



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación y caracterización de las regiones de unión de *PfRON4* a eritrocitos y hepatocitos humanos

Fredy Alexander Pulido Quevedo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Maestría en Bioquímica
Bogotá D.C., Colombia
2022

Determinación y caracterización de las regiones de unión de *PfRON4* a eritrocitos y hepatocitos humanos

Fredy Alexander Pulido Quevedo

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Bioquímica

Directora:

Gabriela Arévalo Pinzón M.Sc., Ph.D

Codirector:

Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez M.D., Dr.Sc.

Línea de Investigación: Bioquímica y Biología Molecular

Grupo de Investigación: Receptor-Ligando

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Maestría en Bioquímica

Bogotá D.C., Colombia

2022

*A mis padres que con esfuerzo y cariño me
han brindado todo su apoyo y colaboración*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas y al programa de Maestría en Bioquímica. Al cuerpo docente, por brindarme los conocimientos propios del campo y contribuir en mi formación personal y profesional en estos años.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por abrirme sus puertas como una fuente de trabajo y a su vez permitirme desarrollar este proyecto, por brindarme sus recursos y herramientas.

A mi directora de tesis, la Doctora Gabriela Arévalo Pinzón, por permitirme trabajar bajo su orientación, por compartir sus conocimientos, su experiencia, por su tiempo y su paciencia, y por el apoyo brindado en cada etapa del desarrollo de este trabajo y del artículo. De verdad gracias.

Al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo, Codirector de este trabajo, Profesor Asociado del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional y Director Científico de la FIDIC, por sus aportes y colaboración.

Agradezco a los investigadores de la FIDIC, en especial a mis compañeras, las niñas del grupo funcional Receptor–Ligando, Adriana Barreto y Jeimmy Castañeda por toda su colaboración, ya que me acompañaron en el proceso, aportando sus conocimientos y ayuda a la elaboración del presente trabajo. A Martha por su ayuda con el cultivo del parásito y a la Doctora Diana por su colaboración con el citómetro.

Agradecimientos enormes a mi familia: mi mamá y mi papá por apoyarme con tantas cosas y a mis hermanos, por estar ahí apoyándome en su momento. A mis amigos por la paciencia a la distancia mantenida por la dedicación a este trabajo.

Resumen

Plasmodium falciparum durante su ciclo de vida, expresa una amplia gama de proteínas entre las que se destaca la proteína del cuello de las roptrias 4 (*PfRON4*). Este es un candidato promisorio a vacuna, ya que se expresa tanto en merozoítos como esporozoítos, participa durante la formación del enlace fuerte con la célula hospedera a través del complejo RONs/AMA1 y es refractario a delección genética. Pese a ello, aún no se conocen las regiones clave de este antígeno que interactúan con las células hospederas, siendo esta información de gran utilidad para combatir la enfermedad causada por este parásito. Por tal motivo, en este trabajo de investigación se sintetizaron 32 péptidos derivados de la región conservada de *PfRON4* y se llevaron a cabo ensayos de interacción receptor-ligando para determinar la capacidad de unión de cada péptido a células hospederas, así como determinar la naturaleza del receptor y habilidad de éstos para inhibir la invasión del parásito en cultivo continuo *in vitro* con la cepa FCB2. Se identificaron cinco HABPs (High Activity Binding Peptides) denominados 42477, 42479, 42480, 42505 y 42513, los cuales se unieron con alta afinidad y especificidad a receptores de tipo proteico sobre la membrana de los eritrocitos. Por su parte, los péptidos 42477 y 42480 se unieron a la membrana de las células HepG2 con constantes de disociación en el rango sub-micromolar, siendo esta interacción dependiente de receptores tipo heparina y/o sulfato de condroitina. Los ensayos de inhibición de la invasión mostraron que los HABPs de *PfRON4* fueron capaces de bloquear la entrada de los merozoítos a los eritrocitos hasta en un 50%. En conclusión, se encontró que las regiones de *PfRON4* 800-819 (42477) y 860-879 (42480) interactúan específicamente con las células hospederas y esto soporta su inclusión en el desarrollo de una vacuna multi-antígeno, multi-estadio basada en subunidades contra *P. falciparum*.

Palabras clave: malaria, *Plasmodium falciparum*, proteína del cuello de las roptrias 4, péptidos sintéticos.

Abstract

Determination and characterization *Pf*RON4's binding regions to human erythrocytes and hepatocytes

Plasmodium falciparum expresses a wide range of proteins during its lifecycle, among which one the most important is rhoptry neck protein 4 (*Pf*RON4); it is a promising vaccine candidate since it is expressed in merozoites and sporozoites, participates in a strong bond formation with host cells via the RONs/AMA-1 complex and is refractory to genetic deletion. Despite this, *Pf*RON4's key regions interacting with host cells remain unknown; such information would be extremely useful for combating *P. falciparum*-related malaria. For this reason, in this research work, thirty-two *Pf*RON4 conserved region-derived synthetic peptides were chemically synthesized, and receptor-ligand interaction/binding assays were carried out for determining the binding capacity of each peptide to host cells, the nature of their receptors and their ability to inhibit *in vitro* parasite invasion with the FCB2 strain. Five HABPS (High Activity Binding Peptides) named 42477, 42479, 42480, 42505 and 42513 were identified, which bound with high affinity and specificity to protein-like receptors on the erythrocyte membrane. Peptides 42477 and 42480 bound to HepG2 cells' membrane, both of them having submicromolar range *K_D*, the interaction being dependent on heparin and/or chondroitin sulphate proteoglycan receptors. Invasion inhibition assays showed that *Pf*RON4 HABPs were able to block merozoite entry into erythrocytes by up to 50%. In conclusion, *Pf*RON4 regions 800-819 (42477) and 860-879 (42480) were found to specifically interact with host cells, which supports their inclusion in the development of a subunit-based, multi-antigen, multistage anti-malarial vaccine against *P. falciparum*.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, rhoptry neck protein 4, synthetic peptides.

Tabla de contenido

| | |
|---|-----------|
| Introducción | 1 |
| 1. Antecedentes..... | 5 |
| 1.1 Participación de las proteínas RONs en el proceso de invasión de <i>Plasmodium</i> <i>sp</i> | 5 |
| 1.2 Enfoque de regiones funcionales de la proteína RON4 | 7 |
| 2. Marco teórico..... | 9 |
| 2.1 La malaria y su distribución | 9 |
| 2.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i> | 10 |
| 2.2.1 Fase hepática del ciclo de vida | 11 |
| 2.2.2 Fase eritrocítica del ciclo de vida | 13 |
| 2.2.3 Fase en el vector | 13 |
| 2.3 Estructuras del merozoíto y esporozoíto. | 13 |
| 2.3.1 Roptrias | 14 |
| 2.3.2 Micronemas y gránulos densos | 15 |
| 2.4 Proceso de invasión del esporozoíto | 16 |
| 2.5 Proceso de invasión del merozoíto..... | 19 |
| 2.5.1 Unión inicial y reorientación. | 19 |
| 2.5.2 Formación del TJ e invasión | 22 |
| 2.6 Métodos de control contra la malaria por <i>P. falciparum</i> | 23 |
| 3. Planteamiento del problema..... | 25 |
| 4. Pregunta de investigación | 27 |
| 5. Justificación | 28 |
| 6. OBJETIVOS..... | 30 |
| 6.1 General | 30 |
| 6.2 Específicos..... | 30 |
| 7. Materiales y métodos | 31 |
| 7.1 Análisis de la actividad de unión de <i>Pf</i> RON4 a las células | 32 |
| 7.1.1 Análisis y selección de la región conservada de <i>Pf</i> RON4. | 32 |
| 7.1.2 Síntesis de péptidos de <i>Pf</i> RON4 y radio marcaje. | 32 |
| 7.1.3 Ensayos de unión de péptidos de <i>Pf</i> cRON4 a eritrocitos y células HepG2. ... | 33 |
| 7.2 Caracterización de la interacción de los péptidos con alta capacidad de unión. | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.1 Saturación | 34 |
| 7.2.2 Ensayos de tratamiento enzimático | 34 |
| 7.2.3 Ensayos de competencia | 35 |
| 7.3 Cultivo de <i>P. falciparum</i> y ensayos de inhibición | 36 |
| 7.3.1 Cultivo y mantenimiento de <i>P. falciparum</i> FCB2 | 36 |
| 7.3.2 Evaluación del efecto hemolítico de los HABPs | 37 |
| 7.3.3 Ensayos de inhibición de la invasión | 37 |
| 7.4 Consideraciones éticas del material proveniente de humanos utilizado en los ensayos | 38 |
| 8. Resultados | 39 |
| 8.1 Análisis y selección de la región conservada | 39 |
| 8.2 Péptidos derivados de <i>Pfc</i> RON4 se unen a eritrocitos humanos y a células HepG2 | 40 |
| 8.3 Las interacciones HABPs-células presentaron <i>kDs</i> en el rango micromolar y submicromolar | 43 |
| 8.4 La unión de los HABPs de <i>Pfc</i> RON4 es susceptible al tratamiento enzimático de los glóbulos rojos y de las células HepG2 | 44 |
| 8.4.1 Los tratamientos enzimáticos no afectan en gran medida la viabilidad celular | 44 |
| 8.4.2 La interacción de <i>Pf</i> RON4 HABPs-célula es dependiente de receptores de tipo proteico en el estadio eritrocítico mientras que en el esporozoíto es dependiente de carbohidratos | 46 |
| 8.5 HABPs con perfiles similares de unión compiten específicamente por la unión a eritrocitos | 49 |
| 8.6 HABPs derivados de <i>Pfc</i> RON4 inhiben la invasión de merozoítos de <i>P. falciparum</i> | 50 |
| 9. Discusión | 53 |
| 10. Conclusiones y recomendaciones | 59 |
| 10.1 Conclusiones | 59 |
| 10.2 Recomendaciones | 60 |
| 11. Productos y resultados de las actividades de generación de nuevo conocimiento | 61 |
| 12. Anexos | 62 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución de la malaria a nivel mundial | 10 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i> | 11 |
| Figura 3. Fase hepática | 12 |
| Figura 4. El merozoíto y sus estructuras intracelulares..... | 16 |
| Figura 5. Secuencia de eventos de la invasión del eritrocito por el merozoíto | 20 |
| Figura 6. Principales interacciones receptor ligando conocidas en <i>P. falciparum</i> | 21 |
| Figura 7. Diagrama de la metodología planteada | 31 |
| Figura 8. Representación esquemática de <i>PfRON4</i> | 40 |
| Figura 9. Comportamiento de unión de los péptidos derivados de <i>PfcRON4</i> | 41 |
| Figura 10. Perfil de unión de los péptidos derivados de <i>PfRON4</i> | 42 |
| Figura 11. Ensayos de saturación de los HABPs derivados de <i>PfRON4</i> | 44 |
| Figura 12. Ensayos de unión de los HABPs derivados de <i>PfcRON4</i> con eritrocitos y células HepG2 tratados con enzimas y competencias..... | 48 |
| Figura 13. Formas de <i>P. falciparum</i> FCB2 en cultivo continuo <i>in vitro</i> | 50 |
| Figura 14. Ensayo de inhibición de la invasión de <i>P. falciparum</i> FCB2 en cultivo continuo <i>in vitro</i> | 52 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

| | |
|----------------|---|
| AMA1 | <i>Apical Membrane Antigen 1</i> |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| CellTOS | <i>Cell Traversal protein for Ookinetes and Sporozoites</i> |
| cHABPs | <i>Conserved High Activity Binding Peptides</i> |
| CABC | <i>Condroitinasa ABC</i> |
| CAC | <i>Condroitinasa AC</i> |
| CR1 | <i>Complement Receptor type 1</i> |
| CRD | <i>Cysteine-Rich-Domain</i> |
| CSP | <i>Circumsporozoite Protein</i> |
| CyRPA | <i>Cysteine-Rich Protective Antigen</i> |
| EBA | <i>Erythrocyte binding antigen</i> |
| FCB2 | <i>Falciparum Colombia Bogotá 2</i> |
| FIDIC | <i>Fundación Instituto de Inmunología de Colombia</i> |
| GLURP | <i>Glutamate Rich Protein</i> |
| GPA | <i>Glycophorin A</i> |
| GPB | <i>Glycophorin B</i> |
| GPC | <i>Glycophorin C</i> |
| H1 | <i>Heparinasa I</i> |
| H2 | <i>Heparinasa II</i> |
| HABPs | <i>High Activity Binding Peptides</i> |
| HSPG | <i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i> |
| IMC | <i>Inner Membrane Complex</i> |
| IMPIPS | <i>Immune Protection Inducing Protein Structures</i> |
| LABP | <i>Low-Activity Binding Peptide</i> |
| <i>kDs</i> | <i>Constantes de disociación</i> |
| MJ | <i>Moving junction</i> |
| MSP | <i>Merozoite Surface Proteins</i> |
| <i>nH</i> | <i>Coeficiente de Hill</i> |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| <i>PfcRON4</i> | <i>Región conservada de P. falciparum RON4</i> |
| PLP1 | <i>Perforin-Like Protein 1</i> |
| OMS | <i>Organización Mundial de la Salud</i> |
| RH | <i>Reticulocyte-binding Homolog</i> |
| RON2 | <i>Rhoptry Neck Protein 2</i> |
| RON4 | <i>Rhoptry Neck Protein 4</i> |
| RON5 | <i>Rhoptry Neck Protein 5</i> |
| RONs | <i>Rhoptry Neck Proteins</i> |

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--|
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RIPR | <i>Rh5 Interacting Protein</i> |
| SUC | Sitios de Unión por Célula |
| SURFIN4.2 | <i>Surface-associated Interspersed protein 4.2</i> |
| TA | Temperatura ambiente |
| TJ | <i>Tight Junction</i> |
| TRAP | <i>Thrombospondin Related Anonymous Protein</i> |

Introducción

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* sp. y es transmitida mediante la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* sp. Estos actúan como vectores artrópodos inoculando las formas infectantes a los hospederos durante la alimentación hematológica (1). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad representa un problema de salud pública, puesto que, para el año 2020 se estimaron 241 millones de casos a nivel mundial, los cuales produjeron alrededor de 627.000 muertes, principalmente en niños menores de 5 años (2). Existen 6 especies de *Plasmodium* capaces de infectar humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* y *Plasmodium knowlesi*. En Colombia, según el boletín epidemiológico del Instituto Nacional de Salud (INS), a la semana epidemiológica número 52 de 2021, se notificaron 72.022 casos de malaria, con predominancia del 49,6% de infección por *P. falciparum* (3). A pesar que los casos de malaria han disminuido con el paso de los años, *P. falciparum* continúa siendo la especie que genera la mayor cantidad de casos a nivel mundial, además de ser el responsable de las complicaciones clínicas severas y altas tasas de mortalidad en pacientes con esta enfermedad (4).

El desarrollo e implementación de métodos de control de la malaria a lo largo de los años, se ha basado en varias estrategias como en el diseño de fármacos que controlen la infección y eviten la aparición y progresión de los efectos graves de la enfermedad (5), la lucha contra la aparición de cepas resistentes a estos medicamentos (6, 7), así como insecticidas para controlar la población de mosquitos vectores (8) y la formulación y desarrollo de vacunas (9), entre otros. Sin embargo, en conjunto, estas estrategias no han logrado frenar de forma definitiva el complejo mecanismo de invasión y evasión por parte del parásito (10). Es por ello que el estudio y conocimiento de los mecanismos de invasión del parásito, ha cobrado gran importancia en los últimos años, en especial con respecto a los mecanismos celulares y moleculares que allí se generan y los agentes partícipes de

dichas interacciones entre la célula hospedera y el parásito, a fin de utilizarlas como blanco para el control de la infección (11). El mecanismo mediante el cual el parásito infecta las células hospederas involucra una serie de etapas en las cuales participan proteínas parasitarias presentes tanto en su superficie, como en orgánulos especializados en su interior (12, 13). En *P. falciparum* se han descrito una gran cantidad de estas proteínas y diversas investigaciones han tratado de determinar su función (14). Dentro de las proteínas de mayor interés, se encuentra un complejo de proteínas provenientes del cuello de las roptrias, denominadas proteínas RONS (del inglés *Rhoptry Neck proteins*) (15). Se ha descrito que estas proteínas son liberadas durante el proceso de invasión del merozoíto, y son exportadas en complejo (RON2, 4 y 5) (14, 16, 17) a la membrana de la célula hospedera, donde sirven como receptor a la proteína AMA1 (del inglés *Apical Membrane Antigen 1*) a través de la proteína RON2 (15, 18-20). Estas proteínas se relacionan con la formación la de estructura de anclaje utilizada por el parásito para acceder al interior de la célula hospedera que es conocida como enlace fuerte o unión fuerte (del inglés *tight junction*, abreviado como TJ).

Dentro del complejo de proteínas RONS, el estudio de la proteína RON4 particularmente ha despertado interés debido a que algunas investigaciones han revelado su importancia no sólo en el estadio sanguíneo, sino también en el estadio hepático con el esporozoíto (forma infectante para el ser humano) (21). La proteína *Pf*RON4 es codificada por un gen de tres exones que da como producto una proteína de 1201 aminoácidos, compuesta por un péptido señal y una agrupación de repeticiones en su secuencia (regiones de baja complejidad) hacia la región N-terminal (22). Por su parte, la región C-terminal de esta proteína es altamente conservada entre diferentes aislados de *P. falciparum*. Se ha visto que regiones conservadas de las proteínas pueden estar relacionadas a una función importante de las mismas dentro del proceso de invasión del parásito a su célula hospedera (23, 24). Teniendo en cuenta esta aproximación, estudios anteriores han planteado una metodología para la identificación de regiones de las proteínas del parásito que tengan capacidad de unión a las células diana de acuerdo con el estadio del parásito en el cual estas proteínas se expresen (25, 26). Esta metodología se fundamenta en un tamizaje inicial, donde péptidos sintéticos son evaluados en su capacidad de interactuar específicamente y con alta afinidad con receptores sobre la membrana de las células blanco. Aquellos péptidos son denominados péptidos con alta capacidad de unión o HABPs (del inglés *High Activity Binding Peptides*). Durante el análisis de estos resultados,

sólo se incluyen aquellos HABPs que no presenten polimorfismos en sus secuencias, denominándose HABPs conservados o cHABPs (del inglés *conserved High Activity Binding Peptides*) y son descartados aquellos que presenten cambios en su secuencia debido a que se ha reportado que estos polimorfismos pueden distraer al sistema inmunológico y han representado un obstáculo importante en el desarrollo de métodos de control (27, 28). Entre las proteínas que han sido caracterizadas bajo esta metodología se encuentra la proteína Rh5 (del inglés *Reticulocyte-binding Homolog 5*) y EBA175 (del inglés *Erythrocyte binding antigen 175*), dos antígenos de gran importancia en *P. falciparum*. En el caso de Rh5, una región comprendida entre los residuos 201-220 ha mostrado interactuar específicamente con la superficie de los eritrocitos e inhibir la invasión *in vitro* en cerca de un 70% (29). En cuanto a EBA175, se ha descrito una región localizada entre los residuos 436-455 que participan en la interacción con el receptor Glicoforina A, GPA (del inglés *Glycophorin A*) sobre los eritrocitos humanos (30). Cuidadasas modificaciones han sido realizadas sobre los HABPs de estas proteínas (denominándose así mHABPs) para la generación de estructuras proteicas que inducen protección inmune IMPIPS (del inglés *Immune Protection Inducing Protein Structures*), como moléculas claves para el desarrollo de una vacuna multi-antígeno, multi-estadio basada en subunidades mínimas (31).

Desafortunadamente, *P. falciparum* presenta una serie de mecanismos de evasión, que dificultan el desarrollo de métodos de control efectivos. Entre estos mecanismos se destaca (además de la variabilidad genética) la habilidad del parásito para utilizar cerca de 25 rutas de invasión distintas dependiendo de la disponibilidad de receptores sobre la célula hospedera y de las proteínas disponibles del parásito. Se ha encontrado que el bloqueo de la función de la proteína EBA175 (que interactúa con GPA) da como resultado el aumento en la expresión de varios genes que le ayudarían a invadir a la célula hospedera (32). Por lo tanto, es necesario la inclusión de los antígenos más relevantes de este parásito en una formulación multi-antígeno que pueda contrarrestar los principales mecanismos de evasión del parásito.

Teniendo en cuenta lo anterior, la proteína PfRON4 aparece como un candidato atractivo debido a las distintas evidencias que muestran su participación esencial en la formación de complejos proteicos para una exitosa invasión del parásito (14-17). Estos complejos,

conformados por la interacción de las proteínas RONS y AMA-1, han mostrado ser cruciales para el proceso de invasión, como se ha visto mediante el uso de anticuerpos bloqueadores (16), o péptidos inhibitorios (19), que incluso interrumpen la formación del complejo AMA1/RONS, como ha sido documentado mediante experimentos de inmunoprecipitación (15). Aunque aún no se conoce bien cómo ocurre la interacción de estos antígenos, cuáles son la totalidad de los componentes y cómo son exportados en complejo durante el proceso de invasión, se ha demostrado consistentemente la asociación de AMA1 con RON4 (33, 34) y mediante estudios de inmunofluorescencia, se ha mostrado la presencia de RON4 en el anillo deslizante durante la formación del TJ (35, 36). Así mismo, se ha mostrado por estudios de delección genética, que RON4 es esencial para la supervivencia del parásito (22). Si bien *P. falciparum* ha sido el modelo de parásito en donde se han llevado a cabo los estudios de co-inmunoprecipitación del complejo RONS/AMA1 y recientemente se ha mostrado la participación de *Pf*RON4 en el complejo SURGE (SURFIN4.2-RON4-GLURP) (37), aún no se conocen las regiones críticas de interacción entre la proteína *Pf*RON4 y la superficie de eritrocitos y hepatocitos que puedan llegar a ser importantes en el proceso de invasión.

Por ello, en este trabajo se investigó e identificaron los cHABPs de la proteína *Pf*RON4 que interactúan específicamente con la membrana de hepatocitos y eritrocitos humanos. Ensayos de interacción receptor-ligando y el uso de péptidos sintéticos permitieron el desarrollo de los objetivos. Se identificaron cinco cHABPs (42477, 42479, 42480, 42505 y 42513) que interactuaron con alta afinidad con receptores sensibles al tratamiento con tripsina y quimiotripsina sobre la membrana del eritrocito. Dos de los mismos péptidos (42477 y 42480) interactuaron también con células hepáticas, siendo el o los receptores sensibles al tratamiento con heparinasa I y condroitinasa ABC. Finalmente, se determinó la actividad funcional de estos cHABPs para inhibir el proceso de invasión de merozoítos de la cepa FCB2 (*Falciparum* Colombia Bogotá 2), encontrando que los HABPs 42477 y 42480 fueron capaces de inhibir la invasión del merozoíto al eritrocito, lo que sugiere un papel destacado de estas dos regiones en el proceso de invasión del merozoíto y apoya su inclusión en el desarrollo de una vacuna anti-malárica, multiestadio, multiantígeno y basada en subunidades contra *P. falciparum*.

1. Antecedentes

1.1 Participación de las proteínas RONs en el proceso de invasión de *Plasmodium sp*

El proceso de invasión en parásitos del género *Plasmodium sp.* es un proceso complejo que involucra una serie de etapas dentro de las cuales se reconoce una interacción inicial débil y reversible, entre componentes de la superficie del parásito y la membrana del eritrocito (12). En seguida, ocurre la reorientación, en la cual el merozoíto se mueve de manera que su extremo apical queda en contacto directo con la superficie del eritrocito, estudios han sugerido que este proceso está mediado por flujo de iones de Ca^{2+} (38). Luego se producen diversas interacciones donde participan varias proteínas, como las provenientes de la familia Rh (del inglés *Reticulocyte-binding Homolog*), donde la interacción descrita más importante es la que ocurre entre la proteína Rh5 y Basigina o CD147 (del inglés *Cluster of Differentiation 147*), interacción conocida como pre-TJ (39) (40). En seguida, se da paso al establecimiento del enlace fuerte o unión fuerte (41) que le permite al parásito impulsarse hacia el interior de la vacuola parasitófora. En este mecanismo participan el motor de actina-miosina anclado al complejo de membrana interna o IMC (del inglés *Inner Membrane Complex*) y el complejo proteico formado por RONs/AMA1, asegurando la internalización del parásito (42).

Estudios iniciales en *Toxoplasma gondii* (modelo de los Apicomplexa) dilucidaron por primera vez la formación de este complejo proteico conformado por las proteínas TgRON2, TgRON4, TgRON5 y TgRON8, y describieron que éste es exportado a la membrana plasmática de la célula hospedera; así mismo, mostraron que la proteína RON2 es insertada en la membrana de la célula hospedera, donde interactúa con TgAMA1 (35). Esta interacción entre RON2 y AMA1 es conservada en *Plasmodium* (20, 43), donde además, participan las proteínas RON4 y RON5 formando parte del complejo, al parecer insertadas dentro de la membrana plasmática de la célula hospedera, para servir como

anclaje de entrada del parásito a su célula blanco (15, 33). Estudios previos en *P. vivax* han mostrado que la proteína *Pv*RON4 interactúa específicamente con la membrana del reticulocito y que la región involucrada en esta interacción está localizada hacia el extremo carboxi-terminal (44). Experimentos de inhibición de la formación del complejo AMA1-ROns mediante anticuerpos (16), han mostrado que la interrupción de la formación de este complejo previene la invasión de los merozoítos, confirmando el importante papel de dicho complejo durante la entrada del parásito a los eritrocitos (15).

Nuevas investigaciones en la formación del enlace fuerte durante la invasión a la célula hospedera en *P. falciparum*, permitieron identificar mediante experimentos de inmunoprecipitación y espectrometría de masas, un nuevo complejo de proteínas que los investigadores denominaron SURGE, debido a que está conformado por las proteínas SURFIN4.2 (del inglés *Surface-associated Interspersed protein 4.2*), RON4 y GLURP (del inglés *Glutamate Rich Protein*) (37). Adicionalmente, esta investigación indicó, que la proteína SURFIN4.2 tiene potencial para unirse a eritrocitos a través de una región denominada CRD (del inglés *Cysteine-Rich-Domain*) que contiene en su secuencia. Las proteínas RON4 y SURFIN4.2 se localizan juntas en el cuello de las roptrias, donde formarían un complejo que podría participar en las primeras etapas de invasión del parásito. A pesar de que el papel de GLURP dentro del complejo no está muy claro, se plantea la hipótesis de que SURGE se encuentra presente en el sitio de interacción del merozoíto con el eritrocito (37).

Diferentes enfoques moleculares de noqueo génico han sido utilizados para tratar de inactivar el gen que codifica para la proteína RON4 en parásitos del género *Plasmodium* (22). En un estudio realizado en *Plasmodium berghei* estos intentos han sido fallidos, lo que sugiere que la proteína desempeña un papel importante en la invasión de los eritrocitos por parte de los merozoítos (36). El uso de un noqueo condicional de *ron4* en *P. berghei* mostró una reducción significativa en la capacidad de los esporozoítos de invadir a la célula hepática, lo cual muestra que probablemente *Pb*RON4 también desempeña un papel importante en el estadio hepático, así como en la fase eritrocítica (36). Así mismo, este trabajo mostró que la disminución de la expresión de AMA1 no mostró ningún efecto sobre la capacidad de invasión de esporozoítos, lo que indica que RON4 actúa de forma independiente de AMA1 en el esporozoíto, y que las interacciones podrían ser diferentes entre estos dos estadios. Adicionalmente, este modelo explicaría la observación de que

RON4 es esencial para la invasión en todos los zoítos Apicomplexa evaluados hasta ahora, mientras que la contribución de AMA1 depende del estadio (36).

Una investigación más actual ha revelado que los componentes del complejo RONs (RON2, 4 y 5) presente en el merozoíto se conservan en esporozoíto, forman un complejo y participan en la invasión de las células de las glándulas salivales en el mosquito (45). Adicionalmente, este estudio mostró, mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-RON4 que los componentes del complejo RONs pueden interactuar con AMA1. Así mismo, se determinó que la ausencia en la expresión de *ron2* o *ron4* en esporozoítos de *P. berghei*, genera una reducción en la expresión recíproca, que afecta además el tráfico de las proteínas hacia las roptrias. Finalmente, concluye que es necesario aplicar otros enfoques a fin de determinar las regiones implicadas en la interacción directa de las proteínas RON2, RON4 y RON5 en esporozoíto (45).

1.2 Enfoque de regiones funcionales de la proteína RON4

En la búsqueda de regiones funcionales de las proteínas del parásito, que puedan ser utilizadas como herramienta para generar componentes que puedan inhibir la invasión y/o el desarrollo del parásito dentro de la célula hospedera, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia ha implementado la utilización de péptidos sintéticos derivados de las secuencias conservadas de proteínas del parásito que participan en el proceso de invasión a la célula blanco. Péptidos derivados de proteínas tanto del estadio de merozoíto (25) como de esporozoíto (26), han sido evaluados y se ha determinado su actividad de unión a las células hospederas de acuerdo con la etapa del ciclo del parásito en la cual participan.

Sin embargo, se ha visto que, a pesar de sus características de unión a las células hospederas, estos péptidos conservados, al ser utilizados para la inmunización de animales experimentales al parecer no son detectados por el sistema inmunológico y, por lo tanto, en una infección natural, no inducen una respuesta inmunitaria de anticuerpos o celular que pueda generar protección. Por su parte, péptidos provenientes de regiones no conservadas son altamente inmunogénicos, pero con baja eficacia protectora. Es así, como se ha planteado la modificación de estos péptidos conservados en los cuales algunos residuos críticos para la unión a la célula hospedera fueron reemplazados y estas

modificaciones permitieron encontrar algunos resultados interesantes: un grupo de HABPs inducía altos títulos de anticuerpos sin generar una respuesta protectora, mientras que otro grupo de HABPs en los cuales se modificaron ciertos aminoácidos específicos indujeron altos títulos de anticuerpos de larga duración y con efectos protectores frente a la infección (46). De forma interesante, se describió que los residuos críticos de los HABPs que participan en la unión a eritrocitos debían ser reemplazados por otros con masa, volumen y superficie similares, pero con una polaridad opuesta, para que los HABPs conservados se vuelvan inmunogénicos e induzcan protección (27). Estudios de relación estructura-función permitieron elucidar que estos cambios inducían un adecuado encaje del péptido dentro del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, lo que mejorara las propiedades inmunogénicas de los HABPs modificados (46).

Teniendo en cuenta las características de la proteína RON4 en *P. falciparum* en cuanto a participación del proceso de invasión, refracción a delección genética y cooperación en la formación de complejos multiproteicos esenciales para una invasión exitosa (22), el siguiente paso es poder determinar qué regiones o HABPs de la proteína *Pf*RON4 podrían estar participando activamente en la interacción con la célula hospedera en busca de puntos clave de acción sobre esta proteína, por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de unión de péptidos sintéticos secuenciales cortos de 20 residuos de longitud derivados de la región conservada de la proteína RON4 de *P. falciparum* comprendida entre los residuos 520 al 1.201, a fin de determinar y caracterizar los HABPs de esta región de la proteína y evaluar su actividad inhibitoria de la invasión en cultivo continuo *in vitro*.

2. Marco teórico

2.1 La malaria y su distribución

La malaria es una enfermedad parasitaria transmitida por la picadura de mosquitos vectores hembra del género *Anopheles* sp. distribuidos en zonas tropicales y subtropicales del mundo (1). Durante la picadura, los mosquitos hematófagos inyectan las formas infectantes del parásito *Plasmodium* sp. al torrente sanguíneo del hospedero intermediario (vertebrado), donde se desarrolla el estadio asexual del parásito desencadenando los síntomas y dando inicio a la enfermedad (47). Esta enfermedad se distribuye a nivel mundial en diferentes zonas endémicas (Figura 1). En los humanos se conocen seis especies del parásito que pueden generar infección, éstas son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* y *P. knowlesi* (48). De todas ellas, las infecciones más prevalentes a nivel mundial son las causadas por *P. falciparum* y *P. vivax*. Datos de la OMS, estimaron para el año 2020 241 millones de casos a nivel mundial, los cuales se concentraron en el continente africano, con un 95% del total de los casos en ese territorio (2). *P. falciparum* es la causa principal de las infecciones en África, mientras en las Américas *P. vivax* encabeza la lista del número de casos. Adicionalmente, durante el 2020, el primer año de la pandemia por COVID19, se estima que hubo 14 millones más de casos de malaria en comparación con el 2019 (241 millones frente a 227 millones), probablemente debido a las interrupciones en la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (2).

En América, los países con más casos de malaria son Venezuela con el 53% de los casos a nivel América, seguido de Brasil (20%) y en el tercer lugar Colombia (48). En Colombia, a lo largo del año 2021 se reportaron 72.022 casos de malaria, de los cuales el 49,6% (n=35.740) correspondió a infección por *P. falciparum*, seguido de *P. vivax* con 49,4% (n=35.606) y 0,9% (n=676) de malaria mixta (ambas especies). Adicionalmente, el 1,64% (n=1.184) de los casos fueron de malaria complicada. La mayoría de los casos se concentran en los departamentos de Chocó, Nariño, Antioquia y Córdoba (3).

La malaria se caracteriza por ser una enfermedad con una sintomatología que es producto de la invasión y destrucción de los eritrocitos por parte de la etapa sanguínea del parásito que es conocida como merozoíto (49). La sintomatología general incluye cefalea, fatiga, dolores musculares y articulares, generalmente seguidos de fiebre, escalofríos, sudoración, anorexia, vómitos y malestar general creciente; los síntomas empeoran con el paso de los días si el paciente no es tratado oportunamente (50, 51). De hecho, en las infecciones causadas por *P. falciparum*, el progreso de la enfermedad puede evolucionar a anemias moderadas a graves, acidosis metabólica, hipoglucemia, insuficiencia renal aguda, alteraciones del sistema nervioso central debido a la malaria cerebral, entre otras manifestaciones severas que conllevan al estado crítico del paciente y consecutivamente a la muerte (52, 53).

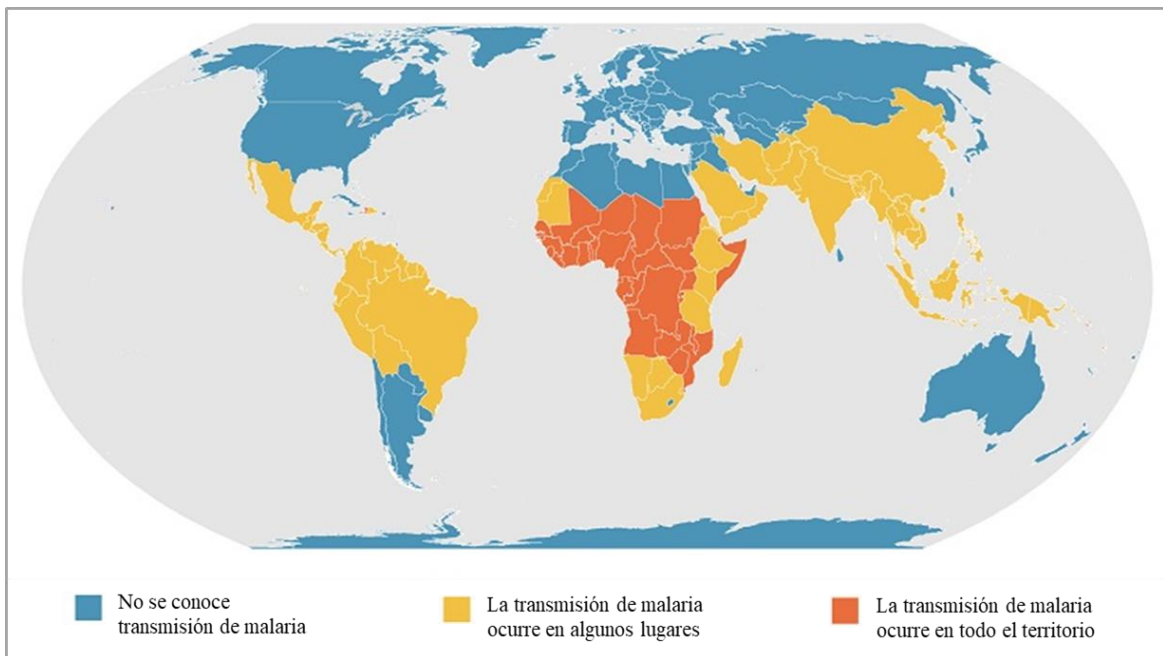


Figura 1. Distribución de la malaria a nivel mundial. Se muestran las áreas endémicas para malaria que incluyen países de Suramérica, Asia y África. Tomado de: (54).

2.2 Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*

Los parásitos del género *Plasmodium* sp. son microorganismos que se desarrollan de forma intracelular y han desarrollado mecanismos eficaces para mantener y propagar su población a partir de la infección de sus hospederos intermediarios y definitivos para conservar su especie. Su ciclo de vida se desarrolla entre un hospedero vertebrado, el hombre, donde desarrolla un ciclo asexual, y uno invertebrado, el mosquito hembra del

género *Anopheles* sp., donde desarrolla su ciclo sexual (Figura 2). Durante su desarrollo el parásito sufre una serie de modificaciones morfológicas y funcionales que le permiten infectar las células hospederas de acuerdo con la fase del ciclo de vida en la cual se encuentre. Las fases asexuales ocurren dentro del ser humano y son denominadas como la fase hepática y la fase eritrocítica. Dentro del vector ocurre la fase sexual.

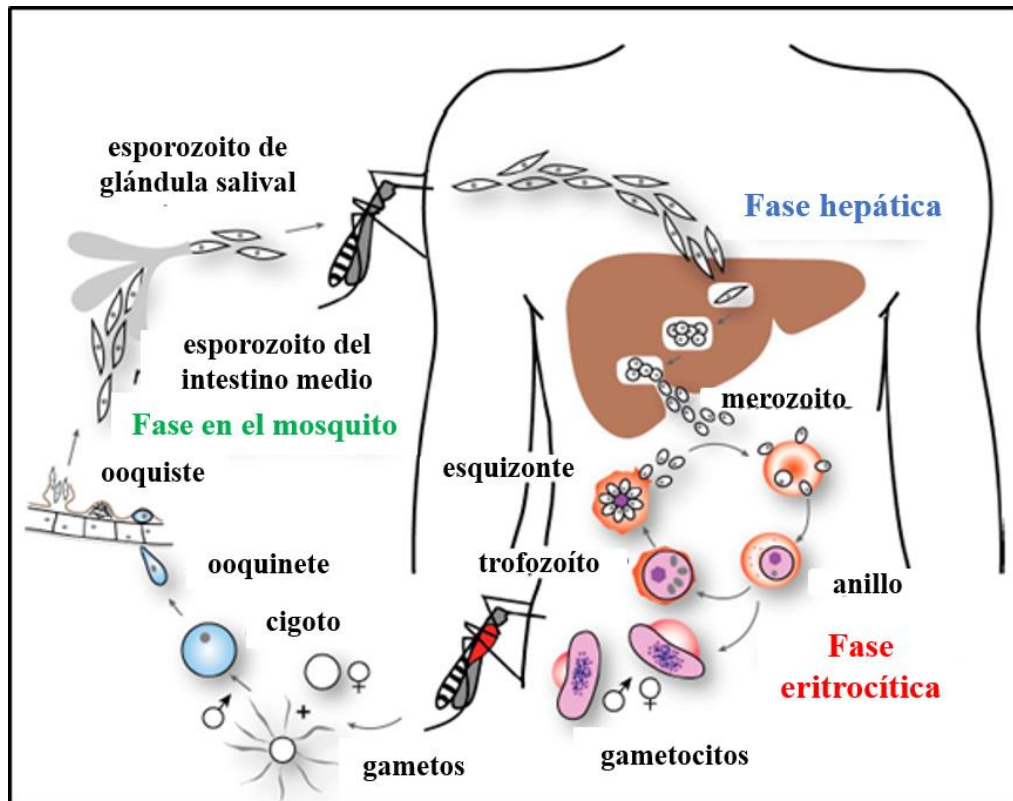


Figura 2. Ciclo de vida de *P. falciparum*. Los esporozoítos son inoculados en el hospedero mediante la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* sp.; por medio del torrente sanguíneo, los esporozoítos migran hasta el hígado e invaden los hepatocitos; allí se transforman en esquizontes hepáticos, los cuales se rompen liberando merozoítos al torrente sanguíneo. Los merozoítos invaden eritrocitos, pasando por el estadio de anillo, trofozoítos y finalmente a esquizontes. Algunos trofozoítos se diferencian en gametocitos masculinos y femeninos, dando inicio al ciclo sexual tras ser consumidos por el mosquito, y finalmente da paso a la generación de esporozoítos infectantes para los humanos. Tomado y modificado (12).

2.2.1 Fase hepática del ciclo de vida

Esta fase del ciclo de vida inicia cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* sp. infectado con el parásito, pica al hospedero humano durante la alimentación hematológica donde son inoculadas las formas infectantes móviles denominadas esporozoítos. Se ha

descrito que alrededor de 15 a 123 esporozoítos son inoculados en una picadura donde algunos tienen la capacidad de infectar células epiteliales (52). Sin embargo, en su mayoría, luego de su inoculación, los esporozoítos migran por el torrente sanguíneo hasta alcanzar el hígado. Una vez encuentran los sinusoides hepáticos, se fijan al endotelio a través de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG, del inglés *heparan sulfate proteoglycans*), atraviesan la pared por medio de las células de Kupffer (55), realizan otro mecanismo denominado *cell traversal* o atravesamiento celular y finalmente invaden los hepatocitos (21) (Figura 3). Dentro de los hepatocitos, los esporozoítos sufren cambios morfológicos y divisiones celulares por mitosis que dan paso a la formación de aproximadamente 30.000 merozoítos hepáticos, los cuales serán liberados al torrente sanguíneo después de 5 a 8 días de iniciada la infección hepática, en una estructura denominada esquizonte hepático. Es importante destacar que esta etapa del ciclo del parásito es asintomática (21).

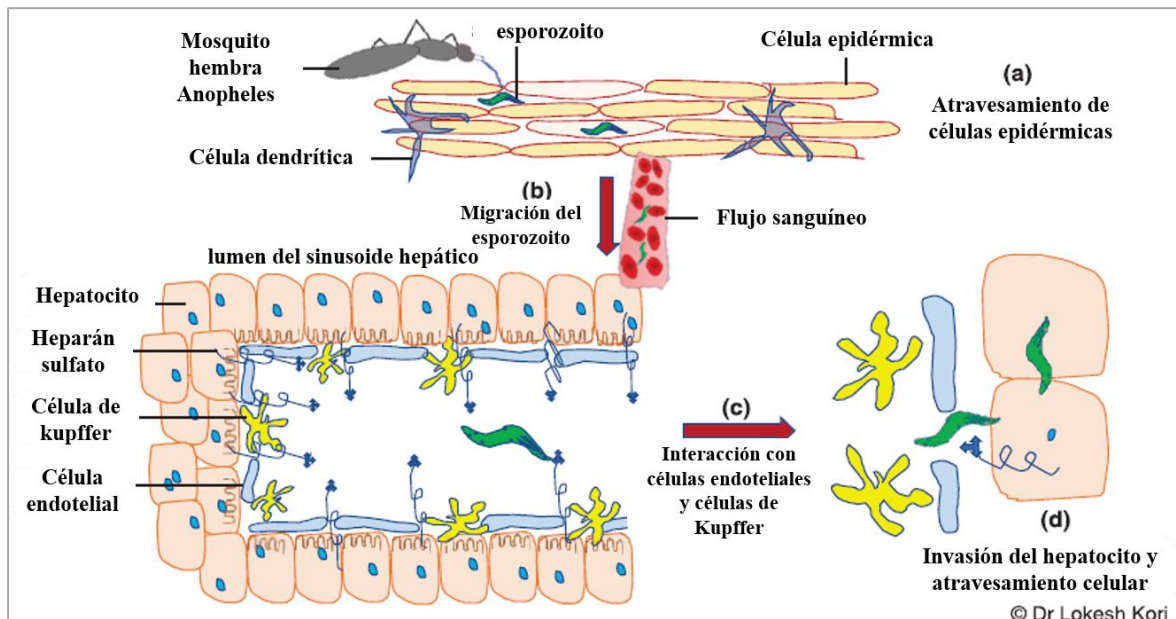


Figura 3. Fase hepática. a. Los esporozoítos ingresan en los tejidos de la piel a través de la picadura de un mosquito, en seguida atraviesan las células epidérmicas para entrar en los vasos sanguíneos. b. se transportan vía torrente sanguíneo e interactúan con los sinusoides hepáticos a través de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), c. luego atraviesan las células endoteliales y de Kupffer mediante la motilidad deslizante y d. finalmente llegan a las células hepáticas, invade los hepatocitos y atraviesan las células vecinas mediante el uso de varios enfoques moleculares. Tomado de (56).

2.2.2 Fase eritrocítica del ciclo de vida

Los merozoítos provenientes de la ruptura del hepatocito son las formas con capacidad de infectar los glóbulos rojos o eritrocitos, por lo tanto, le permiten al parásito perpetuar el ciclo asexual en el torrente sanguíneo y además, son los responsables de la sintomatología que experimentan los pacientes (49). *P. falciparum* invade eritrocitos maduros, con un ciclo eritrocítico que tiene una duración de aproximadamente 48 horas. Durante este tiempo, el merozoíto ingresa a la célula y el parásito muestra varias etapas de desarrollo intra-eritrocítico; entre las 6 y las 22 horas de desarrollo se puede observar una estructura en forma de anillo, entre las 22 y 38 horas aparece el estadio de trofozoíto y el esquizonte está presente aproximadamente entre las 38 y 48 horas (57). Cumplidas las 48 horas del ciclo de vida, el esquizonte se revienta y libera en el torrente sanguíneo merozoítos que son capaces de infectar nuevos eritrocitos, conduciendo a una rápida elevación en el número de parásitos en sangre (58). Algunos de los trofozoítos influenciados por diferentes tipos de estrés, dentro de los cuales se describen la densidad parasitaria, el grado de anemia en el paciente, la respuesta inmune del hospedero, los tratamientos y otras razones aún no conocidas, se diferencian en otro estadio que se conoce como gametocito (59).

2.2.3 Fase en el vector

Los gametos masculinos y femeninos, son las etapas infecciosas para los mosquitos y son los responsables de la reproducción sexual dentro del mismo, estas formas son succionadas por los mosquitos durante la picadura a un hospedero infectado (60). Dentro del mosquito hembra, los gametocitos son liberados en el intestino donde se fertilizan por reproducción sexual y forman una estructura denominada ooquinetos que tiene la capacidad de atravesar el epitelio del intestino medio del mosquito, para posteriormente diferenciarse a ooquistes. Estos ooquistes maduran formando esporozoítos, los cuales son liberados para luego migrar a las glándulas salivales del vector a la espera de una nueva inoculación (1, 12).

2.3 Estructuras del merozoíto y esporozoíto.

Los merozoítos son células uninucleadas, que poseen una forma ovoide y tienen 1µm de largo aproximadamente. Mediante microscopía electrónica es posible apreciar las estructuras que conforman la célula, entre las cuales se destacan el núcleo, la vacuola

digestiva, una mitocondria, entre otras estructuras vesiculares (61). El esporozoíto por su parte cuenta con estructuras muy similares a las descritas en el merozoíto, sin embargo, su forma es más alargada y presenta un movimiento en espiral muy característico que ha sido denominado *gliding motility* o movilidad deslizante (62). En el polo apical de ambas formas invasivas se encuentran orgánulos secretores especializados propios de los microorganismos del filo: las roptrias, los micronemas y otros distribuidos en el citoplasma celular, denominados gránulos densos (Figura 4). Estos orgánulos secretan diferentes tipos de proteínas que desempeñan funciones fundamentales para el complejo proceso de invasión de las células hospederas, que varían según el estadio (13).

2.3.1 Roptrias

Las roptrias son un par de orgánulos grandes en forma de pera, que se encuentran localizadas en el extremo apical del merozoíto y el esporozoíto, poseen un cuerpo denominado bulbo y una prolongación hacia el extremo que se denomina cuello de las roptrias, esta prolongación se observa con una mayor densidad en microscopía electrónica que el resto del cuerpo. Esta diferencia, ha sido relacionada con la composición proteica diferencial entre ambas porciones aunque no se cuente con una estructura membranosa definida que las separe (63). Este par de orgánulos representan una interfaz entre el parásito y la célula hospedera y se encuentran apoyando el proceso de invasión y la síntesis de la vacuola parasitófora mediante las proteínas contenidas allí (64, 65). Se han identificado diferentes poblaciones de proteínas que se localizan en el bulbo y el cuello de las roptrias, sin embargo, se desconoce la función de muchas de estas proteínas y cómo se segregan espacialmente dentro de las roptrias.

Análisis detallados del destino de las proteínas localizadas en el cuello de las roptrias y de las proteínas del bulbo, han sugerido que el contenido de los diferentes subcompartimentos de las roptrias se libera en diferentes puntos durante el proceso de invasión y que, al parecer, las proteínas del cuello se descargan antes que las proteínas del bulbo de roptrias, sin embargo, el mecanismo de cómo las diferentes clases de proteínas son selectivamente liberadas desde los compartimentos de los orgánulos es desconocido (66). Algunas investigaciones han propuesto que la liberación coordinada podría estar relacionada a cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico, los cuales a su vez están sujetos a sí mismo a otros factores externos como los niveles de potasio plasmático (67). Otro estudio sugiere

que la organización de las proteínas dentro de estos orgánulos secretores puede ser determinante en el orden en que éstas van a ser secretadas y podrían estar relacionadas con su función (66).

Varias proteínas del cuello han sido ampliamente implicadas en las primeras etapas de la entrada del merozoíto a la célula hospedera, especialmente en la formación del enlace fuerte o unión estrecha (41), sin embargo, la asociación entre función, momento de descarga y compartimentación dentro de los roptrias no es estricta, pues las evidencias actuales apuntan a que generalmente las proteínas del cuello roptrias, aunque no de forma exclusiva, están involucradas en la entrada a la célula hospedera, mientras que las proteínas del bulbo están relacionadas generalmente con funciones posteriores en el ciclo de vida, como la formación de la vacuola parasitófora (estructura que alberga al parásito durante su desarrollo dentro del eritrocito). Aunque se conocen las funciones de algunas de estas proteínas, muchas permanecen aún sin ser caracterizadas (68, 69).

2.3.2 Micronemas y gránulos densos

Los micronemas son un conjunto de orgánulos alargados, que almacenan proteínas adhesivas y que liberan su contenido proteico sobre la superficie del parásito durante el proceso de invasión a la célula hospedera; se ha descrito que las proteínas allí contenidas cumplen funciones relacionadas con el reconocimiento y selección de las células a invadir (70). Finalmente, los gránulos densos, son unas estructuras redondas, que tienden a acumularse igualmente en el citoplasma celular hacia la región apical de la célula, éstos excretan su contenido principalmente en la vacuola parasitófora (65). Estos tres orgánulos apicales almacenan en su interior material proteico que es liberado secuencialmente ya sea durante o poco después del proceso de invasión, impulsado por diferentes señales, muchas de ellas aún desconocidas (67).

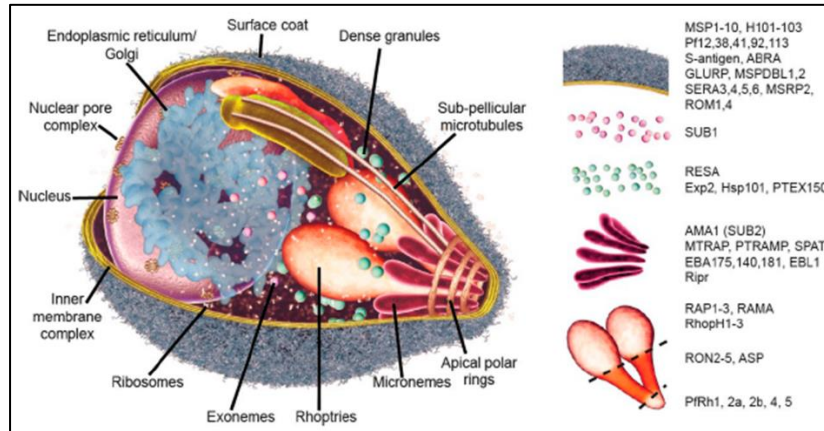


Figura 4. El merozoíto y sus estructuras intracelulares. A la izquierda se representa un merozoíto y se observan las estructuras que conforman el complejo apical: Roptrias, micronemas y gránulos densos. A la derecha se listan varias proteínas y se muestra su localización dentro de los diferentes orgánulos. Tomado de (12).

2.4 Proceso de invasión del esporozoíto

Inicialmente, los esporozoítos que ingresan al tejido mediante la picadura del mosquito utilizan un mecanismo que se denomina movilidad deslizante o *gliding motility* para viajar a través de la piel y hacia los vasos dérmicos (21); ya dentro de los vasos sanguíneos, alcanzan los sinusoides hepáticos y allí se mantienen fijos mediante interacciones con HSPG de las células endoteliales a través de proteínas como la proteína del circumsporozoíto o CSP (del inglés *Circumsporozoite Protein*) y la proteína anónima relacionada a trombospondina o TRAP (del inglés *Thrombospondin Related Anonymous Protein*) (71, 72). La proteína CSP contiene dominios de repetición de trombospondina tipo 1 o TSR (del inglés *Thrombospondin type 1 Repeat*), que se unen a las cadenas de HSPG (71). TRAP es una proteína que es liberada durante la movilidad deslizante, sin embargo, ha mostrado ser esencial también para otros procesos como el deslizamiento de los esporozoítos y la infectividad *in vivo* (62). TRAP contiene un dominio von Willebrand y al igual que CSP contiene dominios TSR, los cuales cumplirían funciones similares a las descritas para CSP, permitiendo la interacción con HSPG (72).

A pesar de que los esporozoítos se ayudan utilizando tanto el torrente sanguíneo como la circulación linfática para alcanzar sus células hospedadoras, ya en el sitio requieren cruzar otras barreras celulares en el camino hacia los hepatocitos; este proceso se conoce como *atravesamiento celular* o *cell traversal* y se describe como el paso del esporozoíto a través de diferentes tipos celulares. Esto no corresponde a una infección productiva, si no al paso

o atravesamiento de las células y aún no está claro si puede o no generar cierto grado de afectación. Investigaciones iniciales mostraron que se genera una ruptura en la membrana plasmática, hiriendo a la célula involucrada (73), sin embargo, estudios más recientes sugieren que este proceso podría ser mediado por vacuolas transitorias sin remodelación de la membrana (74). Adicionalmente, aún no se tiene claro por qué el parásito debe atravesar las células antes del desarrollo de la etapa infecciosa del esporozoíto (56). Hasta el momento se han planteado varias hipótesis: la primera se relaciona con los niveles de calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+) intracelular; altos niveles de Ca^{2+} aumentan la infección de los hepatocitos, mientras altos niveles de K^+ aumenta la invasión y disminuyen el *cell traversal* (75). La segunda hipótesis sugiere que debido al paso celular, los hepatocitos pueden secretar microfactores extracelulares que facilitarían a los esporozoítos infectar a las células vecinas (76) y la tercera hipótesis sugiere que el esporozoíto logra detectar en el microambiente celular el nivel de HSPG, lo que le permite cambiar entre atravesamiento (bajo nivel de HSGP) e infección (alto nivel de HSPG) (77).

En este proceso de atravesamiento celular se han visto involucradas diferentes proteínas, principalmente la proteína similar a la perforina 1 PLP1 (del inglés *perforin-like protein 1*) (74), la proteína de micronemas de esporozoítos esencial para el atravesamiento celular SPECT 1 y 2 (del inglés *Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal*) (78, 79), así como la proteína de atravesamiento celular para ooquistos y esporozoítos CeTOS (del inglés *Cell Traversal protein for Ookinetes and Sporozoites*) (80). Estudios han descrito que la proteína CeTOS se une al ácido fosfatídico en la cara interna de las membranas plasmáticas de forma que podría facilitar la salida del parásito durante el atravesamiento celular (81).

Por mucho tiempo se ha descrito que el proceso de invasión a las células hepáticas está mediado por las proteínas CSP y TRAP, las cuales son antígenos claves en el proceso de invasión del esporozoíto. Se ha encontrado que estas proteínas están inicialmente de forma intracelular y son posteriormente secretadas sobre la membrana del esporozoíto al momento del contacto con el hepatocito (82). Al parecer en esta etapa, CSP cumple una función adhesiva a la célula hepática (83), mientras TRAP contribuye a la internalización de los esporozoítos (84). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que un complejo proteico conformado por las proteínas RON 2, 4 y 5 y por la proteína AMA1 (AMA1/RONs), sería clave para la formación del TJ con el hepatocito (45). Es así como algunas investigaciones han tratado de revelar el rol de las proteínas RONs empleando

diversas aproximaciones. Mediante la metodología de modificación genética, parásitos con expresión condicional de RON4 mostraron reducida capacidad de invasión a las células hepáticas, sugiriendo que RON4 también desempeña un papel importante en el esporozoíto (36). Nuevas investigaciones se han centrado en mostrar que el complejo de proteínas RONs también se forma en esporozoítos y es importante para la invasión de las células de las glándulas salivares del mosquito. En este estudio, utilizando anticuerpos anti-RON4 se logró inmunoprecipitar la proteína AMA1 (45), demostrando que esta proteína desempeña un papel importante en este estadio del parásito y que el mecanismo de invasión podría ser conservado en ambos estadios.

De hecho, estudios recientes con el péptido R1, inhibidor de la formación del complejo AMA1/RONs en merozoítos, han mostrado que este péptido reduce también la actividad de atravesamiento celular y la invasión a hepatocitos por esporozoítos de *P. falciparum*, mostrando que este complejo proteico participa en el proceso de invasión de los hepatocitos por los esporozoítos (85). Sin embargo, al observar solo una inhibición parcial del proceso de invasión del esporozoíto, se hizo la búsqueda de otras proteínas que pudieran estar participando en la invasión. Mediante ensayos de interrupción genética, se determinó que una proteína denominada ligando de unión a eritrocitos apicales de merozoíto o MAEBL (del inglés *Merozoite Apical Erythrocyte-Binding Ligand*) con dominios similares a la proteína AMA1 y expresión abundante sobre esporozoítos de *P. falciparum* es esencial para el atravesamiento celular y la invasión de los hepatocitos por esporozoítos (85).

Adicionalmente, se ha visto que el receptor tetraspanina o CD81 (del inglés *Cluster of Differentiation 81*) está relacionado con la entrada de esporozoítos a los hepatocitos mediante la formación de una vacuola parasitófora, pero no se conoce el ligando con el cual interactúa (86). El esporozoíto utiliza el motor asociado a la membrana plasmática que también impulsa la motilidad de deslizamiento del parásito, similar a como ocurre en merozoíto, para ingresar al hepatocito, donde finalmente se divide por reproducción asexual, generando los esquizontes tisulares, los cuales se rompen liberando la etapa infectiva para los eritrocitos (21).

2.5 Proceso de invasión del merozoíto

El proceso de invasión de los parásitos del género *Plasmodium* sp. es un proceso complejo que involucra una serie de etapas consecutivas donde diferentes ligandos del parásito interactúan con receptores sobre la célula hospedera. Se han descrito tres etapas: la unión inicial, la reorientación y la invasión (Figura 5).

2.5.1 Unión inicial y reorientación.

Inicialmente, el parásito en su forma de merozoíto recién liberado al medio extracelular tras la ruptura del esquizonte, se expone a niveles bajos de potasio, lo que desencadena liberación de Ca^{2+} y a su vez promueve la liberación de moléculas adhesivas hacia la superficie del merozoíto. Estas proteínas median lo que se conoce como la unión inicial, que es un conjunto de interacciones débiles y reversibles donde participan principalmente la familia de proteínas de superficie del merozoíto o MSP (del inglés *Merozoite Surface Proteins*). Esta familia de proteínas ha sido dividida en aquellas que se anclan a la membrana mediante un motivo de GPI (del inglés *glycosylphosphatidylinositol*), dentro de las cuales están MSP 1, 2, 4, 5, y 10 y otras proteínas presentes en la superficie como proteínas periféricas tales como MSP 3, 6, 7 (87). MSP1 es la proteína más abundante sobre la superficie del merozoíto, la cual establece varios complejos multiproteicos con otras MSPs (MSP 6 y 7) e incluso con proteínas provenientes de micronemas y roptrias como la proteína de las roptrias 3, RhopH3 (del inglés *Rhoptry Protein 3*), y las proteínas asociadas a las roptrias 1 y 2, RAP1 y RAP2 (del inglés *Rhoptry Associated Proteins*) (88). Así mismo, se ha descrito que MSP1 interactúa directamente con receptores sobre el eritrocito como Banda 3, GPA (88, 89) y heparina (90), durante este contacto inicial (Figura 6A).

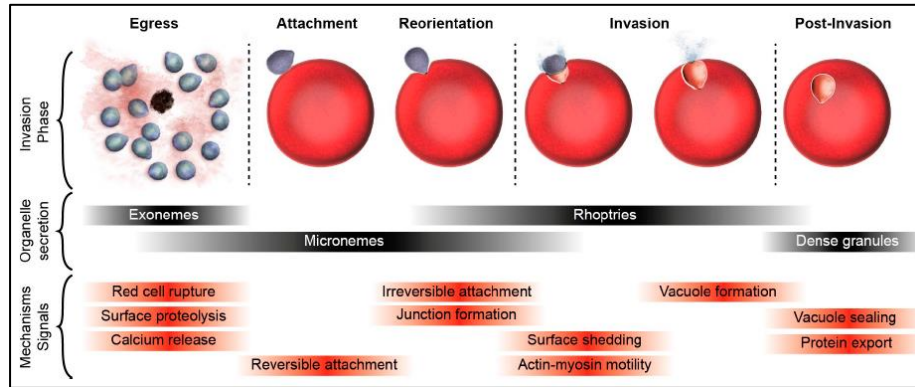


Figura 5. Secuencia de eventos de la invasión del eritrocito por el merozoíto. Se muestra que luego del egreso del merozoíto tras la ruptura del esquizonte, se activan una serie de mecanismos que conllevan a diferentes etapas para la invasión del eritrocito. Inicialmente ocurre la unión inicial mediada por interacciones débiles y reversibles, en seguida se produce la reorientación, seguido de la invasión; en esta etapa se lleva a cabo la formación del enlace fuerte e irreversible, para el ingreso del parásito a la célula y la posterior formación de la vacuola parasitófora que contendrá al parásito durante su desarrollo. Tomado de (12).

Después de la unión inicial, el merozoíto experimenta lo que se conoce como reorientación, un movimiento en el cual el extremo apical de la célula queda en contacto directo con la membrana del eritrocito (67). Esta etapa involucra la liberación de otras dos familias de proteínas, una de ellas deriva de los micronemas y se denominan antígenos de unión al eritrocito o EBAs (del inglés *Erythrocyte Binding Antigens*) y la otra familia deriva de las Rhoptrias, denominadas proteínas homólogas de unión a reticulocito o Rhs (del inglés *Reticulocyte-binding Homologue*) (91), cuya liberación al parecer es mediada por la restauración de los niveles basales de Ca^{2+} citoplasmático. Estas proteínas actúan en conjunto con receptores del eritrocito para llevar a cabo la invasión y pueden estar involucradas en la utilización de rutas alternativas (92) (Figura 6B).

Utilizando enfoques bioquímicos, a través de tratamientos enzimáticos de los eritrocitos para eliminar determinadas moléculas receptoras sobre la superficie de éstos, así como enfoques moleculares de creación de eritrocitos nulos para ciertos receptores, se han caracterizado algunas de las interacciones moleculares descritas para las proteínas EBAs, por ejemplo, se conoce que la proteína *PfEBA175* interactúa con el receptor GPA (41), mientras que *PfEBA140* lo hace con Glicoforina C, GPC (del inglés *Glycophorin C*) (93, 94). Para *PfEBA181*, se sabe que se une a un receptor sensible al tratamiento con Neuraminidasa y Quimotripsina sobre la membrana del eritrocito, sin embargo, aún no se

conoce su identidad (95). Finalmente, el ligando de unión al eritrocito EBL1 (del inglés *Erythrocyte Binding Ligand 1*), se ha descrito que se une específicamente a Glicoforina B, GPB (del inglés *Glycophorin B*) (96).

En cuanto a la familia de proteínas Rhs se conocen cinco miembros denominados: *PfRh1*, *PfRh2a*, *PfRh2b*, *PfRh4* y *PfRh5*, siendo el último integrante el único esencial para la supervivencia del parásito durante el proceso de invasión (97). Por su parte, los otros integrantes se han involucrado en funciones cooperativas con los la familia EBA y en la participación de rutas alternas de invasión (92). Dentro de las interacciones de las proteínas de esta familia, se conoce que Rh4 interactúa con el receptor de complemento tipo 1 o CR1 (del inglés *Complement Receptor type 1*) (98) y Rh5 se une a su receptor Basigina o CD147 (del inglés *Cluster of Differentiation 147*) (39). De estas interacciones la que ha recobrado mayor importancia dentro del proceso de invasión involucra la formación de un complejo de la proteína *PfRh5* con varias proteínas: la proteína denominada antígeno protectoro rico en cisteínas CyRPA (del inglés *Cysteine-Rich Protective Antigen*) y la proteína R1PR (del inglés *Rh5 Interacting Protein*) (99-102). Adicionalmente, otros estudios han identificado una cuarta proteína denominada P113, la cual parece ayudar a anclar el complejo a la superficie del eritrocito, antes de la interacción de Rh5 con su receptor Basigina (103), este complejo es el encargado de formar lo que se conoce como el pre-TJ.

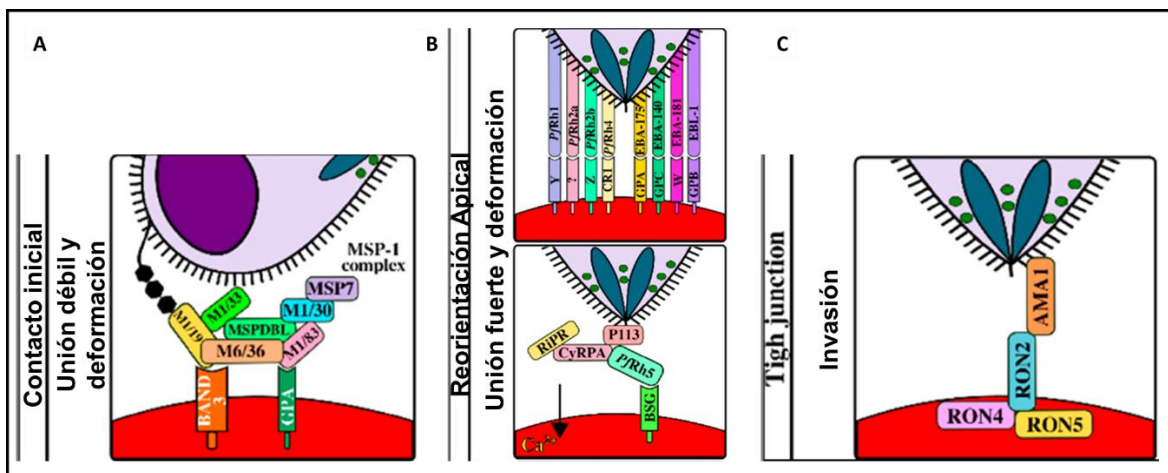


Figura 6. Principales interacciones receptor ligando conocidas en *P. falciparum*. A. Contacto inicial, interacciones débiles reversibles entre el merozoíto y la membrana del eritrocito, mediadas por el complejo MSP1. B. Interacciones entre las familias de proteínas EBAs y Rhs de *P. falciparum* y receptores sobre la superficie del eritrocito durante la reorientación. C. Formación del enlace fuerte durante la etapa avanzada de invasión,

donde participan el complejo de proteínas RON y la proteína AMA1. Figura tomada y modificada de (40).

2.5.2 Formación del TJ e invasión

El proceso de reorientación da paso a la etapa de liberación de proteínas desde las roptrias, evento que a su vez permite la generación de interacciones proteína-proteína que han sido ampliamente descritas y que son indispensables pues dan paso a la formación del TJ, una estructura generada entre las membranas del merozoíto y el eritrocito (104). Posterior a su formación, el TJ migra desde el polo apical del parásito hasta su extremo posterior, por dicha razón se ha denominado también como unión móvil o MJ (del inglés *Moving Junction*) (14). Dicha interacción es irreversible y se ha descrito como móvil, puesto que le permite al parásito impulsarse hacia el interior del eritrocito. Este mecanismo está mediado por el motor de actina-miosina anclado al complejo de membrana interna o IMC (del inglés *Inner Membrane Complex*), que permite la formación de un anillo en el enlace fuerte detrás del complejo formado por las proteínas RONs y AMA1, permitiendo el ingreso del merozoíto al eritrocito (42).

Se sabe que la proteína AMA-1 es liberada desde los micronemas, y translocada a la superficie del merozoíto antes del inicio de la invasión (105). De esta manera, se ha mostrado que la formación del enlace fuerte, es una etapa crucial del proceso de invasión a la célula hospedera, que al ser interrumpido puede evitar la invasión a la célula blanco (19). Se ha descrito que a partir del cuello de las roptrias se secretan las proteínas RONs, las cuales forman un complejo que se inserta en la membrana del eritrocito por medio de señales aún desconocidas (43). Aunque no es claro cómo ocurre el transporte de estos antígenos, estudios de inmunofluorescencia han mostrado la presencia de RON4 en el anillo deslizante durante la formación del MJ (36). La proteína RON2, es liberada desde el cuello de las roptrias y forma un complejo con las proteínas RON4 y RON5, asociándose a la cara citoplasmática del eritrocito, donde quedan inmersas en la membrana mientras RON2 queda expuesta sobre la superficie, para posteriormente interactuar con la proteína AMA1 presente en la superficie del merozoíto (14, 20) (Figura 6C). Esta interacción ocurre entre una región de AMA1 que forma un bolsillo hidrofóbico entre el Dominio I y II, el cual es el sitio de unión a RON2 (104). Experimentos de inhibición de la formación del complejo AMA1/RONs mediante anticuerpos (16, 19, 106), o péptidos de RON2 (104) han demostrado que la interrupción de este complejo evita la invasión de los merozoítos,

demostrando la importancia de las proteínas que participan en complejo durante la entrada del parásito a los eritrocitos.

Finalmente, tras la formación del enlace fuerte y la introducción del parásito dentro del eritrocito, otras proteínas provenientes principalmente del bulbo de las roptrias y de los gránulos densos son excretadas para formar una estructura que se conoce como vacuola parasitófora. En este proceso, algunas enzimas proteolíticas como Subtilisina-1 (SUB-1), actúan procesando algunas proteínas del parásito que ayudan a su mantenimiento (107). La vacuola parasitófora es una estructura que protege al parásito y le genera un ambiente óptimo para el desarrollo de los merozoítos (17, 108). Cuando el MJ ha migrado de forma completa a la parte posterior del merozoíto, la vacuola parasitófora se cierra, permitiéndole al parásito iniciar el proceso de replicación, a fin de perpetuar el ciclo asexual generando múltiples merozoítos, los cuales ciclo tras ciclo invadirán nuevos eritrocitos (49).

2.6 Métodos de control contra la malaria por *P. falciparum*

En la lucha contra la malaria, diferentes estrategias han sido utilizadas para tratar de controlar la enfermedad. Diversas formulaciones han sido postuladas para tal fin, incluyendo vacunas dirigidas contra la fase pre-eritrocítica, que previenen la infección; otras dirigidas contra la etapa sanguínea que limitan la infección o enfoques que buscan bloquear la transmisión (109). Sin embargo, las formulaciones que mayor interés han despertado hasta el momento son las dirigidas contra la etapa pre-eritrocítica. Dentro de esta categoría, se han utilizado esporozoítos atenuados, ya sea por radiación o por manipulación genética (110, 111), vacunas basadas en vectores virales (112) y vacunas basadas en proteínas recombinantes (113). Uno de los principales antígenos que ha sido utilizado en formulaciones basadas en subunidades es CSP, por ejemplo, RTS,S y R21 que han mostrado grados de protección variables (114, 115), sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora muestran que las vacunas basadas en organismos completos o subunidades que involucran una sola variante del parásito no son suficientes para cubrir su amplia diversidad genética (116). Por ello, en la búsqueda de soluciones a esta alta diversidad, enfoques han sugerido el desarrollo de vacunas a partir de subunidades derivadas no de una, sino de varias de las proteínas que participan en la invasión del parásito, y que sean provenientes de varias cepas circundantes, teniendo en cuenta

también las diferentes etapas de desarrollo del parásito, características que en conjunto podrían evitar todos los obstáculos hasta ahora encontrados (28). Este enfoque, por lo tanto, busca identificar regiones conservadas (cHABPs) que son importantes a nivel funcional en las proteínas que participan en la invasión de las células hospederas, lo cual hasta ahora ha permitido identificar varias proteínas en merozoíto (25) y esporozoíto (26) que tienen capacidad de interactuar con la célula hospedera y, adicionalmente, han permitido establecer algunos principios clave para el desarrollo de vacunas a partir de péptidos sintéticos (27, 28). Estos principios se basan en las observaciones obtenidas en los estudios de inmunización realizados, en los cuales se observó que los cHABPs son pobremente inmunogénicos y por lo tanto no son capaces de inducir respuesta protectora en el modelo de primates del género *Aotus*. Por otro lado, los HABPs que presentan variabilidad en su secuencia mostraron ser capaces de inducir una respuesta inmune específica de cepa (31). Para solucionar este problema, se realizaron estudios de la relación estructura-función, que permitieron determinar que los residuos críticos de los cHABPs que participan en la unión a eritrocitos debían ser reemplazados por otros con masa, volumen y superficie similares, pero con una polaridad opuesta, para volverlos inmunogénicos y que induzcan protección (27). Estos cambios permiten un mejor acople del péptido en el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (46), permitiendo obtener más de 100 moléculas que actualmente son candidatos clave para el desarrollo de una vacuna multiantígeno (31).

3. Planteamiento del problema

En Colombia y en muchas otras zonas tropicales y subtropicales del mundo donde se desarrolla el mosquito *Anopheles* spp (56), la malaria representa un serio problema de salud pública; sólo en el 2020 se registraron 241 millones de casos alrededor del mundo, y 627.000 mil muertes, con la mayoría de los casos concentrados en el continente africano, y la mayoría de estos fueron causados por *P. falciparum* (2). Estas cifras no son ajenas a las encontradas en el territorio colombiano, donde para el año 2021, se reportaron más de 70.000 casos, con una importante participación de *P. falciparum*, siendo la causa de casi el 50% de las infecciones. En Colombia, para el año 2021, la mayoría de los casos registrados (76,3%) se presentaron en los departamentos de Chocó, Nariño, Antioquia y Córdoba (3). Adicionalmente, la mayor parte de los casos complicados a nivel clínico y que conllevan a mortalidad están asociados también con esta especie del parásito (4).

Los métodos de control contra esta enfermedad se han basado principalmente en el desarrollo de fármacos que ayuden al control de la infección, con el fin de evitar su progresión a enfermedad grave o fatal y el aumento de casos (5), así como estrategias para el control del mosquito vector (8). Sin embargo, a menudo se encuentran cepas resistentes a los tratamientos disponibles (6), que hacen cada vez más difícil mantener bajo control las infecciones en los diferentes territorios. Otros enfoques que buscan una solución más duradera y eficaz, se han inclinado por el desarrollo y formulación de vacunas, sin embargo, el camino para alcanzar este objetivo es aún incierto (9). Por el momento, la mayor dificultad es el discernimiento de la compleja red de interacciones que se generan entre las células hospederas y las proteínas del parásito.

En *P. falciparum* se han descrito una gran cantidad de proteínas y diversas investigaciones han tratado de determinar su función. En este grupo resaltan las proteínas tanto de superficie, como las provenientes de los orgánulos especializados del parásito. Dentro de estas últimas, las proteínas localizadas en el cuello de las roptrias (RONs) que son

liberadas y exportadas a la superficie de la célula hospedera durante un importante paso del proceso de invasión, se destacan por participar dentro del complejo que da lugar al TJ. Si bien se ha descrito que *PfRON2* interactúa directamente con AMA1 (24, 43, 104) y que *PfRON5* contiene regiones claves que interactúan con células hospederas (117), aún se desconoce si *PfRON4* (el mayor componente del TJ) puede jugar un rol clave en la adhesión a la célula hospedera durante la formación del TJ y si tales regiones tienen capacidad de bloquear el proceso de invasión a la célula hospedera. Hasta el momento, se conoce que *PfRON4* ha demostrado ser refractario a delección genética (22), que es importante para la invasión en ambos estadios del parásito (36) y se ha descrito que en otros parásitos como *P. vivax*, interactúa específicamente con reticulocitos CD71⁺CD45⁻ (118). Por lo tanto, este trabajo de investigación estuvo orientado a incrementar el conocimiento básico de la participación de *PfRON4* en el proceso de invasión de los eritrocitos y los hepatocitos humanos, en busca de nuevas regiones con potencial para ser incluidas en una vacuna multiantígeno, multiestadio contra la malaria por *P. falciparum*.

4. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las regiones conservadas de la proteína RON4 de *Plasmodium falciparum* que interactúan específicamente con hepatocitos y eritrocitos humanos y son capaces de inhibir la invasión de los merozoítos a la célula blanco?

5. Justificación

La malaria es una enfermedad causada por microorganismos del género *Plasmodium* sp., un parásito que se desarrolla a través de un complejo ciclo de vida, que involucra múltiples estadios y que expresa una gran variedad de antígenos, que le permiten mantener su mecanismo de invasión y generar estrategias de evasión al sistema inmunológico (10, 12, 13); por esta razón, esta enfermedad sigue ampliamente distribuida y afecta a millones de personas a nivel mundial (48).

Estrategias para el control de la infección por parásitos del género *Plasmodium* sp. han sido propuestas desde múltiples escenarios (6-9), sin embargo, la falta de una solución definitiva a esta problemática a nivel de salud pública, conlleva a que se mantengan e intensifiquen los esfuerzos por conocer a mayor profundidad los mecanismos de invasión y evasión (10) y la compleja red de interacciones receptor-ligando que le han permitido al parásito hasta el momento mantener el nivel de contagio y propagación de la infección (14) burlando todas las estrategias de control hasta ahora propuestas. Por lo anterior, cada vez se le presta una mayor atención a la identificación, descripción y caracterización de los antígenos del parásito y a los receptores de las células hospederas que participan en las interacciones críticas, para que el proceso de invasión se produzca de forma correcta (12, 13).

La proteína PfRON4 ha demostrado ser esencial en el proceso de invasión, además de estar presente en ambos estadios del parásito *P. falciparum*: el esporozoíto (36, 45) y el merozoíto (14), lo que la hace un candidato aún más importante puesto que métodos de control contra esta proteína estarían dirigidos contra ambas etapas, afectando el desarrollo del parásito desde dos frentes diferentes y, por consiguiente, una mayor posibilidad de obtener una solución efectiva frente a las infecciones. Distintos enfoques han sido abordados en búsqueda de estrategias para la evaluación de la función de las proteínas

del parásito; la aplicación de técnicas moleculares combinadas con aproximaciones bioinformáticas ha permitido obtener información acerca de las regiones conservadas de las proteínas que podrían desempeñar funciones indispensables para el parásito y por consiguiente ser los blancos de acción perfectos para inhibir la entrada del parásito a la célula hospedera. La evaluación de las proteínas completas, requiere la expresión de estas proteínas de forma recombinante o su purificación desde cultivo, lo que conlleva a una enorme cantidad de trabajo y muchas veces trae consigo dificultades en su obtención (119). Es así como los péptidos cortos, derivados de las secuencias conservadas de diversas proteínas que participan en los procesos de invasión del parásito a su célula hospedera, aparecen como una opción útil y han sido utilizados para identificar las regiones mínimas de unión de estas proteínas (25, 26). Adicionalmente, los análisis estructurales y funcionales de los HABPs han permitido mediante cuidadosas modificaciones, mejorar las características inmunológicas de estas moléculas para convertirlas en potenciales candidatos a vacunales (28, 46). Por lo tanto, los estudios encaminados a la comprensión del rol de estos antígenos en el complejo ciclo de invasión del parásito a su célula hospedera, no solo contribuirán a revelar la función del antígeno, sino que además son un punto de partida indispensable para el desarrollo de métodos de control contra *P. falciparum*. Por esta razón, en este trabajo se evaluó la capacidad de unión de péptidos cortos de 20 residuos de aminoácidos, derivados de la región conservada de la proteína RON4 de *P. falciparum* a células HepG2 y a eritrocitos humanos y su capacidad de inhibición de la invasión.

6.OBJETIVOS

6.1 General

Determinar las regiones mínimas de interacción específica de la proteína RON4 de *Plasmodium falciparum* a eritrocitos y hepatocitos humanos, y su capacidad de inhibición de la invasión.

6.2 Específicos

6.2.1 Identificar los péptidos de la proteína *Pf*RON4 que presentan alta capacidad de unión a eritrocitos y hepatocitos humanos.

6.2.2 Caracterizar la interacción de los péptidos de *Pf*RON4 que presentan alta capacidad de unión a eritrocitos y hepatocitos humanos.

6.2.3 Evaluar la habilidad de los péptidos de *Pf*RON4 que presentan alta capacidad de unión a eritrocitos de inhibir el proceso de invasión en el estadio intraeritrocítico.

7. Materiales y métodos

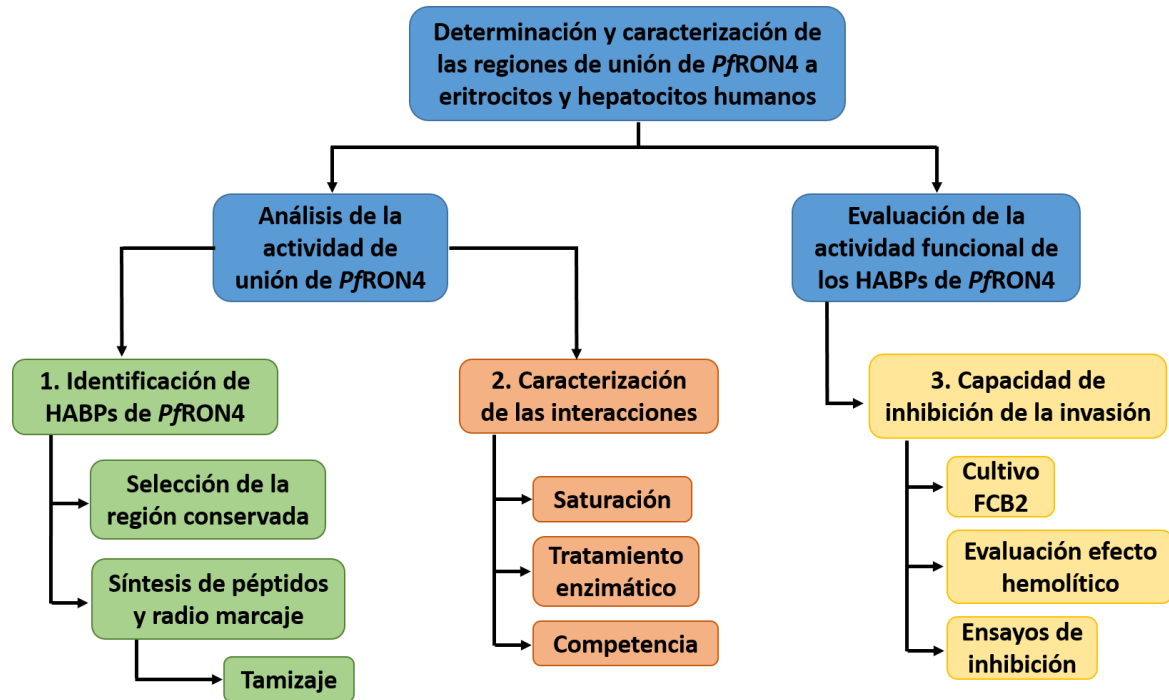


Figura 7. Diagrama de la metodología planteada. Se muestra la metodología planteada para el cumplimiento de cada objetivo (1, 2 y 3).

Para resolver el objetivo 1, se llevaron a cabo las siguientes actividades:

7.1 Análisis de la actividad de unión de P β RON4 a las células

7.1.1 Análisis y selección de la región conservada de P β RON4.

Para la selección de la región conservada de la proteína RON4 de *P. falciparum* se utilizó la secuencia de aminoácidos de la cepa 3D7 depositada en el PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/>) con número de acceso PF3D7_1116000 como anzuelo para la búsqueda de secuencias de P β RON4 en otras cepas de *P. falciparum* mediante la herramienta BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) dentro de la base de datos del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Las secuencias encontradas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW disponible en https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html. Estos alineamientos fueron analizados y se seleccionó la región que presentó menor cantidad de polimorfismos, esta región fue denominada: región conservada de la proteína P β RON4 (P β cRON4).

7.1.2 Síntesis de péptidos de P β RON4 y radio marcaje.

Péptidos de 20 residuos de longitud derivados de P β cRON4 de la cepa 3D7 (PF3D7_1116000) fueron sintetizados por el grupo funcional de síntesis química de la Fundación instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Estos péptidos fueron sintetizados utilizando la estrategia de aminoácidos t-Boc y resina de p-metilbenzhdilamina (0,5 mequiv/g, Bachem), siguiendo la metodología de síntesis de péptidos múltiples en fase sólida (120, 121). Los péptidos fueron purificados mediante RP-HPLC (del inglés *Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography*) y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics) (del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). A aquellos péptidos que no contenían tirosina en su secuencia, se les adicionó durante la síntesis al extremo carboxi-terminal para permitir su marcación con Na¹²⁵I (Yoduro de sodio 125). Cada péptido fue nombrado con un código serial asignado por el grupo funcional de síntesis química.

Para el proceso de radiomarcación se utilizaron 10 μ L de cada péptido (1mg/mL) y se incubaron con 3 μ L de Na¹²⁵I (100 mCi/mL; ARC) y 15 μ L de cloramina T (2,75mg/mL) como agente oxidante de la reacción. La reacción se detuvo después de 15 minutos añadiendo 15 μ L de metabisulfito de sodio (2,3mg/mL). Los péptidos radiomarcados se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de Sephadex G-10

(Pharmacia). A continuación, cada fracción eluída se analizó en un contador gamma (Packard Cobra II) para determinar la marcación.

7.1.3 Ensayos de unión de péptidos de *PfcRON4* a eritrocitos y células HepG2.

- **Tamizaje:** Una solución de eritrocitos humanos al 20% previamente lavados o $1,2 \times 10^6$ de células HepG2, se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas con diferentes concentraciones de cada péptido radiomarcado (0-1,8 μ M) en ausencia (unión total) o presencia (unión no específica) del mismo péptido no radiomarcado (~36 μ M, es decir cerca de 20 veces más concentrado que el radiomarcado) en un volumen final de 200 μ L. Después de la incubación, en el caso de los eritrocitos, éstos fueron lavados dos veces con buffer HBS (solución salina tamponada con ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico [HEPES]) (del inglés *HEPES Buffer Saline*) para retirar el péptido no unido y la radiación asociada a la célula se cuantificó en un contador gamma. En el ensayo con células HepG2, las células fueron recuperadas por centrifugación a 7500 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos sobre un gradiente de 60:40 dioctil phthalate/dibutil phthalate (1.015g/mL). Por último, la cantidad de péptido radiomarcado que se unió a las células se cuantificó en el contador gamma. En los ensayos de tamizaje se realizaron tres replicas independientes para cada péptido y los péptidos que obtuvieron resultados iguales o mayores al 2% en el primer tamizaje, fueron confirmados por medio de un segundo tamizaje.

Los HABPs fueron definidos como aquellos péptidos que presentaron una pendiente en la curva de unión específica mayor o igual al 2% de acuerdo con criterios establecidos previamente (25, 122). La curva de actividad de unión específica fue construida a partir de la resta de las curvas de unión total menos la actividad de unión inespecífica utilizando concentraciones logarítmicas crecientes.

7.2 Caracterización de la interacción de los péptidos con alta capacidad de unión.

Para el desarrollo del objetivo 2, se realizaron los siguientes ensayos:

7.2.1 Saturación

Ensayos de unión modificados fueron realizados para determinar las constantes de unión en el equilibrio y la cooperatividad de la interacción HABPs-eritrocitos o HABPs-HepG2. Brevemente, una solución de eritrocitos al 15% o 1×10^6 células HepG2 fueron incubadas con concentraciones crecientes de cada uno de los HABPs radiomarcados (0-4500nM) en ausencia o presencia del mismo HABP, pero no radiomarcado (cerca de 10 veces más concentrado que el radiomarcado). Las muestras fueron incubadas durante 90 minutos a TA y al finalizar la incubación la unión se cuantificó de la misma forma que en el procedimiento de tamizaje. Los datos experimentales fueron utilizados asumiendo un modelo de unión 1:1. A partir de estos análisis se determinó la constante de disociación (kD), coeficientes de Hill y el número de sitios de unión por célula (123, 124).

7.2.2 Ensayos de tratamiento enzimático

- **Evaluación de la viabilidad celular de eritrocitos y hepatocitos humanos tratados enzimáticamente:** Para evaluar si los tratamientos enzimáticos afectan la viabilidad celular de los eritrocitos y hepatocitos humanos, inicialmente se realizó el tratamiento de las células de la siguiente manera: los eritrocitos fueron tratados con quimotripsina, tripsina y neuraminidasa. Brevemente, una suspensión de eritrocitos al 60% se incubó a 37°C durante 60 minutos con neuraminidasa (150 μ U/mL; ICN 900-67-6), tripsina (1 mg/mL; Sigma T-1005) o quimotripsina (1mg /mL; Sigma C-4129). Luego del tratamiento, los eritrocitos se lavaron dos veces mediante centrifugación con PBS1X a 2.500 rpm durante 5 minutos. En el caso de las células HepG2, un total de $1,2 \times 10^6$ células fueron tratadas enzimáticamente con 500 μ U/mL de Heparinasa I (H1), Heparinasa II (H2), Condroitinasa AC (CAC) ó Condroitinasa ABC (CABC) a 37°C durante 90 minutos. Luego de la incubación a 37°C las HepG2 fueron lavadas con PBS1X para eliminar la enzima. Para evaluar la viabilidad celular, las células HepG2 se les agregó 2 μ L de una solución de yoduro de propidio 50mM (BD Pharmingen) y en el caso de los eritrocitos, éstos fueron incubados con calceína-AM (SIGMA) a una concentración final de 5 μ M por 30 minutos a 37°C. Después del tiempo de incubación, se realizaron lavados con PBS y se leyeron 30.000 eventos en un citómetro FACSCanto II (BD Bioscience). Como control de viabilidad se utilizaron las mismas células sin tratamiento enzimático. Los resultados fueron analizados en el software FlowJo-V10. Adicionalmente, con los datos obtenidos en

citometría, se calculó el porcentaje de viabilidad celular para cada población y se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía, utilizando el software estadístico GraphPad Prism 7.00 para evaluar la diferencia entre de la viabilidad de las células tratadas y los controles no tratados.

- **Ensayos de unión con células tratadas con enzimas:** La actividad de unión específica de los HABPs se evaluó en un ensayo de unión con eritrocitos tratados con diferentes enzimas (tripsina, quimotripsina y neuraminidasa), como se mencionó en el apartado anterior. Para ello, luego del tratamiento enzimático, se realizaron ensayos de unión de cada uno de los HABPs utilizando la misma metodología mencionada en el tamizaje. Eritrocitos no tratados se utilizaron como control positivo de interacción y fueron tomados como el 100% de unión.

De igual forma, se determinó la unión específica de los HABPs a células HepG2 tratadas con H1, H2, CAC ó CAB. Luego del tratamiento enzimático, las células fueron incubadas con cada uno de los HABPs que interactúan con células HepG2. La actividad de unión fue medida como se mencionó en los ensayos de tamizaje. Células no tratadas fueron utilizadas como control positivo de interacción y, al igual que en los tratamientos de los eritrocitos, la unión obtenida con las células no tratadas fue tomada como el 100% de unión. Este valor fue utilizado como punto de comparación para evaluar la diferencia estadística en la unión de los HABPs a las correspondientes poblaciones celulares tratadas enzimáticamente; para ello, los datos representados en porcentaje de unión se sometieron a un análisis en el software GraphPad Prism 7.00.

7.2.3 Ensayos de competencia

Estos fueron realizados entre los HABPs de unión a eritrocitos que presentaron perfiles de unión similares en el tratamiento enzimático y/o kDs similares. Para esto, los HABPs (42480, 42505 y 42513) radiomarcados fueron individualmente incubados en concentraciones constantes ($\sim 0,45\mu\text{M}$) durante 90 minutos con una solución de eritrocitos al 20% en presencia del otro HABP no radiomarcado a diferentes concentraciones (0-30 μM). Las células fueron lavadas y la cantidad de péptido radiomarcado que se unió a las células se cuantificó en el contador gamma, como se describió anteriormente.

7.3 Cultivo de *P. falciparum* y ensayos de inhibición.

Para resolver el tercer objetivo se realizaron las siguientes actividades:

7.3.1 Cultivo y mantenimiento de *P. falciparum* FCB2.

La etapa sanguínea de la cepa FCB2 de *P. falciparum* fue cultivada en eritrocitos humanos grupo sanguíneo "O" positivo obtenidos de donantes sanos, con un hematocrito final del 4%. Como base de crecimiento se utilizó medio RPMI 1640 (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco), enriquecido con HEPES 25mM, glucosa al 5%, hipoxantina 1mg/mL, sulfato de gentamicina 40µg/mL y 10% de plasma "O" positivo, con un pH de 7,4. El cultivo se mantuvo en incubación a 37°C en atmósfera de O₂ al 5%, CO₂ al 5% y N₂ al 90%.

Cada 48 horas, el desarrollo de los parásitos fue verificado mediante observación microscópica de extendidos teñidos con Giemsa o mediante microscopía de fluorescencia (Olympus BX51) con naranja de acridina. Así mismo, se realizó el cambio de medio y la suplementación con eritrocitos frescos hasta alcanzar una parasitemia mayor o igual al 5%. Luego de alcanzar la parasitemia, se realizó la sincronización del cultivo como ha sido descrito previamente (125). Brevemente, mediante observación microscópica se determinó el momento en el cual predominaban las formas jóvenes del ciclo de desarrollo del parásito (anillos y trofozoítos jóvenes) y el *pellet* de eritrocitos fue recuperado por centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10mL de sorbitol al 5% por cada mL de *pellet* celular, la mezcla fue incubada por 10 minutos a 37°C en baño maría, permitiendo la ruptura de las formas maduras. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 2.300 rpm, se retiró el sorbitol y los detritos celulares con pipeta. Posteriormente, el *pellet* fue lavado con 5mL de medio RPMI incompleto (sin plasma), y finalmente se suspendió en medio de cultivo RPMI completo (con 10% de plasma "O" positivo), enriquecido con eritrocitos frescos para alcanzar un hematocrito final del 4%. Posteriormente, se realizó observación microscópica de una muestra del cultivo para determinar la parasitemia final y la presencia de formas jóvenes. Este proceso fue repetido pasado un ciclo de crecimiento del parásito (aproximadamente 48 horas), para lograr un mayor grado de sincronización.

7.3.2 Evaluación del efecto hemolítico de los HABPs

A fin de determinar si los HABPs poseen actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, y poder validar su utilización en los ensayos de inhibición de la invasión, un ensayo de hemólisis se desarrolló de la siguiente manera. Eritrocitos humanos previamente lavados con PBS1X fueron utilizados para preparar una suspensión al 5%. 100µL de esta suspensión y 100µL de los péptidos a una concentración final de 200µM fueron agregados en placas de 96 pozos por duplicado e incubados por 4h a 37°C. Como control positivo de hemólisis se utilizaron 100µL de eritrocitos al 5% con 100µL de Tritón X-100 al 0,1% en PBS (v/v) y como control negativo eritrocitos en PBS1X. Cumplido el tiempo de incubación, la placa fue centrifugada 5 minutos a 2000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 460nm en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific). El rango de 0 y 100% de hemólisis se determinó con los controles (negativo y positivo, respectivamente) y para cada ensayo se realizaron tres réplicas independientes. Para calcular el porcentaje de hemólisis se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{absorbancia de la muestra} - \text{absorbancia del Control Negativo})}{(\text{absorbancia del Control Positivo} - \text{absorbancia del Control Negativo})} \times 100$$

7.3.3 Ensayos de inhibición de la invasión

Al cultivo de la cepa FBC2 de *P. falciparum* previamente sincronizado, se le permitió avanzar hasta el estadio de anillo (~10-18 horas), se determinó la parasitemia y se ajustó a una parasitemia final del 1% y un hematocrito final del 4%. Utilizando una placa de 96 pozos, se realizó el montaje por triplicado utilizando dos concentraciones finales diferentes (200µM y 100µM) para cada uno de los péptidos (ya sea HABPs o controles), se agregaron 50µL del parásito previamente preparado a cada pozo (volumen final de 100µL), se gasificó la cámara para obtener la atmósfera óptima para el crecimiento (O₂ al 5%, CO₂ al 5% y N₂ al 90%) y se incubó a 37°C por 48 horas. Como control de crecimiento se cultivó el parásito en las mismas condiciones en ausencia de péptidos (PBS1X) y como controles de inhibición se utilizó el HABP 4313 derivado de *PfAMA1* (126), a las mismas concentraciones de los péptidos evaluados y EGTA a una concentración de 100 y 50µM.

Al completar el tiempo de incubación se evaluó la presencia de formas jóvenes del parásito en el control positivo mediante microscopía de fluorescencia con naranja de acridina. Para determinar el porcentaje de inhibición de la invasión se utilizó citometría de flujo. Para esto,

la placa de 96 pozos fue centrifugada a 1000 rpm por 2 minutos a TA, se descartó el sobrenadante, se lavó una vez con PBS1X y luego a cada pozo se le agregaron 50 μ L de marcador Syber Green (SIGMA) para una concentración final de 1X y se incubó a 37°C durante 30 minutos protegido de la luz. Completado el tiempo, se lavó dos veces con PBS filtrado 1X y el *pellet* fue resuspendido en 0,5mL de PBS filtrado con glutaraldehído al 0,25% y se realizó la lectura en un citómetro de flujo BD FACS Canto II (excitación a 488nm, emisión a 520nm), con la adquisición de 50.000 eventos. Adicionalmente, se realizaron ensayos de inhibición con mezcla de péptidos a una concentración final de 200 μ M, para evaluar posibles mejoras en la capacidad inhibitoria de los HABPs derivados de P α RON4. Los resultados fueron analizados en el Software FlowJo-V10 de análisis de citometría. Los datos crudos obtenidos en este ensayo fueron el producto de tres réplicas independientes para cada péptido. Para la obtención de los resultados finales se realizó un análisis de los datos obtenidos en el software FlowJo-V10 mediante el programa estadístico GraphPad Prism 7.00, donde se aplicó un análisis de varianza y normalidad de los datos y un análisis mediante ANOVA de una vía con comparaciones múltiples entre los porcentajes de inhibición de la invasión de los HABPs versus los controles no-HABPs y entre los HABPs individuales versus las mezclas en las mismas concentraciones molares.

7.4 Consideraciones éticas del material proveniente de humanos utilizado en los ensayos

Esta investigación se clasifica como una investigación con riesgo mínimo, según lo establecido en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, del Ministerio de Salud. Durante la investigación se empleó sangre total humana. Todos los donantes de las muestras de sangre total que fueron utilizadas en este estudio firmaron un formulario de consentimiento informado después de recibir información detallada sobre los objetivos del estudio y sobre el procedimiento de la toma de muestra sanguínea, cuya información está consignada en el consentimiento informado de donantes de muestras de sangre, que se encuentra adjunto como un anexo al documento de tesis (Anexo A). Todos los datos fueron tratados de acuerdo con la Ley 1581 de 2012 de Protección de Datos Personales, al Decreto 1377 de 2013, y a las demás normas concordantes.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la FIDIC. Se declara que no existen conflictos de interés.

8. Resultados

8.1 Análisis y selección de la región conservada

*Pf*RON4 es una proteína soluble de 1201 residuos de aminoácidos codificada por un gen de tres exones. Hacia la región amino-terminal contiene un péptido señal, regiones de baja complejidad conformadas por varias copias en tándem de dos secuencias de repeticiones imperfectas y un extremo carboxi-terminal rico en cisteínas (22). Aunque no se han llevado a cabo estudios de polimorfismo específicamente en el gen *pfron4*, estudios previos en *pvrn4* han mostrado una baja diversidad genética respecto a polimorfismos de nucleótido único o SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*). Sin embargo, se han encontrado una alta cantidad de haplotipos, debido a las repeticiones en tándem localizadas hacia el extremo amino-terminal, que probablemente están involucradas en la evasión de la respuesta inmune (127). Teniendo en cuenta este antecedente, para el desarrollo del primer objetivo inicialmente se realizó un alineamiento múltiple entre 16 cepas de *P. falciparum*. Este alineamiento permitió seleccionar una región conservada entre los nucleótidos 1558 al 3603, que contiene sólo cambios mínimos en las posiciones 2171, 2277 y 2913, que a nivel de aminoácidos se traduce únicamente en un cambio no sinónimo de un ácido glutámico por una glicina en la posición 724 D/G. Esta región codifica para la secuencia de aminoácidos comprendida entre los residuos ⁵²⁰T al ¹²⁰¹L (Anexos B y C), de la proteína RON4 de *P. falciparum*. (Figura 8).

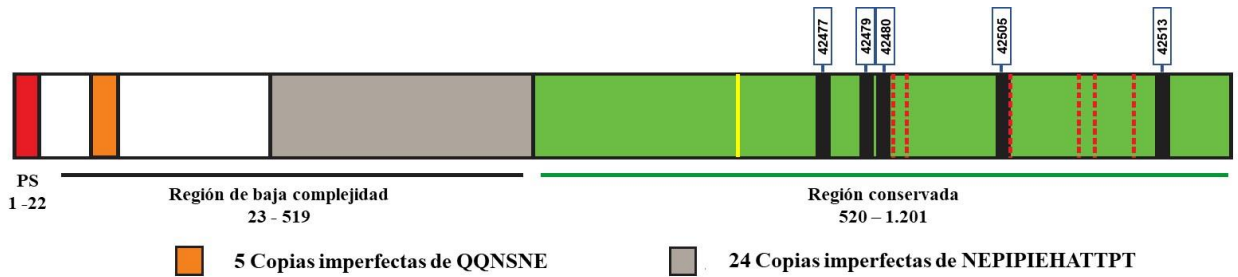


Figura 8. Representación esquemática de *Pf*RON4. En rojo se muestra el péptido señal (PS) comprendido entre los aminoácidos 1-22 según análisis en la plataforma SignalP – versión 6.0. Seguido del PS se encuentra una región de baja complejidad, conformada por varias copias de dos regiones de repeticiones peptídicas. En verde se muestra la región conservada seleccionada en el análisis informático (*Pfc*RON4). Esta contiene sólo un cambio dimórfico en la posición 724 señalado en amarillo. Los residuos de cisteína conservados se muestran como líneas rojas punteadas y los HABPs como barras negras, con su respectiva etiqueta.

8.2 Péptidos derivados de *Pfc*RON4 se unen a eritrocitos humanos y a células HepG2.

La región conservada de *Pf*RON4 fue sintetizada químicamente en 32 péptidos secuenciales de 20 residuos de aminoácidos, estos péptidos fueron radiomarcados con Na^{125}I , para luego ser probados en un ensayo inicial de unión altamente robusto sensible y específico, que permitió obtener secuencias que se unen con alta afinidad y especificidad a las células hospederas (eritrocitos y células HepG2). La unión específica de cada péptido a su respectiva célula fue obtenida por la diferencia entre la curva de unión total (unión del péptido radiomarcado) y la curva de unión no específica o inhibida (unión del péptido radiomarcado en presencia del mismo péptido no radiomarcado). Péptidos con curvas de unión específica con pendientes mayores o iguales al 2% fueron considerados como HABPs, según criterios previamente establecidos (25). Este valor se tomó basándose en que la relación del péptido unido específicamente con el péptido añadido es directamente proporcional a la constante de afinidad y al número de receptores del péptido en los eritrocitos o en la célula hospedera (capacidad de unión) (25, 128). Los péptidos evaluados mostraron varios comportamientos en el ensayo de tamizaje: Péptidos que no se unen a las células, presentando curvas de unión total y no específica con pendientes muy bajas y como consecuencia uniones específicas cercanas a cero. Estos péptidos son denominados como péptidos con baja actividad de unión o LABP (del inglés *Low-Activity Binding Peptides*) (Figura 9 A, tamizaje del péptido 42504 a eritrocitos y Figura 9 D tamizaje del péptido 42511 a células HepG2). El segundo comportamiento está dado por péptidos

que presentaron curvas de unión total e inespecífica con pendientes elevadas, pero con uniones específicas bajas (0-1,9%), éstos son denominados no-HABPs y son representados como se muestra en la gráfica de tamizaje para el péptido 42512 a eritrocitos (Figura 9 B) y del péptido 42469 a células HepG2 (Figura 9 E) y, finalmente, péptidos que presentaron curvas con uniones totales elevadas y uniones no específicas bajas y, como consecuencia, curvas de unión específica mayores o iguales a 2%, como en el caso del tamizaje del péptido 42477 a eritrocitos (Figura 9 C) y del péptido 42480 a células HepG2 (Figura 9 F).

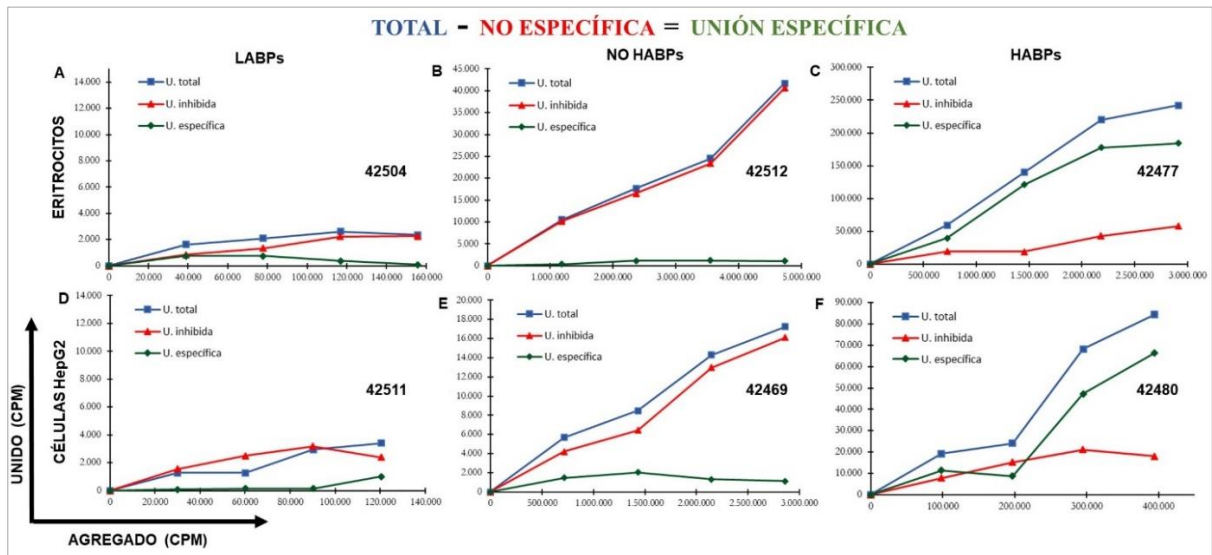


Figura 9. Comportamiento de unión de los péptidos derivados de *PfcRON4*. Los péptidos fueron radiomarcados con Na^{125}I y se utilizaron para realizar ensayos de unión con eritrocitos o células HepG2 en ausencia (unión total-línea azul) o presencia del mismo péptido no radiomarcado (unión inhibida-línea roja). Se obtuvo una curva de unión específica (línea verde) a partir de la resta de las dos curvas anteriores. A y D muestran las curvas de unión de los péptidos 42504 (eritrocitos) y al 42511 (hepatocitos) denominados LABP. Las figuras B y E corresponden a péptidos que presentan curvas de unión total e inhibida elevadas, pero con curvas específicas muy bajas, denominándose no-HABPs. Por último, los péptidos 42477 (eritrocitos) y 42480 (hepatocitos) representan los comportamientos típicos de un HABP. Los datos se muestran como los valores medios de tres experimentos independientes.

En general los ensayos de unión a eritrocitos permitieron identificar cinco HABPs denominados: 42477, 42479, 42480, 42505 y 42513 que se localizaron entre los residuos 800 y 1159 del extremo carboxi-terminal. Por su parte, los ensayos de unión a células hepáticas (HepG2) mostraron que los péptidos 42477 y 42480 se unieron de forma

específica a la membrana de las células HepG2, localizándose entre los residuos 800-879. El resumen de los resultados de unión específica de cada péptido con cada población celular se muestra en la figura 10.

| Código péptido | Secuencia de <i>Pf</i> RON4 | (% Unión específica a GR Humanos) | | (% Unión específica a células HepG2) | |
|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| | | 2 | 4 | 2 | 4 |
| 42463 | 530 THNEHSTTPTNEDTHSENATY 539 | | | | |
| 42464 | 540 TSTNEQHS HDQNT EVHPNDKY 559 | | | | |
| 42465 | 560 LALVPPFQGIKNPIPSNESQPY 579 | | | | |
| 42466 | 580 IISFPNEDDNHAQNEGSINAY 599 | | | | |
| 42467 | 600 PSEGEHNNTDNKEGPIITPLY 619 | | | | |
| 42468 | 620 EGEQAGTAHKEDVTHKHMVGY 639 | | | | |
| 42469 | 640 EHVPPQKTHHGPIITPVGGNY 659 | | | | |
| 42470 | 660 HVPPQTHHAHIITPVGGEHAY 679 | | | | |
| 42471 | 680 HGQGNNDTTYVTMNTDESSS 699 | | | | |
| 42472 | 700 SDTKGEHSNLRSYNKNMNNN 719 | | | | |
| 42473 | 720 HAQRDQYDSDTLNSEGSDDA 739 | | | | |
| 42474 | 740 YSSMQQNFEKNGIDSFKGKG 759 | | | | |
| 42475 | 760 LHVSLRERIIEIMESAKNGY 779 | | | | |
| 42476 | 780 IDGLLKLKDSKDSGKLFMEAY 799 | | | | |
| 42477 | 800 LEKLNINMKDLKKDKNLIISLY 819 | | | | |
| 42478 | 820 EVYDKILSTMFKILTEMSFY 839 | ND | | ND | |
| 42479 | 840 EDSKFYETLGIKKDILNQSL 859 | | | | |
| 42480 | 860 KDIKIKMLRKLGVSYSRLLPP 879 | | | | |
| 42481 | 880 IIKHTEGKSAIKDIIISISSY 899 | | | | |
| 42482 | 900 KE LAQRMAIMFTKWLA PDEY 919 | | | | |
| 42483 | 920 GAVVDYENNVELNLVSSGAP 939 | ND | | ND | |
| 42503 | 940 ILIQQWKYYQNLGFEEEDKD 959 | | | | |
| 42504 | 960 HAYLGLIDELLVMNKRYSQN 979 | | | | |
| 42505 | 980 KDYVETLEKIKKSKVFKHST 999 | | | | |
| 42506 | 1000 KIMRIGGKVSSVPPFNYENVK 1019 | | | | |
| 42507 | 1020 KPSSSIIGSLGNLIKANISTY 1039 | | | | |
| 42508 | 1040 YYKATAQRINSYFHYTEKKS 1059 | | | | |
| 42509 | 1060 KKS SPLKII SVSTLLHLTDMY 1079 | | | | |
| 42510 | 1080 LYKSSDENSGVMDLYNLQL 1099 | | | | |
| 42511 | 1100 NTLNMGKGMVLQYLVHLKFL 1119 | | | | |
| 42512 | 1120 TQEKKNQLKEISEPQNGLIDY 1139 | | | | |
| 42513 | 1140 ET LTKMLI L LSTDSHELLSHY 1159 | | | | |
| 42514 | 1160 EL ENKGFDEDIYIQDEIKNIN 1179 | | | | |
| 42515 | 1180 ESDNNIRDKEEDDAEKMI FDY 1199 | | | | |
| 42516 | 1182 DNNIRDKEEDDAEKMI FDDL Y 1201 | ND | | ND | |

Figura 10. Perfil de unión de los péptidos derivados de *Pf*RON4. Se muestra la secuencia de cada péptido de 20 residuos. Las regiones completamente conservadas (sin ningún cambio a nivel de aminoácidos) están representadas en verde, mientras que péptidos que contengan como mínimo un residuo polimórfico (comparación de 16 cepas de *P. falciparum*) fue representado en amarillo. El péptido tiene un único residuo dimórfico encontrado en la posición 724 (D/G). Las barras negras representan el porcentaje de unión específica de cada péptido a su correspondiente célula. Aquellos péptidos que alcanzaron la línea roja punteada (>2%) fueron considerados como HABPs. Los péptidos que en su secuencia natural no contienen ninguna tirosina, se les ha agregado una en la región carboxi-terminal. A cada secuencia peptídica se le asignó una numeración interna dada por el grupo funcional de síntesis química de la FIDIC. ND: No determinado

8.3 Las interacciones HABPs-células presentaron kDs en el rango micromolar y submicromolar

Los ensayos de interacción receptor-ligando son una herramienta importante para cuantificar y caracterizar receptores, sin embargo, para considerar un sitio de unión como un receptor se deben cumplir ciertos criterios: La unión debe ser de alta afinidad y saturable (129). Para evaluar dichos criterios, la obtención de las constantes de disociación kDs surge como una herramienta importante, ya que muestra la relevancia biológica de las interacciones encontradas, razón por la cual ha sido ampliamente utilizada en diversos campos (25, 129). Las kDs pueden ser halladas mediante experimentos de cinética, es decir aquellos que evalúan la asociación y disociación de un receptor, sin embargo, estos ensayos son más complejos y no son utilizados frecuentemente (129, 130). Por lo cual, la mayoría de los experimentos con radio-ligandos son realizados mediante ensayos de unión con determinación de las kDs en el equilibrio, los cuales se basan en el principio molecular que describe que estas interacciones de asociación y disociación receptor-ligando ocurren de forma simultánea, pues son procesos reversibles que se producen hasta que el equilibrio es alcanzado. Dentro de los ensayos de unión en el equilibrio, los experimentos de saturación que usan varias concentraciones del ligando, permiten evaluar la afinidad de un receptor por un ligando mediante la obtención de la kD , además, permite obtener la densidad de dichos receptores, la cual es descrita como la cantidad máxima de ligando unido (sitios de unión), que está definida por la B_{max} (129). Como la kD es la concentración en la cual el ligando se une a la mitad de sus sitios de unión, la afinidad del ligando por el receptor es alta cuando su kD es baja. Adicionalmente, estos análisis permiten determinar el coeficiente de Hill o nH , el cual indica el grado de cooperatividad de los ligandos que se unen al receptor (130). Los ligandos que muestran nH positivos tienen la capacidad de aumentar la afinidad de un segundo sitio de unión, en consecuencia, la unión de un ligando ayuda a unir más ligandos a los receptores (124). Para determinar la afinidad de la interacción HABP-célula, un ensayo adicional fue llevado a cabo utilizando concentraciones crecientes (0-4500nM) de HABP radiomarcado en presencia o ausencia de HABP no radiomarcado. En general, se encontró que la mayoría de las interacciones HABP-célula blanco mostraron kDs bajas que oscilaron entre 0,8 μ M (42477) y 1,5 μ M (42505) sugiriendo una alta afinidad y especificidad entre las interacciones evaluadas con eritrocitos (Figura 11 A) y con células HepG2 (Figura 11 B). El péptido 42513 no saturó bajo las condiciones experimentales aquí ensayadas (datos no mostrados). Los análisis

sobre las curvas de Hill permitieron calcular coeficientes entre los rangos de 1,1 a 1,8 lo que indica cooperatividad positiva (Hill >1), lo que significa que la unión de un HABP a su receptor sobre la superficie celular facilita la unión de otras moléculas del mismo HABP. Adicionalmente, se muestran los sitios de unión por célula (Figura 11).

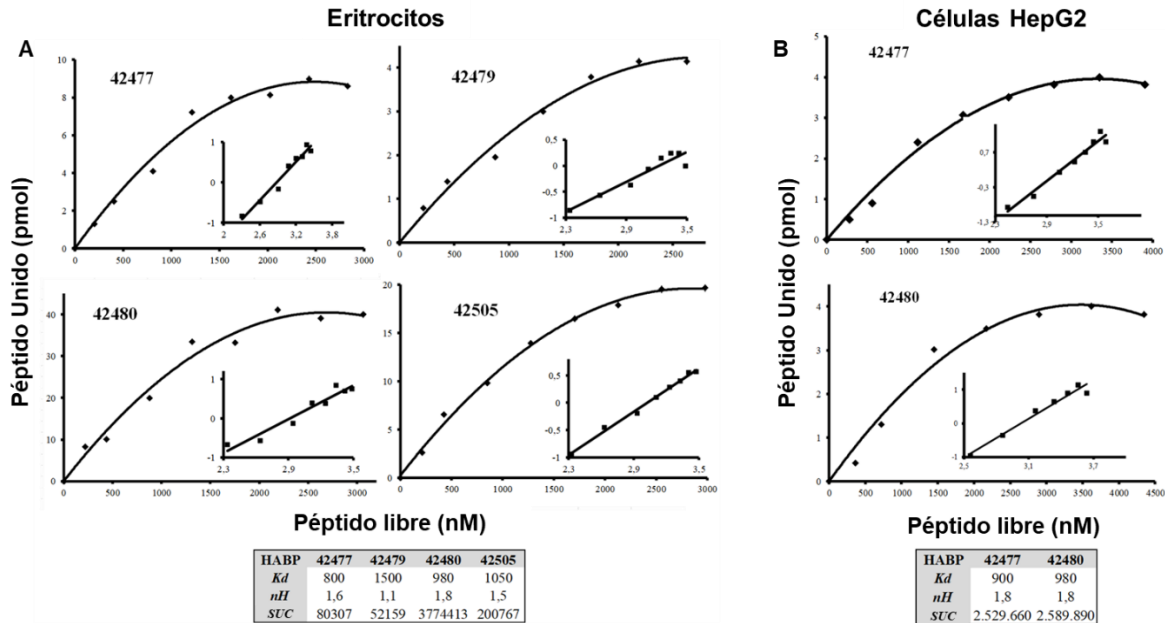


Figura 11. Ensayos de saturación de los HABPs derivados de *Pf*RON4. Curvas de saturación representando la unión específica de los HABPs (A) 42477, 42479, 42480, 42505 con eritrocitos humanos y (B) 42477 y 42480 con células HepG2. En los recuadros de abajo se muestra un resumen de las constantes de disociación (*kDs*), coeficiente de Hill *nH* y los sitios de unión por célula (*SUC*) para cada péptido y para cada población celular evaluada. El recuadro dentro de cada gráfica de saturación muestra el comportamiento lineal del coeficiente de Hill (graficado como el Log péptido libre nM (Eje X) versus Log B/Bmax-B (Eje Y), donde B= cantidad de péptido unido y Bmax= Cantidad máxima de péptido unido).

8.4 La unión de los HABPs de *Pf*RON4 es susceptible al tratamiento enzimático de los glóbulos rojos y de las células HepG2.

8.4.1 Los tratamientos enzimáticos no afectan en gran medida la viabilidad celular

Para caracterizar las regiones de unión de *Pf*RON4 y determinar la naturaleza de los receptores implicados en la interacción de los HABPs identificados sobre la membrana del

eritrocito y de la célula hepática, se realizaron tratamientos enzimáticos sobre las células blanco. En el caso de la membrana del eritrocito, la célula fue tratada con dos enzimas que remueven proteínas sobre la membrana (tripsina y quimotripsina) y una enzima que cataliza la escisión de ácido siálico (neuraminidasa). Previo a realizar los ensayos de unión, se determinó inicialmente si estos tratamientos enzimáticos afectaban la viabilidad celular del eritrocito. Como se mencionó en la metodología, se utilizó como marcador de viabilidad la Calceína AM. Este reactivo no fluorescente es capaz de atravesar tanto células vivas como muertas. Sin embargo, sólo en células vivas las esterasas citoplasmáticas convierten la Calceína AM en un sustrato fluorescente, lo que permite su distinción con células muertas (no-fluorescentes). Los controles de viabilidad con calceína mostraron que ningún tratamiento enzimático afectó la viabilidad de los eritrocitos tratados. Como control de viabilidad se utilizaron eritrocitos no tratados enzimáticamente.

Por su parte, las células HepG2 fueron igualmente tratadas con varias enzimas: La Heparinasa I es una enzima que escinde el enlace glucosaminídico en D-Glucosamina GlcN (N-sulfato) a 1–4 L-Iduronato (IdceA) (2-sulfato), presentes en la heparina. La heparinasa II corta enlaces similares con preferencia por el heparan sulfato mientras que las enzimas condroitinasa AC y ABC degradan sulfatos de condroitina AC y ACB, respectivamente. Para evaluar la viabilidad de las células tratadas con estas enzimas se utilizó la incorporación de yoduro de propidio, éste es un agente intercalante fluorescente que ingresa únicamente a las células con alteraciones en su membrana plasmática, por lo cual permite diferenciar las células cuya viabilidad se vio afectada por los tratamientos enzimáticos. El control de viabilidad de las células HepG2 tratadas con enzimas realizado con yoduro de propidio mostró una viabilidad mayor al 90% en todos los casos (H1: 93,0%, H2: 93,6%, CAC: 92,1% y CAB: 91,7%) al igual que en las células no tratadas (94,2%) utilizadas como control de viabilidad (Figura 12 A). En general no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad de las células sin ningún tratamiento y células tratadas con las distintas enzimas, como se muestra en el gráfico de barras (Figura 12 A, a la derecha inferior).

8.4.2 La interacción de PfRON4 HABPs-célula es dependiente de receptores de tipo proteico en el estadio eritrocítico mientras que en el esporozoíto es dependiente de carbohidratos

Diferentes receptores han sido caracterizados para algunos ligandos de *P. falciparum*, lo que ha permitido definir rutas alternas de invasión, por ejemplo, se ha definido que la interacción entre EBA175 y Glicoforina A es sensible al tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa y tripsina, pero resistente a quimotripsina (41), esto significa que el tratamiento de la célula con neuraminidasa y tripsina afecta regiones de la Glicoforina A que son importantes para la unión de EBA175, por lo cual dicho tratamiento conlleva a una pérdida en esta interacción. En el caso de la interacción de la proteína *Reticulocyte-binding protein homologue 4* o Rh4 con su receptor CR1 (*Complement Receptor 1*), se ha encontrado sensibilidad al tratamiento con tripsina y quimotripsina, y resistencia a neuraminidasa (98). Estos diferentes patrones de sensibilidad enzimática, son la base para clasificar el perfil de invasión que define la vía dependiente (sensible a neuraminidasa) o independiente (resistente a neuraminidasa) de ácido siálico, un carbohidrato presente en importante cantidad sobre la membrana del eritrocito.

Los resultados mostraron que los HABPs de unión a eritrocito tuvieron dos comportamientos diferentes: el primero está dado por HABPs cuyo comportamiento de unión se vio afectado en más de un 50% únicamente por el tratamiento con tripsina, en este grupo, se encuentran los HABPs 42477 y 42479 (Figura 12 B). En el segundo comportamiento, se encuentran los HABPs cuya actividad de unión específica al eritrocito se vio afectada en diferentes porcentajes por los tratamientos con tripsina y quimotripsina. En cuanto al tratamiento con tripsina, se observó una afectación drástica (>80%) en la unión específica de los HABPs 42480 y 42505, mientras que este tratamiento redujo la unión del péptido 42513 en un 32%. Por su parte, el tratamiento con quimotripsina redujo en un 40% la unión del péptido 42480 y de forma drástica la unión de los HABPs 42505 y 42513 (entre 70-100%). El tratamiento con neuraminidasa no tuvo efecto sobre la unión específica HABP-célula (Figura 12 B).

Los análisis realizados a los datos obtenidos mostraron una diferencia estadísticamente significativa (**p<0,0001) en la unión de los HABPs a células tratadas con respecto a la unión de los mismos a células sin ningún tratamiento que fueron utilizadas como control y cuyos valores de unión se establecieron como el 100%. Estos resultados son consistentes

con que los HABPs derivados de *Pf*RON4 se unen a la membrana del eritrocito de forma específica a través de un receptor de tipo proteico. En general, estos tratamientos y los resultados encontrados en los ensayos de unión permiten sugerir que *Pf*RON4 podría estar participando en una vía independiente del ácido siálico, un carbohidrato presente en importante cantidad sobre la membrana del eritrocito (131) y que ha sido ampliamente utilizado para definir perfiles de invasión en las proteínas de *Plasmodium* de acuerdo a su patrón de susceptibilidad enzimática. Así mismo, estos ensayos permiten identificar algunos de los tipos de receptores presentes sobre la membrana del eritrocito y del hepatocito, dependiendo de tipo de tratamiento enzimático realizado.

Con respecto al tratamiento enzimático de las células HepG2, la unión tanto del HABP 42477 como del 42480 se vio drásticamente afectada por el tratamiento con Heparinasa I (más del 50% de la unión se perdió); así mismo, ambos péptidos mostraron una reducción del 35% y 18%, respectivamente, en la unión a células HepG2 tratadas con Condroitinasa ABC, mientras los demás tratamientos no afectaron la unión de estos péptidos a las células blanco (Figura 12 C). Como controles de unión, se utilizaron células HepG2 no tratadas, e igualmente este valor se estableció arbitrariamente como el 100% de unión y se utilizó para comparar la unión de los HABPs a las células tratadas, encontrando diferencias estadísticamente significativas para ambos péptidos ($***p < 0,0001$) en los tratamientos con H1 y CABC (Figura 12 C). Estos resultados sugieren que las regiones comprendidas entre los residuos 800-819 y 860-879 de *Pf*RON4 (HABPs 42477 y 42480, respectivamente), interactúan específicamente con receptores de heparina y/o proteoglicanos de sulfato de condroitina sobre la superficie de las células HepG2.

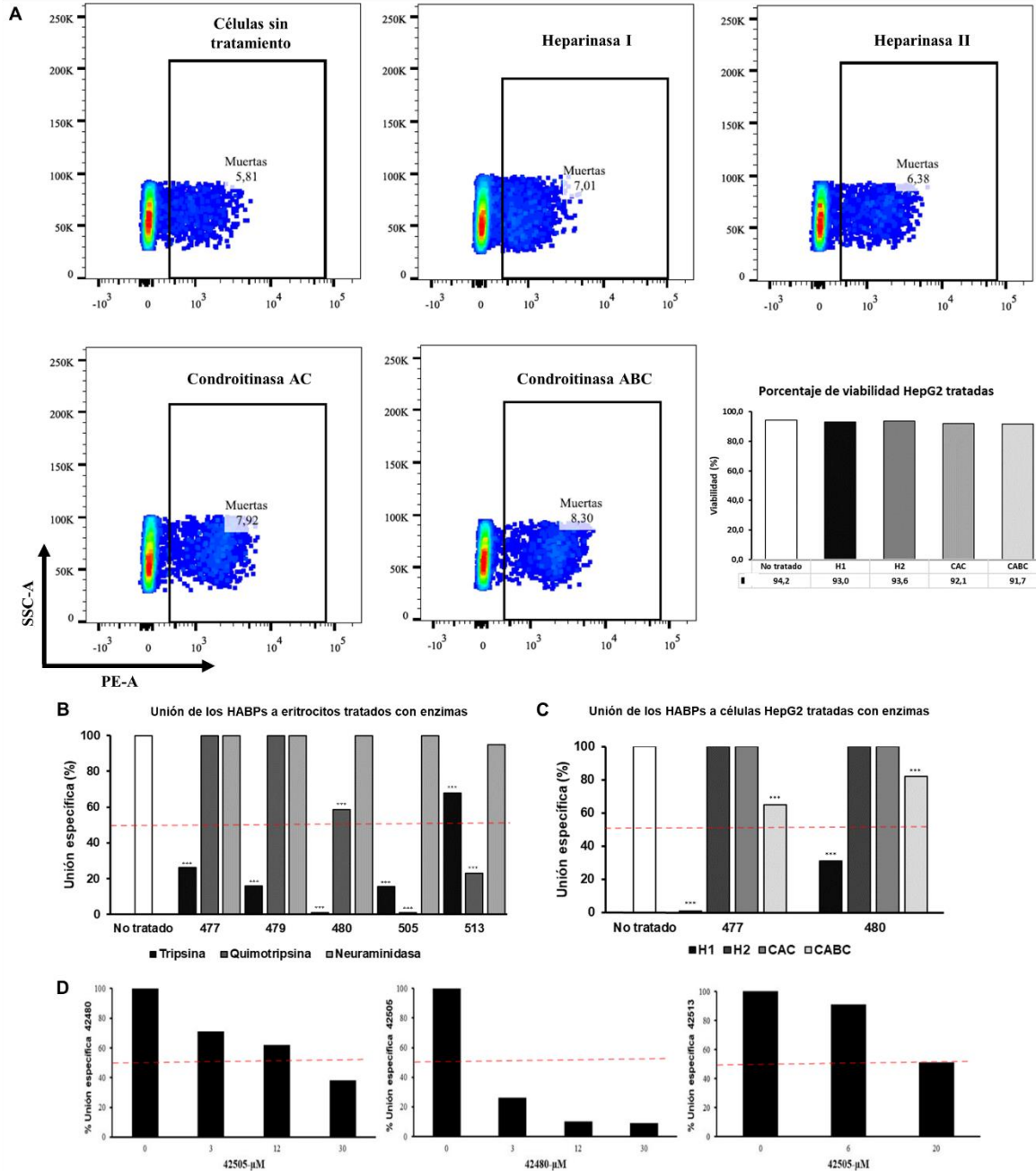


Figura 12. Ensayos de unión de los HABPs derivados de *Pf*RON4 con eritrocitos y células HepG2 tratados con enzimas y competencias. (A). Control de viabilidad de las células HepG2 tratadas con enzimas. En el recuadro se muestra la selección de la población marcada con PE-A, que representa el porcentaje de células muertas, que en todos los casos fue menor del 10% (viabilidad >90%). La gráfica de barras representa el porcentaje de viabilidad para cada tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. (B). Comparación de la unión específica de los HABPs 42477, 42479, 42480, 42505 y 42513 con eritrocitos no tratados o tratados con enzimas (tripsina, quimotripsina o neuraminidasa). Se observan dos comportamientos diferentes en la unión: Un grupo de HABPs (42477 y 42479) presentó reducción de la unión únicamente

en el tratamiento con tripsina y el otro grupo (42480, 42505 y 42513) mostró reducción de la unión en el tratamiento con tripsina y quimotripsina. El tratamiento con neuraminidasa no afectó la unión. (C). Comparación de la unión específica de los HABPs 42477 y 42480 con células HepG2 no tratadas o tratadas con enzimas (Heparinasa I (H1), Heparinasa II (H2), Condroitinasa AC (CAC) o Condroitinasa ABC (CABC)). Ambos HABPs de unión a HepG2 mostraron afectación en la unión a células tratadas con H1 y CABC. Como control se utilizaron eritrocitos o células HepG2 no tratadas (barra blanca) y este valor fue tomado arbitrariamente como el 100% de unión. Las barras representan el porcentaje de unión de cada HABP en presencia o ausencia de tratamiento enzimático de acuerdo con la población celular evaluada. Los *** sobre las barras representan una diferencia estadísticamente significativa en la unión con respecto al control ($p < 0,0001$). (D). Competencia entre HABPs con perfil similar de unión. En el eje Y se muestra el porcentaje de unión específica para uno de los péptidos (radiomarcado) en presencia de diferentes concentraciones del competidor no radiomarcado (eje X). (Izquierda) Se observa un patrón de competencia (inhibición de la unión específica) dependiente de la concentración entre los HABPs 42480 y 42505 que presentaron patrones similares de unión en el tratamiento enzimático de los eritrocitos (sensible a tripsina y quimotripsina). (Centro) Competencia entre 42480 y 42505, pero de forma inversa. (Derecha) Competencia en la unión de los HABPs 42513 y 42505 a un menor rango de concentración molar, muestra el mismo comportamiento.

8.5 HABPs con perfiles similares de unión compiten específicamente por la unión a eritrocitos

En vista de los patrones de unión obtenidos por los HABPs de *Pf*RON4 con eritrocitos tratados con enzimas, se podría sugerir que dos HABPs con un mismo patrón se unen a un mismo receptor; para investigarlo, se evaluó la capacidad de competencia específica para la unión a eritrocitos entre algunos de los HABPs con un patrón de unión sensible a tripsina y quimotripsina. Para ello, se agregaron concentraciones constantes de uno de los péptidos radiomarcados y concentraciones en aumento del otro péptido con un perfil similar de unión, pero sin radiomarcarse. Los resultados permitieron observar un comportamiento de competencia específica por la unión al eritrocito que fue dependiente de la concentración (Figura 12 D izquierda). Este ensayo se realizó de forma inversa entre los HABPs 42480 y 42505, obteniendo resultados comparables, incluso mostrando una inhibición mayor de la unión al eritrocito cuando el HABP 42480 es utilizado como competidor del 42505 (Figura 12 D centro). Adicionalmente, se realizó un ensayo de competencia entre los péptidos 42513 y 42505 con un rango de concentración molar menor del competidor, obteniéndose resultados similares (Figura 12 D derecha).

8.6 HABPs derivados de PfcRON4 inhiben la invasión de merozoítos de *P. falciparum*.

Para evaluar la actividad funcional de los HABPs derivados de PfcRON4, se realizaron ensayos de inhibición de la invasión utilizando un cultivo continuo de la cepa FCB2 de *P. falciparum*. Para ello, el parásito fue mantenido en un cultivo continuo *in vitro* hasta alcanzar un porcentaje de invasión (parasitemia) mayor o igual al 5%, sin embargo, en el cultivo se pueden encontrar las diferentes etapas de desarrollo del parásito (anillos, trofozoítos y esquizontes) (Figura 13 A), por lo tanto, inicialmente se realizó la sincronización del cultivo con sorbitol al 5%, como ha sido previamente reportado (125), permitiendo obtener un cultivo donde predominan formas jóvenes del ciclo de desarrollo (Figura 13 B), y de esta forma poder medir el efecto de los HABPs en un ciclo de invasión.

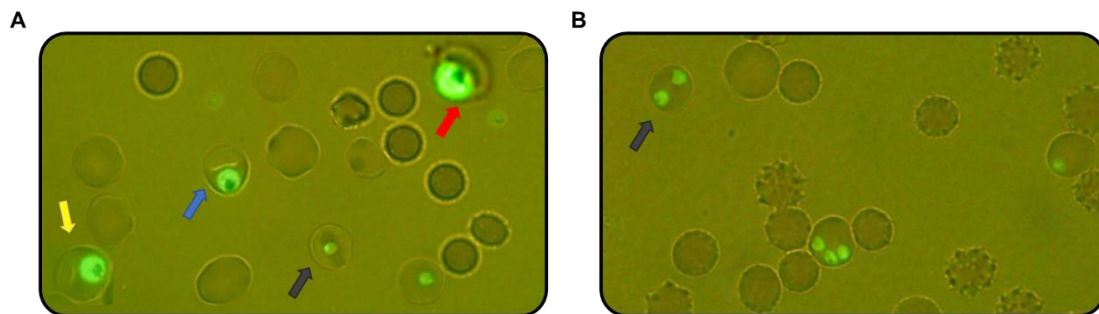


Figura 13. Formas de *P. falciparum* FCB2 en cultivo continuo *in vitro*. Microscopía de fluorescencia con naranja de acridina del cultivo de *P. falciparum*, donde se observan diferentes etapas del desarrollo del parásito durante su ciclo de vida. (A) Cultivo asincrónico (Flecha negra: anillos, azul: trofozoítos jóvenes, amarilla: trofozoítos maduros y roja: esquizontes). (B) Cultivo post sincronización (anillos), se observan eritrocitos multi-parasitados con formas jóvenes.

Inicialmente, se determinó si los HABPs y los péptidos no HABPs (42463 y 42470), poseían actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos y de esta manera poder determinar si podían ser utilizados en los ensayos de inhibición de la invasión. Los resultados mostraron que todos los péptidos evaluados presentaron una actividad hemolítica menor al 0,7% a una concentración de 200 μ M (Anexo D); siendo el valor de hemólisis bastante bajo, se continuó con la evaluación de los péptidos en los ensayos de inhibición de la invasión.

Después de obtener un cultivo con formas jóvenes y de validar la utilización de los diferentes péptidos por poseer baja capacidad hemolítica, ensayos de inhibición de la invasión fueron realizados utilizando dos concentraciones de los HABPs y de los péptidos

utilizados como control. Como control de inhibición de la invasión se utilizó el HABP 4313 derivado de la proteína *PfAMA1*, que ha mostrado porcentajes de inhibición de la invasión de 72 ± 5 a una concentración de $200\mu\text{M}$ (126). El EGTA fue utilizado también como control de inhibición de la invasión, es un agente quelante, que genera el bloqueo del ciclo celular asexual del parásito al retirar los iones de Ca^{2+} indispensables para el crecimiento normal de *P. falciparum* dando lugar a parásitos morfológicamente anormales detenidos en la etapa de trofozoíto maduro (132). Como control positivo de invasión, los parásitos fueron incubados solo con PBS1X. Los resultados mostraron que cuatro de los cinco HABPs para eritrocito (42477, 42479, 42480 y 42513) eran capaces de inhibir la invasión de los merozoítos en cultivo continuo *in vitro* entre un 35 a 51% a una concentración de $200\mu\text{M}$, en comparación con los péptidos de baja capacidad de unión (42463 y 42470), cuya actividad inhibitoria estuvo por debajo del 19% (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.0001$) (Figura 14 A).

Teniendo en cuenta que *P. falciparum* se caracteriza por utilizar múltiples ligandos que interactúan con receptores presentes en la superficie de la célula hospedera y que el bloqueo de diferentes interacciones es crítico para lograr interrumpir su complejo proceso de invasión, a modo preliminar se evaluó si el efecto inhibitorio de un péptido derivado de *PfAMA1* que ha demostrado tener altos niveles de inhibición de la invasión podría ser potenciado utilizando los HABPs derivados de *PfRON4* descritos en este trabajo, los cuales interactúan específicamente con la membrana de la célula hospedera y además mostraron alta capacidad de generar inhibición del proceso de invasión. Por ello, se planteó un ensayo en mezcla con el HABP 4313 derivado de *PfAMA1* (126) y dos péptidos derivados de *PfRON4*. Para este ensayo se seleccionaron los péptidos 42477 y 42480 (con base en el comportamiento observado en los ensayos de unión con eritrocitos tratados enzimáticamente: uno sensible a tripsina y el otro sensible a tripsina y quimotripsina), para ser mezclados en partes iguales con el derivado de AMA1 (HABP de AMA1 + HABP *PfRON4*) y se probaron dos concentraciones molares: $200\mu\text{M}$ ($100\mu\text{M} + 100\mu\text{M}$) y $100\mu\text{M}$ ($50\mu\text{M} + 50\mu\text{M}$).

Los resultados mostraron que cuando el HABP derivado de *PfAMA1* se prueba de forma individual, genera porcentajes de inhibición cercanos al 70%, mientras que cuando es probado en mezcla con cualquiera de los dos HABPs derivados de *PfRON4* (42477 o 42480) en una relación molar igual, no muestra ningún cambio significativo o incluso conlleva a un efecto menor en la capacidad de inhibición de la invasión, como se puede

observar para la mezcla del 42477 con el 4313 a una concentración final de 100 μ M ($p < 0.05$) (Figura 14 B). Por lo tanto, los resultados aquí obtenidos muestran que los péptidos derivados de *Pf*cRON4 presentaron una mayor actividad de inhibición de la invasión cuando se utilizaban de forma individual que en las mezclas con el derivado de *Pf*AMA1.

En conjunto, estos resultados permiten sugerir que las regiones que comprenden los residuos del 800-819 (HABP 42477) y 860-879 (HABP 42480) de *Pf*RON4 son regiones que interactúan específicamente con las células hospederas (tanto con eritrocitos como células hepáticas), mostrando un comportamiento de saturación en la unión, presentando capacidad inhibitoria de la invasión de los merozoítos de *P. falciparum* y por lo tanto son regiones de interés para el desarrollo de métodos terapéuticos o profilácticos contra *P. falciparum*.

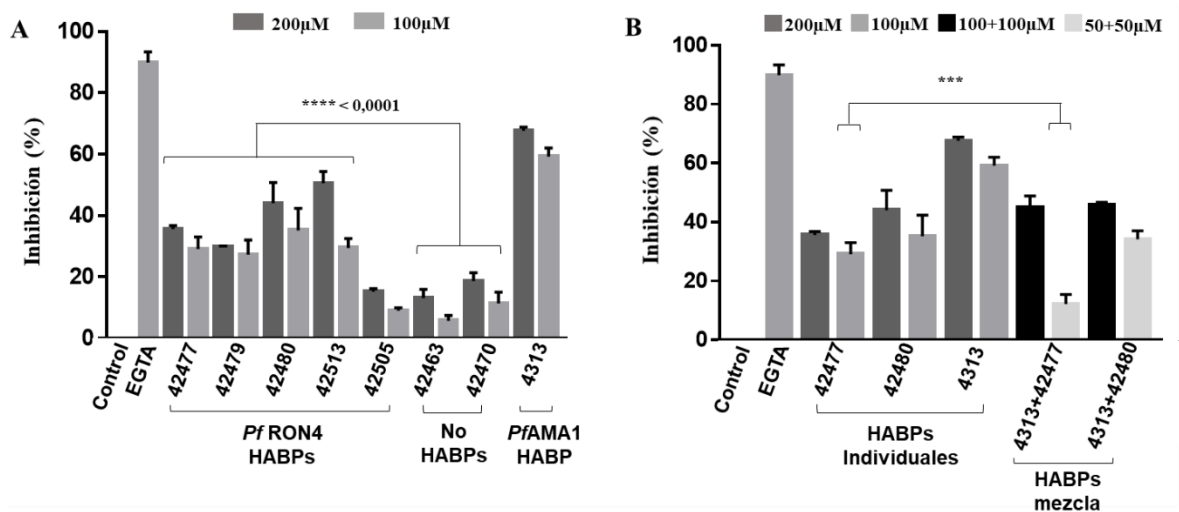


Figura 14. Ensayo de inhibición de la invasión de *P. falciparum* FCB2 en cultivo continuo *in vitro*. (A) Cuatro HABPs derivados de *Pf*cRON4 presentaron actividad inhibitoria de la invasión en cultivo continuo *in vitro* con la cepa FCB2 de *P. falciparum*. Las barras de error indican la desviación para cada ensayo montado por triplicado. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de inhibición de los HABPs versus los no HABPs. (B) La mezcla de dos de los HABPs de *Pf*RON4 con uno derivado de *Pf*AMA1 no mostro mejorar la actividad de inhibición de la invasión. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de inhibición del 42477 individual a 100 μ M, con respecto a la mezcla de 42477 con 4313 a una concentración final de 100 μ M, sin embargo, esta diferencia es a la baja. **** p value <0.0001, *** p value <0.05.

9. Discusión

La malaria continúa siendo una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes a nivel mundial. Datos recientes de la OMS muestran un ligero incremento en el número de casos y muertes en el mundo, lo que enfatiza la necesidad de incrementar las medidas de control y el desarrollo de métodos que ayuden a mitigar el número de infecciones en África, Asia y Latinoamérica (2). Hasta hoy, *P. falciparum* es la especie más peligrosa por sus altas tasas de mortalidad particularmente en niños menores de cinco años. Su ciclo de vida dentro del ser humano se acompaña de dos formas parasitarias, el esporozoíto y el merozoíto, que le permiten una eficiente invasión, gracias a la presencia de complejos multiproteicos liberados desde el polo apical para interactuar eficientemente con sus células blanco (11). El esporozoíto representa un blanco atractivo debido a que es la primera forma invasiva dentro del humano y permanece más expuesto al sistema inmune antes de acceder al hepatocito (21). Por su parte, el merozoíto es responsable de la sintomatología clínica de la malaria, convirtiéndose en un blanco de acción interesante dentro del estudio de esta enfermedad (49). Desafortunadamente, se ha encontrado que, a pesar de contener un mismo genoma, el esporozoíto y merozoíto presentan perfiles proteómicos y transcriptómicos diferenciales, lo que implica, que las proteínas que expresa el esporozoíto para invadir el hepatocito son en su mayoría distintas de las que utiliza el merozoíto para invadir el eritrocito (56). Por tal motivo, para atacar ambas fases del parásito en el humano, se requerirá del estudio profundo de los antígenos expresados en ambos estadios con el objeto de bloquear las principales interacciones hospedero-patógeno.

Dentro de los eventos de invasión, se ha descrito que ambas formas parasitarias realizan un proceso activo de invasión donde forman un TJ para impulsarse dentro de la célula hospedera (133). Dentro de los componentes del TJ, se ha encontrado que varias proteínas serían comunes dentro de esta estructura tanto en el esporozoíto como en el merozoíto, entre las que se destaca la proteína RON4. RON4 en *P. falciparum* es

expresada como un antígeno del cuello de las roptrias que forma un complejo multiproteico con *Pf*RON2, *Pf*RON5 y *Pf*AMA1 (15, 20) y está presente en el anillo deslizante durante la formación del TJ (35, 36). De forma interesante se ha encontrado que, estudios de disrupción genética no han logrado obtener parásitos en ausencia de la proteína RON4, lo que resalta su importancia en el ciclo de vida de *Plasmodium*. Por lo tanto, un acercamiento a su función ha sido desarrollado con estudios de noqueo condicional, logrando establecer que RON4 es esencial para la invasión del hepatocito y eritrocito (36).

Estudios de interacción receptor-ligando en *T. gondii* y *P. vivax* han logrado establecer que el extremo C-terminal de RON4 interactúa de forma específica con la célula hospedera (134, 135). Sin embargo, Aunque *P. falciparum* ha sido el modelo en *Plasmodium* donde se han llevado a cabo los estudios de co-inmunoprecitación del complejo RONs/AMA1 y recientemente se ha mostrado la participación de *Pf*RON4 en el complejo SURGE (37), aún no se conocen las regiones críticas de interacción entre la proteína *Pf*RON4 y la superficie de eritrocitos y hepatocitos que puedan llegar a ser críticos en el proceso de invasión y que puedan cubrir los dos estadios infectivos del parásito con miras al desarrollo de una vacuna.

En este trabajo, con base al alineamiento múltiple de secuencias con 16 cepas de *P. falciparum*, se seleccionó una región conservada de *Pf*RON4 (*Pfc*RON4) ubicada hacia el extremo carboxilo-terminal (Figura 8). Mediante un ensayo de unión/interacción receptor-ligando altamente robusto y específico (Figura 10), utilizando péptidos radiomarcados derivados *Pfc*RON4, se identificaron cinco cHABPs 42477, 42479, 42480, 42505 y 42513 (entre los residuos 800 y 1159) que interactuaron de forma específica con la membrana de eritrocitos humanos y dos HABPs, 42477 y 42480 que se unieron específicamente a células HepG2 (Figura 10), según criterios previamente establecidos (25). Al igual que lo reportado aquí para *P. falciparum*, en *T. gondii* (134, 135) y *P. vivax* (118), también se ha mostrado la unión de RON4 a sus células blanco, de forma interesante, las regiones de unión previamente descritas también se localizan hacia la región carboxilo-terminal. El análisis de la caracterización de esta interacción receptor-ligando detectada para los cHABPs, permitió determinar que dichas interacciones presentan constantes de disociación en el rango nano y micromolar (800-1500 μ M), resaltando su relevancia funcional dentro de los procesos de adhesión del parásito (Figura 11).

Estudios previos determinaron que la región de unión de *Pv*RON4 a eritrocitos humanos, está comprendida entre los residuos 501-520 (HABP 40305) (118), esta región posee homología en 13 residuos consecutivos con la secuencia de *Pf*RON4, sin embargo, realizando un lineamiento entre estas dos secuencias, la región de unión de *Pv*RON4 corresponde a una región diferente a los HABPs encontrados en este trabajo (péptido 42503), dicha región no mostró un porcentaje de unión significativo al eritrocito (Figura 10); este resultado demuestra la importancia de realizar el mapeo y la evaluación de las regiones de unión específicas para cada especie, aunque exista un porcentaje de homología importante entre las secuencias de las proteínas; además, se debe tener en cuenta otras características de cada especie en particular, como el tropismo por una población celular determinada en el proceso de invasión (136).

Estudios previos han identificado una gran cantidad de cHABPs en varias proteínas de *P. falciparum* que participan en la invasión de las células hospederas para cada etapa invasiva del parásito, el merozoíto (25) y el esporozoíto (26). Sin embargo, a pesar de sus características de unión a las células hospederas, estos cHABPs, son pobremente inmunogénicos y no inducen respuesta protectora en el modelo de primates del género *Aotus*. Por otro lado, se ha visto que los HABPs que presentan variabilidad son capaces de inducir una respuesta inmune específica de cepa (31). Debido a esto, se han planteado estudios estructurales e inmunológicos de los cHABPs, que han permitido la modificación química de estos péptidos, lo que permitió que indujeran altos títulos de anticuerpos, de larga duración y con efectos protectores; estos HABPs son denominados estructuras proteicas que inducen protección inmune o IMPIPS y algunos son candidatos clave para el desarrollo de una vacuna multi-antígeno, multi-estadio basada en subunidades mínimas (31). Los HABPs derivados de *Pf*cRON4, sometidos a los análisis mencionados anteriormente, podrían ser parte de estos candidatos a vacuna.

A fin de caracterizar mejor las regiones de unión de *Pf*RON4 a células hospederas y dilucidar la naturaleza de los receptores, se realizaron ensayos de interacción de los HABPs con eritrocitos y células HepG2 tratados enzimáticamente. Los resultados mostraron que la unión de los cHABPs a la membrana del eritrocito fue resistente al tratamiento con neuraminidasa y sensible al tratamiento con tripsina y quimotripsina, sugiriendo la participación de *Pf*RON4 en una vía de invasión independiente de ácido siálico (Figura 12 B), distinto a lo reportado para la proteína RON4 en *P. vivax* para la cual su unión fue susceptible al tratamiento con las tres enzimas, un patrón de susceptibilidad

aun no reportado para ningún receptor conocido (118). Por su parte, el patrón de unión para los cHABPs 42480, 42505 y 42513 de PfRON4 es similar al patrón de unión de la proteína PfRh4 a su receptor CR1 (98). Sin embargo, futuros estudios deben ser direccionados para establecer con exactitud la identidad del receptor para PfRON4.

Teniendo en cuenta que se encontraron cHABPs con comportamientos similares en el patrón de unión basado en la susceptibilidad a enzimas (Figura 12 B), se determinó mediante ensayos de competencia que los HABPs interactúan con el mismo receptor al encontrar patrones de competencia dependientes de la concentración (Figura 12 D).

Por su parte, la unión de los cHABPs a células HepG2 fue evaluada sobre células tratadas con enzimas que remueven distintos tipos de glicosaminoglicanos que hacen parte de proteoglicanos abundantes sobre las células hepáticas. Previos estudios han mostrado que los principales receptores de las proteínas de esporozoíto son carbohidratos abundantes sobre el hepatocito (71, 72, 83, 137). Teniendo en cuenta este antecedente, los resultados mostraron que ambos cHABPs (42477 y 42480) localizados entre los residuos 800-819 y 860-879 de PfRON4 fueron afectados drásticamente por el tratamiento con heparinasa I y en menor proporción por la enzima Chondroitinase ABC, lo que sugiere la interacción de los cHABPs con receptores ya sea tipo heparina y/o proteoglicanos de sulfato de condroitina sobre la superficie de las células HepG2. Estudios en *T. gondii*, mostraron mediante ensayos de *pull-down* y análisis de espectrometría de masas, que la región comprendida entre los residuos 727-860 ubicada hacia la parte C-terminal de TgRON4 interactúa con un componente del citoesqueleto: la región C-terminal de la β -tubulina (134). Los mismos autores más tarde, reportaron que además de la β -tubulina, la región carboxilo-terminal de TgRON4 también se une de forma específica con heparina y sus derivados sobre células CHO (del inglés *Chinese Hamster Ovary*) (135).

Para demostrar que los nuevos cHABPs caracterizados son capaces de bloquear la interacción merozoíto-eritrocito resaltando su actividad funcional dentro del ciclo de invasión eritrocítico, se llevaron a cabo una serie de ensayos de inhibición de la invasión en un cultivo continuo *in vitro* con la cepa FCB2 de *P. falciparum*. Los resultados mostraron que cuatro HABPs (42477, 42479, 42480 y 42513) presentaron una diferencia estadísticamente significativa (< 0.0001) en la capacidad de inhibición de la invasión en comparación con los no HABPs 42463 y 42470 (Figura 14 A). Resultados de inhibición de la invasión con porcentajes similares han sido obtenidos con HABPs derivados de otras

proteínas de *P. falciparum*, donde se han observado grados variables de inhibición (29, 117, 124).

Considerando que *P. falciparum* se caracteriza por poseer múltiples ligandos importantes para la invasión de las células hospederas (14), el bloqueo de múltiples vías podría ser un camino ideal para interrumpir la invasión. Los hallazgos alcanzados hasta ahora utilizando esta herramienta podrían ayudar a mejorar las formulaciones vacunales, de hecho, investigaciones han mostrado que la mezcla de anticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas de importancia en la invasión genera mayor actividad inhibitoria, como es el caso de combinaciones de Rh5 con otros antígenos de merozoíto (138, 139). En vista de la importancia y aplicabilidad futura de este tipo de ensayos, en este trabajo de investigación se llevó a cabo un ensayo preliminar para evaluar si el efecto inhibitorio de un HABP derivado de PfAMA1 que ha mostrado tener altos niveles de inhibición de la invasión (126), podría incrementar el efecto inhibitorio de la invasión de los cHABPs de PfRON4 (Figura 14 B). PfAMA1 es uno de los principales candidatos a vacuna contra la malaria (140) y hace parte del complejo molecular del TJ junto con otras proteínas de las roptrias incluyendo RON4 (15, 104), sin embargo, uno de sus principales problemas es su alta variabilidad genética, lo que ha generado fracaso en sus formulaciones vacunales (141).

Los resultados aquí encontrados mostraron que, la mezcla de HABPs 4313:42477 y 4313:42480 en una relación molar igual, no incrementó el porcentaje de inhibición respecto al uso individual de cada uno (Figura 14 B). Aunque se han conseguido resultados promisorios en algunas mezclas de antígenos, ejemplos como la combinación de anticuerpos dirigidos contra proteínas del complejo Rh5/RIPR/CyRPA, han mostrado una mejor inhibición cuando se usan anticuerpos individuales que en mezcla (142).

La inclusión de múltiples antígenos en una vacuna puede implicar riesgos de competencia antigénica (138, 143), lo que sugiere la realización de una evaluación rigurosa de las posibles combinaciones de antígenos mediante estudios de aditividad, sinergia y antagonismo con péptidos o anticuerpos, que permitan con certeza determinar una mezcla de antígenos con mejor potencial de inhibición; este tipo de metodologías ya se han desarrollado para estos análisis con anticuerpos (144) y podrían ajustarse a ensayos con péptidos.

Todos los resultados acá expuestos, permiten sugerir que PfRON4 contiene regiones de unión de alta afinidad que median interacciones con receptores de tipo proteico sobre la

membrana de eritrocitos humanos y con receptores de heparina y/o proteoglicanos de sulfato de condroitina en la membrana de las células HepG2, siendo los cHABPs 42477 (residuos del 800-819) y 42480 (residuos 860-879) regiones de unión comunes a eritrocitos y hepatocitos, lo que sugiere su inclusión en una vacuna contra *P. falciparum* basada en subunidades, con capacidad de cubrir los dos estadios del parásito.

10. Conclusiones y recomendaciones

10.1 Conclusiones

- Se identificaron cinco péptidos conservados (42477, 42479, 42480, 42505 y 42513), localizados hacia la región carboxilo-terminal de *PfRON4*, entre los residuos 800-1159 que presentaron alta capacidad de unión a eritrocitos y dos de estos mismos péptidos (42477 y 42480) localizados entre los residuos 800-819 y 860-879, respectivamente, interactuaron específicamente con la membrana de las células HepG2. Estas interacciones presentaron *K_D*s en el rango nano y micromolar (0,8μM-1,5μM), sugiriendo interacciones de alta afinidad y especificidad con las células hospedero.
- La proteína *PfRON4* participa en una vía de invasión independiente de ácido siálico, debido a que la unión de los HABPs fue resistente al tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa y sensible al tratamiento con tripsina y/o quimotripsina, demostrando interacción con un receptor de tipo proteico, además los HABPs interactúan con el mismo receptor, ya que se observó un patrón de competencia dependiente de la concentración, lo cual confirma la especificidad de dicha interacción. La interacción de los péptidos 42477 y 42480 con las células HepG2 sugirió receptores tipo heparina y/o proteoglicanos de sulfato de condroitina, ya que fue sensible a Heparinasa I y condroitinasa ABC.
- Cuatro de los HABPs de unión a eritrocito, son capaces de inhibir la invasión de los merozoítos en cultivo continuo *in vitro* para la cepa FCB2 de *P. falciparum* (hasta en un 50%), sugiriendo un papel destacado de estas regiones en el proceso de invasión del merozoíto.

- Debido a los hallazgos descritos en esta investigación para las regiones ⁸⁰⁰L-⁸¹⁹ (HABP 42477) y ⁸⁶⁰K-⁸⁷⁹P (HABP 42480) de PfRON4, **estos cHAPBs son potenciales candidatos** de interés para el desarrollo de métodos terapéuticos contra *P. falciparum* apoyando su inclusión en experimentos que busquen el desarrollo de una vacuna multi-antígeno, multi-estadio basada en subunidades contra **la especie más letal de este parásito.**

10.2 Recomendaciones

- Evaluar la antigenicidad, inmunogenicidad y la capacidad de protección de los cHAPBs derivados de PfRON4, con el fin de caracterizar los residuos críticos que permitan realizar modificaciones químicas en miras de mejorar su potencial como parte de una vacuna.
- Evaluar las interacciones y los posibles efectos sinérgicos entre HABPs derivados de PfRON4 con HABPs derivados de otras proteínas importantes durante el proceso de invasión de *Plasmodium falciparum*.
- Determinar con exactitud la identidad del (los) receptor (es) de interacción de las regiones de unión derivadas de PfRON4, presentes sobre la superficie de las células hospedero, a fin de obtener más información acerca de la biología del parásito y, así mismo, utilizarlo como herramienta en la búsqueda de métodos de control.

11. Productos y resultados de las actividades de generación de nuevo conocimiento

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron presentados en el IV congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular en la modalidad de poster (Anexo E y F).

Adicionalmente, todos los resultados obtenidos fueron consignados en un artículo de investigación y fueron sometidos para publicación en la revista científica *Vaccine* (Anexo G).

12. Anexos

Anexo A: Consentimiento informado de donantes de muestras de sangre:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE VENOSA

| | | |
|--|---|---|
| Título del Estudio | : | Determinación y caracterización de las regiones de unión de <i>PfPRON4</i> a eritrocitos y hepatocitos humanos. |
| Investigador Responsable y profesión | : | Fredy Alexander Pulido Quevedo, Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. |
| Lugar en que se realizará el estudio (Dpto, Sede, Facultad, etc) | : | Centro de Investigación-Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) |
| Unidad Académica | : | Línea de Investigación Receptor-Ligando |
| Nº de teléfonos asociados al estudio | : | 3244672 ext 146 |
| Correo electrónico Investigador Responsable | : | fpulido@unal.edu.co |
| Tipo de muestra requerida | : | Sangre total |

1. ¿Por qué se realiza este estudio?

Este Proyecto de investigación se enmarca en una de las principales enfermedades transmitidas por vectores que se denomina malaria. La malaria es producida por un parásito denominado *Plasmodium* que infecta los hepatocitos y los eritrocitos humanos. Durante el proceso de invasión, los parásitos se unen a las células humanas mediante distintas proteínas.

Diferentes estrategias han sido planteadas para contener la infección por estos parásitos, sin embargo, la falta de una solución definitiva a esta problemática a nivel de salud pública conlleva a que se mantengan e intensifiquen los esfuerzos por conocer a mayor profundidad los mecanismos de invasión y describir las interacciones que ocurren entre el parásito y las células humanas. Por lo anterior, cada vez se le presta una mayor atención

a la identificación, descripción y caracterización de las proteínas del parásito y a los receptores de las células humanas que participan durante el proceso de invasión.

La proteína RON4 de *Plasmodium falciparum* (la especie de *Plasmodium* más letal a nivel mundial) ha mostrado ser esencial en el proceso de invasión de las dos formas parasitarias, denominadas esporozoíto y el merozoíto, afectando el desarrollo del parásito desde dos frentes diferentes y por consiguiente una mayor posibilidad de obtener una solución efectiva frente a las infecciones. Por esta razón, en este trabajo se determinarán que fragmentos de la proteína RON4 de *Plasmodium falciparum* están interactuando específicamente con las células humanas. Las regiones acá identificadas serán evaluadas a nivel funcional para determinar cuáles de ellas pueden servir como posibles candidatos a vacuna.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, usted está siendo invitado a participar en el proyecto titulado “Determinación y caracterización de las regiones de unión de P~~R~~RON4 a eritrocitos y hepatocitos humanos”, donde se le extraerá una muestra de sangre venosa de aproximadamente 7-10mL. Esta muestra será utilizada para cultivar el parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*) y para realizar ensayos de unión entre el parásito y las células sanguíneas (eritrocitos), en busca de blancos terapéuticos contra la malaria.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto está enfocado en determinar, caracterizar y delimitar que regiones de la proteína RON4 de *Plasmodium falciparum* se unen a las células sanguíneas y hepatocitos humanos.

2. ¿Qué implica este estudio?

Si usted decide facilitar una muestra de sangre para este estudio, nosotros extraeremos alrededor de 7-10 mL de sangre de una vena de su brazo mediante la técnica de venopunción. Las muestras serán tratadas y almacenadas en los laboratorios de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Allí realizaremos la separación de los componentes celulares y los utilizaremos para el cultivo de *Plasmodium* y para realizar los ensayos de unión con la proteína RON4.

3. ¿Cómo se realiza la toma de muestra sanguínea?

La sangre se extrae de una vena localizada en la parte interior del brazo. El sitio se limpiará con alcohol antiséptico y se colocará una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en la zona. Se introduce una aguja estéril en la vena. Se recoge la sangre en un frasco hermético o en un tubo adherido a la aguja. La banda elástica se retira del brazo. Se saca la aguja y el sitio se cubre con algodón estéril para detener el sangrado.

4. ¿Cuáles son los riesgos más frecuentes del procedimiento de venopunción?

- ✓ Leve dolor y ardor en el sitio de inserción de la aguja, que ceden en cuanto esta se retira.
- ✓ Hematomas (morados) pequeños que mejorarán espontáneamente o con medidas locales como hielo inicialmente y paños de agua tibia en los días siguientes.

- ✓ Náusea, vómito y desmayos antes o durante la punción de los cuales se recuperará rápidamente.
- ✓ Sangrado más prolongado de lo esperado, (especialmente si toma anticoagulantes o aspirina). Para controlarlo debe hacerse presión suave en el sitio de punción con un algodón seco por unos 2 a 5 minutos.

5. ¿Cuáles son los riesgos más infrecuentes del procedimiento de venopunción?

- ✓ Hematomas que abarcan una gran área del brazo puncionado.
- ✓ Intenso dolor y sensación tipo “corrientazo” y hormigueo que puede presentarse inmediatamente u horas después de la venopunción.
- ✓ Infección en el sitio de punción que se manifiesta por enrojecimiento, calor, dolor y posible secreción en el sitio de ingreso de la aguja días después de la obtención de la muestra.

En caso de presentarse algún evento adverso después el procedimiento, usted recibirá la atención necesaria por parte del profesional en Bacteriología que realizará la toma de muestra, si se llegase a requerir una atención más especializada usted será remitido al centro de atención en salud más cercano. Por favor infórmenos la **EPS a la que pertenece:**

PRECAUCIONES AL REALIZAR EL PROCEDIMIENTO: Por favor informe a nuestro personal si tiene trastorno de la sensibilidad en uno de sus brazos, si le realizan hemodiálisis o si le han realizado una mastectomía de qué lado, para que la venopunción NO se realice en ese brazo.

6. ¿Qué pasará con mi información y mi muestra de sangre?

La información del donante se mantiene reservada, y no aparecerá publicada en ningún lugar. De hecho, las muestras serán almacenadas en un lugar seguro, donde sólo tiene acceso el investigador, y no estarán identificadas con nombres ni ningún dato personal que permita identificar de quién proviene la muestra. La muestra de sangre será sometida a procesos de conservación, para luego utilizarla en el cultivo del microorganismo del cual trata este estudio.

7. ¿Cuáles son los beneficios de participar?

Por ahora, usted como donante no obtendrá ningún beneficio directo al proveer una muestra de sangre para el mantenimiento del cultivo del microorganismo y para los ensayos de unión utilizados en este estudio. Sin embargo, su apoyo aportará en una de las fases más importantes del proyecto. Los resultados de este tipo de estudios podrían ayudar en el futuro para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades transmitidas por vectores, como la malaria, aportando al desarrollo humano y al mejoramiento de la calidad de vida de muchas personas en riesgo de padecer la enfermedad en las zonas tropicales y sub-tropicales de Colombia y el mundo.

**AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA EL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Yo _____: con documento de identificación No. _____

de _____, en pleno uso de mis facultades mentales acepto voluntariamente que me sea tomada una muestra de sangre total con el fin de realizar un aporte al proyecto de investigación: **“Determinación y caracterización de las regiones de unión de P β RON4 a eritrocitos y hepatocitos humanos”**.

Así mismo, declaro que he sido informado acerca de la necesidad de realizar este procedimiento, complicaciones que pueden presentarse durante el mismo y el manejo que se le dará a la muestra obtenida y que todas las inquietudes generadas durante el proceso han sido respondidas satisfactoriamente.

Acepto las indicaciones dadas por el Profesional en Bacteriología acerca del procedimiento y acepto la total responsabilidad de los inconvenientes o consecuencias que surjan al no acatar dichas indicaciones y recomendaciones. Entiendo que la toma de muestras es voluntaria y que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento antes y después de que sea tomada la muestra de sangre. Una vez entendido, autorizo que se me realice el procedimiento de toma de muestras (sangre venosa), por lo tanto, firmo en constancia el presente documento.

Firma: _____

Certifico que he leído y comprendido todo lo anterior y que me encuentro en capacidad de expresar mi libre voluntad.

Nombre profesional que toma la muestra: _____

Firma y Cédula: _____

Fecha de la toma: _____

Nombre testigo: _____

Firma y Cédula: _____

Fecha: _____

Anexo C: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RON4 entre 16 cepas de *P. falciparum*.

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
|-------------|-----------|----------|---------|-----|--------|--------|---------|---------|---------|------|-------|--------|---------|----------|--------|--------|
| Pf3D7_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfGB4_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfTG01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfML01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfIT_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| Pf7G8_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfCD01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfKH01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfKH02_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfDd2_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfGA01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfKE01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfHB3_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfGN01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfSD01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| PfSN01_RON4 | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |
| Prim.cons. | MSSVRFFLC | IFLVLFTF | IDIVKPF | KGN | YGEANF | SFFQAT | PASHIEE | EPQKTES | DAQSNIT | QNEE | INNTK | PLQENI | TNNQQNS | NEQQNNNE | QQNNNE | QQNNNE |

| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
|-------------|----------|---------|--------|----------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|
| Pf3D7_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfGB4_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfTG01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfML01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfIT_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| Pf7G8_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfCD01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfKH01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfKH02_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfDd2_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfGA01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfKE01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfHB3_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfGN01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfSD01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| PfSN01_RON4 | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |
| Prim.cons. | EPLTNQNT | NEVKIND | HNEHEK | NTENKIEE | QYNNIN | NHSHD | INKNQ | SINNMM | NENAD | KNVPHL | DQSAMS | NEKHINE | HTTNP | IESHT | GENNH | DKINE |

| | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
|-------------|----------|-------|--------|------|-------|--------|-----|---------|-------|--------|-------|-------|-------|------|-------|-----|
| Pf3D7_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfGB4_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfTG01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfML01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| Pf7G8_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfCD01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfKH01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfKH02_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfDd2_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfGA01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfKE01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfHB3_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfGN01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfSD01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| PfSN01_RON4 | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |
| Prim.cons. | TNEPIHIE | HAATP | TNEHIH | NEHA | TTTNE | PTNEHA | ATI | THEPTNE | HEHTT | PTNEPI | HNEHA | TTTNE | PIHNE | HATP | TNEPI | PIE |


```

PfcD01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfkH01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfkH02_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfdD2_RON4   AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfgA01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfkE01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfhB3_RON4   AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfgN01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfsD01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
PfsN01_RON4  AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT
*****
Prim.cons.   AYLGLIDELLVMNKRYSQNKDYVETLEKIKKSKVFKHCTKIMRIGGKVSSVFPNYENVKKPSSSIIGSLGNLIKANISTYYKATAQRINSYFHYTEKKSJKSSPLKII SVCTLLHLTDMLYKCSDENSGVMDLYNLQLNTLNMKGKMLVQYLVHLKFLT

```

```

          1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
Pf3D7_RON4  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfgB4_RON4  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PftG01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfML01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfiT_RON4   QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
Pf7G8_RON4  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfcD01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfkH01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfkH02_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfdD2_RON4  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfgA01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfkE01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfhB3_RON4  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfgN01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfsD01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
PfsN01_RON4 QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL
*****
Prim.cons.  QEKKNQLKEICEPQNGLIDETLTkMLILLSTDSHELLSHELENKGFDEDIQDEIKNINESDNNIRKEDDAEKMIFFDL

```

Anexo D: Porcentaje de hemólisis de los péptidos utilizados en el ensayo de inhibición de la invasión (200µM).

Se muestra el porcentaje de hemólisis para cada péptido, obtenido mediante la lectura de absorbancia de tres replicas independientes:

| MUESTRA | % HEMÓLISIS | Desvest |
|-------------------------------------|--------------------|----------------|
| NEGATIVO (PBS 1X) | 0,0 | 0,1 |
| POSITIVO (Tritón X-100 0,1%) | 100,0 | 3,2 |
| 42477 | 0,4 | 0,4 |
| 42479 | 0,7 | 0,1 |
| 42480 | 0,1 | 0,4 |
| 42505 | 0,1 | 0,3 |
| 42513 | 0,0 | 0,2 |
| 42463 | 0,2 | 0,1 |
| 42470 | 0,1 | 0,2 |
| 4313 | 0,4 | 0,3 |

Anexo E: Poster presentado en el VI congreso de Bioquímica y Biología Molecular.

The *Plasmodium falciparum* Rhoptry Neck Protein 4 (RON4) contains human erythrocytes and hepatocytes binding regions

Authors Freddy Alexander Pulido Quevedo^{1,2} (speaker), Gabriela Arévalo Pinzón³ and Manuel Alfonso Patarroyo^{3,4,5}

¹ MSc programme in Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. ² Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), Bogotá, Colombia. ³ Faculty of Sciences, Biology Department, Universidad Antonio Nariño, Bogotá, Colombia. ⁴ Faculty of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. ⁵ Health Sciences Division, Main Campus, Universidad Santo Tomás, Bogotá, Colombia.

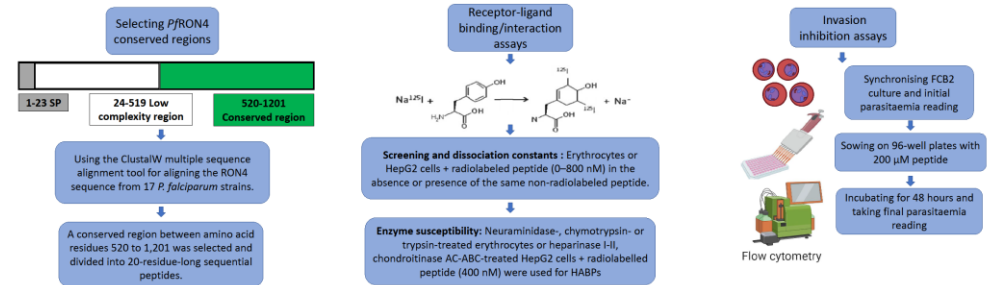
INTRODUCTION

Plasmodium falciparum-related malaria represents a serious public health problem throughout the world due to its high mortality rates. *P. falciparum* expresses rhoptry neck protein 4 (PRON4) during merozoite and sporozoite stages. It participates in tight junction (TJ) formation with host cells via the AMA-1/RON complex and is refractory to complete genetic deletion. Nonetheless, key PRON4 regions interacting with host cells remain unknown; such information would be extremely useful for combating *P. falciparum*-related malaria.

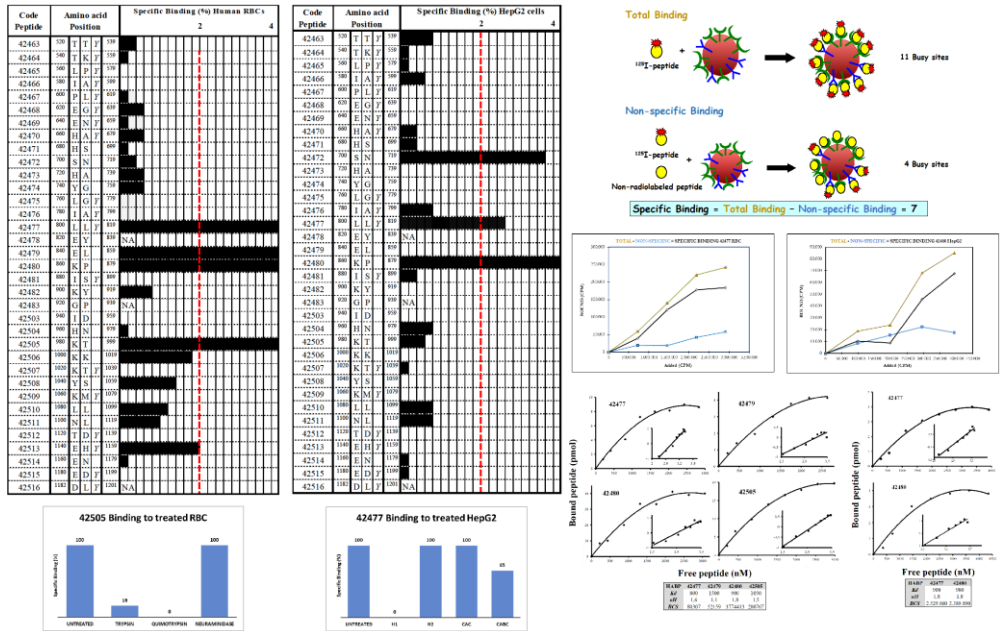
OBJECTIVES

Selecting and synthesizing *Plasmodium falciparum* RON4 conserved region-derived, peptides for evaluating their erythrocyte and HepG2 cell binding activity; characterising the nature of their receptors; and ascertaining their inhibitory effect on parasite invasion of human erythrocytes.

METHODOLOGY



RESULTS



CONCLUSIONS

- Five peptides (42477, 42479, 42480, 42505 and 42513: called high binding activity peptides - HAP) had higher than 2% human erythrocyte binding activity, having nanomolar range K_ds, while two peptides (42477 and 42480) specifically bound to HepG2 membrane, having micromolar range K_ds.
- Cell-peptide interaction was sensitive to erythrocyte treatment involving trypsin and/or chymotrypsin and heparinase I and chondroitinase ABC, suggesting protein-type receptors (erythrocytes) and chondroitin sulphate proteoglycan and/or heparin-type receptors (sporozoites) for PRON4.
- The results revealed that PRON4 800-819 (HABP 42477) and PRON4 860-879 (HABP 42480) residues were regions which specifically interacted with host cells, thereby supporting their inclusion when developing therapeutic targets against the malaria, such as a subunit-based, multiple antigen and multi-stage anti-malarial vaccine.

REFERENCES

- Weiss, G. E.; Gilson, P. R.; Tachalertpaisarn, T.; Tham, W.-H.; de Jong, N. W.; Harvey, K. L.; Fowkes, F. J.; Barlow, P. N.; Rayner, J. C.; Wright, G. J. P. P., Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. 2015, 11 (2), e1004670.
- Richard D, MacRae CA, Riglar DT, Chan J-A, Foley M, Baum J, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. 2010;285(19):14815-22.
- Nozaki, M.; Baba, M.; Tachibana, M.; Tokunaga, N.; Torii, M.; Ishino, T. J. M., Detection of the rhoptry neck protein complex in *Plasmodium* sporozoites and its contribution to sporozoite invasion of salivary glands. 2020, 5 (4).

Anexo F: Certificado de presentación en el VI congreso de Bioquímica y Biología Molecular.



20
20



El comité científico del 34º Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2.

Certifican que el trabajo titulado:

“LA PROTEÍNA DEL CUELLO DE LAS ROPTRIAS 4 (RON4) DE PLASMODIUM FALCIPARUM CONTIENE REGIONES DE UNIÓN A ERITROCITOS Y HEPATOCITOS HUMANOS”

Fue presentado por: Fredy Alexander Pulido Quevedo, Gabriela Arévalo Pinzón, Manuel Alfonso Patarroyo.

Presentado en modalidad póster

En el marco del 34º Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020.

Llevado a cabo en la ciudad de Cartagena, Colombia del 11 al 15 de octubre de 2021.

Dr. Harold Ardila
Presidente Comité organizador

Dra. Elena Stashenko
Presidente Comité Científico
CLAQ 2020, XVIII COLACRO, X COCOCRO, II SPAE

Dra. Marcela Viola
Presidente Comité Científico IV C2B2

Anexo G: Formato de presentación del artículo de investigación sometido para publicación en la revista *Vaccine*.

Vaccine

Plasmodium falciparum rhopty neck protein 4 has conserved regions mediating interactions with receptors on human erythrocytes and hepatocyte membrane –Manuscript Draft–

| | |
|-----------------------|--|
| Manuscript Number: | JVAC-D-22-01637 |
| Article Type: | Original article |
| Section/Category: | Human Fungal/Parasite/Other Vaccines |
| Keywords: | host-pathogen interaction; malaria; Plasmodium; rhopty; RON4; tight junction. |
| Corresponding Author: | Manuel Alfonso Patarroyo, M.D., Dr.Sc. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) Bogota, COLOMBIA |
| First Author: | Fredy Alexander Pulido-Quevedo |
| Order of Authors: | Fredy Alexander Pulido-Quevedo Gabriela Arévalo-Pinzón Jeimmy Johana Castañeda-Ramírez Adriana Barreto-Santamaría Manuel Elkin Patarroyo Manuel Alfonso Patarroyo, M.D., Dr.Sc. |
| Abstract: | Plasmodium falciparum-related malaria represents a serious worldwide public health problem due to its high mortality rates. P. falciparum expresses rhopty neck protein 4 (PFRON4) in merozoite and sporozoite rhopties, it participates in tight junction (TJ) formation via the AMA-1/RON complex and is refractory to complete genetic deletion. Despite this, which PFRON4 key regions interact with host cells remain unknown; such information would be useful for combating P. falciparum-related malaria. Thirty-two RON4 conserved region-derived peptides were chemically synthesised for determining and characterising PFRON4 regions having high host cell binding affinity (high activity binding peptides or HABPs). Receptor-ligand interaction/binding assays determined their specific binding capability, the nature of their receptors and their ability to inhibit in vitro parasite invasion. Peptides 42477, 42479, 42480, 42505 and 42513 had greater than 2% erythrocyte binding activity, whilst peptides 42477 and 42480 specifically bound to HepG2 membrane, both of them having micromolar and submicromolar range Kd. Cell-peptide interaction was sensitive to treating erythrocytes with trypsin and/or chymotrypsin and HepG2 with heparinase I and chondroitinase ABC, suggesting protein-type (erythrocyte) and heparin and/or chondroitin sulphate proteoglycan receptors (HepG2) for PFRON4. Erythrocyte invasion inhibition assays confirmed HABPs' importance during merozoite invasion. PFRON4 800-819 (42477) and 860-879 (42480) regions specifically interacted with host cells, thereby supporting their inclusion in a subunit-based, multi-antigen, multistage anti-malarial vaccine. |
| Suggested Reviewers: | Asif Mohmed International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology New Delhi amohd@icgeb.res.in Expert in the field Surendra K Prajapati National Institute of Malaria Research surendramrc@gmail.com Expert in the field. Brigitte Vulliez-Le Normand Institut Pasteur bvulliez@pasteur.fr Expert in the field. Johan Hoebeke Institute of Molecular and Cellular Biology |

Bibliografía

1. White N, Pukrittayakamee S, Hien T, Faiz M, Mokuolu O, Dondorp A. Malaria. *Lancet* [Internet]. 2014; 383 (9918): 723–35.
2. Source WHOJR. World malaria report 2021. 2021. 2022.
3. Salud INd. Boletín epidemiológico semanal, Semana epidemiológica 52 de 2021. 2021. p. 14.
4. Weiss DJ, Lucas TC, Nguyen M, Nandi AK, Bisanzio D, Battle KE, et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. 2019;394(10195):322-31.
5. Ashley EA, Phyto APJD. Drugs in development for malaria. 2018;78(9):861-79.
6. Kumar S, Bhardwaj T, Prasad D, Singh RKJB, Pharmacotherapy. Drug targets for resistant malaria: historic to future perspectives. 2018;104:8-27.
7. Rosenthal MR, Ng CLJAid. *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance: the effect of heme, protein damage, and parasite cell stress response. 2020;6(7):1599-614.
8. Alout H, Labbé P, Chandre F, Cohuet AJTip. Malaria vector control still matters despite insecticide resistance. 2017;33(8):610-8.
9. Matuschewski KJTFj. Vaccines against malaria—still a long way to go. 2017;284(16):2560-8.
10. Sibley LJS. Intracellular parasite invasion strategies. 2004;304(5668):248-53.
11. Burns AL, Dans MG, Balbin JM, de Koning-Ward TF, Gilson PR, Beeson JG, et al. Targeting malaria parasite invasion of red blood cells as an antimalarial strategy. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019;43(3):223-38.
12. Cowman AF, Berry D, Baum JJocB. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. 2012;198(6):961-71.
13. Preiser P, Kaviratne M, Khan S, Bannister L, Jarra WJM, Infection. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. 2000;2(12):1461-77.
14. Weiss GE, Gilson PR, Taechalertpaisarn T, Tham W-H, de Jong NW, Harvey KL, et al. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. 2015;11(2):e1004670.
15. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan J-A, Foley M, Baum J, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the

rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. 2010;285(19):14815-22.

16. Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJJP. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. 2009;5(1):e1000273.

17. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. 2011;9(1):9-20.

18. Srinivasan P, Yasgar A, Luci DK, Beatty WL, Hu X, Andersen J, et al. Disrupting malaria parasite AMA1–RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion. 2013;4(1):1-9.

19. Tonkin ML, Roques M, Lamarque MH, Pugnière M, Douguet D, Crawford J, et al. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. 2011;333(6041):463-7.

20. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J, et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. 2011;7(2):e1001276.

21. Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MMJNRM. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. 2006;4(11):849-56.

22. Morahan BJ, Sallmann GB, Huestis R, Dubljevic V, Waller KLJEp. Plasmodium falciparum: genetic and immunogenic characterisation of the rhoptry neck protein PfRON4. 2009;122(4):280-8.

23. O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BSJNm. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1 19 across distantly related Plasmodium species. 2000;6(1):91-5.

24. Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF, et al. Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. 2005;102(36):12736-41.

25. Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo MEJCr. Intimate molecular interactions of P. falciparum merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. 2008;108(9):3656-705.

26. Curtidor H, Vanegas M, P Alba M, E Patarroyo MJCmc. Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine. 2011;18(29):4470-502.

27. Patarroyo ME, Patarroyo MAJAocr. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. 2008;41(3):377-86.

28. Patarroyo ME, Bermúdez A, Patarroyo MAJCr. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. 2011;111(5):3459-507.

29. Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Muñoz M, Patarroyo MA, Bermudez A, Patarroyo MEJV. A single amino acid change in the Plasmodium falciparum RH5 (PfRH5) human RBC binding sequence modifies its structure and determines species-specific binding activity. 2012;30(3):637-46.

30. Tolia NH, Enemark EJ, Sim BKL, Joshua-Tor LJC. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 2005;122(2):183-93.
31. Patarroyo ME, Patarroyo MA, Pabón L, Curtidor H, Poloche LAJV. Immune protection-inducing protein structures (IMPIS) against malaria: the weapons needed for beating Odysseus. 2015;33(52):7525-37.
32. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, Plouffe D, Tonkin CJ, Duraisingh MT, et al. Molecular mechanism for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. 2005;309(5739):1384-7.
33. Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, et al. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. 2009;58(1):29-35.
34. Alexander DL, Arastu-Kapur S, Dubremetz J-F, Boothroyd JCJ. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. 2006;5(7):1169-73.
35. Besteiro S, Michelin A, Poncet J, Dubremetz J-F, Lebrun MJ. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. 2009;5(2):e1000309.
36. Giovannini D, Späth S, Lacroix C, Perazzi A, Bargieri D, Lagal V, et al. Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. 2011;10(6):591-602.
37. Quintana MdP, Ch'ng J-H, Zandian A, Imam M, Hultenby K, Theisen M, et al. SURGE complex of *Plasmodium falciparum* in the rhoptry-neck (SURFIN4. 2-RON4-GLURP) contributes to merozoite invasion. 2018;13(8):e0201669.
38. Lew VL, Tiffert TJ. Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events? 2007;23(10):481-4.
39. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. 2011;480(7378):534-7.
40. Patarroyo MA, Molina-Franky J, Gómez M, Arévalo-Pinzón G, Patarroyo ME. Hotspots in plasmodium and RBC receptor-ligand interactions: Key pieces for inhibiting malarial parasite invasion. 2020;21(13):4729.
41. Sim B, Chitnis C, Wasniowska K, Hadley T, Miller LJS. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. 1994;264(5167):1941-4.
42. Angrisano F, Riglar DT, Sturm A, Volz JC, Delves MJ, Zuccala ES, et al. Spatial localisation of actin filaments across developmental stages of the malaria parasite. 2012;7(2):e32188.
43. Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, et al. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. 2011;108(32):13275-80.
44. Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Abril J, Patarroyo MA. Annotation and characterization of the *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 4 (Pv RON4). 2013;12(1):1-10.

45. Nozaki M, Baba M, Tachibana M, Tokunaga N, Torii M, Ishino TJM. Detection of the rhoptry neck protein complex in *Plasmodium* sporozoites and its contribution to sporozoite invasion of salivary glands. 2020;5(4).
46. Patarroyo ME, Salazar LM, Cifuentes G, Lozano JM, Delgado G, Rivera Z, et al. Protective cellular immunity against *P. falciparum* malaria merozoites is associated with a different P7 and P8 residue orientation in the MHC-peptide-TCR complex. 2006;88(2):219-30.
47. Miller LH, Ackerman HC, Su X-z, Wellem's TEJNm. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. 2013;19(2):156-67.
48. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020.
49. Cowman AF, Crabb BSJC. Invasion of red blood cells by malaria parasites. 2006;124(4):755-66.
50. Warrell DA. Clinical features of malaria. Essential malariology: CRC Press; 2017. p. 191-205.
51. Salud OPdl. Directrices para el tratamiento de la malaria. OPS Washington, DC; 2011.
52. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. 2010;107(43):18640-5.
53. Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman MJErimm. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. 2009;11.
54. (CDC) CfDCaP. Where Malaria Occurs 2020 [updated April 9, 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>.
55. Pradel G, Frevert UJH. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. 2001;33(5):1154-65.
56. Kori LD, Valecha N, Anvikar ARJJoVBD. Insights into the early liver stage biology of *Plasmodium*. 2018;55(1):9.
57. Radfar A, Méndez D, Moneriz C, Linares M, Marín-García P, Puyet A, et al. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. 2009;4(12):1899.
58. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. 2008;118(4):1266-76.
59. Kuehn A, Pradel GJJoB, Biotechnology. The coming-out of malaria gametocytes. 2010;2010.
60. Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JCJPB. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. 2005;3(9):e298.
61. Wright GJ, Rayner JCJPP. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. 2014;10(3):e1003943.
62. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. 1997;90(3):511-22.
63. Sherling ES, Perrin AJ, Knuepfer E, Russell MR, Collinson LM, Miller LH, et al. The *Plasmodium falciparum* rhoptry bulb protein RAMA plays an essential role

in rhoptry neck morphogenesis and host red blood cell invasion. 2019;15(9):e1008049.

64. Hanssen E, Goldie KN, Tilley LJM. Ultrastructure of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. 2010;96:93-116.

65. Tonkin CJ, Pearce JA, McFadden GI, Cowman AFJ. Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. 2006;9(4):381-7.

66. Zuccala ES, Gout AM, Dekiwadia C, Marapana DS, Angrisano F, Turnbull L, et al. Subcompartmentalisation of proteins in the rhoptries correlates with ordered events of erythrocyte invasion by the blood stage malaria parasite. 2012;7(9):e46160.

67. Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CEJPP. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. 2010;6(2):e1000746.

68. Knuepfer E, Suleyman O, Dluzewski AR, Straschil U, O'Keeffe AH, Ogun SA, et al. RON 12, a novel *Plasmodium*-specific rhoptry neck protein important for parasite proliferation. 2014;16(5):657-72.

69. Francia ME, Jordan CN, Patel JD, Sheiner L, Demerly JL, Fellows JD, et al. Cell division in Apicomplexan parasites is organized by a homolog of the striated rootlet fiber of algal flagella. 2012;10(12):e1001444.

70. Blackman MJ, Bannister LHJM. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. 2001;117(1):11-25.

71. Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig VJ. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. 1993;177(5):1287-98.

72. Müller H, Scarselli E, Crisanti AJP. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* in parasite-host cell interactions. 1993;35:69-72.

73. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. 2001;291(5501):141-4.

74. Risco-Castillo V, Topçu S, Marinach C, Manzoni G, Bigorgne AE, Briquet S, et al. Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. 2015;18(5):593-603.

75. Kumar KA, Garcia CR, Chandran VR, Van Rooijen N, Zhou Y, Winzeler E, et al. Exposure of *Plasmodium* sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. 2007;156(1):32-40.

76. Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigário AM, Silva S, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. 2003;9(11):1363-9.

77. Coppi A, Tewari R, Bishop JR, Bennett BL, Lawrence R, Esko JD, et al. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. 2007;2(5):316-27.

78. Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda MJPB. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. 2004;2(1):e4.
79. Ishino T, Chinzei Y, Yuda MJCM. A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. 2005;7(2):199-208.
80. Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda MJMm. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. 2006;59(5):1369-79.
81. Jimah JR, Salinas ND, Sala-Rabanal M, Jones NG, Sibley LD, Nichols CG, et al. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. 2016;5:e20621.
82. Sinnis P, Coppi AJPi. A long and winding road: the Plasmodium sporozoite's journey in the mammalian host. 2007;56(3):171-8.
83. Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis PJJBC. The Binding of the Circumsporozoite Protein to Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Is Required for Plasmodium Sporozoite Attachment to Target Cells. 2001;276(29):26784-91.
84. Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V, Ménard RJTEj. Plasmodium sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. 2002;21(7):1597-606.
85. Yang AS, Lopaticki S, O'Neill MT, Erickson SM, Douglas DN, Kneteman NM, et al. AMA1 and MAEBL are important for Plasmodium falciparum sporozoite infection of the liver. 2017;19(9):e12745.
86. Silvie O, Rubinstein E, Franetich J-F, Prenant M, Belnoue E, Rénia L, et al. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. 2003;9(1):93-6.
87. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JSJFmr. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. 2016;40(3):343-72.
88. Lin CS, Uboldi AD, Epp C, Bujard H, Tsuboi T, Czabotar PE, et al. Multiple Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. 2016;291(14):7703-15.
89. Baldwin MR, Li X, Hanada T, Liu S-C, Chishti AHJB, The Journal of the American Society of Hematology. Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. 2015;125(17):2704-11.
90. Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Ishiwa A, Gong H, et al. Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of Plasmodium falciparum. 2013;3(1):1-11.
91. Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P, Barnwell JWJPotNAoS. Two Plasmodium falciparum genes express merozoite proteins that are related to Plasmodium vivax and Plasmodium yoelii adhesive proteins involved in host cell selection and invasion. 2000;97(17):9648-53.

92. Lopaticki S, Maier AG, Thompson J, Wilson DW, Tham W-H, Triglia T, et al. Reticulocyte and erythrocyte binding-like proteins function cooperatively in invasion of human erythrocytes by malaria parasites. 2011;79(3):1107-17.
93. Ashline DJ, Duk M, Lukasiewicz J, Reinhold VN, Lisowska E, Jaskiewicz EJG. The structures of glycophorin CN-glycans, a putative component of the GPC receptor site for Plasmodium falciparum EBA-140 ligand. 2015;25(5):570-81.
94. Rydzak J, Kaczmarek R, Czerwinski M, Lukasiewicz J, Tyborowska J, Szewczyk B, et al. The baculovirus-expressed binding region of Plasmodium falciparum EBA-140 ligand and its glycophorin C binding specificity. 2015;10(1):e0115437.
95. Vera-Bravo R, Valbuena JJ, Ocampo M, Garcia JE, Rodriguez LE, Puentes A, et al. Amino terminal peptides from the Plasmodium falciparum EBA-181/JESEBL protein bind specifically to erythrocytes and inhibit in vitro merozoite invasion. 2005;87(5):425-36.
96. Mayer DG, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. 2009;106(13):5348-52.
97. Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5—an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. 2009;39(3):371-80.
98. Tham W-H, Wilson DW, Lopaticki S, Schmidt CQ, Tetteh-Quarcoop PB, Barlow PN, et al. Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. 2010;107(40):17327-32.
99. Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur DJPotNAoS. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. 2015;112(4):1179-84.
100. Chen L, Lopaticki S, Riglar DT, Dekiwadia C, Uboldi AD, Tham W-H, et al. An EGF-like protein forms a complex with PfRh5 and is required for invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. 2011;7(9):e1002199.
101. Volz JC, Yap A, Sisquella X, Thompson JK, Lim NT, Whitehead LW, et al. Essential role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA complex during Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes. 2016;20(1):60-71.
102. Wong W, Huang R, Menant S, Hong C, Sandow JJ, Birkinshaw RW, et al. Structure of Plasmodium falciparum Rh5–CyRPA–rip r invasion complex. 2019;565(7737):118-21.
103. Galaway F, Drought LG, Fala M, Cross N, Kemp AC, Rayner JC, et al. P113 is a merozoite surface protein that binds the N terminus of Plasmodium falciparum RH5. 2017;8(1):1-11.
104. Vulliez-Le Normand B, Tonkin ML, Lamarque MH, Langer S, Hoos S, Roques M, et al. Structural and functional insights into the malaria parasite moving junction complex. 2012;8(6):e1002755.
105. Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AFJ, immunity. Independent translocation of two micronemal proteins in developing Plasmodium falciparum merozoites. 2002;70(10):5751-8.

106. Hossain ME, Dhawan S, Mohammed AJPr. The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. 2012;110(5):1711-21.
107. Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. 2009;28(6):725-35.
108. Straub KW, Cheng SJ, Sohn CS, Bradley PJJcm. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. 2009;11(4):590-603.
109. Coelho CH, Doritchamou JYA, Zaidi I, Duffy PE. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. Nature Publishing Group; 2017.
110. Epstein J, Tewari K, Lyke K, Sim B, Billingsley P, Laurens M, et al. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8+ T cell immunity. 2011;334(6055):475-80.
111. Vaughan A, Wang R, Kappe SHJHv. Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. 2010;6(1):107-13.
112. Ewer KJ, Sierra-Davidson K, Salman AM, Illingworth JJ, Draper SJ, Biswas S, et al. Progress with viral vectored malaria vaccines: A multi-stage approach involving "unnatural immunity". 2015;33(52):7444-51.
113. Nascimento I, Leite LJBjom, research b. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. 2012;45:1102-11.
114. Stoute JA, Heppner DG, Mason CJ, Siangla J, Opollo MO, Kester KE, et al. Phase 1 safety and immunogenicity trial of malaria vaccine RTS, S/AS02A in adults in a hyperendemic region of western Kenya. 2006;75(1):166-70.
115. Collins KA, Snaith R, Cottingham MG, Gilbert SC, Hill AVJSr. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. 2017;7(1):1-15.
116. Molina-Franky J, Cuy-Chaparro L, Camargo A, Reyes C, Gómez M, Salamanca DR, et al. *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stage vaccine development. 2020;19(1):1-18.
117. Curtidor H, Patiño LC, Arévalo-Pinzón G, Vanegas M, Patarroyo ME, Patarroyo MAJP. *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 5 peptides bind to human red blood cells and inhibit parasite invasion. 2014;53:210-7.
118. Bermúdez M, Arévalo-Pinzón G, Rubio L, Chaloin O, Muller S, Curtidor H, et al. Receptor–ligand and parasite protein–protein interactions in *Plasmodium vivax*: analysing rhoptry neck proteins 2 and 4. 2018;20(7):e12835.
119. Guerra ÁP, Calvo EP, Wasserman M, Chaparro-Olaya JJB. Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*. 2016;36:97-108.
120. Houghten RAJPotNAoS. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. 1985;82(15):5131-5.
121. Merrifield RBJJotACS. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. 1963;85(14):2149-54.

122. Ocampo M, Urquiza M, Guzman F, Rodriguez L, Suarez J, Curtidor H, et al. Two MSA 2 peptides that bind to human red blood cells are relevant to *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. 2000;55(3):216-23.
123. Valbuena JJ, Bravo RV, Ocampo M, Lopez R, Rodriguez LE, Curtidor H, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* EBA-175 homologue sequences that specifically bind to human erythrocytes. 2004;321(4):835-44.
124. Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Muñoz M, Suarez D, Patarroyo MA, Patarroyo MEJV. Rh1 high activity binding peptides inhibit high percentages of *Plasmodium falciparum* FVO strain invasion. 2013;31(14):1830-7.
125. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. 1979;418-20.
126. Urquiza M, Suarez JE, Cardenas C, Lopez R, Puentes A, Chavez F, et al. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. 2000;19(4-5):508-13.
127. Buitrago SP, Garzon-Ospina D, Patarroyo MA. Size polymorphism and low sequence diversity in the locus encoding the *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 4 (PvRON4) in Colombian isolates. *Malar J.* 2016;15(1):501.
128. URQUIZA M, RODRIGUEZ LE, SUAREZ JE, GUZMÁN F, OCAMPO M, CURTIDOR H, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells. 1996;18(10):515-26.
129. Hein P, Michel MC, Leineweber K, Wieland T, Wettschureck N, Offermanns S. Receptor and binding studies. *Practical methods in cardiovascular research*: Springer; 2005. p. 723-83.
130. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Radioligand binding assays and their analysis. *Receptor binding techniques*: Springer; 2012. p. 31-77.
131. Gaur D, Mayer DG, Miller LH. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. 2004;34(13-14):1413-29.
132. Wasserman M, Alarcón C, Mendoza PM. Effects of Ca⁺⁺ depletion on the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. 1982;31(4):711-7.
133. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege JJ. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. 1978;77(1):72-82.
134. Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Gong H, Ishiwa A, Recuenco FC, et al. Characterization of the interaction between *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 4 and host cellular β -tubulin. 2013;3(1):1-9.
135. Takemae H, Kobayashi K, Sugi T, Han Y, Gong H, Ishiwa A, et al. *Toxoplasma gondii* RON4 binds to heparan sulfate on the host cell surface. 2018;67(2):123-30.
136. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KS, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. 2015;125(8):1314-24.
137. Arévalo-Pinzón G, Garzón-Ospina D, Pulido FA, Bermúdez M, Forero-Rodríguez J, Rodríguez-Mesa XM, et al. *Plasmodium vivax* cell traversal protein for

ookinetes and sporozoites (CeITOS) functionally restricted regions are involved in specific host-pathogen interactions. 2020:119.

138. Williams AR, Douglas AD, Miura K, Illingworth JJ, Choudhary P, Murungi LM, et al. Enhancing blockade of *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: assessing combinations of antibodies against PfRH5 and other merozoite antigens. 2012;8(11):e1002991.

139. Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CAJPo. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. 2012;7(1):e30251.

140. Hill AVJPTotRSBBS. Vaccines against malaria. 2011;366(1579):2806-14.

141. Ouattara A, Mu J, Takala-Harrison S, Saye R, Sagara I, Dicko A, et al. Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine. 2010;9(1):1-13.

142. Healer J, Wong W, Thompson JK, He W, Birkinshaw RW, Miura K, et al. Neutralising antibodies block the function of Rh5/Ripr/CyRPA complex during invasion of *Plasmodium falciparum* into human erythrocytes. 2019;21(7):e13030.

143. Saul A, Fay MPJPo. Human immunity and the design of multi-component, single target vaccines. 2007;2(9):e850.

144. Azasi Y, Gallagher SK, Diouf A, Dabbs RA, Jin J, Mian SY, et al. Bliss' and Loewe's additive and synergistic effects in *Plasmodium falciparum* growth inhibition by AMA1-RON2L, RH5, RIPR and CyRPA antibody combinations. 2020;10(1):1-12.