

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

EXPRESIÓN Y PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA HSP70-817

(HEAT SHOCK PROTEIN) EN EL DESARROLLO SEXUAL DE

Plasmodium berghei

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

PRESENTA

IBT. VIANEY SALDAÑA NAVOR

COMITÉ DE TESIS:

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

> ASESORES: DR. MARIO HENRY RODRÍGUEZ LÓPEZ DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Patogénesis Molecular del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Rodríguez Gutiérrez.



Este trabajo es parte del proyecto "Determinación de la participación de moléculas de la superficie y del complejo apical de los oocinetos de *Plasmodium vivax* en la susceptibilidad diferencial de los mosquitos *An. albimanus y An. pseudopunctipennis*". Con número de registro ante CONACYT 107006.



Además, agradezco el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el sistema de becas de posgrado con número de becario 319594.

ÍNDICE

1. II	NTRODUCCIÓN	iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1.	Malaria	iError! Marcador no definido.
1.2.	Plasmodium	iError! Marcador no definido.
1.3.	Ciclo de vida de Plasmodium	n _i Error! Marcador no definido.
1.5.	Diferenciación de cigoto a oc	cinetoiError! Marcador no definido.
1.6.	HSP70 en <i>Plasmodium</i>	iError! Marcador no definido.
2. J	USTIFICACIÓN	iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3. ⊢	IIPÓTESIS	iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.	OBJETIVOS	iError! Marcador no definido.
4.1.	GENERAL	iError! Marcador no definido.
4.2.	ESPECÍFICOS	iError! Marcador no definido.
5. N	IETODOLOGÍA	iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.1.	Parásitos	iError! Marcador no definido.
5.1 Ma	.1. Producción y purificación rcador no definido.	n de gametocitos y gametosiError!
5.1	.2. Cultivo y purificación de	e cigotos ¡Error! Marcador no definido.
5.1	.3. Cultivo y purificación de	oocinetosiError! Marcador no definido.
5.2.	Western blot	iError! Marcador no definido.
5.3.	Inmunofluorescencia indirec	taiError! Marcador no definido.
5.4.	Ensayo de inhibición del des	arrollo del parásito ¡Error! Marcador no
aetini	100.	
5.4	.1. Efecto en la fertilización.	iError! Marcador no definido.

5.4.2. Efecto en el desarrollo de cigotos a oocinetos..... ¡Error! Marcador no definido.

Producción y purificación de los diversos estadios (gametocitos, 6.1. ganetos, cigotos y oocinetos) de la fase sexual de P. berghei ¡Error! Marcador no definido. 6.2. Obtención de proteínas totales de los diversos estadios de la fase sexual*P.berghei*.....iE rror! Marcador no definido.30 Analisis de la presencia de la proteína HSP70-817 en los diversos 6.3. 6.4. Inmunolocalización de la proteína HSP70-817 en los diversos estadios de la fase sexual de *P. berghei*iError! Marcador no definido. 6.5. Efecto del anticuerpo α-HSP70-817 en el proceso de fertilización y DISCUSIÓN......iERROR! MARCADOR NO DEFINIDO. 7.

11. REFERENCIAS ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium*, transmitidos al humano a través de la picadura de mosquitos vectores del género *Anopheles sp.* El ciclo de vida de *Plasmodium* comprende una etapa asexual y una sexual que se llevan a cabo en un hospedero vertebrado (humano) y un invertebrado (mosquito) respectivamente. Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia altamente conservada en la evolución. Particularmente las proteínas de choque térmico tipo HSP70, son de las más abundantes y conservadas. Estas proteínas se han encontrado en células de mamíferos, levaduras, bacterias y parásitos, participando en diversos procesos biológicos como plegamiento, degradación y tráfico de proteínas, reconocimiento e interacción celular, entre otros.

Estudios recientes indican que las HSP70's tienen un papel esencial en el ciclo de vida del parásito Plasmodium por ejemplo, en P. falciparum se ha observado que algunas HSP70's participan en el desarrollo y patogénesis durante el ciclo asexual. Estudios sobre la participación de estas proteínas durante el desarrollo sexual de Plasmodium aún no han sido reportados. La diferenciación del parásito en el intestino del mosquito vector es un proceso dinámico y determinante en su ciclo de vida, que comprende las siguientes fases: la gametogénesis, fertilización, formación de un cigoto que se desarrolla a una forma móvil e invasiva, el oocineto, que invade el intestino del mosquito y madura a ooquiste, éste a su vez forma esporozoítos que invaden las glándulas salivales. Estas fases comprenden el ciclo sexual que culmina con la fase infectiva en el mosquito para la transmisión del parásito al humano. En el genoma de P. berghei se han identificado genes que codifican diferentes HSP70's. Estudios realizados nuestro grupo de trabajo sugieren que una de estas proteínas en (PBANKA_121930) participa en la fertilización en P. berghei. Además, estudios proteómicos de los organelos que participan en el proceso de invasión y adhesión (micronemas) indican que una HSP70 es secretada por el complejo apical.

El objetivo de este proyecto fue estudiar la expresión y participación de la proteína HSP70-817 en el proceso de fertilización y desarrollo de cigoto-oocineto de *P. berghei*. Un anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 reconoció en ensayos de Western blot a la proteína que se expresa en los estadios de cigoto y oocineto de *P. berghei*. En ensayos de inmunolocalización la proteína HSP70-817 se encontró en el estadio de cigoto, tanto en la superficie como en el interior celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria, causada por protozoarios del Phylum Apicomplexa del género *Plasmodium* (1) y es transmitida a los humanos por la picadura de mosquitos del género *Anopheles* (2). Existen cuatro especies que infectan al humano, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* (3) y recientemente se describió que *P. knowlesi* que infecta simios, causa la enfermedad en humanos (4).

La mayor prevalencia de la enfermedad la ocasionan *P. falciparum,* con predominio en África, y *P. vivax,* en Asia y América (5). En el 2010 se reportaron a nivel mundial 216 millones de casos y se produjeron 655, 000 defunciones, el 91% de ellas en África. El 86% de las muertes ocasionadas por *Plasmodium* en todo el mundo correspondieron a niños menores de 5 años de edad (6) Figura 1.



Figura 1.- Países con transmisión de malaria y fase de los programas de control hasta 2012 (6).

En América, la malaria es endémica en 21 países, donde el 30% de la población se encuentra en riesgo de transmisión (7). Los países con niveles altos de transmisión son: Brasil, Venezuela, Guyana, Perú, Bolivia y Colombia, Honduras y Nicaragua, donde se presentan más de 10 casos por cada mil habitantes, de acuerdo a los índices parasitarios anuales (IPA) (8).

En México, hasta la semana epidemiológica 45 del año 2013, se han reportado 443 casos, todos por *P. vivax*. Los cinco estados con mayor número de casos son: Chiapas con 140 casos, Nayarit 114 casos, Sinaloa con 72 casos, Durango con 67 casos y Chihuahua con 27 casos (9).

1.2. Plasmodium

Las especies de *Plasmodium* poseen 3 genomas distintos: un genoma nuclear de ~ 24 Mb, organizado en 14 cromosomas lineales, con alrededor de 5,300 genes, un genoma circular de DNA de 35 Kb que se alberga en el apicoplasto y que codifica para 30 proteínas (10) y por último un genoma mitocondrial siendo uno de los más pequeños que se conocen (6 Kb). El genoma mitocondrial contiene elementos repetidos en tándem que se conservan en el Phylum Apicomplexa (11). Este Phylum incluye a otros patógenos humanos de los géneros, *Toxoplasma, Cryptosporidium, Isospora,* y patógenos de animales de los géneros *Eimeria, Babesia* y *Theileria* (12).

Los Apicomplexa son un grupo de parásitos intracelulares obligados que invaden una gran variedad de células hospederas, pero que carecen de los medios clásicos de movilidad tales como flagelos o cilios. Sin embargo, se mueven de una forma peculiar llamada "gliding" (13). Este mecanismo de movilidad se presenta sólo en las fases invasivas (merozoíto, esporozoíto y oocineto), que además tienen una característica morfológica de su Phylum, que es la presencia de organelos secretores especializados que se localizan en el extremo apical (denominado complejo apical); éstos organelos (micronemas, roptrias y gránulos densos) tienen un rol crítico en la motilidad del parásito y en el reconocimiento e invasión al huésped. Proteínas de micronemas participan en la adhesión y ruptura

de la célula huésped, proteínas de las roptrías; participan en la modificación de la célula hospedera, así como en la formación de una vacuola parasitófora y los gránulos densos, son necesarios para la modificación de la célula huésped (14).

El complejo ciclo de vida del parásito, requiere de la expresión específica de genes y proteínas únicas para cada estadio. Podemos mencionar por ejemplo proteínas de membrana, de tráfico vesicular, de señalización, de citoesqueleto, de ciclo celular, de metabolismo, chaperonas. Los estudios proteómicos que se han realizado en las diferentes etapas han descrito distintas familias de proteínas, cuya expresión es exclusiva de gametos, cigotos, oocinetos y quizá hasta ooquistes (15–17).

1.3. Ciclo de vida de Plasmodium

El ciclo de vida de *Plasmodium* es complejo y comprende una secuencia de dos fases (Figura 2). En el hospedero humano ocurre la fase asexual (esquizogonia) que se subdivide en dos, una ocurre en el hígado (esquizogonia intrahepatica) y otra en la sangre (esquizogonia intra-eritrocitica), mientras que en el mosquito se desarrolla la fase sexual (esporogonia)

1.3.1 Fase asexual

Inicia cuando un mosquito hembra infectado con *Plasmodium* pica a un individuo sano y al momento que toma su comida sanguínea inocula esporozoítos, los cuales invaden a las células hepáticas a los 30 ó 40 minutos (18).

P. vivax y *P. ovale* tienen la particularidad de mantener formas latentes en el hígado denominadas hipnozoítos, lo que da la posibilidad de recurrencia a la infección en periodos posteriores, éstas se denominan recaídas y caracterizan a estas especies de parásitos (18). Dentro de los hepatocitos se inicia el ciclo exoeritrocítico o esquizogonia pre-eritrocítica, el parásito se multiplica aumentando el volúmen de la célula y se transforma en esquizonte que al madurar se rompe y libera al torrente sanguíneo miles de merozoítos (aproximadamente 10, 000 para *P. vivax/P ovale* y 30, 000 en *P. falciparum*) que penetran a los eritrocitos. Una vez dentro de los eritrocitos, los merozoítos se reproducen formando trofozoítos y posteriormente esquizontes eritrocíticos, los cuales maduran y rompen al eritrocito liberando merozoítos (dando inicio a los síntomas y al cuadro clínico de la enfermedad; que se manifiesta con fiebre, escalofríos, ictericia y hepato-esplenomegalia, convulsiones, anemia grave, hemorragias e hipoglicemia, por mencionar algunos). Una proporción de estos merozoítos, aproximadamente el 10% (19,20), se diferencian a gametocitos macho y hembra, los cuales permanecen en la circulación dentro de los eritrocitos hasta que son tomados por un mosquito cuando ingiere su comida sanguínea (21).

1.3.2 Fase sexual

Los mosquitos Anopheles hembra pican a un hospedero infectado tomando sangre con gametocitos, que maduran a gametos minutos después de la ingestión ya en el intestino del mosquito, los gametos se activan y aumentan de volumen, lo que causa la ruptura de la membrana del eritrocito (22). Durante la activación, el gametocito masculino sufre un proceso denominado exflagelación produciendo ocho gametos machos (microgametos). Al mismo tiempo, los gametocitos hembra sufren un incremento en volumen y se transforman en gametos hembra (macrogametos). Cuando los parásitos salen del eritrocito en el estómago del mosquito, se da la fertilización (23). Cuando un gameto hembra es encontrado por un microgameto, éste se adhiere por la parte anterior a la membrana celular del microgameto, donde los núcleos de los gametos masculino y femenino se fusionan dando origen a un cigoto, el cual en un periodo de 18-24 horas se convierte en un oocineto móvil, el cual es capaz de evadir las enzimas proteolíticas secretadas en el intestino del mosquito durante la digestión. También es capaz de penetrar la membrana peritrófica que rodea el bolo sanguíneo y que está formada principalmente por quitina (24); el oocineto llega a las microvellosidades del intestino para invadir las células epiteliales y alcanza la lámina basal donde continua con su desarrollo hacia la fase de ooquiste (25).

El ooquiste es envuelto por una pared quística, formada por proteínas secretadas por el parásito y la membrana basal (21). El ooquiste se proyecta a la cavidad del mosquito (hemocele) y crece, después se observa una retracción citoplasmática que inicia cuando el citoplasma se desprende de la pared interna del ooquiste para formar un esporoblasto (26). Después de dos a tres semanas de la comida infectiva, el ooquiste madura y se rompe, liberando miles de esporozoítos invasivos que migran, invaden y se concentran en las glándulas salivales (27).



Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Los esporozoítos son inoculados por la picadura de un mosquito en el hospedero vertebrado, posteriormente se lleva a cabo un ciclo exo-eritrocítico en las células del hígado, de donde se liberan merozoítos que invaden a los eritrocitos y se producen gametocitos que son tomados durante la alimentación de un mosquito, en el intestino del invertebrado se da la reproducción sexual del parásito y se producen esporozoítos que son inoculados a un vertebrado, completándose así el ciclo de vida del parásito (28).

1.4. Fases invasivas en Plasmodium

En el ciclo de vida de *Plasmodium* se presentan tres fases invasivas: merozoítos, esporozoítos y oocinetos. Los esporozoítos lisan y atraviesan las células de Kupffer, los hepatocitos en el hospedero vertebrado y las células de las glándulas salivales en el hospedero invertebrado, el merozoíto lleva a cabo interacciones célula-célula para poder entrar y crecer dentro del eritrocito, mientras que el oocineto invade las células del epitelio intestinal del mosquito (29). Estas fases invasivas difieren tanto en su tamaño y forma; pero presentan una organización estructural conservada, las tres están rodeadas de un peliciclo de tres membranas y una red de microtúbulos. Además en el extremo anterior tienen un complejo apical, que posee vesículas secretoras: roptrias, gránulos densos y micronemas, a las que se les ha atribuido funciones en el reconocimiento e invasión de sus células blanco (30).

Las roptrías son organelos alargados, conectados por delgados cuellos al extremo apical del parásito. En su porción basal la matriz del organelo muestra una apariencia esponjosa, mientras que la región del cuello es electrón densa. Las proteínas encontradas en las roptrías son sintetizadas en el retículo endoplásmico y pasan a través del complejo de Golgi (31).

Los gránulos densos son organelos esféricos distribuidos en la célula, localizados en el complejo apical. La matriz es uniformemente electrón densa debido a la alta concentración de proteína. Varios estudios demuestran que la secreción del contenido de los gránulos densos tiene lugar después de la invasión del parásito y la localización en la vacuola parasitófora (PV) (31).

Los micronemas son pequeños organelos electrón-densos que están restringidos al tercio apical del cuerpo del parásito. El organelo está rodeado por una membrana y presenta una matriz electrón-densa debido a su gran contenido proteico. Las proteínas micronemales tienen puntos isoeléctricos por debajo de 7.0. Todas las proteínas encontradas en los micronemas son sintetizadas con un

péptido señal N-terminal que medía su entrada en la ruta secretoria por translocación a través de la membrana del retículo endoplasmático (31).

En la fase asexual los merozoítos y en la fase sexual los oocinetos y esporozoítos de *Plasmodium* contienen micronemas. En los oocinetos estos organelos están involucrados en el reconocimiento celular entre el hospedero y el parásito; así como en la unión y movilidad vía secreción de moléculas solubles en la interacción con diferentes compartimentos dentro del estómago del mosquito (32).

Los oocinetos difieren de los esporozoitos y merozoitos, en que carecen de roptrías y gránulos densos. Los oocinetos de *Plasmodium* secretan su contenido micronemal constitutivamente (32,33).

Las proteínas micronemales (MICs) son liberadas en la superficie del parásito antes de la invasión y son transportadas al extremo posterior de la célula, siendo cortadas y liberadas en su camino (32).

Las proteínas del oocineto secretadas por los micronemas, que hasta ahora se han descrito, incluyen a: P25/P28; la proteína relacionada a la trombospondina y a la proteína circunesporozoítica (CTRP); la proteína adhesiva secretada por el oocineto (SOAP) (34); la proteína del oocineto de ataque a la membrana (MAOP); la proteína de recorrido celular para oocinetos y esporozoitos (CeITOS); y la proteína relacionada al dominio del factor Von Willebrand tipo A (WARP) (35).

La proteína CTRP es esencial para la invasión a las células epiteliales (36), SOAP participa en la invasión del epitelio intestinal y favorece la diferenciación de oocineto a ooquiste (34), MAOP interviene en la ruptura de la membrana de las células epiteliales (2), mientras que CeITOS es necesaria para que el oocineto migre a través del citoplasma celular y logre establecerse en la lámina basal, para su posterior desarrollo a ooquiste (37).

Los anticuerpos contra algunas de las proteínas de micronemas identificadas, tienen la capacidad de bloquear la transmisión, entre las cuales se encuentran a

CTRP, quitinasa, WARP y SOAP (38). Además, existe evidencia que demuestra que se requiere de interacciones específicas entre el parásito y el intestino del mosquito, que permiten la invasión al intestino, lo cual es un paso crucial para el desarrollo del parásito de la malaria en el invertebrado (39).

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

Una de las familias de proteínas más abundantes en las células son las proteínas de choque térmico (HSP) por sus siglas en inglés Heat Shock Proteins. Éstas fueron descubiertas en *Drosophila melanogaster* después de la exposición a altas temperaturas. Posteriormente se identificó que las HSP son un componente altamente conservado y que forman parte del mecanismo de defensa que mantiene la supervivencia de la célula, especialmente cuando ésta se encuentra en condiciones desfavorables (40) (ver tabla 1).

FISIOLÓGICAS	PATOLÓGICAS	AMBIENTALES
Ciclo y división celular	Infección viral	Choques térmicos
Factores de crecimiento	Infección Metales pesado bacteriana	
Diferenciación celular	Infección parasitaria	Inhibidores metabólicos
Desarrollo de tejido	Fiebre	Análogos de aminoácidos
Estimulación hormonal	Inflamación	Etanol
	Isquemia	Antibióticos
	Hipertrofia	Radiación
	Lesión oxidante	
	Neoplasia	
	Autoinmunidad	

Tabla 1.-Condiciones que inducen la expresión de proteínas HSP's (41).

La secuencia de las HSPs muestran un alto nivel de conservación en la escala evolutiva y son clasificadas en varias familias con base a su peso molecular en Daltones (Da), por ejemplo: HSPs pequeñas (26 y 42 kDa), HSP60, HSP70, HSP90 y HSP104. La mayoría de éstas actúan como chaperonas, en el plegamiento y ensamble de proteínas ó en la disociación de agregados proteicos, aunque también se han descrito otras funciones en distintos compartimentos celulares (42) Tabla 2.

Nombre	Localización	Función	
Pequeñas HSP 20	Citoplasma	Vasorelajación	
HSP 22	Citoplasma	Estabilización del citoesqueleto	
HSP 25 (ratón)	Citoplasma/núcleo	Chaperona	
HSP 27 (humana)	Citoplasma/núcleo	Dinámica de la actina	
HSP 40	Citoplasma	Chaperona	
HSP 47	Retículo endoplásmico	Control en síntesis de colágeno	
HSP 60 HSP 58	Mitocondrias	Chaperonas	
HSP 70	Citoplasma/núcleo	Chaperonas	
HSP 75	Mitocondria	Chaperonas	
Grp 78	Retículo endoplásmico Receptor		
HSP 90	Citoplasma	Unión a receptores	
Grp 94	Retículo endoplásmico	Chaperona	
HSP 110 HSP 105	Citoplasma	Chaperona	
HSP 110	Nucléolo/citoplasma	Citoprotectoras	

Tabla 2.-Localización y función de algunas HSP's (42).

En organismos Eucariontes, la transcripción de las HSP está regulada por una familia de cuatro factores de choque térmico (HSF1-4). En condiciones de estrés se aumenta la expresión de los genes que codifican para estas proteínas.

Estructuralmente, las HSP 70 poseen tres dominios: un dominio ATPasa Nterminal de 45 KDa, que une adenosín trifosfato (ATP) y lo hidroliza a adenosín difosfato (ADP) y fósforo inorgánico. Un dominio de unión a sustrato de 15 KDa, que permite el reconocimiento y unión a regiones ricas en aminoácidos hidrofóbicos de una proteína nativa. Por último, un dominio C-terminal de 15 KDa, que interviene en la unión al péptido. Las HSP se localizan en el citosol y en todos los compartimentos de las células, tales como el cloroplasto, retículo endoplásmico, y mitocondria (43) (Figura 3).



Figura 3. Estructura y dominios de una HSP70 (Fuente: http://pdslab.biochem). Las proteínas HSP70 poseen en su extremo amino un dominio ATPasa, un dominio de unión a sustrato y un dominio C-terminal que es rico en alfa hélices.

1.5 Fertilización en Plasmodium

La reproducción sexual del parásito de la malaria lleva a cabo en el hospedero invertebrado (mosquito). La diferenciación del parásito en el intestino del mosquito vector es un proceso dinámico en el ciclo de vida. Éste proceso ha sido ampliamente estudiado y se ha observado que la expresión de proteínas durante el desarrollo del parásito en las diferentes células y tejidos del mosquito es muy diversa. Por ejemplo, el proceso de fertilización; por el cuál los gametos se fusionan para crear un cigoto (44), sigue un programa de interacciones bioquímicas, en las cuales están involucradas moléculas de adhesión celular, transducción de señales y de iniciación de vías metabólicas (45).

Entre las proteínas que participan en el proceso de fertilización en *Plasmodium* se encuentra una proteína *hapless* (HAP2), que participa en el proceso de fusión de gametos y está presente únicamente en gametos masculinos (46). En la primera fase de este proceso, las moléculas de adhesión celular se presentan en la superficie de la matriz del gameto femenino (el equivalente a la zona pelúcida en mamíferos y la membrana gelatinosa en la mayoría de los invertebrados). Durante la interacción de los gametos en esta primera fase, se inicia una vía de transducción de señales que activa al gameto masculino. En la siguiente fase, las membranas de los dos gametos se fusionan (47). En los gametos macho se ha observado la presencia de una familia de proteínas con dominios de 6 cisteínas (P48/45, P47 y P230) que están presentes en la superficie y juegan un papel esencial en el reconocimiento y unión a gametos femeninos (48).

Los organismos más empleados en estudios de fertilización son invertebrados acuáticos y peces, debido a sus características físicas específicas, como poseer axonemas gigantes, además de que proporcionan una perspectiva evolutiva sobre la estructura y la función en los vertebrados superiores (49). Un modelo exitoso para el estudio de fertilización y el desarrollo embrionario es el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (50). En este organismo se clonó y secuenció el gen que codifica para el receptor para espermatozoides y su producto proteico se localiza en la membrana plasmática del huevo. Se demostró que esta proteína contiene un dominio citoplasmático corto, el cual no mostró similitud con proteínas conocidas, pero de forma muy interesante tuvo similitud con proteínas de la familia de choque térmico tipo HSP70 (51).

1.5. Diferenciación de cigoto a oocineto

El desarrollo del parásito en el intestino del mosquito inicia con la gametogénesis y una vez completado el proceso de fertilización tiene como resultado la formación del cigoto. Este estadio se caracteriza por ser sensible al ambiente en el intestino del mosquito, no es móvil y muestra una polarización del núcleo y por la aparición de microtúbulos perinucleares; estas características preparan al cigoto para su diferenciación a oocineto, esta forma es móvil lo que le permite salir del bolo alimenticio. Este estadio del parásito secreta proteasas que lo hacen resistente al ambiente hostil, además de que es capaz de alcanzar el epitelio intestinal e invadirlo (52). Este proceso de diferenciación puede llevarse a cabo en un periodo de 8 a 10 horas post-fertilización (53). Adicionalmente, el oocineto; a diferencia del cigoto; es un estadio elongado que posee un complejo apical conformado por un anillo polar y micronemas, el oocineto ejecuta un tipo de locomoción denominada "gliding", que le permite atravesar la capa de la matriz peritrófica, interaccionar con las microvellosidades e invadir a las células del epitelio intestinal (54).

1.6. HSP70 en Plasmodium

La familia de las proteínas HSP70 es una de las más conservadas en la evolución, éstas se han encontrado en células de mamífero, levaduras, bacterias y parásitos, participando en diversos procesos biológicos como plegamiento, degradación y tráfico de proteínas, reconocimiento e interacción celular (40).

En los genomas de parásitos del género *Plasmodium*, se han descrito 61 secuencias que podrian codificar para diferentes HSP70 (PlasmoDB).

En *P. falciparum* se ha observado la producción de las proteínas HSP70 en respuesta al estrés, como una estrategia de supervivencia contra los cambios de temperatura (55). En esta especie, se han encontrado seis proteínas HSP70 que poseen características específicas. Por ejemplo la proteína PfHSP70-1, localizada en núcleo y citosol (56), y la PfHSP70-2, que está en retículo endoplásmico; ambas proteínas actúan como chaperonas. Otra proteína, la PfHsp70-x, que podría ser citosólica (57) o de núcleo debido a que presenta alta identidad con la proteína PfHSP70-1 (55). La proteína PfHSP70-3, se encuentra en mitocondria pero la función que desempeña aún es desconocida, sin embargo, la identidad entre esta proteína y la HSPA9B (una HSP70 de humanos) indica que puede estar involucrada en la exportación de proteínas. Las otras dos proteínas HSP70 de *P. falciparum* son PfHSP70-y y PfHSP70-z, ambas se localizan en retículo endoplásmico y citoplasma respectivamente y presentan función de chaperonas moleculares (55).

Otra proteína tipo HSP es PfHip que incrementa la actividad de chaperona de las proteínas PfHSP70-1 y PfHSP70-2 (58). En *P. berghei* una proteína HSP70 se reportó en el proteoma de la superficie y en micronemas (organelos apicales de las fases invasivas) (16).

En otro estudio, Torres y colaboradores en 2005 (59) identificaron en el genoma de *P. berghei* una molécula que presentó similitud con el receptor del ovocito de *S. purpuratus*. En este estudio, se utilizó la secuencia de aminoácidos

ya caracterizada del receptor del erizo de mar y se realizó una búsqueda en la base de datos de P. yoelii. Posteriormente, esta secuencia se comparó con la base de datos de *P. berghei* y de esta forma se obtuvieron diversas secuencias, entre las que la HSP70-242 con número de acceso PB000242.00.0 fue la que presentó mayor similitud e identidad al receptor del erizo de mar (30% de similitud y 51% de identidad). La secuencia nucleotídica del gen codificante de P. berghei se amplificó por PCR y se clonó. Posteriormente; parte de la región amino terminal (aminoácidos 1-529) se expresó en Escherichia coli utilizando el vector pRSET-A. La proteína recombinante en *E. coli* se purificó y se utilizó para la producción de anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal denominado α -HSP70-242, reconoció a la proteína HSP70 en la superficie de los gametos hembra de P. berghei (por ensayos de inmunofluorescencia). Cuando el anticuerpo α-HSP70-242 se adicionó a gametocitos, antes de la diferenciación y fecundación, se observó una inhibición del 92% en el desarrollo a oocinetos, utilizando una concentración de 400 µg/ml del anticuerpo. La inhibición fue dosis dependiente ya que a menor concentración del α -HSP70-242 el porcentaje de inhibición fue menor, esto se observa en la Figura 4.



Figura 4. Inhibición de la fertilización de *P. berghei* utilizando el anticuerpo monoclonal α -HSP70-242. (A) El anticuerpo monoclonal α -HSP70-242 se adiciono al inicio de un cultivo con gametocitos, se incubando por 24 horas a 21°C y se contó el número de oocinetos. (B) Utilizando el anticuerpo monoclonal α -HSP70-242 se localizó a la proteína en la superficie de gametos hembra de *P. berghei* (59).

Actualmente, están reportadas en la base de datos de *P. berghei*, 6 secuencias que corresponden a proteínas HSP70 con los siguientes ID de acceso: PBANKA_071190 (HSP70-817), PBANKA_121930 (HSP70-242), PBANKA_081890, PBANKA_091440, PBANKA_135720, PBANKA_101050. De las 6 proteínas HSP70 de *P. berghei*, tres presentan un alto grado de similitud y éstas son: HSP70-242, HSP70-817 Y HSP70-081890.

Tomando en cuenta los antecedentes de los estudios realizados con la proteína HSP70-242, que mostró su expresión en la superficie de gametos hembra e inhibe el desarrollo del parásito. En nuestro grupo de trabajo se decidió estudiar a la proteína HSP70-817 la cual presenta similitud a la HSP70-242 de *P. berghei*, para ello se generaron anticuerpos monoclonales como se describe a continuación:

Para la producción de anticuerpos monoclonales que reconozcan a la HSP70-817 de *P. berghei*, se llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica para la HSP70-817 de P. berghei se obtuvo de la base de datos PlasmoDB (ID: PBANKA 071190, http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp). A partir de esta secuencia se diseñaron los oligonucleótidos 817Nhel (5' ATGGCTAACGCAAAAGCAAAG 3') y 817XholN (5' GCT CGA GAT CAA CTT CTT CAA CAG 3'), mismos que priman en los extremos amino y carboxilo, respectivamente y poseen sitios de corte para las enzimas de restricción Nhel y Xhol. Con estos oligonucleótidos se amplificó, mediante PCR, la región codificante integra de la HSP70-817. En la reacción de PCR, se utilizó como molde ADN genómico de P. berghei cepa ANKA 2.34 con las siguientes condiciones: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C, y una incubación final de 72°C por 5 min. El producto de PCR (2000 Kb) se purificó del gel y posteriormente se digirió con las enzimas de restricción Nhel y Xhol, cuyos sitios de corte se encuentran en los oligonucleótidos 817Nhel y 817XholN, respectivamente. El producto de PCR digerido se clonó en el vector de expresión pET-24a(+) (Novagen) generando la construcción pET817. De manera que el pET817 contiene la proteína HSP817 de P. berghei fusionada por el carboxilo a 6 Histidinas codificadas en el pET-24a(+). La integridad del péptido de fusión (HSP817-6His) se corroboró mediante secuenciación.

La producción de la HSP70-817 se realizó en la cepa BL21 de *Escherichia coli*. Para la expresión de la HSP817-6His, la cepa BL21/pET817 se creció en LB a 37 $^{\circ}$ C durante 4 horas. Posteriormente, al cultivo s e le agregó IPTG a una concentración final de 250 μ M y se incubó a 21 $^{\circ}$ C por 30 min. Al término de este tiempo, el cultivo se centrifugó y el concentrado celular se mantuvo en congelación (-20 $^{\circ}$ C) hasta su uso.

Para la purificación de la HSP817-6His se utilizó la resina de Níquel (Ni-NTA) y se siguieron las recomendaciones del fabricante (Gibco BRL).

Para la generación de anticuerpos monoclonales α -HSP70-817, se mezclaron 50 µg de la HSP817-6His purificada con adyuvante completo de Freund's y se inmunizaron, por vía intramuscular, a 2 ratones hembra BALB/c siguiendo el esquema de inmunización descrito por Harlow y Lane, (2008). En este trabajo se utilizaron cuatro anticuerpos generados contra la HSP70-817 los cuales se denominaron (α -HSP817-1F7, α -HSP817-2D10, α -HSP817-2C3 y α -HSP817-2C5).

En experimentos pre-liminares realizados en el laboratorio se demostró que la proteína recombinante HSP70-817 es reconocida por estos anticuerpos (ver apéndice Figura 13) y debido a que esta proteína presenta un porcentaje de similitud del 28% con el receptor del ovocito de *S. purpuratus*, es posible considerar su participación en el desarrollo sexual del parásito. Los anticuerpos monoclonales α -HSP70-817 fueron la herramienta para caracterizar y estudiar el papel funcional de dicha proteína en el desarrollo sexual de este parásito en el mosquito.

2. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado la importancia de las proteínas HSP70 en el desarrollo y patogénesis durante el ciclo asexual de *Plasmodium*. Sin embargo, la mayoría de los estudios están enfocados a las fases en el hospedero vertebrado, mientras que los estudios durante el desarrollo del parásito en el hospedero invertebrado son muy escasos.

Es fundamental conocer cuál es el papel de las proteínas HSP70, en procesos esenciales del parásito como la fertilización y la diferenciación durante su desarrollo en el mosquito. Dicha información contribuirá a entender mejor los mecanismos moleculares que rigen la transmisión de parásitos causantes de enfermedades transmitidas por vector, tales como la malaria.

3. HIPÓTESIS

La proteína HSP70-817 participa en la fertilización y en la diferenciación de cigotos a oocinetos de *P. berghei*.

4. OBJETIVOS

4.1.GENERAL

Investigar la participación de la proteína HSP70-817 en la fertilización y diferenciación de cigotos a oocinetos de *P. berghei*.

4.2. ESPECÍFICOS

Determinar la expresión de la proteína HSP70-817 en gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos de *P. berghei*.

Determinar la participación de la proteína HSP70-817 en la fertilización y en la diferenciación de cigotos a oocinetos de *P. berghei*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Parásitos

Los parásitos que se utilizaron en este trabajo fueron *P. berghei* de la cepa Antwerpen Katanga (ANKA): la clona 2.34 productora de fases asexuales (trofozoitos, esquizontes, merozoitos) y sexuales (gametocitos, gametos, cigotos, oocinetos, ooquistes, esporozoítos). Los parásitos se mantuvieron mediante pases en ratones machos de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad.

Se realizaron purificaciones de parásitos de los siguientes estadios: gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos. Para ello, los parásitos se descongelaron (viales conservados en nitrógeno líquido y se reprodujeron en ratones macho de la cepa BALB/c con 6 semanas de edad; hasta un máximo de 6 pases (para evitar pérdida de viabilidad de los gametocitos) (60). Los ratones BALB/c se inocularon por vía intraperitoneal (IP) con una alícuota de parásitos descongelados. El monitoreo de la infección se realizó de 7 a 9 días post-infección mediante un frotis sanguíneo, se tomó una gota de sangre de la cola del ratón y se realizó un extendido en un portaobjetos (número de ratón, cepa de parásitos, pase y fecha) la muestra se fijó con Metanol absoluto y se tiñó con Giemsa al 40% en buffer Giemsa (ver apéndice), durante 20 minutos, el frotis se observó al microscopio óptico (objetivo de 100X) (61).

5.1.1. Producción y purificación de gametocitos y gametos

Para la obtención de gametocitos y gametos, se siguió el siguiente protocolo: 2 ratones machos de la cepa BALB/c con 6 semanas de edad se inocularon por vía intraperitoneal con 200 µl de Fenilhidrazina (6 mg/ml) en buffer de fosfatos (PBS) 1x estéril (ver apéndice), para inducir la producción de reticulocitos (62). Al tercer día estos ratones se inocularon con 250 µl de sangre parasitada, 3 días post-infección se comprobó la infección de los ratones, mediante un extendido y una prueba de exflagelación (viabilidad de gametocitos machos) la cual consistió en tomar 5 µl de sangre de la cola del ratón y ésta se diluyo 1:5 con medio completo RPMI 1640 (Gibco BRL, ver anexo), suero fetal

bovino (GIBCO BRL) al 20% (inactivado durante 30 min a 56 °C), a un pH de 8.3. Una vez mezclada la sangre se agitó vigorosamente y se depositaron 10 µl en un porta- objetos, se colocó un cubre-objetos cuyos bordes contenían vaselina (para evitar que la muestra se evaporara) y se dejó incubando a 20°C durante 10-15 minutos, pasados los cuales, las muestras se observaron en el microscopio óptico, bajo el objetivo de 40X. Esta prueba nos permitió evaluar la viabilidad de los gametocitos machos por medio de la observación de centros exflagelantes (63) seleccionando aquellos ratones que presentaron la mayor cantidad de gametocitos viables.

Para eliminar las formas asexuales y obtener una muestra enriquecida de gametocitos, a los ratones infectados con *P. berghei* se les trató con pirimetamina (esta droga inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que es esencial para la síntesis de DNA en la fase asexual) (64). Para dicho tratamiento, los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con 200 µl de pirimetamina (1 mg/ml de PBS 1X-Tween 20 al 0.05%), en el día 4º. y 5º. post infección. Al 6º día post-infección se tomó un extendido de la cola de cada uno de los ratones, se fijó, se tiñó y se analizó en el microscopio óptico (100X) para comprobar la eliminación de las formas asexuales y confirmar la presencia de gametocitos (22).

Para la purificación de gametocitos, el procedimiento se realizó a 37°C (para evitar la activación de los gametocitos). La sangre de ratones tratados con pirimetamina y conteniendo principalmente gametocitos, fue obtenida por punción cardiaca utilizando heparina (100 U/ml) como anticoagulante y se colocó en una jeringa sin aguja de 10 ml la cual contenía celulosa (CF-11) (Whatman, Maidstone UK) para eliminar la mayoría de los leucocitos contaminantes (65) (el CF-11 se adicionó hasta la marca de 10 ml y se empaquetó mediante unos golpecitos hasta la marca de 5 ml). Esta columna de CF-11 se hidrató con 3 ml de PBS 1X, pH 7.2 antes de adicionar la sangre conteniendo los gametocitos. Se colectó el eluido, y aprox. 2 ml de éste se colocaron en tubos cónicos de 15 ml conteniendo como máximo 4 ml de Nicodenz al 15% en PBS (el Nicodenz se preparó a partir de una solución stock al 27.6% en buffer para Nicodenz (ver apéndice)). Los tubos con

Nicodenz y el eluido de sangre parasitada se centrifugaron por 10 minutos a 2083 g y a 37 $^{\circ}$ C, se recuperó la interfase con una pipeta Pasteur y para eliminar el exceso de Nicodenz, se realizaron dos lavados con PBS 1X pH 7.2 y a 37 $^{\circ}$ C, centrifugando a 1575 g por 3 minutos.

Para obtener gametos, se utilizaron gametocitos purificados como se describió previamente, éstos fueron inducidos a la diferenciación (gametogénesis), mediante el cambio de temperatura (de 37 a 20°C) y de pH (de 7.2 a 8.3), esto se realizó mediante la incubación de los gametocitos con medio RPMI (a 20°C y pH 8.3) durante 7-10 minutos, pasados los cuales, se tomó una muestra de 1 µl, se colocó en un porta objetos de vidrio, se dejó secar al aire, se fijó y se tiñó con Giemsa como se mencionó anteriormente. Las láminas se analizaron en el microscopio óptico para visualizar a los gametos. Los gametos machos (microgametocitos) se identificaron por la presencia de flagelos (microgametos) y las hembras por sus características basófilas específicas (22), (coloración que adquiere su citoplasma y núcleo con la tinción de Giemsa) (61).

5.1.2. Cultivo y purificación de cigotos

Para la producción de cigotos, los reactivos y la extracción de los gametocitos se llevó a cabo a 4°C y en un tiempo de 2-5 min antes de la activación de los gametos y la fertilización. La sangre de ratones infectados con *P. berghei* y conteniendo gametocitos se pasó por una columna de CF-11 (como se describió previamente) y se eluyó de la columna utilizando 3 ml de medio RPMI frío (4°C). La sangre de la columna se colectó en u n matraz frío (4°C), el cual contenía 2 ml de SFB descomplementado y 3 ml de medio RPMI, cuidando que el eluído de la sangre y el volumen del matraz no pasara de un volumen mayor a 10 ml y que la sangre quedara a una dilución final de 1:5 (medio completo con suero y sangre). Una vez recolectada la sangre parasitada, se agitó vigorosamente, se tapó con una pieza de parafilm y se colocó en la incubadora a 20°C durante 3 horas, para permitir su desarrollo (gametogénesis y fertilización). Antes de incubar

los parásitos, se tomó una muestra de aprox. 10 µl para confirmar la viabilidad de los gametocitos machos (exflagelación) la cual se observó en el microscopio óptico y se confirmó la presencia de gametocitos viables por medio de la observación de centros exflagelantes (63). El matraz con el cultivo se incubó durante 3 horas a 20°C (64) para el desarrollo de cigotos.

Después de 3 horas de incubación; la sangre con parásitos se colocó en tubos cónicos de 15 ml, se centrifugó 5 minutos a 2083 *g*, freno: 0, a 20°C, se descartó el sobrenadante y el botón celular se diluyó 1:4 con medio RPMI para su purificación. En un tubo de 15 ml, se colocaron 2 ml de Nicodenz al 12% y sobre éste se colocó el botón celular de cigotos (diluido 1:2 con PBS 1X) y se centrifugó durante 15 minutos a 2083 *g*, freno: 0, a 20°C. Se colectó la interfase conteni endo los cigotos utilizando una pipeta Pasteur. Los cigotos fueron lavados dos veces utilizando 1ml de PBS 1X y se centrifugó 5 minutos a 2268 *g* (64). Se tomó una muestra de 1 µl, se colocó en un porta objetos de vidrio, se dejó secar al aire, se fijó y se tiñó con Giemsa, como se mencionó anteriormente. La pastilla de aproximadamente 100 µl se almacenó a -70°C para su uso posterior en ensa yos de Western blot (Sección 5.2) o bien se fijaron para ensayos de inmunofluorescencia (Sección 5.3).

5.1.3. Cultivo y purificación de oocinetos

Para el cultivo de oocinetos, la sangre de ratones conteniendo gametocitos se diluyó como ya se describió en la sección 5.1.2 y se incubó durante 24 horas a 20°C para permitir el desarrollo a oocinetos. Para la purificación de oocinetos, primero se corroboró la presencia de éstos, se tomó una muestra de aproximadamente 10 µl del cultivo y se colocó en un porta-objetos al cual después se le colocó un cubre-objetos (con vaselina en los bordes) y de esta forma, la muestra se observó en el microscopio (objetivo 40X).

Para la purificación de oocinetos, el cultivo se colocó en tubos de 50 ml, se centrifugó durante 5 minutos a 1333 g y a 20°C. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó una vez con aproximadamente 40 ml de PBS 1X. Los oocinetos se centrifugaron 5 minutos a 2083 g a 20°C, se descartó el sobrenadante y el cultivo se diluyó 1:20 (con respecto al botón celular) con NH₄Cl 0.17M frio (4°C), se incubó durante 25 minutos en h ielo con agitación vigorosa. Concluido este tiempo, el cultivo se centrifugó 5 minutos a 1333 g, freno: 0, se descartó el sobrenadante y se lavaron con aprox. 40 ml de PBS 1X. La suspensión conteniendo oocinetos se centrifugó 5 minutos a 1080 g, freno: 0, se descartó el sobrenadante y se lavá con aprox. 40 ml de PBS 1X. Se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 750 g, freno: 0, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavá con aprox. 40 ml de PBS 1X. Se centrifugó 5 minutos a 563 g, freno: 0, y se descartó el sobrenadante. El botón celular, se resuspendió 1:2 con PBS 1X para su purificación utilizando Nicodenz (64).

Para purificar los oocinetos, se utilizó un gradiente de 5 ml de Nicodenz al 17%. El número de tubos que se preparó estuvo en función del volumen de solución con oocinetos que se purificó, se colocaron 5 ml de Nicodenz y hasta un ml de suspensión. Se utilizaron tubos cónicos de 15 ml a los cuales se les adicionó el Nicodenz y luego la suspensión, oocinetos/PBS, esta última se colocó lentamente para evitar que se mezclaran. Para separar a los oocinetos se centrifugó durante 25 minutos a 1333 *g* a 20°C, después, se colectó la interfase utilizando una pipeta Pasteur. Se hicieron dos lavados con PBS 1X (para eliminar

el exceso de Nicodenz), centrifugando durante 5 minutos a 750 g a 20°C (64). Se tomó una muestra de 1 µl, se colocó en un porta objetos de vidrio, se dejó secar al aire, se fijó y se tiñó con Giemsa como se mencionó anteriormente. El botón celular, conteniendo los oocinetos purificados se almacenó a -70°C para su uso posterior en ensayos de Western blot (Sección 5.2) o bien se fijaron para ensayos de inmunofluorescencia (Sección 5.3).

5.2. Western blot

Para identificar si la proteína HSP70- 817 de *P. berghei* se expresa en los gametocitos, gametos, cigotos u oocinetos se utilizó la técnica de Western blot (66).

Los parásitos purificados de los diferentes estadios (gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos) se resuspendieron en aproximadamente 150 µl de Buffer de Lisis (ver apéndice) con antiproteasas PBS 1X y sonicados (para las muestras de gametocitos, gametos, cigotos se dieron 2 pulsos de 5 segundos y para la muestra de oocinetos 3 pulsos de 10 segundos con el Duty Cycle en 50 y Output Control 3, manteniendo las muestras en hielo) la muestra se centrifugó por 10 minutos a 42, 588 *g* a 4°C. Se tomó una alícuota de 10 µl del sobrenadante para realizar la cuantificación de proteínas, la cual se realizó mediante el kit 2D Quant Kit de Amersham Biosciences. Las proteínas se solubilizaron mezclando los parásitos con el buffer de muestra (ver apéndice) (67). Las muestras se desnaturalizaron hirviendo por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a 42,588 *g* a 4°C y se colectó el sobrenadante.

Para la electroforesis unidimensional (67), se cargaron 50 µg de proteína total de cada una de las muestras (de cada fase del parásito) por carril en un gel de poliacrilamida de 8.6 x 6.8 cm al 12%. La electroforesis se realizó a 100-150 volts por aproximadamente 1 hora. Al término de la misma, los geles conteniendo las proteínas de los parásitos, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 100 volts constantes. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa

se bloqueó (para evitar uniones inespecíficas) con PBS 1X-Tween 0.05% y 5% de leche por 1 hora a temperatura ambiente. Se descartó la solución bloqueadora y se adicionó el anticuerpo primario α -HSP70-817 (generados en contra de la HSP70 recombinante de *P. berghei*) a una dilución 1:500 en PBS 1X-0.05% Tween 0.05% leche descremada. Se incubó con agitación (75 rpm) a 4°C durante toda la noche. Para eliminar el anticuerpo no unido se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS1X-Tween 0.05% frío (4°C). Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a HRP (Invitrogen) 1:2000 en PBS 1X-Tween 0.05% con leche descremada por 1 hora a 75 rpm a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizaron los 3 lavados en la forma descrita anteriormente. Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo se reveló en un cuarto oscuro con un kit de Quimioluminiscencia (Millipore Inmobilon Western) utilizando placas fotográficas. Los controles negativos incluyeron la incubación de la membrana con PBS 1X (omitiendo la incubación con el anticuerpo primario α -HSP70-817) pero incubando con el anticuerpo secundario. El control positivo incluyó la incubación de la membrana conteniendo a la proteína recombinante HSP70-817. Para evidenciar que en cada carril se cargó la misma cantidad de proteína la membrana conteniendo los extractos de proteínas recombinantes y de parásitos se incubó con un anticuerpo monoclonal que reconoce a una proteína constitutiva de *Plasmodium* (α -actina) a una dilución de 1:1000.

5.3. Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar la localización de la proteína HSP70-817 en la célula utilizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Para ello, utilizamos el anticuerpo monoclonal 2C3 generado en contra de la proteína HSP70-817 y los diferentes estadios del parásito de *P. berghei* (gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos).

Los parásitos (botón celular de 10 μ l diluido en 200 μ l de PBS 1X) se fijaron por desecación, colocando 25 μ l en los pozos de las laminillas de vidrio (se esperó de 3 a 5 minutos y se retiró el PBS) y se observó al microscopio óptico, para verificar que no hubiera una cantidad excesiva de parásitos (10-20 parásitos por campo) las laminillas se etiquetaron y se almacenaron a -20°C envueltas en papel adsorbente y aluminio hasta su uso.

Para el ensayo de inmunofluorescencia, las laminillas se sacaron del congelador y los pozos se bloquearon con albúmina sérica de bovino (BSA) al 1% en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda, se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS 1X, se incubó con el anticuerpo primario en PBS 1X a una dilución 1:200, a 4°C dura nte toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados de cinco minutos comercial α -ratón acoplado a ALEXA (Abcam) a una dilución de 1:200 por 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados por cinco minutos con PBS 1X. Finalmente se agregó una gota de antifading (que contiene 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir el núcleo celular) a cada muestra y para preservar la fluorescencia.

Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DM1000) con el objetivo 100X usando el mismo tiempo y las condiciones de exposición para las muestras experimentales y controles. El control positivo incluyó la incubación de los parásitos con el anticuerpo α-Pbs25, que reconoce a la proteína de superficie Pbs25 (esta es una proteína que se expresa en gametos hembra y a partir del estadio de cigotos a ooquistes) y para el control negativo se

incluyeron pozos con parásitos que recibieron todo el tratamiento como los experimentales pero a los cuales se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

Para la inmunolocalización intracelular de la proteína HSP70-817 en las diferentes fases de los parásitos, éstos fueron permeabilizados incubando en la solución bloqueadora con BSA 1% en PBS 1X/TritónX-100 al 0.5% en los portaobjetos y sometidos a las mismas condiciones de bloqueo, lavados e incubados con los anticuerpos primarios α -HSP70-817 que se mencionaron anteriormente.

5.4. Ensayo de inhibición del desarrollo del parásito

5.4.1. Efecto en la fertilización

Para determinar la participación de la proteína HSP70-817 en el desarrollo sexual de *P. berghei,* el primer proceso que se analizó fue el efecto del anticuerpo α -HSP70-817 en la fecundación de los gametos. Para ésto, se realizaron ensayos de inhibición del desarrollo del parásito, en el cual se agregó el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 a diferentes concentraciones (10,100 y 200 µg/ml) al tiempo cero de un cultivo de gametocitos (antes de que ocurra el proceso de fertilización) y se incubó a 20°C por 24 horas. Se utilizó como control positivo el cultivo de los parásitos sin la adición del anticuerpo y como control negativo se utilizaron cultivos de los parásitos adicionando un volumen igual de PBS 1X pH 7.4 al utilizado en cada una de las concentraciones del α -HSP70-817.

Transcurridas las 24 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron por 5 minutos a 1575 *g*, se descartó el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió y de ésta se tomó 1 µl para realizar gota gruesa y se tiñó con Giemsa al 10% por 20 minutos. Las gotas gruesas se analizaron en el microscopio óptico (100x inmersión) para contar el número total de oocinetos.

El porcentaje de inhibición \pm SD (desviación estándar) se calculó a partir de los oocinetos formados en 1 µl de muestra. Se comparó el número de oocinetos producidos en los cultivos tratados con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 con los controles mencionados, mediante una prueba estadística de Tukey.

5.4.2. Efecto en el desarrollo de cigotos a oocinetos

Para determinar la participación de la proteína HSP70-817 en el desarrollo de cigoto a oocineto se prepararon gametocitos de *P. berghei* en ratones Balb/c como ya se describió anteriormente (Sección 5.1.1). Los cultivos se prepararon, se permitió que los gametos se fecundaran (~ 30 minutos) y a dos diferentes horas post-fertilización (1 y 6 horas) se agregó el anticuerpo α -HSP70-817, a tres diferentes concentraciones (10,100 y 200 µg/ml) en un ensayo por triplicado. Los parásitos con el anticuerpo se dejaron continuar con su desarrollo a oocinetos durante 24 horas, incubándolos a 20°C en cámara húm eda.

A las 24 horas, los cultivos se centrifugaron por 5 minutos 1575 *g*, se descartó el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió y de ésta se tomó 1 µl para realizar gota gruesa y se tiño con Giemsa al 10% durante 20 min. Las gotas gruesas se analizaron en el microscopio óptico (100x inmersión). El porcentaje de inhibición ±SD se calculó a partir de los oocinetos formados en 1 µl de muestra. Se comparó el número de oocinetos producidos en los cultivos tratados con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 con los controles (cultivos de oocinetos que no recibieron anticuerpo α -HSP70-817) mediante la prueba estadística de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1. Producción y purificación de los diversos estadios (gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos) de la fase sexual de *P. berghei*.

A partir de cultivos de *P. berghei* cepa 2.34 iniciados con la sangre de cuatro ratones infectados, se obtuvieron preparaciones enriquecidas por arriba del 90% de cada uno de los estadios de interés (gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos) (Figura 5).



Figura 5. Frotis de preparaciones purificadas de las diferentes fases sexuales de *P. berghei* teñidos con Giemsa al 10%. Las flechas señalan a estadios específicos obtenidos A: gametocitos; B: gametos; C: cigotos; D: oocinetos de *P. berghei*.

6.2. Obtención de proteínas totales de los diversos estadios de la fase sexual de *P. berghei*.

Con los diversos estadios purificados de *P. berghei*, se hizo la extracción de proteínas totales, se midió su concentración y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, utilizando 10 y 20 µg de cada extracto proteico. Posteriormente el gel fue teñido con Azul de Coomassie y se observó el patrón de bandas de cada estadio, así como la integridad de las proteínas obtenidas (Figura 6 y 7).



Figura 6. Gel de poliacrilamida al 12% con extractos proteicos de *P. berghei* teñido con Azul de Coomassie. Gametocitos 10 y 20 µg (carriles 1 y 2), Gametos 10 y 20 µg (carriles 3 y 4) Estándar de peso molecular BenchMark[™] Pre-Stained Protein Ladder (carril 5).



Figura 7. Gel de poliacrilamida al 12% con extractos proteicos de *P. berghei* teñido con Azul de Coomassie. Estándar de peso molecular BenchMark[™] Pre-Stained Protein Ladder (carril 1). Cigotos 10 y 20 µg (carriles 2 y 3) oocinetos 10 y 20 µg (carriles 4 y 5).

6.3. Análisis de la presencia de la proteína HSP70-817 en los diversos estadios de la fase sexual de *P. berghei.*

En los ensayos de Western blot se utilizó una concentración de 50 µg de extracto proteico de cada uno de los estadios. En el control positivo se observó una banda de 75 kDa correspondiente a la proteína recombinante HSP70-817 y el control negativo no presentó señal en el peso esperado. Con la concentración utilizada se pudo observar la presencia de una banda con peso molecular de aproximadamente 75 kDa (carril 4 y 5) en los estadios de cigotos y oocinetos, respectivamente. También se observaron dos bandas (marcadas con un asterisco) en todos los extractos proteicos a la altura de 50 y 25 kDa (Figura 8).



Figura 8. Ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 y extractos proteicos de las diferentes fases sexuales de *P. berghei* fueron separados en geles de poliacrilamida al 12% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Carril 1: Proteína recombinante, 2: gametocitos; 3: gametos; 4: cigotos; 5: oocinetos; 6: oocinetos (control negativo, omitiendo la incubación con el anticuerpo primario).

6.4. Inmunolocalización de la proteína HSP70-817 en los diversos estadios de la fase sexual de *P. berghei*

Para determinar la localización celular de la proteína HSP70-817 de *P. berghei*, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia con cada uno de los estadios del parásito: gametocitos, gametos, cigotos y oocinetos; permeabilizados y sin permeabilizar, incubados con el anticuerpo monoclonal 2C3. En muestras de gametocitos y gametos permeabilizados no se observó señal con el anticuerpo 2C3 (Figura 9 y Figura 10). En cigotos permeabilizados se observó señal intracelular y en los extremos del parásito (Figura 11). En el estadio de oocinetos no se observó señal con el anticuerpo α -HSP70-817 Figura 12. El control negativo no mostro señal en ninguno de los estadios. La proteína Pbs25 que se expresa a partir del estadio de gametos hembra hasta oocinetos, mostró señal, siendo esta proteína el control positivo. Las flechas indican a los parásitos en las diferentes condiciones.



Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal 2C3 en muestras de gametocitos. En la columna A las fechas señalan a los parásitos en campo claro; en la columna B no se observó señal de fluorescencia con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 utilizando el anticuerpo secundario Alexa 488; en la columna C las flechas indican la tinción de los núcleos con DAPI. Objetivo 100X.



Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal 2C3 en muestras de gametos. En la columna A las fechas señalan a los parásitos en campo claro; en la columna B no se observó señal de fluorescencia con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 utilizando el anticuerpo secundario Alexa 488; en la columna C las flechas indican la tinción de los núcleos con DAPI. Objetivo 100X



Figura 11. Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal 2C3 en muetras de cigotos de *P. berghei*. En la columna A las fechas señalan a los parásitos en campo claro; en la columna B las flechas indican la señal de fluorescencia con el anticuerpo monoclonal α-HSP70-817 tanto en cigotos sin permeabilizar y permeabilizados utilizando el anticuerpo secundario Alexa 488; en la columna C las flechas indican la tinción de los núcleos con DAPI. Objetivo 100X.



Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal 2C3, en muestras de oocinetos. En la columna A las fechas señalan a los parásitos en campo claro; en la columna B no se observó señal de fluorescencia con el anticuerpo monoclonal α-HSP70-817 utilizando el anticuerpo secundario Alexa 488; en la columna C las flechas señalan la tinción de los núcleos con DAPI. Objetivo 100X

6.5. Efecto del anticuerpo α-HSP70-817 en el proceso de fertilización y desarrollo de cigoto a oocineto de *P. berghei*

Para determinar la participación de la proteína HSP70-817 de *P. berghei* en el proceso de fertilización de los gametos macho y hembra y en la diferenciación de cigoto a oocinetos, dos puntos críticos de la fase sexual durante el ciclo de vida en el mosquito. Se realizó una curva de concentraciones, que incluyó la adición del anticuerpo α -HSP70-817 a las concentraciones siguientes: 10, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 µg/ml, estas concentraciones se adicionaron a cultivos de 100 µl de *P. berghei* al tiempo cero (antes de la activación de los gametocitos); y a las 24 horas se realizó el conteo de oocinetos en gota gruesa. En el ensayo se observó que no hubo una disminución en el número de oocinetos en los cultivos que recibieron anticuerpo.



Gráfica 1. Curva de concentraciones con el anticuerpo α-HSP70-817. A cultivos con gametocitos de *P. berghei* se les adicionó una concentración diferente del anticuerpo α-HSP70-817 y 24 horas después se realizó el conteo de oocinetos. (n=2).

El siguiente ensayo consistió en agregar el anticuerpo α -HSP70-817 2C3 a las concentraciones de 10, 100 y 200 µg/ml pero a 3 tiempos (tiempo 0 antes de la fertilización, Tiempo de 1 hora y 6 horas post-fertilización). Los datos obtenidos fueron analizados, utilizando la prueba estadística de Tukey, la cual indicó que no hubo un efecto de inhibición del desarrollo del parásito en las diferentes condiciones con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 2C3 como se observa en la gráfica 2.



Gráfica 2. Ensayo de inhibición del desarrollo del parásito con el anticuerpo monoclonal α -HSP70-817 adicionado a diferentes tiempos y concentraciones. A cultivos con gametocitos de *P. berghei* se les adicionó una concentración diferente (10, 100 y 200 µg/ml) del anticuerpo α -HSP70-817 a diferentes tiempos (cero, una y seis horas post-fertilización) y 24 horas después se realizó el conteo de oocinetos. (n=3).

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión y participación de la proteína HSP70-817 en el desarrollo sexual de *P. berghei*.

Los resultados de los ensayos de Western blot para determinar los estadios en los que se expresa la proteína HSP70-817, mostraron que esta proteína se expresa en cigotos y oocinetos. Tal como se esperaba, el anticuerpo monoclonal reconoció a la proteína recombinante HSP70-817 y el peso de ésta fue similar a la banda detectada en cigotos y oocinetos indicando que el anticuerpo reconoció a la proteína nativa HSP 817 de *P. berghei*.

Es importante mencionar que en el ensayo de Western blot se observaron bandas a la altura de 50 y 25 kDa, lo cual podría atribuirse a la presencia de inmunoglobulinas de ratón (cadenas pesadas y ligeras). Esto quedó demostrado cuando realizamos un ensayo de Western blot en el cual se resolvieron las proteínas del suero de ratón y se incubaron con el anticuerpo 2C3, este ensayo dio como resultado un patrón de bandas de 25 y 50 kDa (ver Figura 14 en apéndice), confirmando que las proteínas de 25 y 50 kDa en nuestras muestras experimentales corresponden a contaminación de inmunoglobulinas del suero de ratón unidas a los parásitos de *P. berghei*, las cuales están siendo reconocidas por el anticuerpo monoclonal 2C3.

En los ensayos de Inmunofluorescencia la proteína HSP70-817 presentó localización tanto intracelular como en la superficie del parásito, únicamente en el estadio de cigotos. Este resultado de inmunofluorescencia contrasta con el obtenido en el ensayo de Western blot y podría explicarse por el hecho de que son dos técnicas diferentes, en las cuales las proteínas son sometidas a diferentes tratamientos, en el Western blot se utilizan agentes desnaturalizantes que linearizan a la proteína y determinan la exposición de los diferentes epitopes que conforman al antígeno y que podrían ser detectados con el anticuerpo y en la inmunofluorescencia se utilizan fijadores y/o permeabilizadores. En el Western blot la proteína se encuentra desnaturalizada y sus epitopes completamente

expuestos, a diferencia de la Inmunofluorescencia donde la proteína se encuentra en su estado nativo y muchos de los epitopes expuestos pueden ser conformacionales. Además, cada estadio del parásito comprende procesos diferentes que determinan el procesamiento y plegamiento de las proteínas que son requeridas para la diferenciación del parásito, que a su vez permite la exposición de ciertos epitopes que podrían ser reconocidos por el anticuerpo monoclonal. Sin embargo, lo que sí es claro es que el anticuerpo 2C3 detectó a un epitope de la proteína nativa HSP70-817 en cigotos de *P. berghei*.

El hallazgo de la proteína HSP70-817 en oocinetos por Western blot podría deberse a que en esta técnica la estructura lineal de la proteína, permitió que el anticuerpo reconociera a un epitope que no se detectó por Inmunofluorescencia. Sin embargo, el hallazgo de la HSP70-817 en oocinetos en este estudio concuerda con un estudio de proteómica que incluyó el análisis de la superficie y los micronemas de oocinetos de *P. berghei* realizado por Lal K. en 2009 (16) en el cual la proteína HSP70-817 se encontró en la superficie del oocineto de *P. berghei*.

Los estudios sobre las HSP70 en *Plasmodium*, se han enfocado principalmente a la fase asexual, en *P. falciparum* se ha observado que el papel central de estas proteínas se enfoca a su actividad de chaperonas en la supervivencia del parásito ante los cambios en temperaturas (43,68). También en el tráfico de proteínas entre el hospedero y el parásito y en la patogénesis (68,69).

Los estudios de la fase sexual, por ejemplo la proteómica de los esporozoítos han reportado la expresión de la HSP70 en este estadio (70,71).

En este trabajo estudiamos a la HSP70-817 durante la fase sexual, los estudios que reportan las posibles funciones que pudiera tener esta proteína en el invertebrado, son muy escasos. Sin embargo, en un estudio reciente se analizaron los perfiles de expresión de diferentes HSP70 en *P. berghei* (72) y se observó que el transcrito de la proteína HSP70-817 fue el más abundante en el ciclo de vida del parásito. Cabe mencionar que en este estudio no se analizaron las diferentes

fases del ciclo sexual, específicamente no se incluyó el análisis de la expresión de esta proteína en cigotos. La expresión de la proteína HSP70-817 se demostró que se expresa en los estadios de anillo, trofozoitos, gametocitos, oocinetos, ooquistes y esporozoítos. La metodología que ellos utilizaron no permitió obtener información sobre la función de esta proteína, y únicamente sugirieron que la HSP70-817 puede tener un rol crítico durante el ciclo de vida de *Plasmodium*.

Con los ensayos de inhibición de la fertilización utilizando el anticuerpo 2C3 no fue posible observar que las diferentes concentraciones tuvieran un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del parásito en este proceso; a pesar de utilizar altas concentraciones del anticuerpo. Posteriormente, cuando adicionamos el anticuerpo en tres diferentes puntos de la fase sexual: el tiempo cero antes de la fertilización, tiempo de 1 y 6 horas post-fertilización, tampoco fue posible detectar un efecto sobre la diferenciación del parásito. A excepción del tiempo cero utilizando una concentración de 200µg/ml donde se observó una disminución del 50% con respecto al control. Finalmente, el análisis estadístico realizado nos indicó que las diferencias no fueron estadísticamente significativas y por lo tanto se requiere aumentar el número de réplicas biológicas para poder detectar los posibles efectos del anticuerpo y/o la posible función de la proteína HSP70-817 en la fertilización y/o diferenciación de los parásitos de *P. berghei*.

En este estudio no fue posible detectar un efecto del anticuerpo en el proceso de fertilización, pero es importante mencionar que la proteína HSP70-817 alto de similitud con otra presenta un grado HSP70 (HSP70-242) (PBANKA_121930) la cual en un estudio previo hecho por Torres y colaboradores en 2005 (59), esta proteína se reportó que se expresa en gametos hembra y los anticuerpos monoclonales inhibieron el 92% del desarrollo a oocinetos. Aunque estas dos proteínas presentan 28% de similitud pareciera que la participación en el proceso de fertilización y diferenciación del parásito difiere.

Es importante mencionar que estructuralmente, la proteína HSP70-817 presenta una región carboxilo terminal que tiene un motivo EEVD, el cual está presente en la mayoría de las HSP70 citosólicas de organismos eucariotas. En este trabajo se observó a la HSP70-817 en el citosol en parásitos permeabilizados lo cual y que este dato coincide con las otras HSP70, previamente descritas. En organismos eucariotas, este motivo permite a las HSP70 interaccionar con otras HSP's. En *Plasmodium* se han demostrado algunas de estas interacciones facilitan el plegamiento de proteínas clave que le permiten al parásito continuar su ciclo de vida en el hospedero(73–75).

Las HSP70 son proteínas altamente conservadas e inmunogénicas (76,77), la vacunación con estas proteínas en *P. falciparum* resulta en una alta protección contra la infección en el hospedero (78,79), así también se observaron altos niveles de anticuerpos en contra de la HSP70 que es el ortólogo de HSP70 de *P. berghei* (80), basado en esta información las HSP70 de *Plasmodium* son consideradas como un antígeno para la inmunodetección o el desarrollo de vacunas.

El estudio del parásito en el mosquito han sido motivo de estudio para identificar moléculas blanco para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión, para ello es necesario conocer la biología del parásito de la malaria, identificar las interacciones que lleva a cabo en el hospedero invertebrado que son tan importantes y complejas como las que se dan el hospedero vertebrado y que requieren de un enfoque único para entender los procesos de diferenciación del parásito y de esta forma desarrollar nuevos blancos quimioterapéuticos que permitan el control de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

- La proteína HSP70-817 se expresa en los estadios de cigoto y oocineto de *P. berghei*.
- La proteína HSP70-817 se expresa en la superficie e intracelular del estadio de cigoto de *P. berghei*.

9. PERSPECTIVAS

 Para conocer la participación de la proteína HSP70-817 en el desarrollo de las fases sexuales de *Plasmodium*, se propone generar un knock-out del gen codificante HSP70-817 y analizar su expresión en el estadio de cigoto.

10. APÉNDICE

MEDIO RPMI

Se vierte el contenido de un sobre de medio RPMI 1640 (GIBCO, BRL) en 900 ml de agua estéril y se adiciona: hipoxantina 50 mg/ml, 2 g de NaHCO₃ y 0.3 g de L-glutamina. Se ajusta a pH 8.3 y se agregan los antibióticos (penicilina 5 mg/ml, estreptomicina 5 mg/ml, neomicina 1 mg/ml). Se afora a 1 litro y se filtra usando una membrana de 0.2 μ m.

Buffer de lisis

Tris pH 7.4 .01M, NaCl 0.15M, SDS 0.1%, NP-40 1%, EDTA 2M.

Buffer de carga en condiciones reductoras

Tris pH 6.8 250 mM, SDS 277 mM, 40% de glicerol, 0.5% de azul de bromofenol, y 20% de β -mercaptoetanol

Buffer Giemsa

0.005 M KH2PO4 y 0.007 M Na2HPO4

Ajustar pH a 7.2

Solución salina de Fosfatos (PBS) 1X (1 Litro)

NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Na2HPO4 10 mM, KH2PO4 1.8 mM

Ajustar pH a 7.3

Buffer para Nicodenz

Tris 5 mM, EDTA 0.32 mM, KCl 3 mM

Ajustar pH 7.5

Buffer de corrida 5X (1 Litro)

Tris-base 27 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.5%

Buffer de transferencia 1X (1 litro)

Tris-base 25 mM, glicina 0.15 mM, metanol 20%.

No es necesario ajustar pH.

Persulfato de amonio (APS) al 10%

Para preparar 10 ml de APS, disolver 1.0 gramo de APS en 10 ml de H₂O bidestilada

Almacenar a -20°C en alícuotas de 20µl.

Tris-HCI 1.5 M (0.5 Litros)

Para preparar 500 ml de Tris HCl 1.5 M, pesar 90.85 gramos de Tris base. Ajustar pH a 8.8. Aforar a 0.5 litros.

Almacenar a 4°C

Acrilamida al 30% (Acrilamida-Bisacrilamida)

Para preparar 1 litro de Acrilamida-Bisacrilamida, pesar 30 gramos de acrilamida y 1.0 gramo de bisacrilamida. Aforar a 1 litro

Almacenar a 4ºC.

Electroforesis SDS-Poliacrilamida

Gel Separador

	AL 10%		AL 12%	
	5 ml	10 ml	5 ml	10 ml
Acrilamida 30%	1.67 ml	3.34 ml	2.0 ml	4 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl	50 µl	100
TrisHCI 1.5M pH 8.8	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml
Agua	2 ml	4 ml	1.675 ml	3.35 ml
APS	25 µl	50 µl	25 µl	50 µl
Temed	2.5 µl	5 µl	2.5 µl	5 µl

Gel Concentrador

	2 ml	4ml
Acrilamida 30%	335 µl	670 µl
SDS 10%	20 µl	40 µl
TrisHCI 1.5M pH 6.8	500 µl	250 µl
Agua	1.35 ml	2.7 ml
APS 10%	20 µl	40 µl
Temed	2 µl	4 µl

kDa

2D10 2C3 1B4 1F7 1B10 5E5 MPM



Figura 13. Ensayo de Western blot con los anticuerpos monoclonales α -HSP70-817 que reconocen a la proteína recombinante HSP70-187.





11. REFERENCIAS

- 1. Miller, Good, Milon. Malaria Pathogenesis. Science. 24 de junio de 1994;264:1878-83.
- 2. Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 de noviembre de 2004;101(46):16310-5.
- 3. Escalante AA, Ayala FJ. Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 de noviembre de 1994;91(24):11373-7.
- 4. Collins WE. *Plasmodium knowlesi* : A Malaria Parasite of Monkeys and Humans^{*}. Annu Rev Entomol. 7 de enero de 2012;57(1):107-21.
- 5. Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Defining the global spatial limits of malaria transmission in 2005. Adv Parasitol. 2006;62:157-79.
- WHO | World Malaria Report 2012 [Internet]. WHO. [citado 15 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.htm
- 7. Betanzos RAF. La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. Bol Méd Hosp Infant México. abril de 2011;68(2):159-68.
- 8. PAHO. Malaria en la región de las Américas. 2011.
- SINAVE/DGE/. cua7.pdf [Internet]. SALUD; 2013. Recuperado a partir de: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem45/pdf/cua7.pd f
- 10. Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, et al. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum. J Mol Biol. 16 de agosto de 1996;261(2):155-72.
- 11. Verma P, Sharma YD. Malaria genome project and its impact on the disease. J Vector Borne Dis. junio de 2003;40(1-2):9-15.
- 12. Ménard R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. Cell Microbiol. febrero de 2001;3(2):63-73.
- 13. Soldati-Favre D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. Parasite Paris Fr. septiembre de 2008;15(3):197-205.
- 14. Kats LM, Cooke BM, Coppel RL, Black CG. Protein Trafficking to Apical Organelles of Malaria Parasites - Building an Invasion Machine. Traffic. 29 de noviembre de 2007;9(2):176-86.

- 15. Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TWA, Berriman M, et al. A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. Science. 7 de enero de 2005;307(5706):82-6.
- 16. Lal K, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR, Wastling JM, et al. Characterisation of Plasmodium invasive organelles; an ookinete microneme proteome. PROTEOMICS. marzo de 2009;9(5):1142-51.
- 17. Sam-Yellowe TY, Florens L, Wang T, Raine JD, Carucci DJ, Sinden R, et al. Proteome analysis of rhoptry-enriched fractions isolated from Plasmodium merozoites. J Proteome Res. octubre de 2004;3(5):995-1001.
- 18. Shortt HE, Garnham PCC. Persisting Exo-erythrocytic Cycle in Plasmodium Cynomolgi. Br Med J. 26 de junio de 1948;1(4564):1225-8.
- 19. Hawking F, Worms MJ, Gammage K. 24- and 48-hour cycles of malaria parasites in the blood; their purpose, production and control. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1968;62(6):731-60.
- 20. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012;4(1):e2012013.
- 21. Knell A. A publication of the tropical programme of the welcome trust. 1991.
- 22. Aikawa M, Carter R, Ito Y, Nijhout MM. New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in Plasmodium gallinaceum. J Protozool. agosto de 1984;31(3):403-13.
- Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. Trends Parasitol. diciembre de 2005;21(12):573-80.
- 24. Shen Z, Jacobs-Lorena M. Characterization of a Novel Gut-specific Chitinase Gene from the Human Malaria Vector Anopheles gambiae. J Biol Chem. 14 de noviembre de 1997;272(46):28895-900.
- 25. Sinden RE. Plasmodium differentiation in the mosquito. Parassitologia. septiembre de 1999;41(1-3):139-48.
- 26. Vanderberg J, Rdodin J, Yoeli M. Electron Microscopic and Histochemical Studies of Sporozoite Formation in Plasmodium berghei*. J Eukaryot Microbiol. 1967;14(1):82-103.
- Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. Annu Rev Entomol. 1998;43(1):519-43.
- Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. Clin Microbiol Rev. 11 de abril de 2011;24(2):377-410.

- 29. Soldati D, Foth BJ, Cowman AF. Molecular and functional aspects of parasite invasion. Trends Parasitol. diciembre de 2004;20(12):567-74.
- 30. Aikawa M. Variations in structure and function during the life cycle of malarial parasites. Bull World Health Organ. 1977;55(2-3):137-56.
- 31. Souza W de. Secretory organelles of pathogenic protozoa. An Acad Bras Ciênc. junio de 2006;78(2):271-92.
- 32. Li F, Templeton TJ, Popov V, Comer JE, Tsuboi T, Torii M, et al. Plasmodium ookinetesecreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. J Biol Chem. 18 de junio de 2004;279(25):26635-44.
- 33. Lecona AN, Rodríguez MH, Argotte RS, Alvarado A, Rodríguez MC. Plasmodium berghei Ookinetes Glide and Release Pbs25 and Circumsporozoite Thrombospondin-Related Protein on Solid Surface Substrata. J Parasitol. febrero de 2010;96(1):216-8.
- 34. Dessens JT, Sidén-Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, et al. SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. Mol Microbiol. julio de 2003;49(2):319-29.
- 35. Yuda M, Yano K, Tsuboi T, Torii M, Chinzei Y. von Willebrand Factor A domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout Plasmodium parasites. Mol Biochem Parasitol. agosto de 2001;116(1):65-72.
- 36. Dessens, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, et al. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. EMBO J. 15 de noviembre de 1999;18(22):6221-7.
- 37. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. Mol Microbiol. marzo de 2006;59(5):1369-79.
- 38. Sinden RE. A proteomic analysis of malaria biology: integration of old literature and new technologies. Int J Parasitol. diciembre de 2004;34(13-14):1441-50.
- Ghosh AK, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. From the Cover: Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci. 26 de septiembre de 2011;108(41):17153-8.
- 40. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. Hum Reprod Update. abril de 2000;6(2):149-59.
- 41. Kiang JG, Tsokos GC. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. Pharmacol Ther. noviembre de 1998;80(2):183-201.
- 42. Coronato S, Di Girolamo W, Salas M, Spinelli O, Laguens G. Biologia de las proteinas del shock termico. 1999;59(5/1):477-86.

- 43. Misra G, Ramachandran R. Hsp70-1 from Plasmodium falciparum: protein stability, domain analysis and chaperone activity. Biophys Chem. junio de 2009;142(1-3):55-64.
- 44. Rosati F, Capone A, Giovampaola CD, Brettoni C, Focarelli R. Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. Int J Dev Biol. 2000;44(6):609-18.
- 45. Jansen S, Ekhlasi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. Sperm adhesion molecules: structure and function. Cells Tissues Organs. 2001;168(1-2):82-92.
- 46. Blagborough AM, Sinden RE. Plasmodium berghei HAP2 induces strong malaria transmissionblocking immunity in vivo and in vitro. Vaccine. agosto de 2009;27(38):5187-94.
- 47. Liu Y, Tewari R, Ning J, Blagborough AM, Garbom S, Pei J, et al. The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in Chlamydomonas and Plasmodium gametes. Genes Dev. 15 de abril de 2008;22(8):1051-68.
- 48. Van Dijk MR, van Schaijk BCL, Khan SM, van Dooren MW, Ramesar J, Kaczanowski S, et al. Three members of the 6-cys protein family of Plasmodium play a role in gamete fertility. PLoS Pathog. abril de 2010;6(4):e1000853.
- 49. Hinton DE, Hardman RC, Kullman SW, Law JMM, Schmale MC, Walter RB, et al. Aquatic animal models of human disease: selected papers and recommendations from the 4th Conference. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol CBP. marzo de 2009;149(2):121-8.
- 50. Samanta MP, Tongprasit W, Istrail S, Cameron RA, Tu Q, Davidson EH, et al. The transcriptome of the sea urchin embryo. Science. 10 de noviembre de 2006;314(5801):960-2.
- 51. Foltz KR, Partin JS, Lennarz WJ. Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. Science. 5 de marzo de 1993;259(5100):1421-5.
- 52. Shahabuddin M. Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. Parasitology. 1998;116 Suppl:S83-93.
- 53. Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. Cell Microbiol. julio de 2004;6(7):671-85.
- 54. Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C. Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. EMBO J. 15 de noviembre de 2000;19(22):6030-40.
- 55. Shonhai A, Boshoff A, Blatch GL. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. Protein Sci. septiembre de 2007;16(9):1803-18.
- 56. Kappes B, Suetterlin BW, Hofer-Warbinek R, Humar R, Franklin RM. Two major phosphoproteins of Plasmodium falciparum are heat shock proteins. Mol Biochem Parasitol. mayo de 1993;59(1):83-94.

- 57. Sargeant TJ, Marti M, Caler E, Carlton JM, Simpson K, Speed TP, et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. Genome Biol. 2006;7(2):R12.
- 58. Ramya TNC, Surolia N, Surolia A. 15-Deoxyspergualin modulates Plasmodium falciparum heat shock protein function. Biochem Biophys Res Commun. 22 de septiembre de 2006;348(2):585-92.
- 59. Jorge Aurelio Torres Monzón. Caracterización de una molécula que participa en la fertilización de Plasmodium berghei. [México, DF.]: Centro de Investigación y de estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; 2005.
- 60. Dearsly AL, Sinden RE, Self IA. Sexual development in malarial parasites: gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. Parasitology. junio de 1990;100 Pt 3:359-68.
- 61. Warhurst DC, Williams JE. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. J Clin Pathol. 1996;49(7):533.
- Landau, I, Boulard, Y. Life cycles and Morphology. In: Rodent Malaria [Internet]. Academic Press, London: R. Killick-Kendrick and W. Peters; 1978 [citado 20 de octubre de 2013]. 53-84 p. Recuperado a partir de: https://www.lumc.nl/con/1040/81028091348221/810281121192556/811070740182556/81 1070749352556/#The%20course%20of%20blood%20stage%20infections:%20asexual%20mu Itiplication
- 63. Carter R, Nijhout MM. Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. Science. 28 de enero de 1977;195(4276):407-9.
- 64. Rodríguez MC, Margos G, Compton H, Ku M, Lanz H, Rodríguez MH, et al. Plasmodium berghei: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. Exp Parasitol. mayo de 2002;101(1):73-6.
- 65. Kawamoto Y, Winger LA, Hong K, Matsuoka H, Chinzei Y, Kawamoto F, et al. Plasmodium berghei: sporozoites are sensitive to human serum but not susceptible host serum. Exp Parasitol. noviembre de 1992;75(3):361-8.
- 66. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. septiembre de 1979;76(9):4350-4.
- 67. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 15 de agosto de 1970;227(5259):680-5.
- 68. Kumar N, Nagasawa H, Sacci JB Jr, Sina BJ, Aikawa M, Atkinson C, et al. Expression of members of the heat-shock protein 70 family in the exoerythrocytic stages of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. Parasitol Res. 1993;79(2):109-13.

- 69. Rénia L, Mattei D, Goma J, Pied S, Dubois P, Miltgen F, et al. A malaria heat-shock-like determinant expressed on the infected hepatocyte surface is the target of antibody-dependent cell-mediated cytotoxic mechanisms by nonparenchymal liver cells. Eur J Immunol. julio de 1990;20(7):1445-9.
- 70. Tsuji M, Mattei D, Nussenzweig RS, Eichinger D, Zavala F. Demonstration of heat-shock protein 70 in the sporozoite stage of malaria parasites. Parasitol Res. 1994;80(1):16-21.
- 71. Lindner SE, Swearingen KE, Harupa A, Vaughan AM, Sinnis P, Moritz RL, et al. Total and putative surface proteomics of malaria parasite salivary gland sporozoites. Mol Cell Proteomics MCP. mayo de 2013;12(5):1127-43.
- 72. Hliscs M, Nahar C, Frischknecht F, Matuschewski K. Expression Profiling of Plasmodium berghei HSP70 Genes for Generation of Bright Red Fluorescent Parasites. PLoS ONE. 27 de agosto de 2013;8(8):e72771.
- 73. Gitau G, Shonhai A. Characterization of a the Plasmodium falciparum Hsp70-Hsp90 organising protein. Malar J. 2010;9(Suppl 2):P11.
- 74. Gitau GW, Mandal P, Blatch GL, Przyborski J, Shonhai A. Characterisation of the Plasmodium falciparum Hsp70–Hsp90 organising protein (PfHop). Cell Stress Chaperones. 18 de octubre de 2011;17(2):191-202.
- 75. Pesce E-R, Acharya P, Tatu U, Nicoll WS, Shonhai A, Hoppe HC, et al. The Plasmodium falciparum heat shock protein 40, Pfj4, associates with heat shock protein 70 and shows similar heat induction and localisation patterns. Int J Biochem Cell Biol. enero de 2008;40(12):2914-26.
- Fan JY, Davidson EA. Molecular cloning and antigenic mapping of heat-shock protein 70 from the malaria species Plasmodium berghel. Am J Trop Med Hyg. noviembre de 1996;55(5):570-6.
- 77. Maresca B, Kobayashi GS. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. Experientia. 1994;50(11-12):1067-74.
- 78. Kumar N, Zhao Y, Graves P, Perez Folgar J, Maloy L, Zheng H. Human immune response directed against Plasmodium falciparum heat shock-related proteins. Infect Immun. mayo de 1990;58(5):1408-14.
- 79. Na B-K, Park J-W, Lee H-W, Lin K, Kim S-H, Bae Y-A, et al. Characterization of Plasmodium vivax heat shock protein 70 and evaluation of its value for serodiagnosis of tertian malaria. Clin Vaccine Immunol CVI. marzo de 2007;14(3):320-2.
- Behr C, Sarthou JL, Rogier C, Trape JF, Dat MH, Michel JC, et al. Antibodies and reactive T cells against the malaria heat-shock protein Pf72/Hsp70-1 and derived peptides in individuals continuously exposed to Plasmodium falciparum. J Immunol Baltim Md 1950. 15 de noviembre de 1992;149(10):3321-30.