo y que la banda diferencial entre las muestras inducidas y no inducidas estuviera ahí, pero solapándose con otras proteínas más abundantes. Para comprobar esto se llevó a cabo un análisis mediante Western-blot empleando un anticuerpo frente a la secuencia terminal de histidinas fusionada a la proteína CyRPA. Los resultados (no mostrados) fueron sin embargo nuevamente negativos ya que no pudimos detectar la proteína de interés.

Existen diversas posibilidades que podrían explicar el bajo o nulo nivel de expresión. En primer lugar, cabría pensar en la inestabilidad de la proteína CyRPA en el sistema de expresión bacteriano. Se ha descrito que la presencia de determinados aminoácidos en las primeras posiciones de la proteína favorecen una degradación más rápida de ésta⁴⁵. Concretamente la presencia de ciertos aminoácidos voluminosos tras la metionina hace que la proteína sea etiquetada para su rápida degradación. Sin embargo, en nuestro caso la secuencia que tenemos es Met-Ile, y en dicho estudio la Ile no corresponde a ninguno de los aminoácidos desestabilizantes.

La presencia de otros sitios de iniciación de la traducción en posición interna puede descartarse ya que, como se comentó, durante el proceso de optimización del gen se modificó la secuencia de un posible sitio de iniciación interno. Lo mismo cabe decir en relación con la existencia de estructura secundaria en el mRNA transcrito que pudiese interferir con la iniciación de la síntesis de proteínas, ya que se eliminaron secuencias que pudiesen generar horquillas.

Otra posible explicación, al menos teóricamente, podría ser la degradación prematura del mRNA, debido a alguna característica particular de la secuencia de este RNA. Sin embargo, en los casos en que se ha investigado a fondo la baja expresión del gen de interés, los niveles del RNA han resultado normales.

Actualmente estamos llevando a cabo la expresión de *pvycyrpa* en células eucarióticas de insecto a través de la infección con baculovirus, donde esperamos poder solventar las dificultades encontradas hasta ahora.

CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones que se obtienen de esta investigación son las siguientes:

- El gen *cyrpa* de muestras de sangre seca de pacientes afectados de malaria ha sido aislado, y las secuencias de las siete muestras analizadas han sido depositadas en GenBank, la base de datos del NIH estadounidense en la que se encuentran depositadas las secuencias de más de 300.000 especies.
- Se ha observado, en las diferentes secuencias obtenidas en este estudio y en otras de un origen similar, diferencias tanto a nivel genético como en la secuencia de aminoácidos. Esto, probablemente sea debido a la elevada capacidad de adaptación que poseen los protozoos parásitos del género *Plasmodium*, lo que hace que sea tan difícil desarrollar una vacuna efectiva contra ellos.
- El gen *cyrpa* ha sido clonado en un vector procariota, pET-9a(+), y con la construcción resultante se han transformado células de *E. coli*, comprobando que la estrategia de expresar de manera heteróloga el producto de este gen en un organismo procariota no da resultados satisfactorios en cuanto a la producción de la proteína.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Girard, M. P., Reed, Z. H., Friede, M. & Kieny, M. P. A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine* **25**, 1567-1580 (2007).
2. Harrison, J. & Matson, P. Patterns and controls of nitrous oxide emissions from waters draining a subtropical agricultural valley. *Global Biogeochem. Cycles* **17**, n/a-n/a (2003).
3. Garrido-Cardenas, J. A., Cebrián-Carmona, J., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F. & Mesa-Valle, C. Analysis of Global Research on Malaria and Plasmodium vivax. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, 1928 (2019).
4. Levine, N. D. *The Protozoan Phylum Apicomplexa Volume I. Volume II.* (1988).
5. Ejigiri, I. & Sinnis, P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 401-407 (2009).
6. McIntosh, H. & Olliaro, P. Artemisinin derivatives for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1999). doi:10.1002/14651858.cd000256
7. Muñoz, J. *et al.* ¿Cuánta primaquina es necesaria para erradicar los hipnozoitos de Plasmodium vivax? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**, 29-30 (2006).
8. Ellis, R. D., Sagara, I., Doumbo, O. & Wu, Y. Blood stage vaccines for Plasmodium falciparum: Current status and the way forward. *Hum. Vaccin.* **6**, 627-634 (2010).
9. Bozdech, Z. *et al.* The transcriptome of Plasmodium vivax reveals divergence and diversity of transcriptional regulation in malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16290-16295 (2008).
10. Gilson, P. R. *et al.* Evaluation of 4-amino 2-anilinoquinazolines against Plasmodium and other apicomplexan parasites in vitro and in a P. Falciparum Humanized NOD-scid IL2R null Mouse Model of Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1-44 (2019). doi:10.1128/AAC.01804-18
11. Alonso, P. L. *et al.* A research Agenda to underpin Malaria Eradication. *PLoS Med.* **8**, (2011).
12. Carter, R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* **19**, 2309-2314 (2001).
13. Lopez-Rodriguez, M. H. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Rev. Biomed.* **19**, 61-79 (2008).
14. Coppi, A. *et al.* The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J. Exp. Med.* **208**, 341-356 (2011).
15. Miura, K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 765-781 (2016).
16. Paula, D. *et al.* Malaria : revisión bibliográfica . Malaria : bibliographic review . 162-175 (2020).
17. Kurtovic, L. *et al.* Multifunctional Antibodies Are Induced by the RTS,S Malaria Vaccine and Associated With Protection in a Phase 1/2a Trial. *J. Infect. Dis.* 1-11 (2020). doi:10.1093/infdis/jiaa144

18. Sun, P. *et al.* Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN-gamma. *J. Immunol.* **171**, 6961-7 (2003).
19. Cohen, J., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R., Vekemans, J. & Leach, A. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Hum. Vaccin.* **6**, 90-96 (2010).
20. Alonso, P. L. Malaria : deploying a candi- date vaccine (RTS , S / AS02A) for an old scourge of. *Heal. (San Fr.* 83-93 (2006).
21. Wilby, K. J., Lau, T. T. Y., Gilchrist, S. E. & Ensom, M. H. H. Mosquirix (RTS,S): A novel vaccine for the prevention of Plasmodium falciparum malaria. *Ann. Pharmacother.* **46**, 384-393 (2012).
22. van Schaijk, B. C. L. *et al.* A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on P. falciparum b9/slarp gene-deficient sporozoites. *Elife* **3**, (2014).
23. Roestenberg, M. *et al.* A double-blind, placebo-controlled phase 1/2a trial of the genetically attenuated malaria vaccine PfSPZ-GA1. *Sci. Transl. Med.* **12**, 1-10 (2020).
24. Mordmüller, B. *et al.* Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature* **542**, 445-449 (2017).
25. Bijker, E. M. *et al.* Novel approaches to whole sporozoite vaccination against malaria. *Vaccine* **33**, 7462-7468 (2015).
26. Richards, J. S. *et al.* Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to Plasmodium falciparum malaria for vaccine and biomarker development. *J. Immunol.* **191**, 795-809 (2013).
27. Lin, C. S. *et al.* Multiple plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **291**, 7703-7715 (2016).
28. Garrido-Cardenas, J. A., Mesa-Valle, C. & Manzano-Agugliaro, F. Genetic approach towards a vaccine against malaria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 1829-1839 (2018).
29. Shobhona, S. & Sulabha, P. Malaria vaccine: a current perspective. *J. Vector Borne Dis.* **45**, 1-20 (2008).
30. Escalante, A. A. *et al.* A monkey's tale: The origin of Plasmodium vivax as a human malaria parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1980-1985 (2005).
31. Mordmüller, B. *et al.* Direct venous inoculation of Plasmodium falciparum sporozoites for controlled human malaria infection: A dose-finding trial in two centres. *Malar. J.* **14**, 0-10 (2015).
32. Crompton, P. D., Pierce, S. K. & Miller, L. H. Science in medicine Advances and challenges in malaria vaccine development. *Heal. (San Fr.* **120**, 4168-4178 (2010).
33. Vanderberg, J. P. Reflections on early malaria vaccine studies, the first successful human malaria vaccination, and beyond. *Vaccine* **27**, 2-9 (2009).

34. Heppner, D. G. The malaria vaccine-Status quo 2013. *Travel Med. Infect. Dis.* **11**, 2-7 (2013).
35. Thera, M. A. & Plowe, C. V. Vaccines for Malaria: How Close Are We? *Annu. Rev. Med.* **63**, 345-357 (2012).
36. Arévalo-Herrera, M. & Herrera, S. Plasmodium vivax malaria vaccine development. *Mol. Immunol.* **38**, 443-455 (2001).
37. Chen, E., Salinas, N. D., Ntumngia, F. B., Adams, J. H. & Tolia, N. H. Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for Plasmodium vivax Malaria Vaccine Design. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, 1-15 (2015).
38. Volz, J. C. *et al.* Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *Cell Host Microbe* **20**, 60-71 (2016).
39. Favuzza, P., Dreyer, A. M., Wittlin, S., Matile, H. & Pluschke, G. Cysteine-Rich Protective Antigen (CyRPA) as promising blood-stage candidate protein for inclusion in a malaria subunit vaccine. *Malar. J.* **11**, 1-2 (2012).
40. Favuzza, P. *et al.* Generation of Plasmodium falciparum parasite-inhibitory antibodies by immunization with recombinantly-expressed CyRPA. *Malar. J.* **15**, 1-14 (2016).
41. Tamborrini, M. *et al.* Vaccination with virosomally formulated recombinant CyRPA elicits protective antibodies against Plasmodium falciparum parasites in preclinical in vitro and in vivo models. *npj Vaccines* **5**, 1-8 (2020).
42. Knuepfer, E. *et al.* Divergent roles for the RH5 complex components, CyRPA and RIPR in human-infective malaria parasites. *PLoS Pathog.* **15**, 1-25 (2019).
43. França, C. T. *et al.* Identification of Highly-Protective combinations of plasmodium vivax recombinant proteins for vaccine development. *Elife* **6**, 1-22 (2017).
44. J. M. RUBIO, A. BENITO, J. ROCHE, P. J. BERZOSA, M. L. GARCI'A, M. MICO' , M. EDU' , A. J. A. Semi-Nested, Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Human Malaria Parasites and Evidence of Plasmodium Vivax Infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 183-187 (1999).
45. Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. & Varshavsky, A. The N-end rule in bacteria. *Science (80-)*. **254**, 1374-1377 (1991).