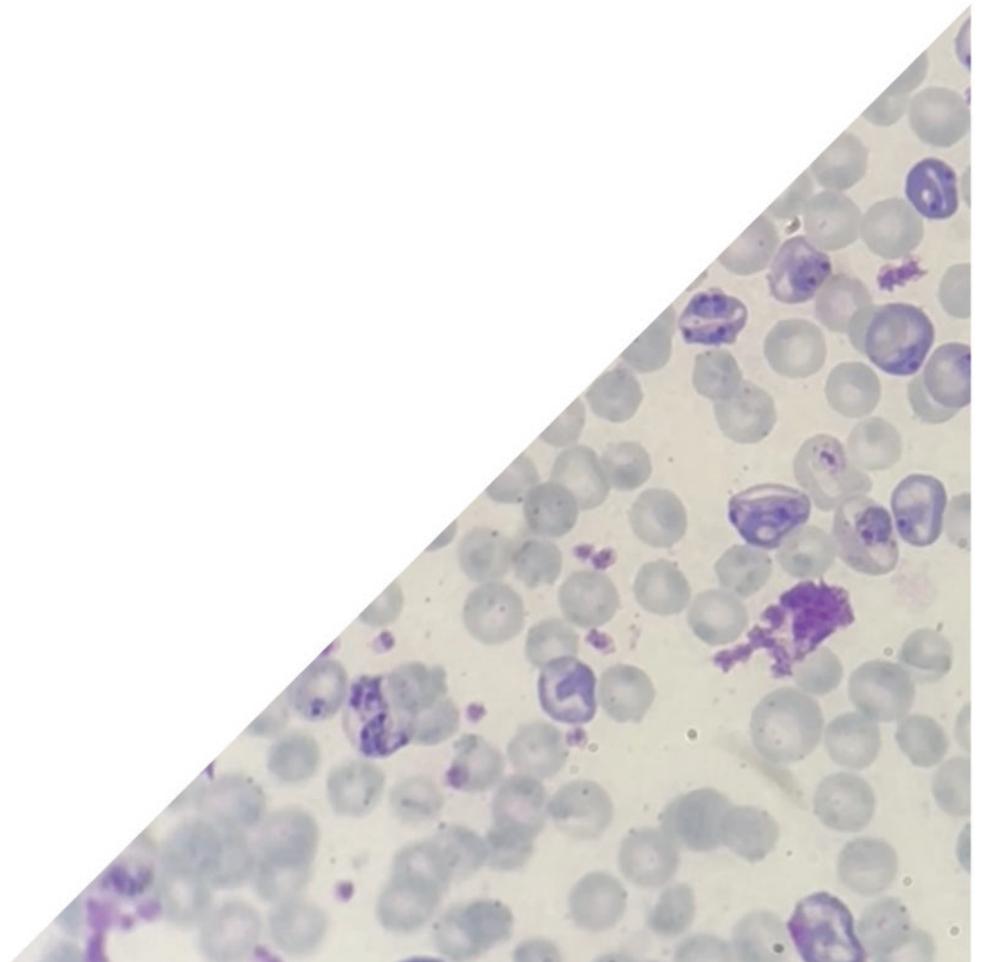


Caracterización funcional de la pequeña chaperona de choque térmico HSP27 en el ciclo de vida de *Plasmodium berghei*

Tesis de grado para optar por el título de Licenciada en Biotecnología

Autora: Sofía Cavagnaro

Directora: Dra. Georgina Montagna



Agradecimientos

Gracias a la UNSAM, que me dio el lugar para formarme como profesional y como persona. También a todos los docentes que me acompañaron en este camino, gracias por enseñarme lo hermoso de esta carrera.

A Georgina por haberme introducido al mundo de la investigación y de *Plasmodium*, por haberme enseñado con tanta paciencia y dedicación. A Paula, Meli y Gabi, por la ayuda y compañía todos los días en la mesada. A Mechi y Sofi, por las charlas y las risas en la mesada todos los días, fueron una compañía enorme.

A Dani, mi compañera todos estos años, acumulando risas, chismes y citas de estudio interminables (también compañera de retos, de todas esas veces que nos reímos fuerte en clase). Mi eterna compañera de grupos. Sin vos todo hubiese sido mil veces más aburrido. Por más años quejándonos de la gente.

A las pibardas, Agus, Mica, Orne, Cande, Lara, Sofi, y Gasti. Gracias por los chistes que están escondidos en los apuntes de clase (que no puede ver nadie más que nosotros). Gracias por la compañía, por el apoyo durante esas noches largas estudiando, por las crisis y llantos durante la época de parciales que superamos entre todos, las charlas interminables por el grupo y las meriendas eternas. Que la vida siempre nos encuentre con unos mates, medialunas y algo sin tacc.

A la camada, al labo 1 y labo 2. Por compartir esos almuerzos en mensa, por hacer que los trabajos prácticos eternos sean lo más divertido del día. Hicieron que esta sea una experiencia inolvidable. Somos la mejor camada de la UNSAM, la única que todos los recreos se ponía de acuerdo para armar meriendas. Estoy orgullosa de poder decir que son mis colegas. Agradezco también a Mari y Gonza, compartiendo mesada todos estos años, viéndonos sufrir y también teniendo éxitos.

A mis amigas de toda la vida, Agus, Lula, Lilu, Trini, Zow, Lali y Maga. Gracias por bancarme estos años de ausencia por estudiar, por obligarme a salir y por hacer que problemas grandes parezcan chiquitos. Son incondicionales y les confío mi vida (porque sé que me la salvaron más de una vez).

A Nico, sin tu apoyo no hubiera llegado hoy a dónde estoy. Sos lo mejor que me dio la facultad, me inspiras todos los días para ser mejor persona (y mejor profesional). Gracias por esperarme para merendar después de cursar, por tenerme paciencia cuando no estaba en mis mejores momentos. Sos mi compañero de vida, estuviste al lado mío durante todos mis logros, aconsejándome y evitando que me vuelva loca. Te amo.

A Ceci, que siempre está dispuesta a escucharme y aconsejarme en mi vida, por tus palabras de aliento cada vez que tenía que rendir cualquier examen.

A mis papas, que les debo esta vida y otra más, gracias a ustedes pude hacer esta hermosa carrera. Gracias por irme a buscar cuando salía de cursar de noche, por su esfuerzo para que yo pueda dedicarme por completo a ser licenciada, por darme independencia, por estar ahí en los

momentos más difíciles de mi vida. Sin ustedes nunca hubiera sido capaz de lograr esto, y por eso son mi dedicatoria más importante.

A mis abuelos, que deben estar mirando desde algún lugar. Espero que estén orgullosos de la mujer en que me convertí.

Resumen

La enfermedad de la malaria es causada por el protozoo *Plasmodium spp.*, del filo *Apicomplexa*. El parásito es transmitido por un insecto vector, la hembra del mosquito de la especie *Anopheles*. La transmisión vectorial comienza cuando la hembra del mosquito *Anopheles* ingiere los gametocitos a partir de la sangre de un hospedador infectado. Dentro del mosquito las gametas forman un cigoto, el cual se convierte en un ooquineto polarizado móvil que invade las células epiteliales del intestino del vector. Luego se diferencia formando ooquistes, dentro de los cuales se desarrollan numerosos esporozoítos, las formas infecciosas del parásito que van a iniciar nuevamente el ciclo de replicación dentro del hospedador mamífero.

Las pequeñas chaperonas de choque térmico (sHSP) son proteínas ubicuas que participan de múltiples procesos celulares. Se ha reportado que en diferentes sistemas celulares estas proteínas participan de mecanismos de regulación del citoesqueleto. En *Plasmodium berghei* se ha demostrado que la HSP20 afecta el desplazamiento del esporozoíto, más específicamente disminuye la velocidad de gliding y aumenta la adhesión del zoíto al sustrato. Esto tiene como consecuencia un efecto crítico en la transmisión natural de la malaria. Recientemente se identificó en nuestro laboratorio una proteína de 27 kDa, la PbHSP27, que comparte el dominio C-terminal alfa-cristalino característico de la familia de las sHSPs. Se determinó la expresión de esta chaperona utilizando una fusión a la etiqueta fluorescente mCherry, y se observó que PbHSP27 se expresa en los estadios sexuales en la sangre del hospedador, particularmente en los esquizontes y también en cigotos y ooquinetos, estadios que se forman dentro del insecto vector. Nuestra hipótesis de trabajo es que la PbHSP27 cumple un rol importante en el desarrollo de *P. berghei* en los estadios de esquizonte maduro, cigoto y ooquinetos.

Para poder migrar e invadir el intestino del mosquito, los cigotos se diferencian a ooquinetos, los cuales una vez maduros presentan la forma característica de los zoítos de *Apicomplexa*. Como primer objetivo, decidimos realizar un estudio fenotípico de ooquinetos que sobreexpresan la PbHSP27 fusionada a la etiqueta mCherry. Cuando realizamos ensayos *in vitro*, que reproducen el ciclo del parásito desde la maduración de las gametas hasta la formación de ooquinetos, observamos que los cultivos de parásitos que sobreexpresan PbHSP27 producían un número muy pequeño de ooquinetos comparados con los parásitos salvajes, a pesar que las gametas PbHSP27 mCherry presentaban una capacidad de exflagelación normal. Al analizar el fenotipo de los ooquinetos que sobreexpresan la proteína PbHSP27 fusionada a mCherry observamos que los mismos no adquieren la forma polarizada y alargada característica de los ooquinetos maduros, sino que la mayoría presenta una forma redondeada, similar a los estadios inmaduros del ooquinetos. Posteriormente, como segundo objetivo, intentamos generar parásitos transgénicos carentes del gen *Pbhsp27*, pero no conseguimos obtener una población clonal que tuviera esta delección. Por lo tanto, concluimos que la proteína PbHSP27 no solo podría cumplir un rol en el mecanismo de elongación celular que permite la diferenciación de cigoto a ooquinetos, sino que también sería esencial durante la etapa sanguínea del parásito.

Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AmpR: Cassette de resistencia a ampicilina.

ATP: Adenosín trifosfato.

ARN: Ácido ribonucleico.

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico.

DH5 α : Cepa de *E. coli* mejorada para la transformación de ADN por el método de CaCl₂. Se definen por tres mutaciones: recA1, endA1 que ayudan a la inserción del plásmido y lacZ Δ M15 que permite la detección del blanco azul.

DHFR: Dihidrofolato reductasa timidilato sintetasa.

dNTP: Nucleósido trifosfato.

FLAG: Etiqueta peptídica con la secuencia aminoacídica DYKDDDDK.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GFP (*Green Fluorescent Protein*): Proteína fluorescente utilizada para marcación.

H₂O: Agua.

IMC: Complejo Interno de Membrana.

kDa: Kilodalton.

KO (*Knock-Out*): Cepa mutante por delección genómica.

kb: Kilobase.

M: Molar.

Nucleofector: Conjunto de soluciones para la electroporación de parásitos.

Nycodenz: Medio de gradiente de densidad yodado.

UTR (*Untranslated Region*): Región no traducida.

ORF (*Open Reading Frame*): Marco abierto de lectura.

pb: Par de bases.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa.

PM: Marcador de peso molecular.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

RPMI: Medio de cultivo RPMI-1640, utilizado para el cultivo de células sanguíneas.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

WB: Western Blot.

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Glosario.....	4
Índice.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. Enfermedad de la malaria.....	7
1.2. Ciclo de vida de Plasmodium spp.....	8
1.3 Motilidad en Plasmodium spp.....	10
1.3.1 Estadios móviles de Plasmodium spp.....	10
1.3.2 Complejo interno de membranas y motor molecular.....	12
1.3.3 Desarrollo del ooquinetos.....	12
1.4 Pequeñas chaperonas de choque térmico.....	13
1.5 Identificación de la PbHSP27.....	14
2. Hipótesis.....	20
3. Objetivos.....	20
4. Materiales y Métodos.....	21
4.1 Ensayo de Western Blot.....	21
4.2 Técnicas de Biología Molecular.....	22
4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
4.2.2 Ligación de insertos de ADN.....	22
4.2.3 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	22
4.2.4 Digestión de ADN utilizando enzimas de restricción.....	22
4.2.5 Purificación de ADN mediante Kit de Purificación (QIAGEN).....	23
4.2.6 Generación de E. coli químicamente competentes.....	23
4.2.7 Transformación de E. coli químicamente competentes.....	23
4.2.8 Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.....	23
4.2.9 Generación de líneas transgénicas de P. berghei carentes de la proteína PbHSP27.....	24
4.2.10 Generación de líneas transgénicas de P. berghei que sobreexpresan la proteína HSP27 fusionada a la etiqueta FLAG.....	25
4.2.11 Generación de líneas transgénicas de P. berghei que expresen la proteína PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG de forma condicional.....	26
4.3 Transfección de parásitos Plasmodium berghei.....	27
4.3.1 Cultivo y purificación de esquizontes de P. berghei.....	27
4.3.2 Transfección de esquizontes mediante electroporación.....	27
4.3.3 Selección de los parásitos recombinantes.....	28
4.3.4 Criopreservación de parásitos en estadio sanguíneo.....	28
4.3.5 Determinación de la parasitemia mediante tinción por GIEMSA.....	28
4.3.6 Purificación de parásitos de P. berghei en el estadio sanguíneo.....	29
4.3.7 Preparación de ADN genómico a partir de parásitos P. berghei en estadio sanguíneo.....	29
4.3.8 Clonado de parásitos.....	29

4.4 Generación de ooquistos de <i>P. berghei</i>	30
4.4.1 Inducción de reticulocitosis e infección con la cepa de <i>P. berghei</i>	30
4.4.2 Ensayo de exflagelación de gametocitos masculinos.....	30
4.4.3 Cultivo de ooquistos de <i>P. berghei</i>	30
4.4.4 Purificación de ooquistos de <i>P. berghei</i> por NH ₄ Cl.....	31
5. Resultados.....	31
5.1 Evaluación de la expresión de PbHSP27 mediante Western Blot.....	31
5.1.1 Análisis de especificidad de sueros utilizando estadios sanguíneos de <i>P. berghei</i>	31
5.1.2 Análisis de la expresión de PbHSP27 en ooquistos de <i>P. berghei</i>	33
5.2 Análisis fenotípico de ooquistos de <i>P. berghei</i> que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry.....	34
5.2.1 Optimización del protocolo de cultivo de ooquistos in vitro.....	34
5.2.2 Obtención de imágenes por microscopía de epifluorescencia de ooquistos.....	35
5.2.2 Evaluación de la exflagelación de gametocitos en ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry.....	37
5.2.3 Estudio del desarrollo de ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry.....	37
5.3 Estudio de la función de PbHSP27 en estadios sanguíneos de <i>P. berghei</i>	39
5.3.1 Síntesis del vector B3D+ hsp27 KO FLAG para la generación de parásitos transgénicos.	39
5.3.2 Generación y genotipificación de parásitos sanguíneos de <i>P. berghei</i> carentes de la proteína PbHSP27.....	42
5.4 Determinación de proteínas que interactúan con PbHSP27 en ooquistos.....	47
5.4.1 Generación del vector B3D+ HSP27 FLAG para la producción de parásitos transgénicos.....	47
5.4.2 Generación de parásitos sanguíneos de <i>P. berghei</i> que sobreexpresan la proteína PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG.....	49
5.5 Estudio de la función de PbHSP27 en ooquistos mediante la expresión condicional del gen Pbhsp27.....	50
5.5.1 Síntesis del vector B3D+ ama HSP27 FLAG para la generación de parásitos transgénicos.....	50
6. Discusión.....	57
6.1 La proteína PbHSP27 se expresa tanto en estadios de esquizontes como ooquistos de <i>P. berghei</i>	57
6.2 La sobreexpresión de PbHSP27 fusionada a la proteína mCherry impide el desarrollo normal de ooquistos.....	58
6.3 La proteína PbHSP27 es esencial para el desarrollo de esquizontes.....	60
7. Conclusiones.....	62
8. Referencias.....	63

1. Introducción

1.1. Enfermedad de la malaria

La malaria es una enfermedad infecciosa, causada por parásitos de la especie *Plasmodium spp.*, los cuales se transmiten mediante un insecto vector, el cual comprende a las hembras de mosquitos de la especie *Anopheles*. La infección por este parásito comienza con un cuadro febril, y continua con una serie de síntomas como dolores de cabeza, náuseas y dolores musculares. Los síntomas más graves de la enfermedad son la anemia, causada por una disminución del nivel de glóbulos rojos, y la ictericia, dada por fallas en el hígado¹. Actualmente se encuentran identificadas 5 especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*) que pueden infectar humanos, siendo la infección por *P. falciparum* aquella con mayor tasa de mortalidad, debido a que poseen proteínas que insertan en los glóbulos rojos y permiten que los mismos se adhieran a distintos tejidos endoteliales, incluyendo tejido pulmonar, placentario y cerebral². La adherencia de glóbulos rojos a la vasculatura cerebral causa mayor severidad en la enfermedad, llevando a un estado de coma que puede derivar en la muerte³. Por otra parte los parásitos de la especie *P. vivax* no causan malaria severa pero pueden mantenerse en estado quiescente dentro de las células hepáticas, y reactivarse en un lapso de 3 semanas a 12 meses⁴, a menos que sean erradicadas con un tratamiento específico. Por otro lado, *Plasmodium berghei*, es una de las especies responsables de causar malaria en ratones, y por lo tanto es la especie utilizada como modelo de estudio *in vivo* de esta enfermedad⁵ y es la que usamos en nuestro laboratorio.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reporte de 2023, se identificaron 249 millones de casos de malaria en todo el mundo en 2022, lo que supuso un aumento de 5 millones de casos en comparación con las cifras de 2021⁶. Esta tendencia creciente en los casos se comenzó a observar a partir del año 2015, y esto muy probablemente se relacione con el efecto sobre las temperaturas, la lluvia y la humedad que causa el cambio climático, ya que la población de mosquitos se ve favorecida en ambientes cálidos y húmedos. Se predice que estas condiciones climáticas se podrían establecer en nuevas regiones geográficas, lo que permitiría una expansión del mosquito a nuevas áreas donde esta enfermedad se encuentra erradicada. En términos de muertes producidas por la enfermedad, se observa una cifra estable de 14 muertes cada 100.000 personas. Particularmente en el caso de niños menores de 5 años que adquirieron esta enfermedad, el 76% fallecieron a causa de la misma⁶. Con la pandemia de COVID-19, muchas de las tareas de prevención, diagnóstico y tratamiento se descontinuaron, lo que generó un aumento en el impacto de esta enfermedad⁷.

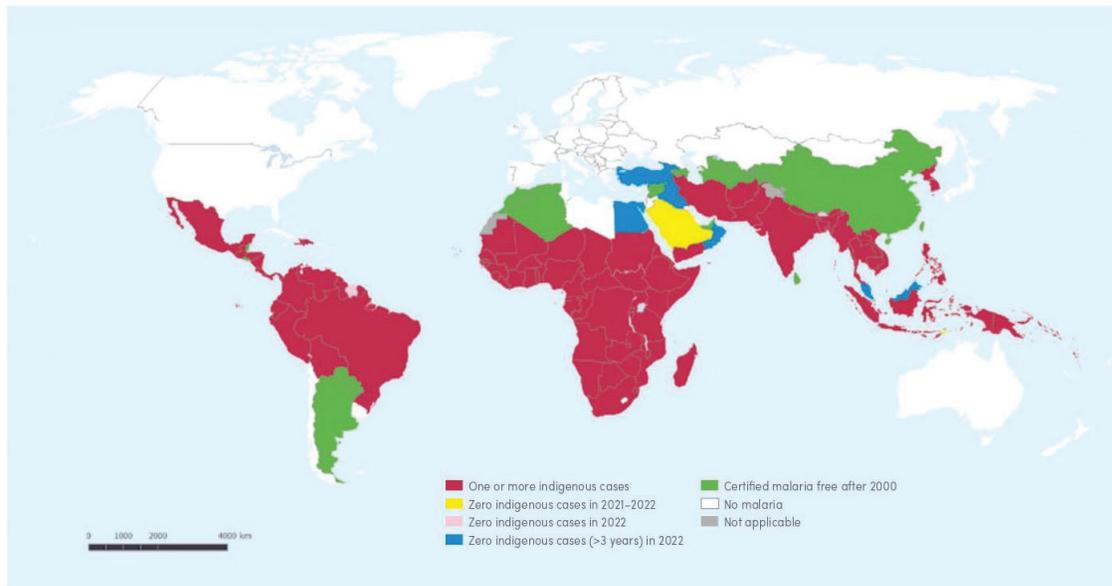


Figura 1: Distribución mundial de casos de malaria en humanos. Extraído del World Malaria Report (OMS, 2023). La enfermedad se distribuye principalmente en regiones tropicales, donde se observa en rojo países que actualmente presentan casos de pacientes que contraen la enfermedad localmente. Argentina fue declarada libre de malaria en 2019, por lo que se representa de color verde en el mapa.

Argentina fue declarada libre de malaria en 2019, lo que significa que no se registran casos autóctonos, aunque aún se reportan casos de malaria de turistas que han visitado o provienen de países con circulación activa del parásito. Además, sigue en circulación el insecto vector, e incluso en los últimos años se detectaron especies de *Anopheles* transmisoras de malaria que no habían sido detectadas previamente⁸, lo que supone una amenaza constante para la generación de nuevos casos autóctonos. Más aún, hay un surgimiento de cepas de *Plasmodium spp.* resistentes a fármacos lo que sumado a la aparición de vectores resistentes a insecticidas, son factores que colaboran para la reintroducción de la malaria en áreas ya erradicadas⁹.

1.2. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

La infección mediada por *Plasmodium spp.* comienza cuando el mosquito infectado pica al hospedador vertebrado, introduciendo esporozoítos, la forma infectiva del parásito, los cuales atraviesan la barrera epitelial hasta llegar a la circulación sanguínea. Los esporozoítos viajan por el torrente sanguíneo hacia el hígado, atraviesan las células de Kupffer e invaden los hepatocitos¹⁰, formando una vacuola parasitófora dentro de la cual comienzan a replicarse y diferenciarse, formando merozoítos, que luego son liberados a la circulación, para comenzar a invadir a los glóbulos rojos. Dentro del glóbulo rojo, éstos comienzan un ciclo altamente replicativo denominado “Ciclo Asexual o Sanguíneo”, donde los merozoítos se diferencian primero a un estadio denominado anillo, luego a trofozoíto, y por último a un estadio replicativo denominado esquizonte, dentro del cual se clasifican como inmaduros cuando el contenido de merozoítos por glóbulo rojo es de 2 a 8, mientras que el esquizonte maduro contiene aproximadamente entre 8 y 64 merozoítos. Una vez llegado a este estadio ocurre la ruptura del esquizonte (y por consiguiente del glóbulo rojo que los contiene) y se liberan múltiples merozoítos, que reinician el ciclo asexual¹¹. Este ciclo también ocurre dentro de una vacuola

parasitofora dentro del glóbulo rojo, degradando hemoglobina para obtener aminoácidos que promueven el desarrollo del parásito y produciendo hemozoína, un cristal que se acumula en el interior del parásito¹². Los glóbulos rojos presentan un ambiente adecuado para los estadios sanguíneos de *Plasmodium spp.* ya que al no expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad le permite al parásito evadir el sistema inmunológico durante la infección¹³. Durante el transcurso del ciclo asexual, el aumento de la ruptura de los glóbulos rojos puede llevar al desarrollo de anemia hemolítica en el hospedador¹⁴ y además, la liberación de componentes del parásito dado por este evento de ruptura produce una estimulación de la respuesta inmune innata del hospedador, lo que sumado a la liberación de hemozoína induce el desarrollo de los primeros síntomas como la fiebre.

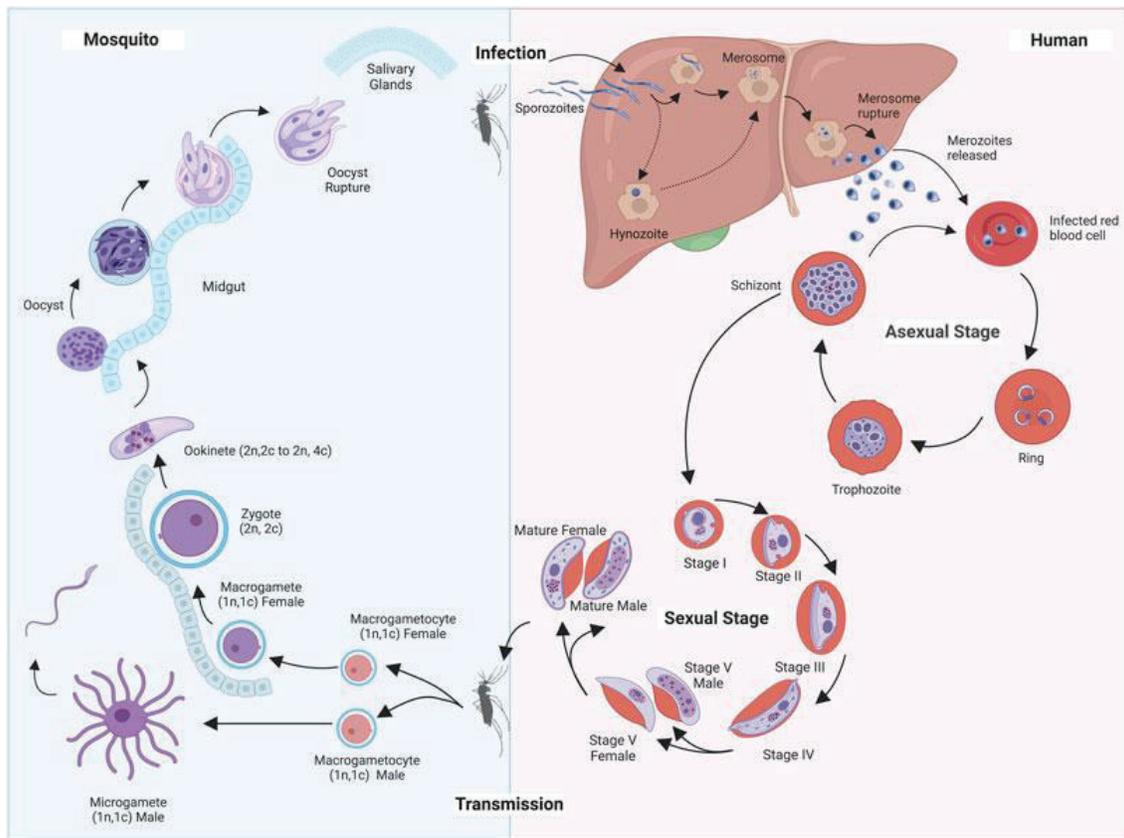


Figura 2: Ciclo de vida de *Plasmodium spp.* Extraído de Chahine, Z. et al. (2022)¹⁵. En la derecha se detallan los estadios del parásito que se desarrollan dentro del hospedador vertebrado, mientras que a la izquierda se observan los estadios que se desarrollan dentro de la hembra de *Anopheles spp.*

Durante cada ciclo sanguíneo, una pequeña porción de parásitos se diferencian en las formas sexuales, denominadas gametocitos¹⁶. Estas formas comienzan un proceso de maduración que comprende múltiples estadios (I-IV) hasta alcanzar el estadio final (V) (Fig. 2). Si el hospedador es picado nuevamente por otra hembra del mosquito *Anopheles spp.*, ésta ingiere los gametocitos maduros presentes en la sangre. Al ingresar al intestino del insecto, se producen cambios en el ambiente como aumento de pH, presencia de ácido xanturénico (un intermediario metabólico presente en el mosquito¹⁷) y disminución de temperatura (la temperatura basal del mosquito es aproximadamente 20°C mientras que la del hospedador es de 37°C). Estos cambios

inducen un proceso dinámico por el cual los microgametos masculinos en desarrollo emergen como flagelos móviles, el mismo se denomina exflagelación y se produce a partir de los 15 minutos posteriores a la activación^{16,18}. A continuación, los microgametos móviles se fusionan con el macrogameto femenino no móvil, dando lugar a la fertilización que lleva a la formación del cigoto, que luego a través de estadios de maduración intermedios (Fig. 3) se desarrolla al ooquinetto, una forma móvil que migra al epitelio del intestino medio del mosquito¹⁶.

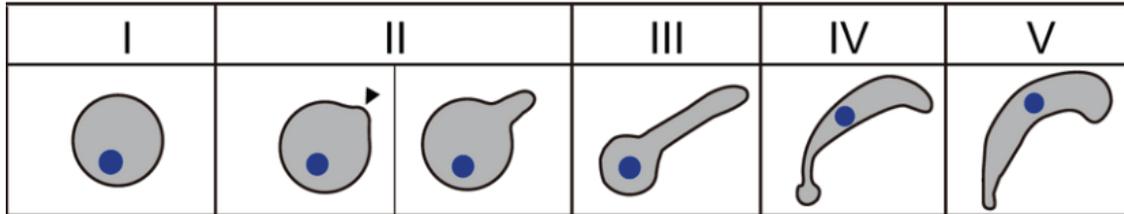


Figura 3: Estadios de desarrollo y maduración del ooquinetto en *Plasmodium spp.* Adaptado de Wang et al (2022)¹⁹. Se muestra la morfología de todos los estadios de formación del ooquinetto, desde el estadio de cigoto (I) hasta el estadio de ooquinetto maduro (IV-V). Los estadios inmaduros (II-III) se caracterizan por presentar una forma mayormente redondeada.

Gracias a su motilidad celular, el ooquinetto atraviesa la lámina basal del intestino del mosquito y se diferencia en la forma de oocisto, dentro del cual nuevamente ocurren múltiples eventos de división celular para formar cientos de esporozoítos. Estos últimos son liberados al romper el oocisto, pasan a la hemolinfa y se dirigen a las glándulas salivales del mosquito, dentro de las cuales se convierten en esporozoítos maduros capaces de reiniciar el ciclo de infección²⁰.

1.3 Motilidad en *Plasmodium spp.*

1.3.1 Estadios móviles de *Plasmodium spp.*

Los tres estadios móviles en *Plasmodium spp.* son merozoítos, esporozoítos y ooquinetos. Los ooquinetos permiten la colonización del intestino del mosquito; los esporozoítos se diseminan a partir del sitio de inoculación del mosquito atravesando diferentes tejidos hasta invadir los hepatocitos y colonizar el hígado del hospedador; y por último, los merozoítos que egresan del hígado e invaden los glóbulos rojos. Estos estadios presentan una organización y estructura celular alargada y polarizada altamente similar entre sí, debido al arreglo de microtúbulos subpeliculares (MT) que surgen de un anillo apical polarizado (APR) (Fig 4)²¹. Otras estructuras presentes en la zona apical de estos zoítos son las roptrias, organelas secretoras que liberan proteínas que participan en el proceso de invasión, por lo que no se encuentran en ooquinetos (ya que no es un estadio invasivo) y micronemas, las cuales también son organelas secretoras encargadas de liberar proteínas, principalmente adhesinas, que participan tanto en procesos de invasión como en procesos de migración^{21,22} (Fig. 4). El movimiento de los zoítos de *Plasmodium spp.* se denomina *gliding* o deslizamiento y depende de la presencia de un motor molecular basado en moléculas de actina y miosina que participa tanto en la invasión como en la migración del parásito^{21,23-26}.

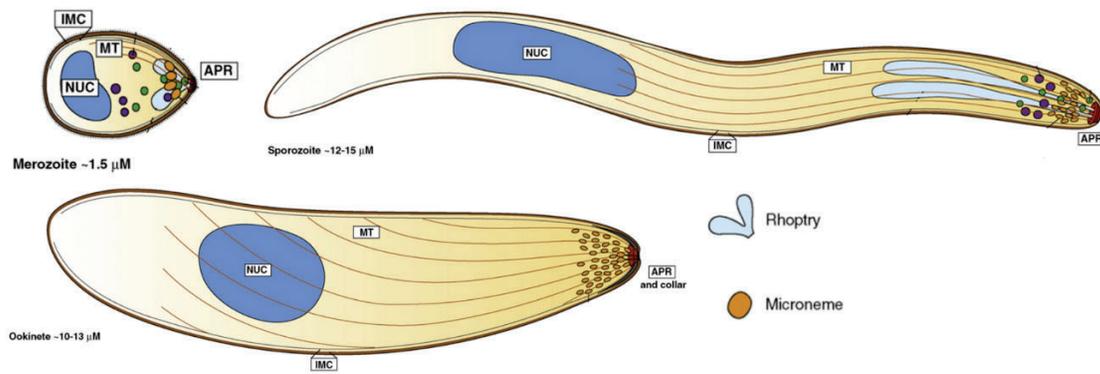


Figura 4: Morfología celular de los estadios móviles de *Plasmodium spp.* Adaptado de Baum et al. (2008)²¹. Los tres estadios poseen elementos del citoesqueleto en común, como el anillo polar apical (APR), el IMC y el arreglo de microtúbulos que permite la polarización celular. Los ooquinetos no poseen rhoptrios ya que son organelas específicas del proceso de invasión celular, proceso que el ooquineto no realiza.

Debido a la similitud estructural entre los zoítos, se hipotetiza que la forma que adquieren los parásitos gracias a la polarización celular y el arreglo de microtúbulos subpelículaes está relacionada con la capacidad de moverse, ya que se vio en múltiples trabajos que mutaciones que derivan en la alteración de la forma celular resultan en la inhibición o alteración de diversos parámetros de motilidad²⁷.

En el caso particular de los ooquinetos, a partir del análisis del movimiento tridimensional de los mismos, se demostró que se mueven conservando una trayectoria helicoidal hacia la izquierda²⁸. Sin embargo, parásitos mutantes en una alveolina, proteína estructural del complejo interno de membranas (IMC, Fig. 5), muestran formas anormales y realizan trayectorias lineales²⁹. Esta falta de movimiento quiral del parásito knockout implica fuertemente que la forma de la célula, determinada por la arquitectura del citoesqueleto, es el principal impulsor del movimiento quiral del ooquineto²⁸. Además, los ooquinetos, a diferencia de los esporozoítos, muestran diferentes modos de movilidad en función de la elasticidad del sustrato. La observación de que los ooquinetos se mueven de forma predominantemente circular en los geles más blandos y de forma predominantemente lineal en las superficies más duras sugiere que el parásito detecta la rigidez de su entorno y adapta su comportamiento móvil en consecuencia³⁰.

En el caso del esporozoíto, su patrón de movimiento es principalmente circular o helicoidal, y no requiere que la estructura celular se deforme³¹. La motilidad es necesaria en múltiples eventos críticos en la vida del esporozoíto. Después de alcanzar las glándulas salivares, permanecen inmóviles³². Una vez que el mosquito pica al hospedador los esporozoítos entran en contacto con la piel, donde nuevamente activan el mecanismo de *gliding* con una velocidad de movimiento de 1 a 2 $\mu\text{m}/\text{seg}$, lo que es casi 10 veces mayor que la velocidad de los neutrófilos^{10,33}. Se ha visto que la motilidad eficiente del esporozoíto es crítica para la invasión de la piel, y que sin ella no pueden atravesar el epitelio e infectar al hospedador^{34,35}. Al llegar a los vasos sanguíneos, la velocidad de movimiento se reduce drásticamente y viajan de forma pasiva hasta alcanzar los hepatocitos, donde utilizan el glideosoma para invadir a las células³⁶.

Por último, los merozoitos utilizan el glideosoma principalmente en la invasión de glóbulos rojos, donde luego de un evento de reconocimiento y orientación, los merozoitos insertan moléculas en las membranas de los glóbulos rojos a través de las roptrias, para permitir la deformación de los glóbulos rojos y la entrada del parásito a la célula hospedadora^{11,22}.

1.3.2 Complejo interno de membranas y motor molecular.

Los parásitos apicomplejos se caracterizan por la presencia de una triple membrana, fácilmente distinguible al microscopio electrónico. Esta tricapa característica de los protistas del grupo Alveolata está compuesta por la membrana plasmática y un complejo interno de membrana (IMC) que corre paralelamente a esta membrana²². El IMC está compuesto por vesículas aplanadas (o alvéolos) derivados del aparato de Golgi, sobre las que se apoyan los microtúbulos subpelliculares, conectados a través de proteínas estructurales denominadas alveolinas que forman una red (Fig. 5)^{22,37,38}.

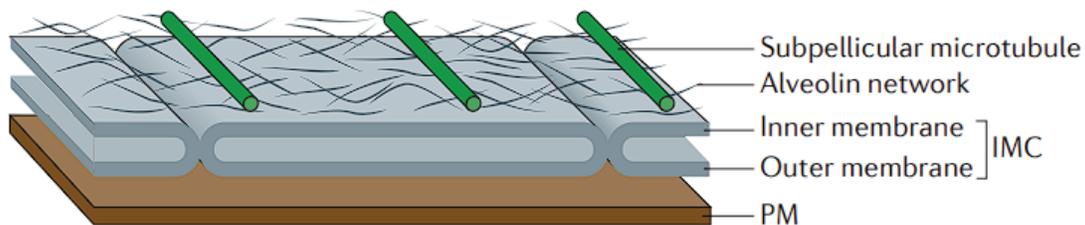


Figura 5: Estructura del citoesqueleto de *Plasmodium* spp. Adaptado de Frénel et al. (2017)³⁰. Se representan los tres componentes principales: la membrana plasmática (PM), el complejo interno de membrana (IMC) formado por vesículas aplanadas que dan lugar a la membrana interna y externa, y por último una red de microtúbulos subpelliculares junto con una red de moléculas alveolinas.

El motor molecular que lleva a cabo la motilidad de *gliding* en los parásitos *Apicomplexa* se denomina glideosoma, el cual está compuesto principalmente por moléculas de actina y miosina. La miosina A (MyoA) es una molécula de miosina tipo XIV que es exclusiva del filo *Apicomplexa*^{39,40} y uno de los componentes claves del glideosoma. Fue caracterizada principalmente en *T. gondii* y *P. falciparum*, y se encuentra anclada al complejo interno de membrana (IMC), donde forma un complejo con una cadena liviana de miosina MLC en *Toxoplasma gondii* (MTIP en *Plasmodium* spp.) así como también con las proteínas GAP40, GAP45 y GAP50, las cuales pertenecen a la familia de proteínas asociadas al glideosoma (GAP)⁴¹⁻⁴³. La proteína GAP45 se encarga de anclar el glideosoma a la membrana plasmática, mientras que GAP40 y GAP50 anclan a MyoA al IMC (Fig. 5)⁴⁴. Las proteínas GAPM, GAP40 y GAP50 se encargan de anclar el glideosoma al citoesqueleto del parásito, principalmente al IMC. MTIP y MyoA son las proteínas encargadas de realizar la fuerza necesaria para permitir el movimiento, y se encuentran ancladas al IMC mediante GAP50 y a la membrana plasmática del parásito mediante GAP45²².

1.3.3 Desarrollo del ooquinetto

Durante la maduración de cigoto a ooquinetto, ocurre una serie de cambios estructurales que dan lugar a la elongación celular y modificación de la membrana plasmática que permite que el ooquinetto alcance la forma elongada y polarizada, característica del estadio maduro (Fig. 3), y que le permitirá al parásito invadir las células del epitelio intestinal para continuar con el

desarrollo del parásito⁴⁵. El desarrollo y establecimiento de la polaridad celular en diversos eucariotas puede estar regulado por factores internos tales como el tráfico de proteínas, los microtúbulos y la dinámica de actina⁴⁶. Se sabe que en los ooquistos la morfogénesis está mediada por las estructuras del citoesqueleto de la película, incluyendo el IMC y los microtúbulos subcelulares subyacentes (Fig. 4). Para poder alcanzar la forma polarizada del ooquisto se deben nuclear los microtúbulos subpeliculares en la zona apical, los cuales poseen un arreglo simétrico y una disposición radial, y para ello, es imprescindible que durante el desarrollo del ooquisto se ensamble correctamente el anillo polar apical, ya que será el centro de nucleación de los microtúbulos subpeliculares⁴⁷. El arreglo de microtúbulos entonces es responsable de la elongación celular necesaria para llevar a cabo el desarrollo del ooquisto, pero aún no se conocen todos los agentes que participan en este proceso²⁷.

Actualmente solo hay pocas proteínas que se han identificado en el proceso de desarrollo y elongación de ooquistos. ISP1/ISP3 son proteínas residentes del complejo interno de membrana y exclusivas del filo *Apicomplexa*⁴⁸. Estas proteínas se expresan en la zona apical del cigoto, y al palmitoilarse comienzan a traccionar sobre los microtúbulos subpeliculares, estabilizando el centro de nucleación de microtúbulos y llevando a cabo la elongación celular y desarrollo del ooquisto¹⁹. Por otro lado, Rab11a, una proteína perteneciente a la familia de las pequeñas Ras GTPasas, está involucrada en la regulación del transporte de material de membrana mediado por vesículas, por lo que aporta el material necesario para la elongación de la membrana que permite la maduración del ooquisto⁴⁹. También se ha identificado la importancia del mensajero cGMP a través de la fosfodiesterasa degradante de nucleótidos cíclicos δ al momento de mantener la estructura celular para poder iniciar el movimiento de *gliding* en ooquistos⁵⁰.

1.4 Pequeñas chaperonas de choque térmico

Las pequeñas chaperonas de choque térmico o sHSPs son proteínas ubicuas de bajo peso molecular (15 a 30 kDa) que están presentes tanto en organismos procariotas como en eucariotas, son independientes de ATP y se encuentran altamente conservadas⁵¹. La estructura general de estas proteínas consiste en un dominio C-terminal denominado dominio alfa-cristalino, el cual posee una conservación a nivel aminoacídico y tiene una longitud aproximada de 90 aminoácidos, y luego dos dominios, la región amino-terminal variable (NTR) y la región carboxi-terminal flexible (CTR) que tienen importancia en el ensamblaje de las subunidades y/o su estabilidad⁵², debido a que estas proteínas, en algunos casos, cumplen sus funciones cuando se encuentran formando oligómeros de diversos tamaños^{52,53}. Estas chaperonas se encuentran involucradas en múltiples procesos celulares, siendo la más conocida la función de evitar agregación proteica frente a una situación de estrés térmico, pero también se han encontrado sHSPs relacionadas a procesos de interacción y regulación de los elementos del citoesqueleto. Se han descrito sHSPs que interaccionan con la actina, como por ejemplo la HSP27 de humanos, que se encuentra presente en células del músculo liso y al fosforilarse y dimerizar permite la estabilización de F-actina⁵⁴. Estudios sobre la HSP20 en mamíferos proponen también funciones de regulación del citoesqueleto, como la protección de los filamentos de actina, inhibición de la interacción entre miosina y F-actina y competición con la fosforilación de cofilinas⁵⁵⁻⁵⁷.

En los últimos años se han comenzado a descubrir y caracterizar el rol de las sHSPs en parásitos del filo *Apicomplexa*^{34,58-61}. En Montagna et al. (2012)³⁴ se identificó a HSP20 en *Plasmodium berghei*, la cual se localiza de forma polarizada en los esporozoítos maduros y está involucrada en los procesos de motilidad, ya que esporozoítos carentes de esta proteína presentaron una reducción en la velocidad así como una modificación en el patrón de adhesión, lo que resultó en una menor velocidad de *gliding* y por consiguiente, una disminución en la infección. Debido a que la velocidad de polimerización/despolimerización de actina está directamente relacionada con la velocidad de *gliding*, se postuló que HSP20 podría regular la tracción necesaria durante la motilidad del esporozoíto, regulando la polimerización de los filamentos de actina, o la actividad de las proteínas de unión a actina (Fig. 6).

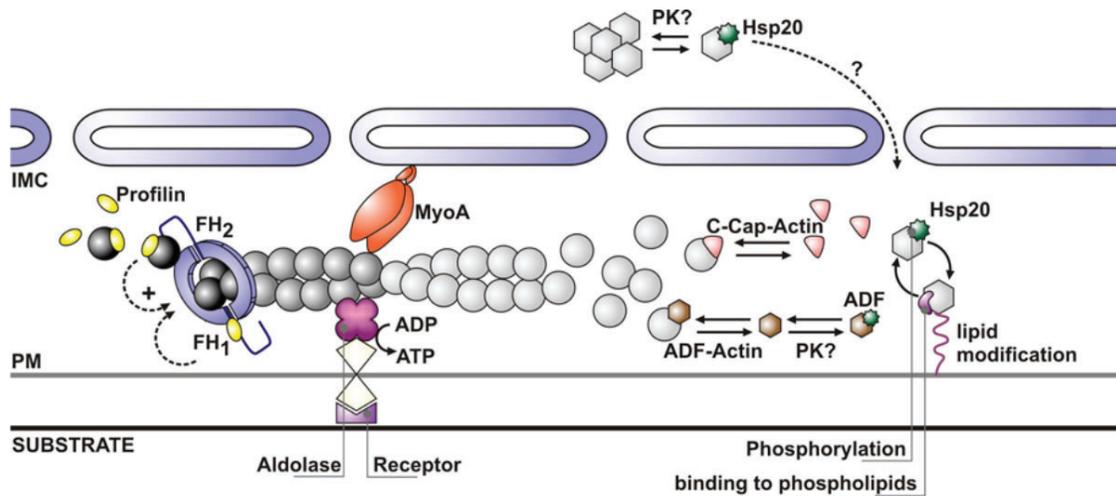


Figura 6: Modelo propuesto para la dinámica de polimerización y despolimerización de actina en *Plasmodium* spp. Adaptado de Montagna et al. (2012)⁵⁸. La motilidad dependiente del sustrato se denomina *gliding* o deslizamiento, llevado a cabo por un motor molecular compuesto por moléculas de actina y miosinas, sujetas al IMC por un complejo de proteínas de anclaje. Todo el conjunto molecular se denomina glideosoma, y está formado por una molécula de miosina tipo XIV, miosina A (MyoA) que camina sobre los filamentos de actina gracias a la hidrólisis de ATP, que genera el cambio conformacional en MyoA que permite la tracción. Los filamentos de actina se encuentran unidos de forma indirecta a los receptores transmembrana de la familia TRAP (blanco). Las proteínas secuestradoras de G-actina, ADF1 (marrón), profilina (amarillo) y C-CAP (rosa) regulan la extensión de los filamentos de actina. Forminas (FH1 y FH2) pueden participar de la polimerización de actina en las extremidades apicales reclutando complejos de G-actina (círculos)/profilina. Algunas modificaciones post-traduccionales como la fosforilación podrían regular a proteínas de unión a actina. Resultados recientes indican que la HSP20 podría modular la velocidad y direccionalidad de los esporozoítos mediante la interacción directa con el complejo de actina-miosina o de forma indirecta, mediante la competencia con el factor ADF.

1.5 Identificación de la PbHSP27

Previamente, en el laboratorio se caracterizó una nueva sHSP en *Plasmodium berghei*, HSP27, cuyo peso molecular es de aproximadamente 27 kDa. Utilizando herramientas de bioinformática como NetPhos 3.1 y GPS-PAIL 2.0, se predijeron sitios de fosforilación y acetilación en la secuencia aminoacídica de HSP27 (Fig. 7A).

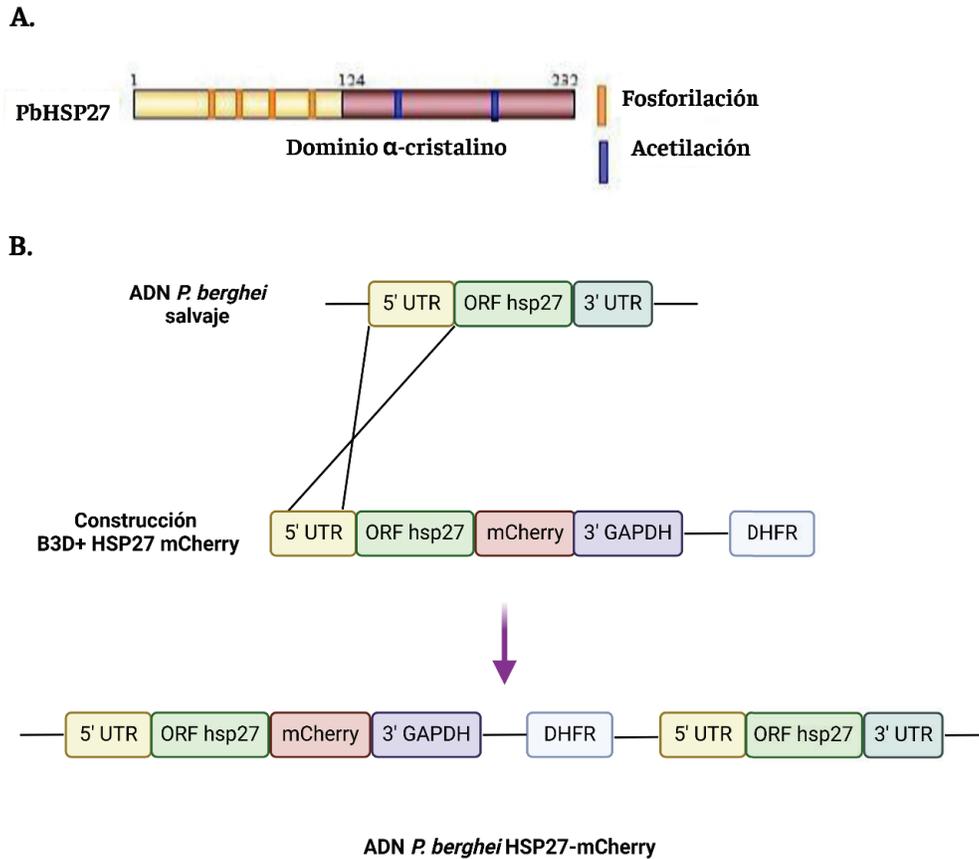


Figura 7: Análisis de la proteína PbHSP27. A. Esquema de la proteína PbHSP27 con las modificaciones postraduccionales predichas B. Estrategia de inserción para la generación de parásitos con sobreexpresión de HSP27 fusionada a mCherry. Los experimentos de transfección se realizan utilizando los estadios sanguíneos del parásito, que son haploides.

Para estudiar la expresión de HSP27 durante el ciclo de vida de *P. berghei*, se generó una línea de parásitos transgénicos los cuales expresaban una copia adicional de PbHSP27, la cual se encontraba fusionada a la proteína fluorescente mCherry (Fig. 7B). Al estudiar la expresión de esta proteína durante el desarrollo de *P. berghei* en la sangre de ratón se encontró que esta proteína se expresaba exclusivamente en los esquizontes maduros pero no en los estadios de anillo, trofozoítos ni en los esquizontes inmaduros (Fig. 8).

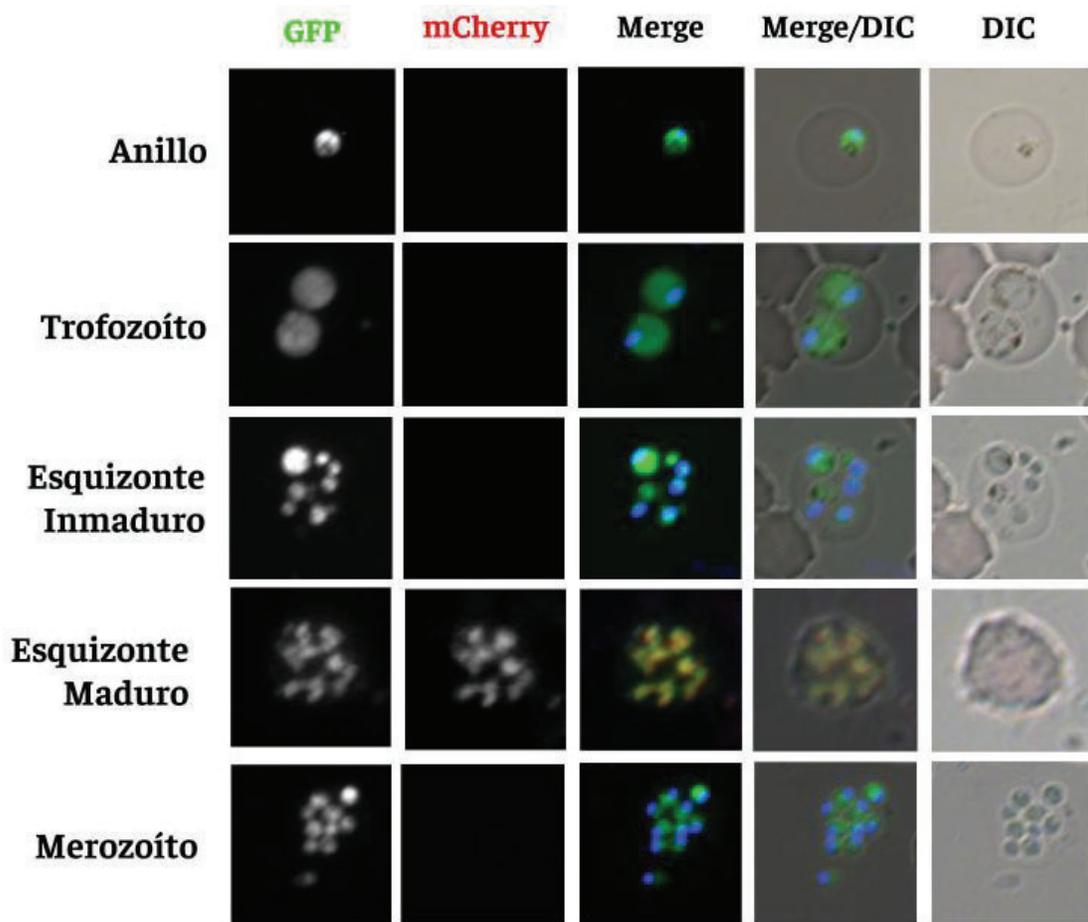


Figura 8: Expresión de PbHSP27 en el ciclo asexual de *P. berghei*. Imágenes tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia. La expresión de PbHSP27 se determinó mediante la señal obtenida en el canal correspondiente a la emisión de la proteína mCherry (rojo). La cepa también expresa la proteína GFP en el citosol (verde). Los núcleos fueron detectados utilizando Hoechst 33342 (azul). Durante el ciclo asexual o sanguíneo, PbHSP27 se expresa únicamente en esquizontes maduros. Los parásitos se obtuvieron *in vivo*, a partir de la sangre de un ratón infectado que luego de ser extraída fue purificada para eliminar células del sistema inmune y glóbulos rojos no infectados.

Cuando se realizaron cultivos *in vitro* que imitan las condiciones de desarrollo del parásito dentro del mosquito, se vió que la PbHSP27 no está presente en gametocitos femeninos ni masculinos, pero vuelve a expresarse en el estadio de cigoto hasta el estadio de ooquistos maduros (Fig. 9 y 10).

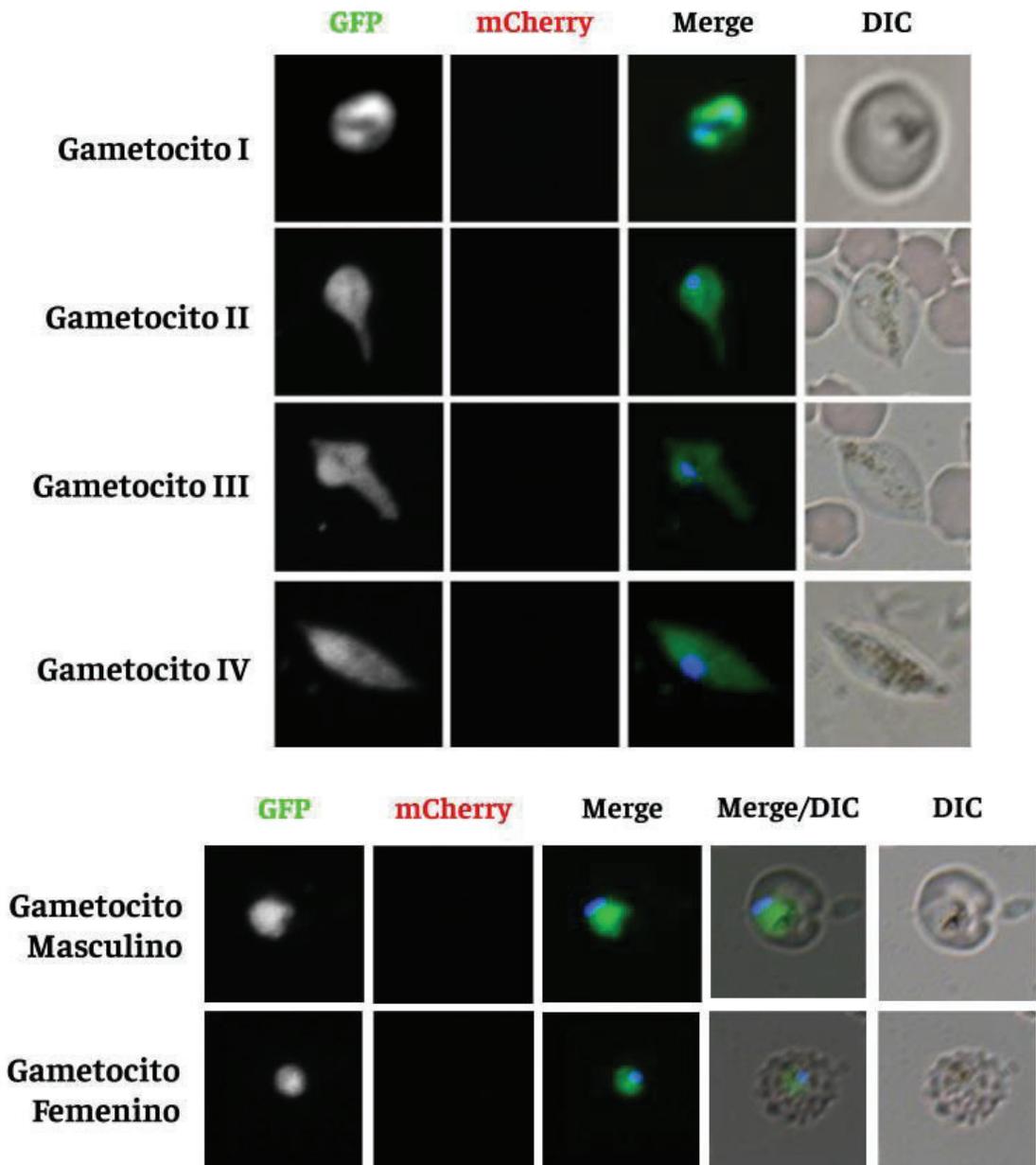


Figura 9: Expresión de PbHSP27 en gametocitos de *P. berghei*. Imágenes tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia. La expresión de PbHSP27 se determinó mediante la señal obtenida en el canal correspondiente a la emisión de la proteína mCherry (rojo). La cepa también expresa la proteína GFP en el citosol (verde). Los núcleos fueron detectados utilizando Hoechst 33342 (azul). PbHSP27 no se expresa durante el desarrollo de gametocitos, así como tampoco se expresa en gametocitos maduros, tanto masculinos como femeninos. Los gametocitos inmaduros fueron obtenidos *in vivo*, a partir de la sangre de un ratón al cual se le indujo previamente reticulocitosis. Los gametocitos maduros fueron obtenidos *in vitro*, a partir de la sangre de un ratón infectado, la cual se incubó en las condiciones necesarias para que ocurra la activación y maduración de gametas.

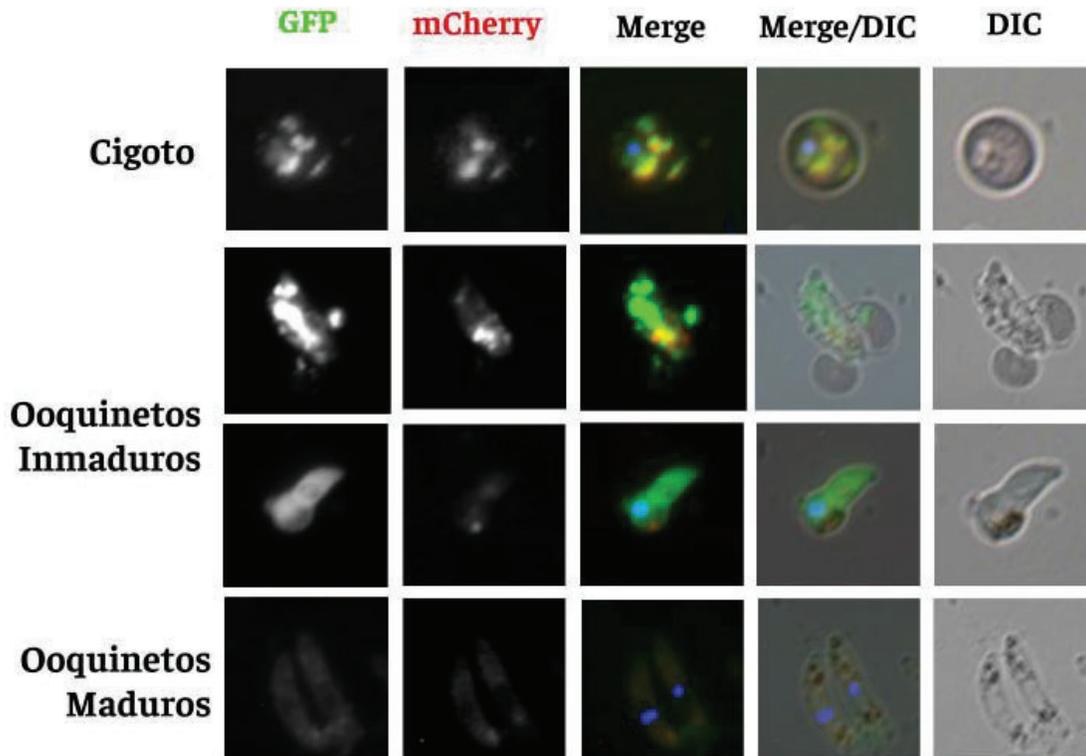


Figura 10: Expresión de PbHSP27 en cigoto y ooquinetos de *P. berghei*. Imágenes tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia. La expresión de PbHSP27 se determinó mediante la señal obtenida en el canal correspondiente a la emisión de la proteína mCherry (rojo). La cepa también expresa la proteína GFP en el citosol (verde). Los núcleos fueron detectados utilizando Hoechst 33342 (azul). PbHSP27 se expresa tanto en cigoto como en ooquinetos. Estos estadios se obtuvieron *in vitro*, donde se incubó la sangre del ratón infectado en condiciones que imitan el interior del mosquito, y se extrajo una muestra a distintos intervalos de tiempo de incubación y purificando la muestra para facilitar la detección de parásitos.

Además, para facilitar el estudio de esta proteína se generaron sueros anti-PbHSP27 mediante la inmunización de ratones utilizando PbHSP27 expresada en *Escherichia coli* y luego purificada. Los cuatro sueros anti-HSP27 fueron generados en el laboratorio del Dr. Carlos Buscaglia.

Los sueros fueron evaluados utilizando muestras de ooquinetos salvajes así como ooquinetos que expresaban PbHSP27 fusionada a mCherry (Fig. 11A) donde se determinó que los sueros 1 y 3 eran los que poseían una mayor especificidad para la detección de la proteína de interés. Por otro lado, al realizar geles de mayor porcentaje de poliacrilamida, en ooquinetos salvajes se obtuvo una doble banda a la altura de 22 y 25 kDa, lo que indicaría la existencia de al menos dos formas de PbHSP27. Tal vez una de ellas posea algunas de las modificaciones post-traduccionales predichas en la figura 7A (Fig. 11B). Por último, al estudiar la expresión en esquizontes, el resultado fue inconcluso, ya que se obtuvo una única banda de aproximadamente 58 kDa tanto en parásitos salvajes como en parásitos que sobreexpresaban PbHSP27 fusionada a mCherry, por lo que no se pudo determinar la especificidad de los sueros para estos estadios. Los experimentos descritos fueron realizados por la estudiante de Maestría Karina Caruso en el laboratorio de la Dra. Montagna en Brasil⁶².

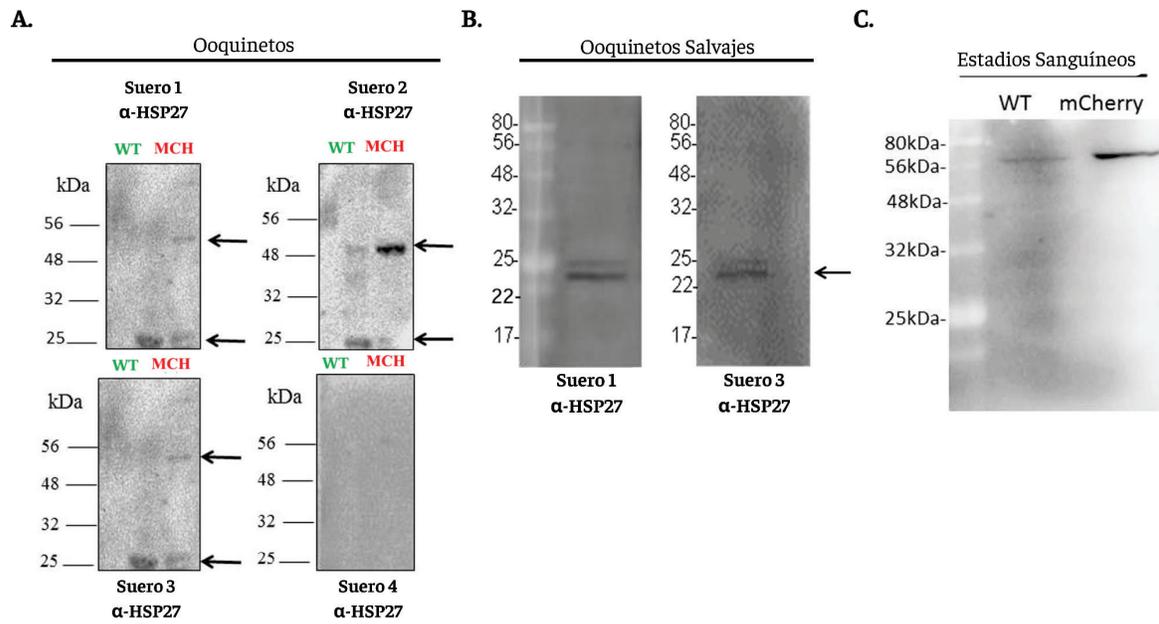


Figura 11: Expresión de HSP27 en *P. berghei*. Resultados anteriores. A. Ensayos de WB de oocinets salvajes (WT) y HSP27 mCherry (MCH) con los sueros anti-HSP27 1, 2, 3 y 4. SDS-PAGE 12%. B. Ensayos de WB de oocinets salvajes con los sueros 1 y 3. SDS-PAGE 15%. C. Ensayos de WB de esquizontes salvajes y HSP27 mCherry utilizando el suero 3 anti-HSP27. SDS-PAGE 12%.

2. Hipótesis

La pequeña chaperona de choque térmico PbHSP27, recientemente identificada en el laboratorio, participa en procesos importantes del desarrollo de *Plasmodium berghei*, una especie que infecta a roedores. Particularmente en aquellos estadios en los cuales se encuentra expresada: esquizonte maduro, cigoto y estadios intermedios hasta la formación del ooquineto maduro.

3. Objetivos

El **objetivo general** es mejorar el conocimiento de la función de las pequeñas chaperonas de choque térmico (sHSP) en los diferentes estadios de *Plasmodium*. Particularmente, nos enfocaremos en el estudio de la expresión y la función de la HSP27 en esquizontes y durante la formación de los ooquinetos a partir de cigotos.

Objetivos específicos:

- 1- Optimizar los ensayos de Western Blot para estudiar la expresión de PbHSP27 en esquizontes y ooquinetos de parásitos salvajes y parásitos que expresen la PbHSP27 fusionada a mCherry generados anteriormente.
- 2- Profundizar el análisis fenotípico de los parásitos que sobreexpresen PbHSP27 fusionada a mCherry.
- 3- Generar una población de parásitos carentes del gen *Pbhs27*.
- 4- Generar una población de parásitos que sobreexpresen PbHSP27 fusionada a una etiqueta molecular pequeña como el péptido FLAG para revalidar el fenotipo observado en el estadio de ooquinetos de los parásitos PbHSP27 mCherry.

4. Materiales y Métodos

4.1 Ensayo de Western Blot

Las proteínas se separaron por geles de SDS-PAGE y el porcentaje de poliacrilamida utilizado varió según las muestras (esquizontes u ooquistos). En los ensayos utilizando esquizontes, la concentración de parásitos sembrados fue de 20×10^6 a 50×10^6 , mientras que cuando se utilizaron ooquistos en la siembra del gel, la concentración varió entre 10^3 a 10^5 parásitos.

Para el ensayo de Western Blot (WB), se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida hacia una membrana de PVDF (Amersham) mediante el método de transferencia húmeda. Para corroborar que la transferencia se haya realizado correctamente se tiñó la membrana utilizando solución de 0,5% Ponceau 1% en ácido acético, incubando la membrana en dicha solución durante 10 minutos en agitación y posteriormente enjuagándola con agua. A continuación, se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación con una solución de leche en polvo 3% preparada en PBS 1X. Se añadió el anticuerpo primario correspondiente en cada caso y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Para la detección de la proteína PbHSP27 se utilizaron 4 sueros anti-PbHSP27 en una dilución 1:500. Para la detección de la proteína mCherry se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-mCherry 3A11 (dshb Biology) en una dilución 1:100, así como también se utilizó suero de ratón anti-mCherry generado en el laboratorio en una dilución 1:500.

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de ratón, acoplado a un fluoróforo que se excita a una longitud de onda de 790 nm (Jackson) en una dilución 1:20000, o acoplado a HRP (*horseradish peroxidase*, Jackson) en una dilución 1:5000. Las diluciones de todos los anticuerpos fueron realizadas utilizando solución de bloqueo. Los lavados de los anticuerpos se realizaron con una solución de PBS 1X y 0,05% de NP40, e incubando la membrana en la solución 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, proceso que se repitió tres veces. Para el revelado se utilizó el equipo Odyssey modelo DLx (LI-COR) o el kit Clarity ECL (Bio-Rad). Cuando fue necesario se realizó el *stripping* de las membranas, incubándolas 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación con una solución que contiene 250 mM de glicina, 0,125 % de SDS y 1 mM de Tween 20. La incubación se realizó dos veces, y luego las membranas se lavaron 4 veces con PBS 1X.

Las muestras de parásitos se prepararon mediante la adición de un volumen de buffer Laemmli 2X (Sigma) y un posterior calentamiento de la muestra durante dos minutos con agua en ebullición.

4.2 Técnicas de Biología Molecular

4.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR fue utilizada tanto para la obtención de fragmentos de interés, sea a partir de ADN plasmídico o ADN genómico, así como para la confirmación de presencia de fragmentos de interés en plásmidos y el genotipado de parásitos.

Cuando se utiliza como templado ADN plasmídico, el protocolo fue el siguiente: 1 µL de Phusion High Fidelity (PFU) producida en el instituto; 0,4 ng de ADN plasmídico; 0,4 mM de dNTPs (ThermoFisher); 0,4 mM de cada oligonucleótido; 1,2 mM de MgCl₂; 5 µL buffer 5X producido en el instituto y H₂O miliQ hasta alcanzar el volumen final de la reacción, el cual es de 25 uL.

Al utilizar ADN genómico, el protocolo que se utilizó fue el siguiente: 0,05 U de Taq DNA Polimerasa (ThermoFisher); 2 mM MgCl₂; 2,5 µL buffer Taq 10X KCl (ThermoFisher), 1 µg de ADN genómico; 0,4 mM dNTPs (ThermoFisher), 0,4 mM de cada oligonucleótido y H₂O miliQ hasta alcanzar un volumen final de 25 uL.

La PCR para ambos casos se realizó con las siguientes condiciones: 95°C 3 minutos; 34 ciclos de: 95°C 30 segundos, 52°C 45 segundos, 68°C 1 minuto; 68°C 10 minutos de extensión final.

4.2.2 Ligación de insertos de ADN

La reacción de ligación de ADN se realizó utilizando 400 U de la enzima T4 Ligasa (New England BioLabs); 1µL del buffer T4 Ligasa 10X (New England BioLabs); 3 ng de inserto, 1 ng de vector y volumen suficiente de H₂O miliQ hasta alcanzar un volumen final de 10 uL.

4.2.3 Electroforesis en Gel de Agarosa

Los productos de PCR así como el chequeo por digestión de ADN plasmídico de clones positivos durante la síntesis de vectores fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa. Los geles fueron realizados con 1% de agarosa y 0,1% de bromuro de etidio en buffer TAE 1X (Tris Base 40 mM, Ácido acético glacial 20 mM y 1 mM EDTA pH 8,0). A las alícuotas de ADN a analizar se les adicionó Gel Loading Dye, Purple 6X (New England BioLabs). Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V y 40 mA durante el tiempo necesario para el análisis. Los geles fueron observados en un transiluminador.

4.2.4 Digestión de ADN utilizando enzimas de restricción

Para analizar la incorporación al vector de los insertos así como también para preparar los vectores e insertos para la ligación, se realizó digestión enzimática utilizando enzimas de restricción comerciales. En la mezcla de reacción se utilizaron: entre 4 y 10 U de cada enzima de restricción (New England BioLabs); el buffer Cutsmart 10X (New England BioLabs) y entre 100 y 1000 ng de ADN. La mezcla de reacción se incubó 16 horas a 37°C.

4.2.5 Purificación de ADN mediante Kit de Purificación (QIAGEN)

Para purificar el ADN plasmídico y los insertos luego de una digestión con enzimas de restricción se utilizó el kit comercial QIAGEN QIAamp Mini, siguiendo el protocolo informado por el fabricante.

4.2.6 Generación de *E. coli* químicamente competentes

Para generar bacterias *E. coli* cepa DH5 α químicamente competentes, se partió de un stock previo mantenido a -80°C. Se plaqueó una porción de las bacterias en una placa conteniendo medio Luria Bertani (LB) suplementado con Agar Agar y se incubó 16 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una colonia aislada y se inoculó en 5 mL de medio LB y nuevamente se incubó 16 horas a 37°C en agitación. Posteriormente, se inocularon 100 mL de medio LB con 2 mL del cultivo realizado previamente, y se incubó a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica (OD) del cultivo alcanzó un valor cercano a 0,6. Luego mediante pasos de centrifugación e incubación en frío se descartó el medio de cultivo, obteniendo un pellet de células las cuales fueron conservadas en buffer de frizado (100 mM KCl, 50 mM CaCl₂, 10% glicerol, 10 mM acetato de potasio; pH de 6,2) a -80°C.

4.2.7 Transformación de *E. coli* químicamente competentes

Para seleccionar plásmidos que poseen los insertos de interés, así como amplificarlos para obtener mayor masa de ADN para los experimentos de transfección de los parásitos se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α . A una alícuota de entre 100 y 200 μ L de bacterias competentes se le adicionó el ADN y se incubó a 4°C durante 30 minutos, y posteriormente se realizó un choque térmico en un baño a 42°C durante 1 minuto seguido rápidamente de una incubación a 4°C durante 2 minutos. Las células fueron luego incubadas en 1 mL de LB a 37°C 1 hora en agitación, y pasado el tiempo, se centrifugaron y se obtuvo el pellet de células transformadas, el cual se resuspendió en un volumen de 100 μ L, y fueron plaqueadas en una placa de LB suplementado con Agar Agar y ampicilina (100 μ g/mL).

4.2.8 Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

A partir de un cultivo líquido de la cepa bacteriana de la cual se deseaba obtener el plásmido, el mismo se centrifugó 1 minuto a 13000 r.p.m para obtener el pellet bacteriano. A continuación el pellet fue resuspendido en una solución de 100 μ L de buffer P1 (0,01M EDTA; 0,025M Tris-HCl pH 8) junto con 2 μ L de RNasa A (PureLink, Invitrogen) para lisar las bacterias. Una vez resuspendido, se añadieron 200 μ L de solución P2 (1% SDS; 0,2M NaOH) para aumentar el pH del medio y degradar el ADN genómico, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, agitando cada dos minutos por inversión. Por último, se agregaron 200 μ L de solución P3 (Acetato de potasio 3M pH 5,5) para neutralizar la solución y precipitar las proteínas, y se incubó 15 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m. Al sobrenadante se le añadieron 0,7 volúmenes de isopropanol (Merck), vortexeando para homogeneizar la solución, y se centrifugó 30 minutos a 13000 r.p.m. Por último, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 μ L de solución de etanol al 70% (Merck) y una vez

descartado el etanol, se dejó secar el pellet 20 minutos a 60°C. Finalmente el pellet de ADN plasmídico fue resuspendido utilizando 40 µL de agua miliQ estéril.

4.2.9 Generación de líneas transgénicas de *P. berghei* carentes de la proteína PbHSP27

Para generar líneas transgénicas de *P. berghei* que no posean la proteína PbHSP27, el locus genómico que contiene el gen *Pbhsp27* fue blanco de un vector de sustitución B3D+ *hsp27* KO FLAG, que contiene las regiones 5' y 3' UTR del gen *Pbhsp27* así como el cassette de selección positiva que confiere resistencia a la droga pirimetamina. El plásmido donde se integraron las regiones 5' y 3' UTR fue el B3D+ FLAG (Fig. 12), el cual posee el gen de la dihidrofolato reductasa timidilato sintetasa (DHFR) de *T. gondii*, que confiere resistencia a pirimetamina, un marcador de selección para la resistencia a ampicilina para ser utilizado en *E. coli* y el péptido FLAG. Los fragmentos 5' y 3' UTR fueron generados mediante una PCR, utilizando como templado un plásmido generado previamente en el laboratorio, que contenía ambos fragmentos y se encontraba secuenciado. A continuación se presenta la secuencia de los oligonucleótidos utilizados:

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Sitio de restricción
5' UTR HSP27 Rev	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CTAAATTTATATCGTTTATTTTATTAAT	NotI
5' UTR HSP27 Forward	TCC <u>CCGCGGG</u> GAGACATTTTATTGTGGTTAC	SacII
3' UTR HSP27 Reverse	ATAA <u>GGTACCT</u> CCAATTGGCCAAAATGACG	KpnI
3' UTR HSP27 Forward	CCCA <u>AGCT</u> TGGGGTGTTCCTGAAGAAT	HindIII

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para obtener los fragmentos 5' y 3' UTR, con los sitios de corte de las enzimas de restricción correspondientes.

Para el posterior genotipificado y análisis del genoma de los parásitos transfectados se utilizaron además los siguientes oligonucleótidos:

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Sitio de Restricción
TgPro	CGCATTATATGAGTTCATTTTACACAATCC	-
Flag Reverse	CGG <u>GATCCC</u> GCATCTTGTCATCGTCATC	BamHI
Flag Forward	CGG <u>ACTAGT</u> CCGATGGACTACAAAGAC	SpeI

5' Testing HSP27	CGTGATATACTAAACAAGGAGC	-
3' Testing HSP27	CGCATTATATGAGTTCATTTTACACAATCC	-
ORF hsp27 Forward	TAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> TAAACTATATGTTTTTTTTTAATAGTG	NotI
ORF hsp27 Reverse	CGG <u>ACTAGT</u> CCGTGAGGTCACCTTGGATAAC	SpeI
3' GAPDH Reverse	CGGGATCCCGCGGTGTGAAATACCGCAC	BamHI

Tabla 2. Secuencia de los oligos utilizados en la genotipificación y secuenciación durante el desarrollo del experimento. Subrayado se encuentran los sitios de corte de la enzima correspondiente.

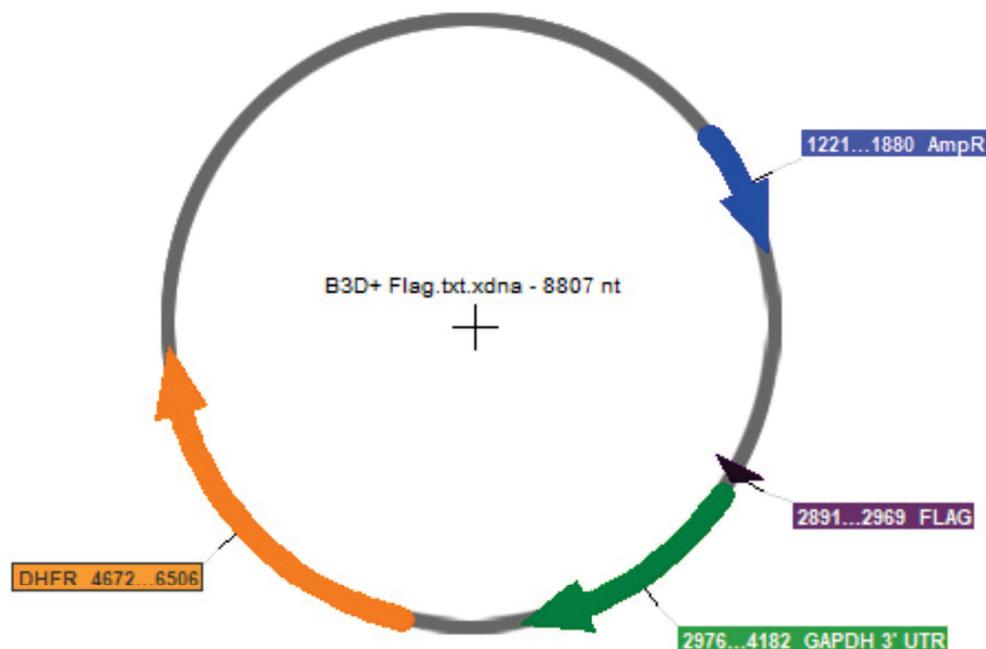


Figura 12: Esquema del vector B3D+ FLAG. El vector tiene un tamaño de 8807 pb., y cuenta con un cassette de resistencia a ampicilina (AmpR, azul) para la selección en *E. coli*, un cassette de resistencia a pirimetamina (DHFR, naranja) para la selección de parásitos transgénicos, una etiqueta peptídica (FLAG, violeta) para el etiquetado de proteínas y la región 3' UTR del gen *gapdh* de *P. berghei*.

4.2.10 Generación de líneas transgénicas de *P. berghei* que sobreexpresan la proteína HSP27 fusionada a la etiqueta FLAG

Para generar líneas transgénicas de *P. berghei* que posean una copia extra de la proteína PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG, se generó un plásmido de inserción B3D+ HSP27 FLAG de forma que en el locus genómico *Pbhsp27* ocurra un evento de simple recombinación que permita la inserción del fragmento del plásmido que contiene el 5' UTR del gen *hsp27*, seguido del marco

abierto de lectura (Open Reading Frame, ORF) del gen *Pbhsp27* (ORF *hsp27*), y además el cassette de selección positiva que confiere resistencia a la droga pirimetamina. El plásmido donde se integraron las regiones 5' UTR y ORF *hsp27* fue el B3D+ FLAG⁶³ (Fig. 12). El fragmento 5' UTR-ORF *hsp27* fue generado mediante una PCR, utilizando como templado un plásmido generado previamente en el laboratorio, que contenía ambos fragmentos y se encontraban secuenciados. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Sitio de restricción
5' UTR HSP27 Forward	TCCC <u>CGCGGG</u> GAGACATTTTATTGTGGTTAC	SacII
ORF <i>hsp27</i> Reverse	CGG <u>ACTAGT</u> CCGTGAGGTCACCTGGATAAC	SpeI

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para obtener el fragmento 5'UTR-ORF *hsp27* con los sitios de las enzimas de restricción correspondientes.

4.2.11 Generación de líneas transgénicas de *P. berghei* que expresen PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG de forma condicional

Para generar líneas transgénicas de *P. berghei* que expresan de forma condicional la proteína PbHSP27 fusionada la etiqueta FLAG en esquizontes y no en ooquistos (estrategia de cambio de promotor), se generó un plásmido de sustitución B3D+ *ama* HSP27 FLAG de forma que en el locus genómico *Pbhsp27* ocurra un evento de doble recombinación, que permita un reemplazo con el fragmento del plásmido que contenga el 5' UTR del gen *Pbhsp27*, seguido por el 5' UTR (promotor) del gen *Pbama-1*, fusionado al ORF de *hsp27* seguido por la etiqueta FLAG, y además el cassette de selección positiva que confiere resistencia a la droga pirimetamina, finalizando con el 3' UTR del gen *Pbhsp27*. El plásmido utilizado para la integración fue el B3D+ FLAG (Fig. 12)⁶³.

Los fragmentos se generaron a partir de una PCR, utilizando como templado ADN genómico de *P. berghei*. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Sitio de restricción
5' UTR HSP27 Reverse	TCCC <u>CGCGGG</u> GAAAGGATACAATTTCTATAG	SacII
5' UTR HSP27 Forward	TCCC <u>CGCGGG</u> GAGACATTTTATTGTGGTTAC	SacII
ORF <i>hsp27</i>	CGG <u>ACTAGT</u> CCGTGAGGTCACCTGGATAAC	SpeI

Reverse		
ORF hsp27 Forward	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> AAACTATATGTTTTTTTTTAATAGTG	NotI
5'UTR AMA Reverse	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> AAATTATATCGTTTTATTATTATAAT	NotI
5'UTR AMA Forward	T <u>CCCCGCGG</u> GGAGTGCTGCGCAATTA AAAAGAG	SacII
T7 Universal	TAATACCGACTCACTATAGGG	-

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para obtener los fragmentos con los sitios de restricción correspondientes que serán utilizados en la síntesis del vector.

4.3 Transfección de parásitos *Plasmodium berghei*

La transfección de parásitos *P. berghei* fue realizada siguiendo el protocolo descrito en Janse et al. (2006)⁶⁴.

4.3.1 Cultivo y purificación de esquizontes de *P. berghei*

Para obtener estadios sanguíneos de *P. berghei* se infectaron ratones de cualquier cepa disponible, sin importar sexo ni especie, mediante inyección intraperitoneal de la cepa *P. berghei* ANKA GFP⁶⁴. Cuando el ratón alcanzó una parasitemia de entre 1 y 3%, determinada por GIEMSA (ver sección 4.3.5 de Materiales y Métodos), se le realizó punción cardíaca bajo anestesia y se obtuvo el total de la sangre del ratón, la cual contenía los parásitos. Estos parásitos fueron cultivados en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado y gentamicina (RPMI completo) a 37°C durante 18 horas, con una agitación de 77 r.p.m. en una estufa que mantiene condiciones hipóxicas (CO₂ 5%, O₂ 5%, N₂ 90%). Para poder obtener un pellet de esquizontes purificados se utilizó un gradiente de centrifugación diferencial con Nycodenz 50% (Sigma), utilizando 10 mL de la solución de Nycodenz cada 30 mL de cultivo de parásitos. La solución de Nycodenz se coloca en el fondo de un tubo Falcon de 50 mL y por encima el volumen de cultivo de parásitos, y luego de un paso de centrifugación de 30 minutos a 1500 r.p.m sin freno (para evitar romper el gradiente), los esquizontes forman una fase de coloración marrón que se ubica entre el medio de cultivo y la solución de Nycodenz. Se recolectaron los esquizontes utilizando una pipeta Pasteur y estos fueron lavados en medio RPMI. Para comprobar la calidad y cantidad de esquizontes purificados se realizó un frotis del cultivo luego de las 18 horas y un frotis luego de la purificación, y ambos fueron teñidos por colorante GIEMSA, y observados en el microscopio Olympus BX40 con un objetivo de 100X.

4.3.2 Transfección de esquizontes mediante electroporación

Para la preparación del ADN plasmídico, se realizó una digestión con las enzimas SacII y KpnI en el caso del vector B3D+ *hsp27* KO FLAG y del vector B3D+ *ama* HSP27 FLAG (ver sección

4.2.4 en Materiales y Métodos), y la enzima AvrII para el vector B3D+ HSP27 FLAG. Posteriormente se purificó el ADN mediante la utilización de columnas QIAGEN (ver sección 4.2.5 en Materiales y Métodos), y se determinó la cantidad de ADN plasmídico utilizando el equipo Nanodrop. Una vez alcanzada la cantidad necesaria de ADN plasmídico digerido (entre 5 y 10 ug) se le adicionó buffer de transfección Nucleofactor (Lonza), donde cada 5 µg de ADN se agregaron 100 µL de buffer. El pellet de esquizontes se resuspendió utilizando la solución de Nucleofactor y ADN plasmídico digerido, y esto fue colocado dentro de una cuba de electroporación (Lonza) utilizando el electroporador Amaxa Gene Pulser, con el programa de electroporación U33. Una vez realizada la electroporación de los esquizontes, se añadió a la cuba 50 µL de medio RPMI completo y se transfirió el volumen total a un ratón vía inyección intravenosa a través de la cola, con ayuda de una lámpara infrarroja que induce la dilatación de las venas y facilita la inyección.

4.3.3 Selección de los parásitos recombinantes

Debido a que los parásitos recombinantes presentan un cassette de resistencia a pirimetamina, para poder seleccionarlos se administró pirimetamina (70 ng/mL, pH 3,5-4,5) en el agua de beber de los ratones inoculados con los parásitos transfectados 24 horas después de la infección. Se monitoreó la parasitemia de los ratones durante un período de 20 días, y aquellos parásitos con parasitemia positiva fueron anestesiados y se recolectó la sangre mediante punción cardíaca. Una alícuota se criopreservó para futuras infecciones mientras que la otra se utilizó para obtener ADN genómico (ADNg).

4.3.4 Criopreservación de parásitos en estadio sanguíneo

Se realizó una solución utilizando sangre de ratón infectado junto con solución de frizado en una proporción 1:2 (100 µL de sangre y 200 µL de solución de frizado) y esto fue almacenado en nitrógeno líquido a una temperatura de -80°C.

4.3.5 Determinación de la parasitemia mediante tinción por GIEMSA

Para determinar la presencia de parásitos en la sangre de los ratones se utilizó el método de tinción por GIEMSA, ya que esta solución tiñe de color violeta oscuro los núcleos de las células, lo que permite diferenciar entre glóbulos rojos no infectados (que no poseen ADN) y glóbulos rojos infectados (donde el ADN visualizado corresponderá al material genético del parásito). Para realizar esta técnica, se tomó una gota de sangre a partir de la cola del ratón y se colocó en un portaobjetos, realizando un frotis sanguíneo. Una vez que el frotis se dejó secar a temperatura ambiente, se fijó la muestra sumergiéndose en metanol (Merck) durante 20-30 minutos, y pasado ese tiempo se sumergió el vidrio en solución de GIEMSA 10% (Merck) durante 40-45 minutos. Para la observación de la muestra, los vidrios fueron lavados con agua de la canilla, secados al aire y analizadas en microscopio óptico campo claro, utilizando un objetivo de 100X (Olympus BX40). Para el cálculo del porcentaje de parasitemia, se contabilizan el número de parásitos y glóbulos rojos totales por campo, y esto se repite en 10 a 20 campos, y luego se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Promedio parásitos por campo}}{\text{Promedio glóbulos rojos por campo}} * 100$$

4.3.6 Purificación de parásitos de *P. berghei* en el estadio sanguíneo

Para la obtención de parásitos libres que provienen de estadios sanguíneos, se infectaron ratones con cada una de las líneas de parásitos que se deseaba purificar, y una vez alcanzada una parasitemia de entre 4-7%, determinada diariamente por tinción de GIEMSA, se realizó una punción cardíaca para obtener la sangre infectada. Luego se confeccionó una columna, utilizando una jeringa de 5 mL sin el émbolo, donde se colocó una capa fina de algodón, luego una capa de celulosa fibrosa (Sigma) y por último una pequeña capa de bolitas de vidrio (272-300 μm , Sigma), con el objetivo de eliminar las células de gran tamaño como las células del sistema inmune. La columna fue lavada 3 veces con 1 volumen de columna de PBS 1X y luego se colocó la sangre infectada, que se diluyó con PBS 1X hasta alcanzar los 14 mL de volumen final. La solución de sangre y PBS fue centrifugada 8 minutos a 1500 r.p.m sin freno, se descartó el sobrenadante, y el pellet (conformado por glóbulos rojos) fue resuspendido en 14 mL de una solución de saponina 0,2%, la cual se preparó en PBS 1X, con el objetivo de lisar los glóbulos rojos. Nuevamente se centrifugó la solución, esta vez 8 minutos a 3000 r.p.m, sin freno, descartando el sobrenadante posteriormente. El pellet obtenido, que contenía principalmente parásitos en estadios sanguíneos, fue lavado dos veces con 400 μL de PBS 1X, y las muestras se conservaron a -20°C . Este pellet de parásitos fue utilizado tanto para la extracción de ADN genómico de estadios sanguíneos como para ensayos de Western Blot.

Se cuantificó el número de parásitos sanguíneos a partir de la parasitemia del ratón al momento de la punción cardíaca, determinando el número de parásitos por μL de sangre de ratón partiendo del número de glóbulos rojos por μL de sangre de ratón:

$$7 * 10^6 \text{ GR}/\mu\text{L} * \% \text{ de parasitemia} = x \text{ parásitos}/\mu\text{L sangre de ratón}$$

4.3.7 Preparación de ADN genómico a partir de parásitos *P. berghei* en estadio sanguíneo

Para la extracción de ADN genómico a partir de un pellet de parásitos en estadio sanguíneo se utilizó el kit comercial de QIAGEN DNeasy Blood & Tissue, siguiendo el protocolo provisto por el proveedor.

4.3.8 Clonado de parásitos

Para obtener poblaciones clonales de parásitos se comenzó infectando un ratón con la muestra de parásitos deseada. Una vez que la parasitemia de este ratón se encontraba entre 0,5 y 1%, se procedió a realizar el siguiente cálculo (sabiendo que en un ratón hay $7*10^6$ glóbulos rojos por μL de sangre) para determinar cuántos parásitos hay por μL de sangre de ratón:

$$7 * 10^6 \text{ GR}/\mu\text{L} * \% \text{ de parasitemia} = x \text{ parásitos}/\mu\text{L sangre de ratón}$$

Una vez determinado ese valor, se realizaron diluciones seriadas de la sangre del ratón utilizando medio RPMI hasta llegar a un volumen de sangre que permite inocular mediante inyección intravenosa por la cola a un ratón con un único glóbulo rojo infectado, y este proceso se realizó para 8 ratones, los cuales fueron mantenidos con pirimetamina en el agua de beber.

4.4 Generación de ooquistos de *P. berghei*

Se realizó una adaptación del protocolo de obtención *in vitro* de ooquistos descrito en Gao et al. (2018)⁴⁸.

4.4.1 Inducción de reticulocitosis e infección con la cepa de *P. berghei*

Es necesaria la inducción de reticulocitos ya que los gametocitos, tanto femeninos como masculinos, de *P. berghei* tienen una preferencia a invadir este tipo celular⁶⁵ y por lo tanto es crucial para obtener un buen rendimiento de ooquistos, debido a que estos derivan de la fecundación de gametocitos (Fig. 2). Para lograr la inducción de reticulocitos, se inoculó por vía peritoneal a los ratones con una solución de 6 mg/mL de Fenilhidrazina (Sigma) preparada en NaCl 9%.

Para garantizar la obtención de ooquistos, se debe inocular un stock de parásitos metabólicamente activos. Por lo tanto, aproximadamente una semana antes de la inyección con fenilhidrazina, se inoculó vía peritoneal a un ratón, sin importar cepa, edad ni sexo, con la cepa de parásitos criopreservada de la cual se desean obtener ooquistos. Cuando la parasitemia de este ratón se encontró entre 1 a 3%, se procedió a la punción cardíaca para obtener los parásitos, los cuales se utilizaron para infectar a un ratón C57BL/6 que había sido inyectado con fenilhidrazina 24 horas antes. Los ratones utilizados para este segundo paso son de la cepa C57BL/6, debido a que son un modelo más similar de la infección de *P. falciparum* en humanos⁵.

4.4.2 Ensayo de exflagelación de gametocitos masculinos

El proceso de exflagelación de gametas masculinas es un evento que indica que los gametocitos masculinos están completamente maduros, y es posible observar este evento *in vitro*. Para poder observarlo, a partir del tercer día de la infección con parásitos, se tomó una gota de sangre de la cola del ratón (actividad que se debe realizar entre las 14 y 16 horas del día, dado que el ritmo circadiano del ratón afecta el ciclo de vida de *P. berghei*) y se colocó en un portaobjetos, cubriéndola con un cubreobjetos. Esto se dejó reposar durante 10 minutos a 20°C, debido a que esta es la temperatura dentro del mosquito, y el cambio de temperatura da inicio a la exflagelación. La exflagelación se pudo observar en un microscopio de campo claro utilizando un objetivo 40X (Leica DM500). El conteo de eventos de exflagelación se realizó contando cuántos centros de exflagelación se visualizaban por campo, proceso que se repitió por 10 campos ópticos del microscopio, y luego se calculó el promedio de eventos de exflagelación por campo⁶⁶.

4.4.3 Cultivo de ooquistos de *P. berghei*

Una vez observados los eventos de exflagelación, se realizó una punción cardíaca y la sangre se cultivó en una botella con superficie adherente (BIOFIL), la cual contiene medio de ooquistos (8 mL de medio RPMI, 1 mL suero FCS inactivado y 10 µL de ácido xanturénico 50 mM (Sigma)). La sangre se cultivó 22 horas a 20°C, imitando las condiciones de fecundación del parásito dentro del mosquito.

4.4.4 Purificación de ooquinetos de *P. berghei* por NH₄Cl

El cultivo se centrifugó a 1500 r.p.m durante 8 minutos sin freno y el pellet se resuspendió en una solución de NH₄Cl 0,35M durante 1 hora a 4°C para facilitar la lisis de glóbulos rojos. Luego se centrifugaron las muestras a 1500 r.p.m durante 12 minutos sin freno y se recolectaron los ooquinetos en el pellet. Los mismos se lavaron 2 veces con PBS 1X y finalmente se resuspendieron en 200 µl de PBS. La concentración de ooquinetos se determinó por recuento en una cámara de Neubauer. El pellet de ooquinetos se utilizó para analizar mediante Western Blot.

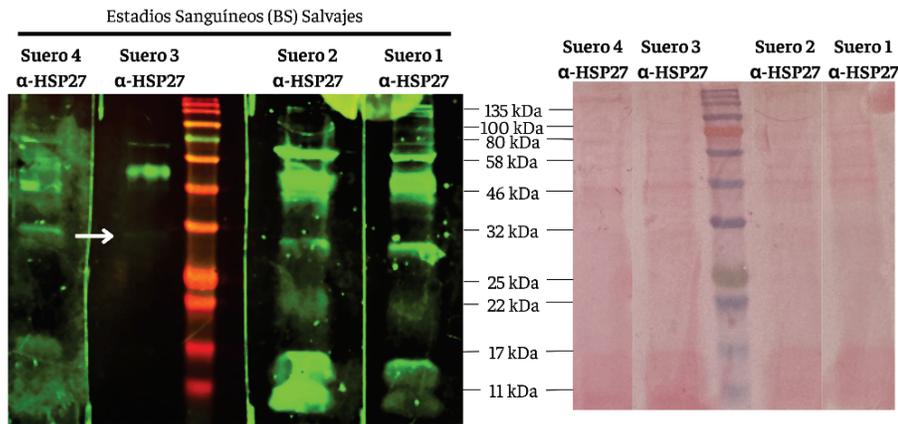
5. Resultados

5.1 Evaluación de la expresión de PbHSP27 mediante Western Blot

5.1.1 Análisis de especificidad de sueros utilizando estadios sanguíneos de *P. berghei*

En primera instancia, decidimos analizar la especificidad de los cuatro sueros anti-PbHSP27 disponibles en el laboratorio en los estadios sanguíneos de *P. berghei* mediante ensayos de WB. Para esto utilizamos como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón acoplado a un fluoróforo cuya excitación ocurre a 790 nm (Figura 13).

A.



B.

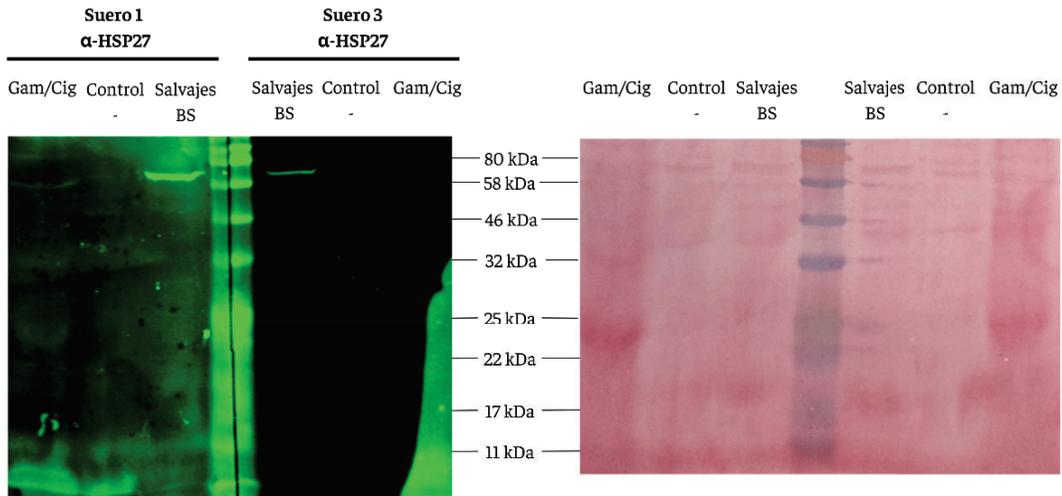


Figura 13. Detección de PbHSP27 en estadios asexuales de *P. berghei*. **A.** WB de estadios sanguíneos de *P. berghei* obtenidos a partir de sangre de ratón. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana PVDF, donde se utilizaron los cuatro sueros anti-HSP27 como anticuerpo primario (izquierda). Tinción de Ponceau luego de la transferencia a la membrana de PVDF (derecha). **B.** WB de estadios sanguíneos obtenidos a partir de sangre de ratones infectados (BS): fueron separadas en un gel SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana PVDF, donde se utilizaron los sueros anti-HSP27 1 y 3 como anticuerpo primario (izquierda). Tinción de Ponceau luego de la transferencia a la membrana de PVDF (derecha). Control neg. 1: sangre de animal no infectado, Control neg 2 (gam/cig): cultivo in vitro a 20°C conteniendo mayoritariamente estadios de gametocitos y cigotos pero no ooquistos.

Se observan en la figura 13A que el suero con mayor especificidad es el suero 3, ya que en los sueros 1, 2 y 4, se observan múltiples bandas inespecíficas, mientras que en el suero 3 se observan tres bandas, una muy tenue entre 25 y 32 kDa que podría corresponder al monómero de HSP27, una de peso molecular aproximadamente de 80 kDa, observada previamente (Figura 11C) y otra de aproximadamente 54 kDa que podría corresponder a un dímero de la proteína HSP27. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente en ooquistos (Figura 11A), donde se concluyó que el suero 3 era el más específico para el estadio de ooquistos.

Una vez determinado el suero con mayor especificidad, se realizó un segundo ensayo de WB, esta vez adicionando dos controles negativos, el primero correspondiente a sangre de un

ratón no infectado, la cual fue purificada siguiendo el mismo protocolo de purificación de sangre proveniente del animal infectado (Control neg 1). Además se incluyó un control adicional en donde un cultivo *in vitro* a partir de sangre de ratones en medio de ooquistos a 20°C durante 16 horas, donde se dejó que ocurra la formación de cigotos, pero no la de ooquistos, es decir el cultivo contenía mayoritariamente gametas y cigotos (Control neg 2). Todas las muestras fueron desnaturalizadas en buffer Laemmli comercial, al que esta vez le agregamos 5% de β -mercaptoetanol y 100 mM final de DTT, (además de los que ya contiene el buffer comercial) para intentar disociar los oligómeros (Figura 13B). Con los sueros 1 y 3 observamos una banda en las muestras correspondientes a las muestras sanguíneas entre los marcadores de 58 y 80 kDa. Con el suero 3 no observamos bandas en los controles, mientras que el suero 1 presentó una banda en el control negativo 2.

5.1.2 Análisis de la expresión de PbHSP27 en ooquistos de *P. berghei*

Posteriormente, se realizó un gel de SDS-PAGE 15% para el análisis de muestras de *P. berghei* en cultivo de ooquistos, utilizando nuevamente como anticuerpos primarios el suero 3 anti-HSP27 al que en primer lugar se lo reconoció con un anticuerpo secundario acoplado a fluorescencia detectada con el equipo Odyssey (Figura 14A). Como resultado se obtuvieron numerosas bandas inespecíficas en todas las muestras, por lo tanto decidimos someter a la membrana a un proceso de *stripping* e incubarla nuevamente con el suero 3 anti-HSP27 y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a HRP. En este caso observamos una doble banda a la altura de 25 kDa aproximadamente (Fig. 14B) que coincide con la observada previamente en la figura 10B. Esta doble banda podría deberse a posibles modificaciones post-traduccionales que posee la proteína (Figura 8A).

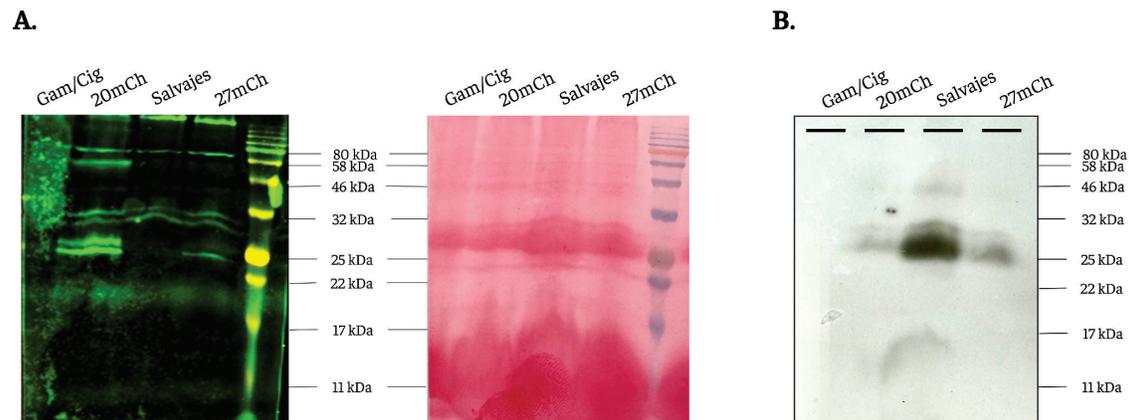


Figura 14: Expresión de PbHSP27 en ooquistos. A. Ensayos de WB de ooquistos de *P. berghei* salvajes. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana PVDF, donde se utilizó el suero 3 de anti-HSP27 como anticuerpo primario Tinción de Ponceau luego de la transferencia a la membrana de PVDF (derecha). B. La misma membrana se *strippeó* y se incubó nuevamente con la misma concentración de suero 3 anti-HSP27. Gam/cig: cultivo *in vitro* a 20°C conteniendo mayoritariamente gametas y cigotos. 20mCh: ooquistos que sobreexpresan HSP20 fusionada a mCherry y mantienen la copia endógena. Salvajes: ooquistos salvajes. 27mCh: ooquistos que sobreexpresan HSP27 fusionada a mCherry y mantienen la copia endógena.

5.2 Análisis fenotípico de ooquistos de *P. berghei* que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry

Debido a que PbHSP27 se expresa en el estadio de ooquistos, se decidió estudiar el fenotipo de los ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry, para obtener mayor información sobre la función de esta proteína en este estadio en particular.

5.2.1 Optimización del protocolo de cultivo de ooquistos *in vitro*

El primer cultivo de ooquistos se realizó siguiendo el protocolo descrito en Gao et al. (2018)⁴⁸, donde se parte de un stock criopreservado de parásitos, el cual se utiliza para infectar directamente al ratón inoculado con fenilhidrazina. Esta droga se utiliza para inducir reticulocitosis y aumentar el número de gametocitos en la sangre del ratón infectado (ver sección 4.4.1 de Materiales y Métodos). Cuando se realizó el protocolo de esta forma, no se obtuvieron ooquistos al finalizar el protocolo, y tampoco se observaron eventos de exflagelación masculina en la sangre del ratón infectado, el cual es un paso crítico a chequear antes de realizar el cultivo *in vitro* para la generación de ooquistos (ver sección 4.4.2 de Materiales y Métodos). Por lo tanto, se decidió cambiar las condiciones del protocolo, e infectar primero a un ratón BALB/c con el stock de parásitos criopreservados, y una vez infectado, utilizar la sangre del ratón BALB/c para infectar al ratón C57BL/6 (previamente tratado con fenilhidrazina) para el cultivo de ooquistos. Es decir que se cambió la inoculación con parásitos criopreservados por una inoculación utilizando un pasaje de parásitos metabólicamente activos. Además, se comprobó que el hecho de no observar eventos de exflagelación masculina deriva frecuentemente en no obtener ooquistos al finalizar el cultivo y por lo tanto, se decidió proceder con el protocolo de cultivo de ooquistos, solo si observamos exflagelación en la sangre del ratón C57BL/6.

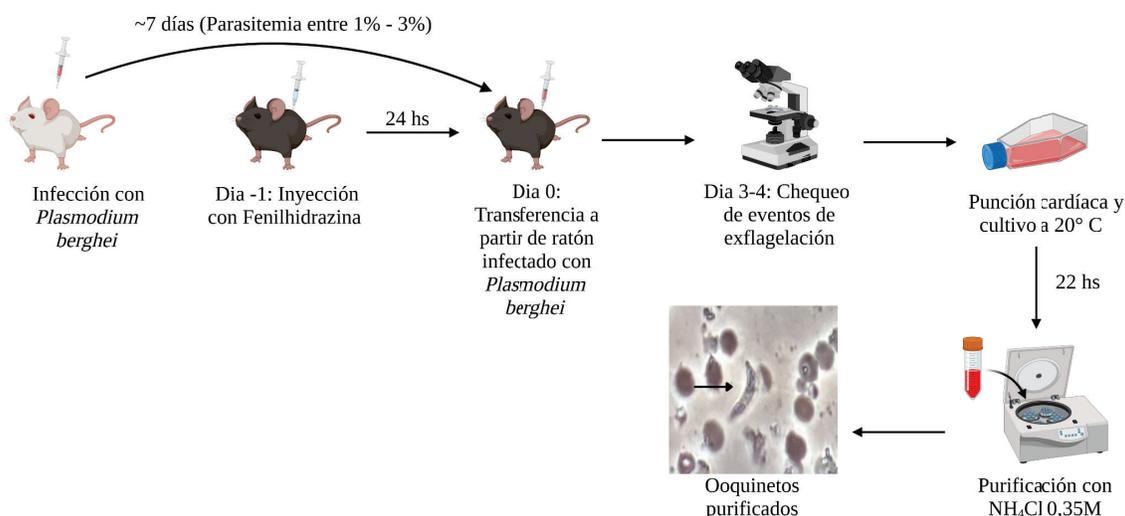


Figura 15: Protocolo de obtención de ooquistos de *P. berghei* *in vitro* optimizado. Se determinó que para el correcto desarrollo del protocolo, idealmente se deben utilizar parásitos transferidos de otro animal para infectar al ratón a partir del cual se desea obtener ooquistos, y que los eventos de exflagelación masculina son un paso que indica la maduración correcta de las gametas, paso crítico en la formación de ooquistos. Imagen creada en Biorender.

5.2.2 Obtención de imágenes por microscopía de epifluorescencia de ooquistos

Debido a que en el laboratorio de la Dra. Georgina Montagna en el IIBio-UNSAM no se habían realizado observaciones de los estadios intermedios de formación de los ooquistos de *P. berghei* al microscopio, se decidió poner a punto la observación y análisis de ooquistos de *P. berghei* utilizando el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Para ello, se obtuvieron ooquistos de *P. berghei* de la cepa ANKA GFP, la cual es una cepa salvaje con la excepción de que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente GFP. Una vez obtenido el pellet de ooquistos después de la purificación (ver sección 4.4 de Materiales y Métodos), se colocó una gota de 2 μ L de parásitos en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, sellando la unión y dejando reposar a la muestra aproximadamente 5-10 minutos. Una vez pasado ese tiempo, se realizó la observación al microscopio utilizando un objetivo 100X (Nikon), y fue posible observar y distinguir los estadios desde la formación del cigoto hasta la maduración completa del ooquisto (Fig. 16). La clasificación se realizó teniendo en cuenta las micrografías de fluorescencia reportadas en Wang et al. (2020)¹⁹.

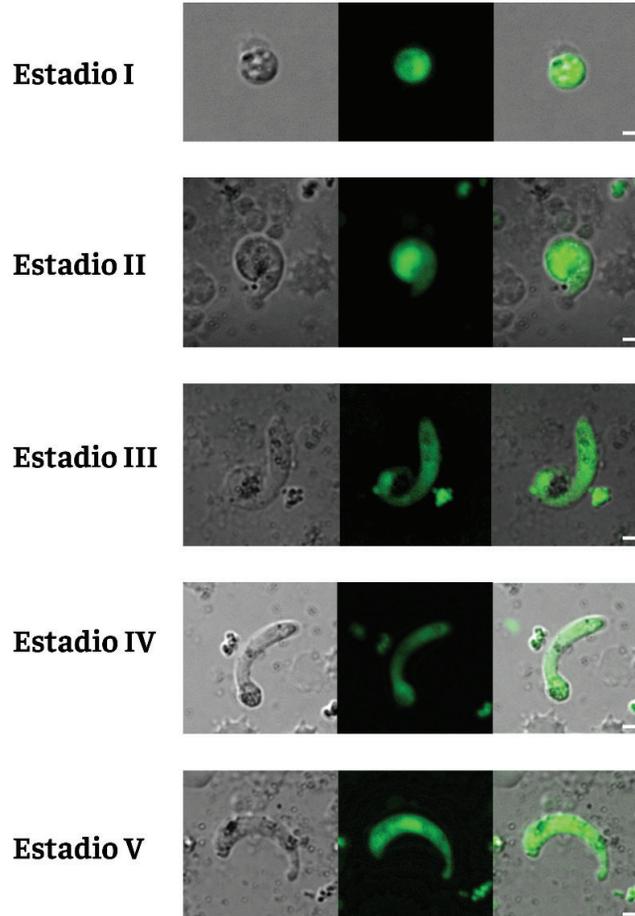


Figura 16: Estadios de desarrollo del ooquisto en *P. berghei*. La expresión de la proteína GFP se expresa de forma constitutiva en todo el parásito, lo que permite evidenciar las características morfológicas que diferencian a cada estadio intermedio durante el desarrollo del ooquisto. Las imágenes fueron tomadas luego de la purificación de un cultivo que fue incubado 22 horas y purificado por NH_4Cl , por lo que el estadio predominante fue el más desarrollado (estadio V). Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio Nikon Eclipse 80i junto con la cámara Axiocam 208 Color (Zeiss). Barra de escala: 2 μm .

5.2.2 Evaluación de la exflagelación de gametocitos en ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry

Para poder analizar si la exflagelación de los gametocitos masculinos ocurre de forma adecuada en los parásitos con sobreexpresión de PbHSP27 fusionada a mCherry, se contabilizaron los eventos de exflagelación masculina en cada campo óptico del microscopio y se compararon los valores de exflagelación promedio por campo respecto a gametocitos masculinos salvajes (cepa ANKA GFP). Este proceso se repitió para tres cultivos diferentes de cada cepa, y los datos obtenidos se analizaron utilizando GraphPad (Prism), obteniendo el siguiente gráfico:

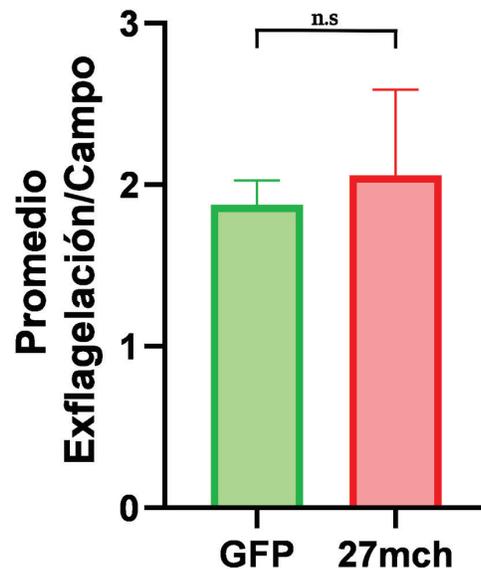


Figura 17: Promedio de exflagelación de gametocitos masculinos por campo óptico del microscopio. Se contabilizaron los centros de exflagelación de gametocitos masculinos (caracterizados por la salida de múltiples flagelos del glóbulo rojo infectado) en cada campo óptico del microscopio Leica DM500. Se representa el promedio de eventos de exflagelación por campo óptico para las dos cepas estudiadas. Se contabilizaron aproximadamente 10 campos por cultivo. Se realizaron 3 cultivos diferentes para cada una de las cepas estudiadas. Test Mann Whitney; $p > 0,05$; $n = 4$. n.s = no significativo.

Como se observa en la figura 17, no hay diferencias significativas entre el nivel de la exflagelación de gametocitos masculinos salvajes (ANKA GFP) que se utilizaron como control, y la cepa que sobreexpresa PbHSP27 fusionada a mCherry (27mch).

5.2.3 Estudio del desarrollo de ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry

Para determinar si el desarrollo de ooquistos durante el cultivo *in vitro* ocurre de forma normal, se determinó como indicador el número total de ooquistos maduros al finalizar el protocolo, el cual fue calculado utilizando una cámara de Neubauer. Nuevamente se utilizó como cepa control la cepa ANKA GFP, y esta determinación se realizó a partir de 4 cultivos para cada cepa. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando GraphPad (Prism).

En la figura 18A se observa que se obtiene un número de ooquistos maduros totales considerablemente mayor en los cultivos salvajes respecto a los cultivos HSP27mch, y al mirar con más detalle la población de ooquistos HSP27 mCherry podemos discriminar entre los

ooquinetos que presentan una forma más redondeada y los que presentan una forma más elongada (Fig. 3). Luego calculamos la proporción de ooquinetos redondos, que refiere a estadios de ooquinetos inmaduros donde la forma es predominantemente redondeada (estadios II a III), y estadios elongados a los estadios maduros (IV a V). Como se observa en la figura 18 B, en el cultivo de la cepa salvaje, la proporción mayoritaria de ooquinetos es elongada, es decir son ooquinetos completamente maduros, mientras que en los cultivos de la cepa que sobreexpresa PbHSP27 fusionada a mCherry, la población mayoritaria corresponde a las formas redondeadas, es decir a formas inmaduras.

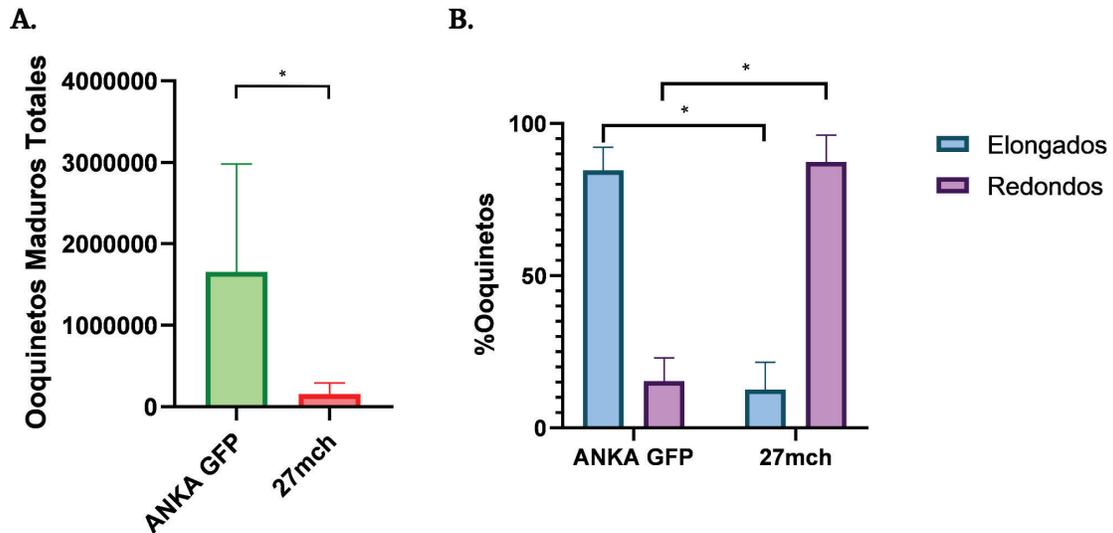


Figura 18: Análisis del desarrollo de ooquinetos. A. Número de ooquinetos maduros (estadio V) totales por cepa. Test Mann Whitney; $p < 0,05$; $n = 4$. B. Porcentaje de ooquinetos redondos (estadios II a III) y elongados (estadios IV y V) para ambas cepas. Test Mann Whitney; $p < 0,05$; $n = 4$.

Esta tendencia se observó también en frotis realizados a partir de cultivos de ooquinetos purificados y teñidos mediante GIEMSA. En la figura 19 A, correspondiente a un cultivo realizado con la cepa que sobreexpresa PbHSP27 fusionada a mCherry, se puede observar que los ooquinetos tienen una forma redondeada, mientras que los ooquinetos salvajes (Fig. 19 B) tienen una forma completamente elongada y siguiendo la curvatura de los microtúbulos subpeliculares de los zoítos, morfología característica de los ooquinetos maduros.

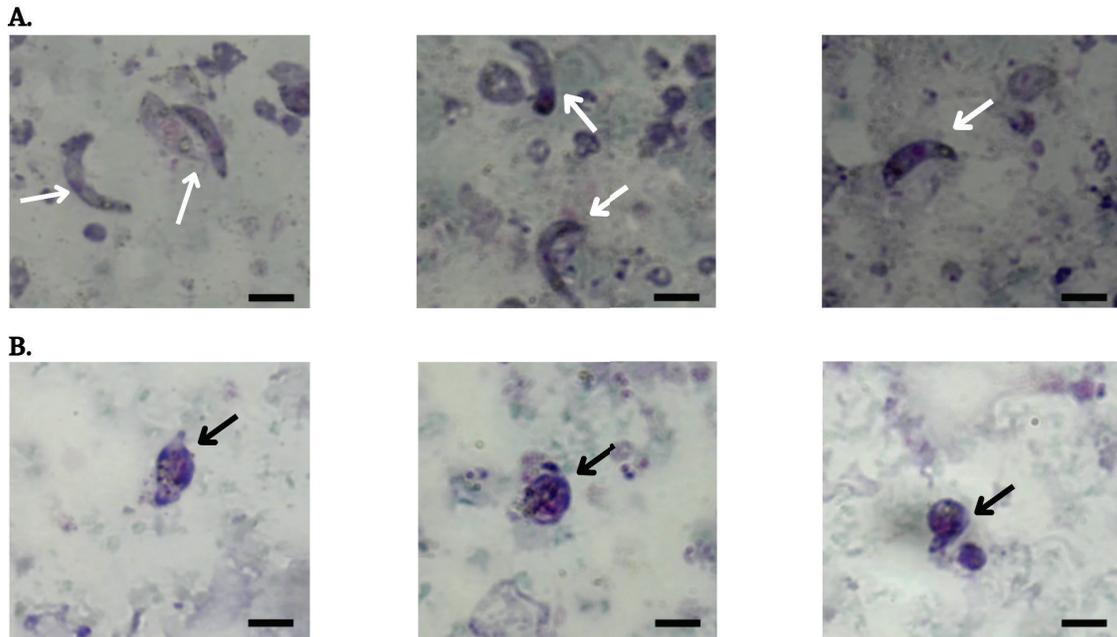


Figura 19: Tinción de GIEMSA para detectar ooquistos. A. Cultivo de ooquistos salvajes. La mayoría posee una morfología elongada y con una curvatura, correspondiente a la forma de un ooquisto maduro. **B.** Cultivo de ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry. Presentan en su mayoría una forma redondeada, similar a estadios inmaduros de ooquistos. Barra de escala: 5 µm.

5.3 Estudio de la función de PbHSP27 en estadios sanguíneos de *P. berghei*

Para poder comenzar a dilucidar el rol de PbHSP27 en estadios sanguíneos de *P. berghei* decidimos generar una línea transgénica de parásitos de *P. berghei* que no posean el gen *Pbhsp27*, y para ello generamos una construcción que me permita obtener una población de parásitos Knock Out (KO) para el gen de la proteína PbHSP27 por la estrategia de doble recombinación o reemplazo.

5.3.1 Síntesis del vector B3D+ *hsp27* KO FLAG para la generación de parásitos transgénicos

Para comenzar con la síntesis del vector, primero se realizó una reacción de PCR para obtener ambos insertos de interés, el 5' UTR y el 3' UTR del gen *Pbhsp27*. El molde utilizado fue un plásmido secuenciado que contenía ambas regiones, previamente generado en el laboratorio. Los primers utilizados se describen en la Tabla 1 (ver sección 4.2.9 en Materiales y Métodos).

Para corroborar que la reacción de PCR ocurrió correctamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, y se corrió un 10% del volumen final de la reacción de PCR (Fig. 20A). Luego ambos productos fueron digeridos con las enzimas que permiten el clonado direccional de ambos fragmentos en el vector (SacII y NotI para el fragmento 5' UTR; HindIII y KpnI para el fragmento 3' UTR, Figura 23B). Luego de digerir los fragmentos con las enzimas adecuadas, ambos fueron purificados utilizando el kit de columnas de purificación QIAmp DNA Micro Kit (QIAGEN). Por último, para corroborar la eficiencia de la purificación, nuevamente se realizó un chequeo mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Fig. 20B).

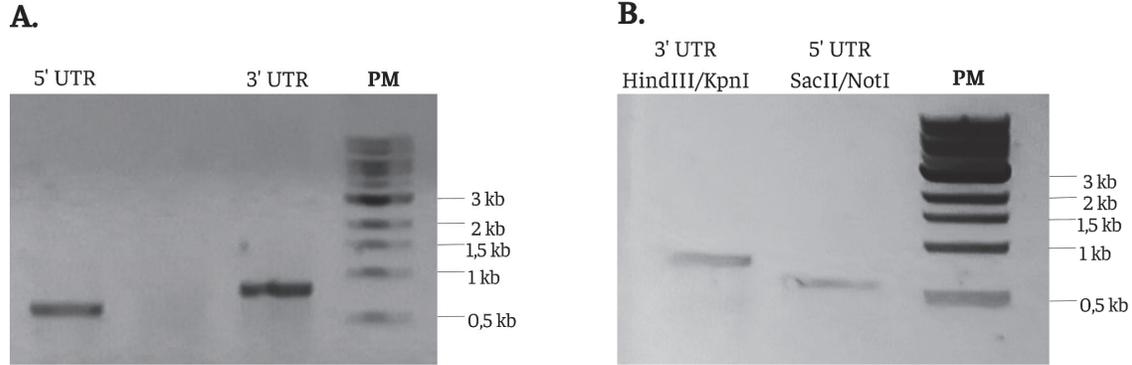


Figura 20: Obtención de los fragmentos 5' y 3' UTR de *hsp27*. A. Amplificación de los insertos 5' y 3' UTR de *hsp27* mediante PCR. El fragmento 5' UTR tiene un tamaño de 614 pb. mientras que el fragmento 3' UTR tiene un tamaño de 824 pb. B. Digestión y purificación de los insertos 5' y 3' UTR con las enzimas de restricción correspondientes.

Una vez obtenidos ambos fragmentos, se realizó la digestión del vector B3D+ FLAG con las enzimas SacII y NotI, y una posterior purificación, para proceder a la ligación del vector con el inserto 5' UTR de *Pbhsp27*, y la posterior transformación de bacterias con el producto de la ligación. Luego se analizó el ADN plasmídico extraído de las bacterias resistentes a ampicilina, utilizando las enzimas de restricción SacII y EcoRI, ya que si estaba presente el fragmento 5' UTR se debían obtener bandas de 7488 pb y 1933 pb y si no estaba presente, las bandas deberían presentar un tamaño de 7488 pb y 1319 pb (Fig. 21A). Una vez seleccionado el clon 4 como positivo, este se digirió con las enzimas HindIII y KpnI, para proceder a la ligación con el fragmento 3' UTR. La selección de clones positivos se realizó mediante una digestión con las enzimas HindIII y KpnI, por lo que se observó el fragmento liberado correspondiente al inserto 3' UTR de *Pbhsp27* en el clon 1, resultando positivo para la incorporación del inserto (Fig. 21B).

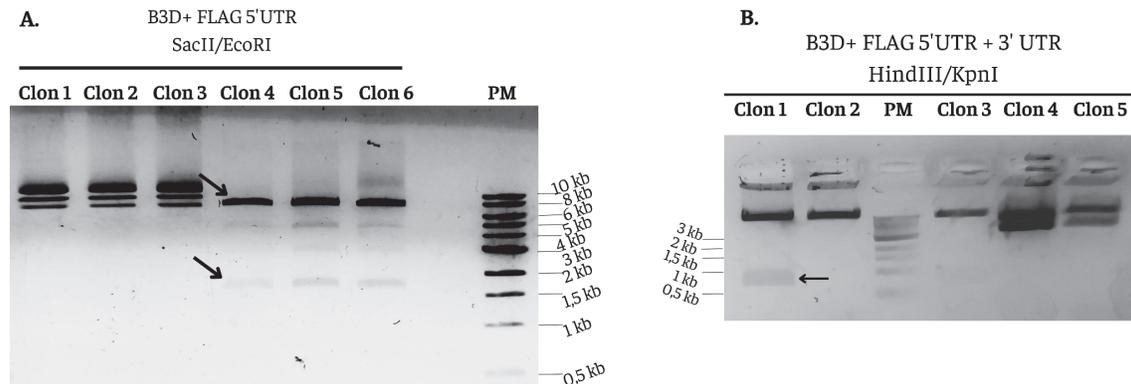


Figura 21: Ligación de los insertos 5' y 3' UTR en el vector B3D+ FLAG. A. Chequeo de clones positivos que hayan incorporado el vector B3D+ FLAG conteniendo el inserto 5' UTR de *hsp27*, utilizando las enzimas SacII y EcoRI. Tamaño esperado de clones positivos: 7488 pb y 1933 pb. Tamaño esperado de clones negativos: 7488 pb y 1319 pb. B. Chequeo de clones positivos que poseen tanto la región 5' UTR como 3' UTR de *hsp27* dentro del vector B3D+ FLAG, utilizando las enzimas HindIII y KpnI. Tamaño esperado de clones positivos: 9358 pb y 811 pb. Tamaño esperado de clones negativos: 9358 pb.

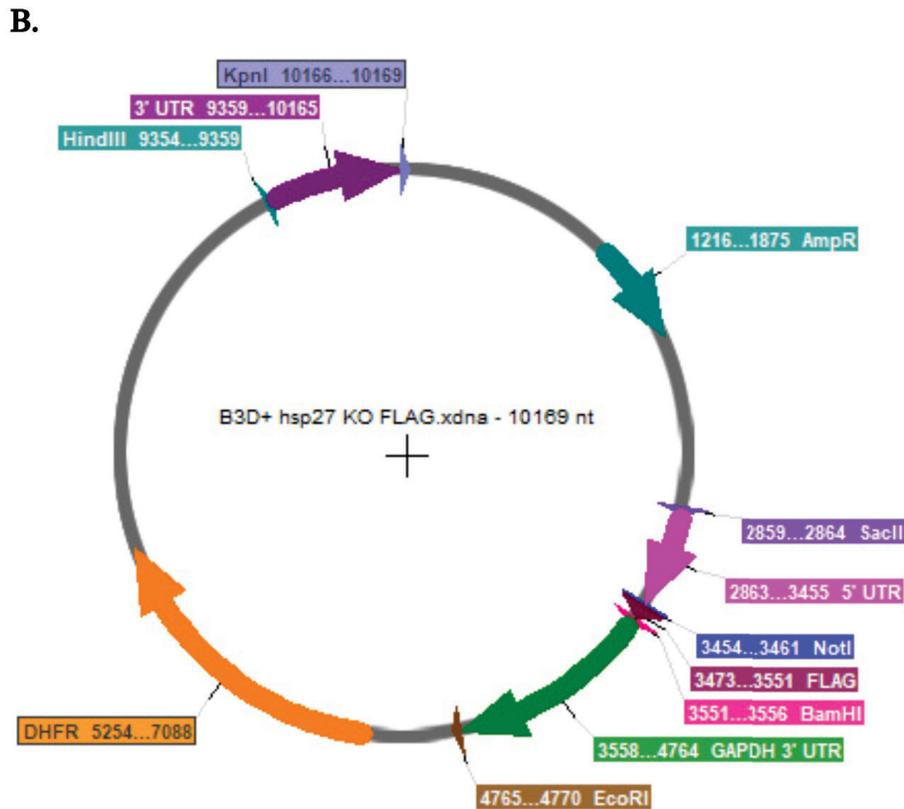
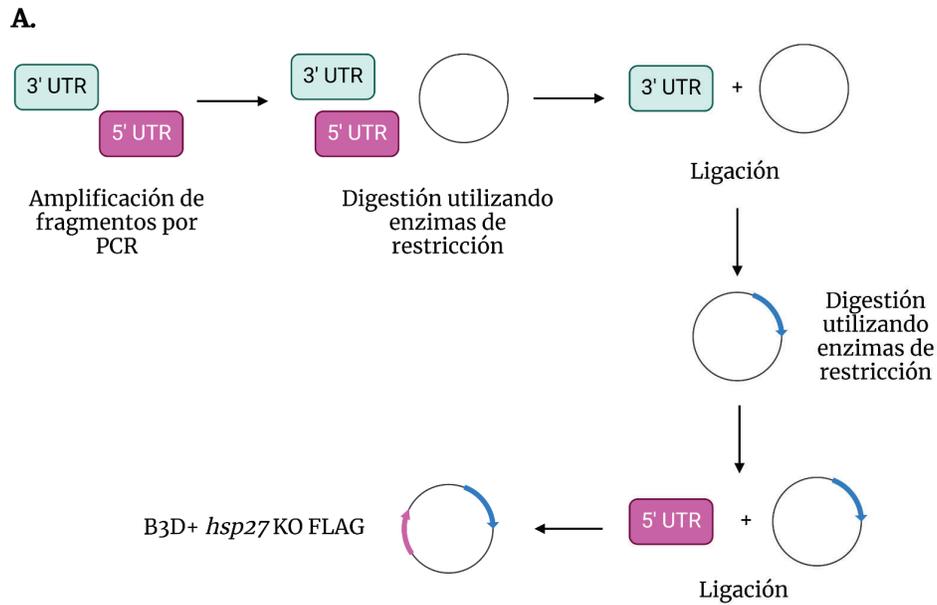


Figura 22: Construcción del vector B3D+ *hsp27* KO A. Representación de la estrategia de clonados secuenciales para la construcción del vector. Se comenzó con la amplificación de los fragmentos de interés (5' UTR y 3' UTR del gen *Pbhsp27*), y luego se digirió a cada fragmento con las enzimas de digestión correspondientes (SacII y NotI para el 5' UTR; HindIII y KpnI para el 3' UTR) y al vector se lo digirió con las enzimas HindIII y KpnI. Luego se procedió a la ligación del fragmento 3' UTR, y una vez obtenido el producto de integración, el nuevo vector fue digerido con las enzimas SacII y NotI para la ligación con el fragmento 5' UTR. Imagen creada en Biorender. **B.** Diagrama del vector B3D+ *hsp27* KO FLAG. Se detallan los sitios de restricción relevantes en el proceso de generación del vector (SacII, NotI, BamHI, EcoRI, HindIII y KpnI) así como la resistencia a ampicilina (AmpR), la resistencia a pirimetamina (DHFR), la etiqueta peptídica FLAG y los fragmentos de interés 5' y 3' UTR del gen *Pbhsp27*.

Por último, una vez obtenido el vector con todos los elementos necesarios y luego de corroborar mediante secuenciación que la construcción era la deseada, utilizando los primers TgPro y T7 (Tabla 2 y tabla 4, sección 4.2 de Materiales y Métodos), la construcción se digirió con las enzimas SacII y KpnI y se realizó una purificación mediante kit de QIAGEN para obtener el ADN digerido que se utilizará en la transfección de los parásitos (Fig. 23).

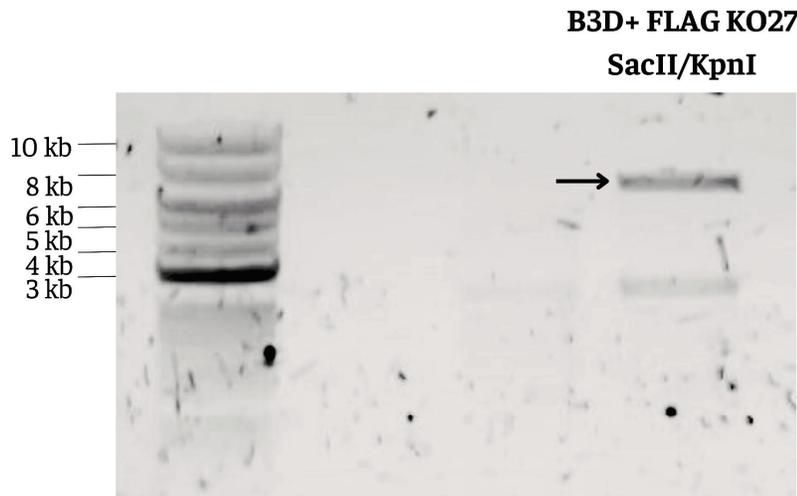


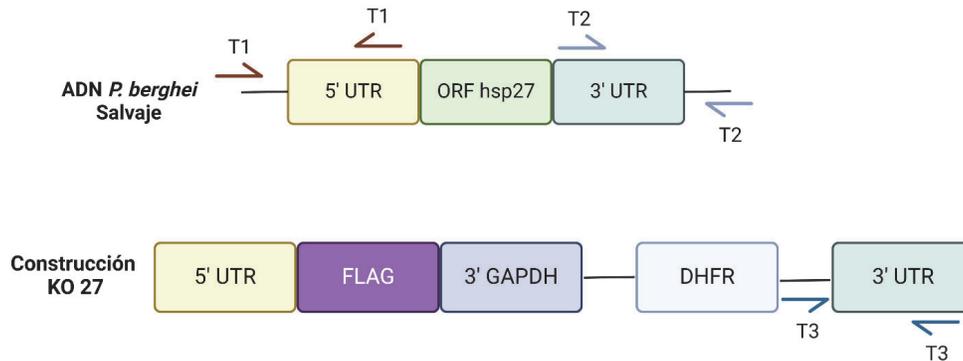
Figura 23: Preparación del vector para la transfección. Se corrió el vector digerido y purificado para utilizar en la transfección de estadios sanguíneos de *P. berghei*. Tamaño esperado para el fragmento que contiene la resistencia a pirimetamina flanqueada por el 5'UTR y el 3'UTR del gen de interés: 7306 pb. Se utilizaron ambos fragmentos en la reacción de transfección.

5.3.2 Generación y genotipificación de parásitos sanguíneos de *P. berghei* carentes de la proteína PbHSP27

Una vez realizada la transfección de parásitos, se realizó el seguimiento del ratón y al día 15 post-inoculación intravenosa de los parásitos transfectados, detectamos parásitos en la sangre del ratón por tinción de GIEMSA. Cuando la parasitemia alcanzó aproximadamente un valor de 3,8% (al día 18 post-inoculación), se procedió a la punción cardíaca del ratón y la obtención de la sangre, a partir de la cual se purificaron los estadios sanguíneos y luego el ADN genómico de los mismos, utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). Para determinar si la modificación genética había ocurrido correctamente, se utilizaron oligonucleótidos que aparean sólo sobre el locus *Pbhsp27* del genoma del parásito y no en el vector (denominados testing), así como oligonucleótidos que aparean sólo dentro del vector: un oligonucleótido que aparee sobre la etiqueta FLAG y otro entre la región del gen DHFR y el 3' UTR, denominado TgPro (Fig. 24A).

Primero se debieron evaluar las condiciones óptimas de amplificación de estos oligonucleótidos ya que era la primera vez que se realizaba genotipificación de parásitos en el laboratorio, y para ello se realizó una PCR sobre ADN genómico de una cepa salvaje de *P. berghei* (gADN WT) así como el vector B3D+ *hsp27* KO FLAG como control. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24B, que confirma que todos los oligonucleótidos se encontraban funcionando correctamente.

A.



B.

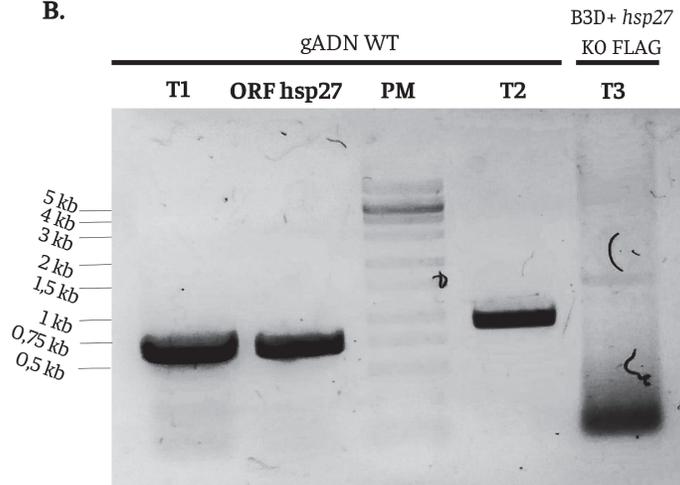


Figura 24: Puesta a punto de los pares de oligonucleótidos para la genotipificación de parásitos. A. Esquema de los oligonucleótidos utilizados durante la puesta a punto. Imagen creada en Biorender. B. Resultado de la PCR para el chequeo del funcionamiento de los oligonucleótidos. Como control positivo se amplificó el gen *Pbhsp27*. Se observa amplificación con todos los oligonucleótidos y templados utilizados.

Una vez corroboradas las condiciones óptimas de los primers, se procedió a realizar la reacción de PCR sobre el ADN genómico de los parásitos transfectados. Como se observa en la figura 25B, no hubo amplificación sobre el ADN genómico cuando se utilizaron los pares de oligonucleótidos que amplifican los 5' y 3' UTRs del locus del gen *hsp27* después de la inserción de nuestra construcción (locus transgénico), mientras que sí se amplificaron las regiones 3' y 5' UTR del locus WT de *hsp27*, los cuales se utilizaron como control positivo de la reacción de PCR, por lo que concluimos que no hubo integración de la construcción en el genoma los parásitos obtenidos.

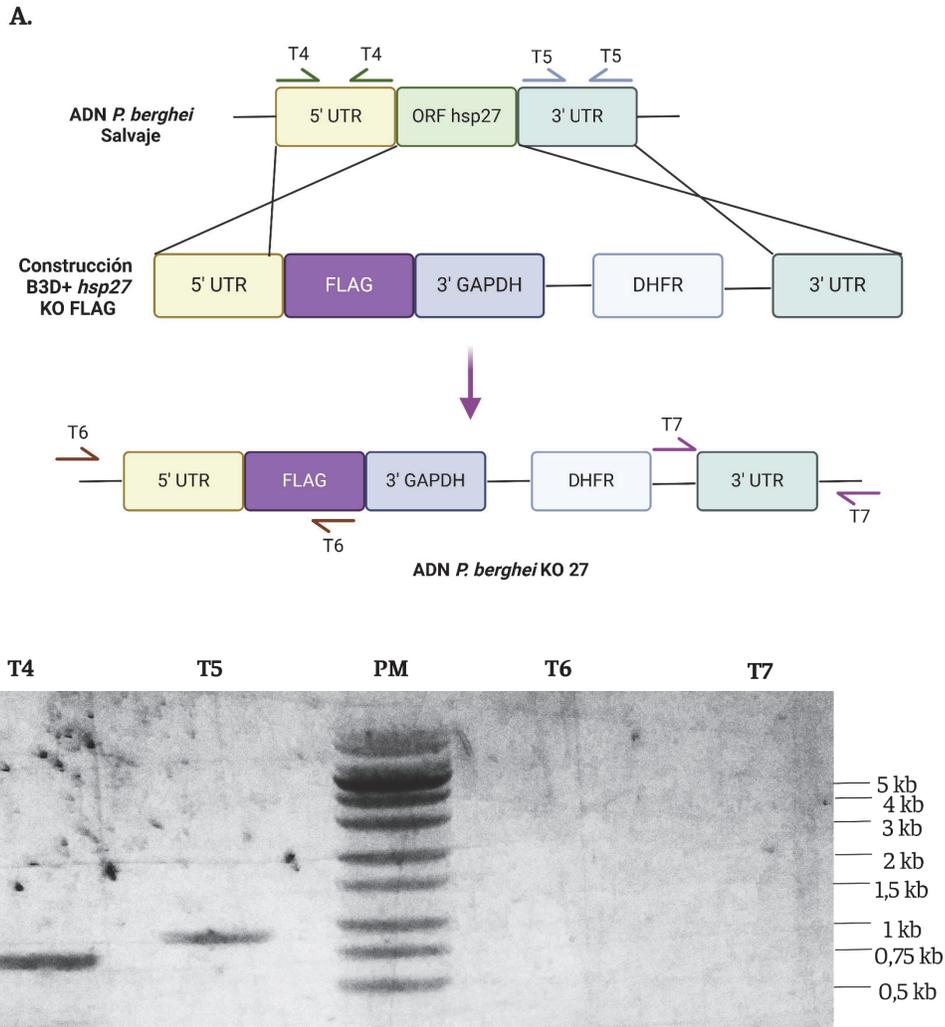
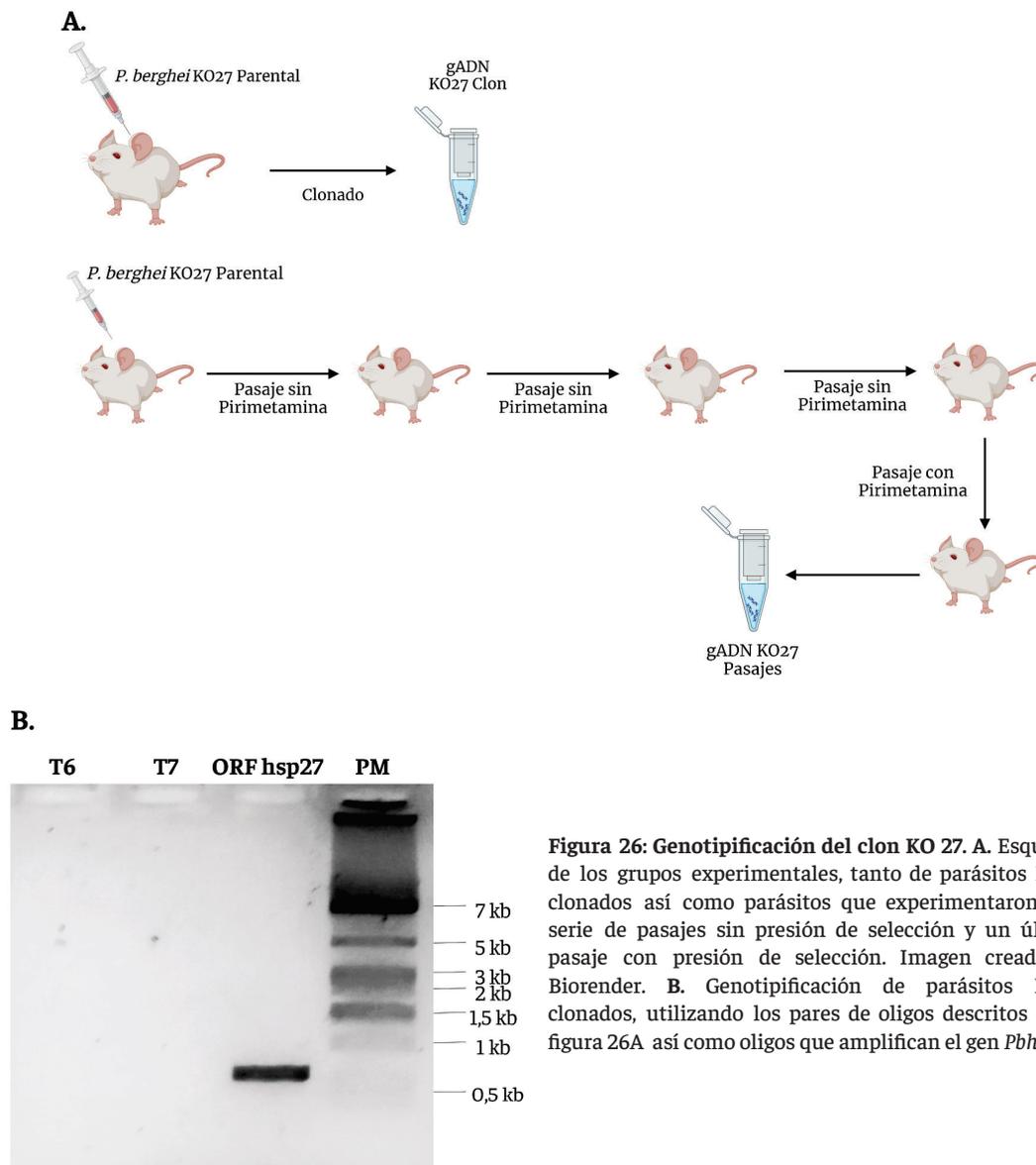


Figura 25: Genotipificación de la cepa parental de parásitos *hsp27* KO. **A.** Esquema de los oligonucleótidos utilizados en la genotipificación. Imagen creada en Biorender. **B.** Genotipificación de parásitos de *P. berghei* luego de la transfección. Se observa amplificación de las regiones 5' UTR y 3' UTR del gen *Pbhsp27* (T4 y T5), como control de que la reacción de PCR funcionó correctamente, pero no se observa amplificación al utilizar la combinación de oligonucleótidos que indica integración en el genoma (T6 y T7).

Para aislar una población de parásitos transgénicos clonales, se realizó una dilución de los parásitos parentales obtenidos. Se infectaron 8 ratones con el volumen de sangre adecuado para estimar que cada uno de ellos fueran inoculados con un único parásito, y se mantuvieron con pirimetamina en el agua de beber. De los 8 ratones inoculados, sólo uno mostró parásitos resistentes a pirimetamina, por lo cual se realizó punción cardíaca del ratón y se purificó el ADN genómico del clon. Paralelamente, para investigar la posibilidad de que estos parásitos sean resistentes debido a la presencia del plásmido episomal, se inoculó un ratón con la cepa parental de los parásitos transgénicos y se mantuvo en ausencia de presión de selección con pirimetamina. Cuando la parasitemia alcanzó entre 3 y 5%, se realizó una punción cardíaca y se realizaron 2 pasajes subsiguientes, siempre en ausencia del antibiótico, y finalmente se realizó un último pasaje en presencia de pirimetamina. Aquellos parásitos presentes en este último ratón se purificaron a partir de la sangre del mismo y se obtuvo el ADN genómico. Estos pasajes se

realizaron debido a que si los parásitos resistentes a pirimetamina obtenidos luego de la transfección lo eran debido a la incorporación del plásmido y no a la integración de la resistencia en el genoma, los pasajes en ausencia de antibiótico son una forma de lograr que los parásitos eliminen el plásmido, y solo sobrevivan en el último pasaje aquellos que hayan incorporado la resistencia en el genoma⁶⁷.

Procedimos a realizar ensayos de PCR utilizando tanto el ADN genómico del clon (gADN KO27 Clon 4) así como el de los parásitos que atravesaron los pasajes sin pirimetamina (gADN KO27 Pasajes). Al genotipificar los parásitos provenientes del ensayo de clonado, no se observó amplificación para los pares de oligonucleótidos correspondientes al evento de integración en el genoma y se obtuvo amplificación al utilizar los oligonucleótidos que amplifican el gen *Pbhsp27* (Fig. 26B).



Por otro lado, para determinar la presencia del episoma, se realizó una PCR tanto sobre el gADN KO27 clon así como gADN KO27 pasajes, utilizando los pares de oligonucleótidos descritos en la figura 25A. Se observó amplificación para la región comprendida entre el 5' UTR de *Pbhsp27* y la etiqueta FLAG al utilizar gADN KO27 Clon, pero no se observó cuando se utilizó el par de oligonucleótidos que amplifican sobre la región del plásmido cercana al 3' UTR del gen *Pbhsp27* (Fig. 27A). Por último, para determinar si los parásitos seleccionados luego de los pasajes sin pirimetamina sobrevivieron gracias a una mutación espontánea o a la presencia del episoma, se realizó un ensayo de PCR utilizando oligonucleótidos que hibridan sobre el 3' UTR del gen *gapdh* y sobre la etiqueta FLAG (Tabla 2). Se observa en la figura 27 B que tanto para el gADN KO27 Clon como para el gADN Pasajes se obtuvo producto de amplificación, lo que confirma que los parásitos aún luego de los pasajes sin antibiótico conservaron el plásmido.

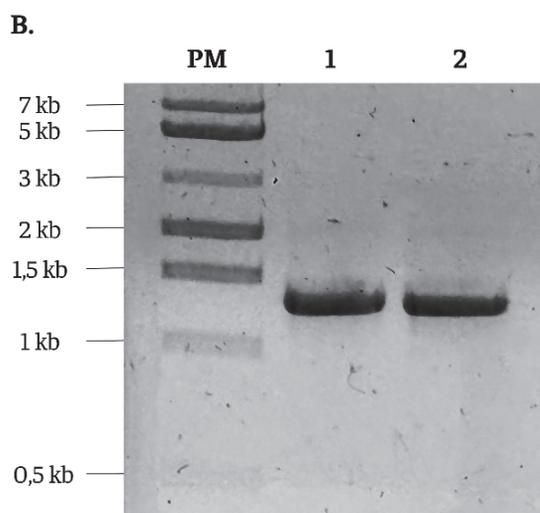
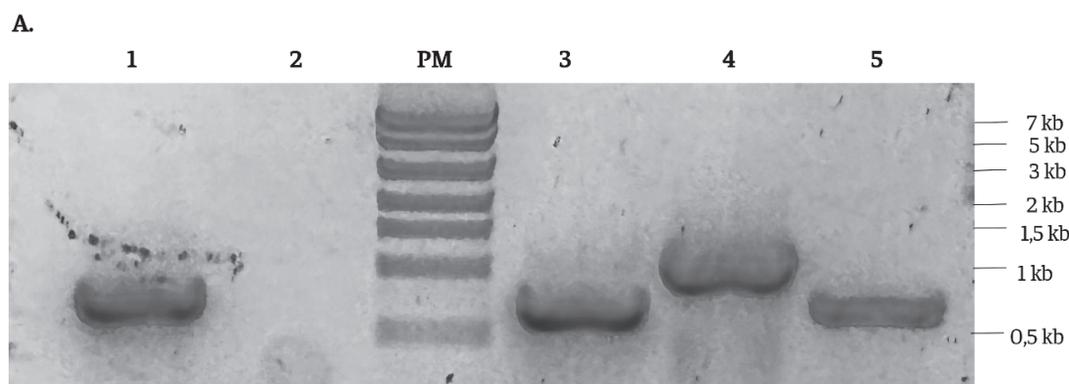


Figura 27: Determinación de la presencia de un episoma. **A.** Determinación de la presencia de ADN episomal en el grupo de parásitos KO27 que pasaron por el procedimiento de clonado (gADN KO27 Clon). Calle 1: Amplificación del fragmento 5' UTR hsp27 - FLAG sobre gADN Clon. Calle 2: Amplificación del fragmento TgPro - 3' UTR hsp27 sobre gADN Clon. Calle 3: Amplificación del fragmento 5' UTR hsp27 - FLAG sobre el vector B3D+ *hsp27* KO FLAG. Tamaño esperado: 703 pb. Calle 4: Amplificación del fragmento TgPro - 3' UTR hsp27 sobre el vector B3D+ *hsp27* KO FLAG. Tamaño esperado: 1160 pb. Calle 5: Amplificación del ORF del gen *Pbhsp27* sobre gADN Clon. Tamaño esperado: 702 pb. **B.** Amplificación utilizando oligonucleótidos que permitan obtener el 3' UTR del gen *gapdh* y la etiqueta FLAG contenidos dentro del episoma. Calle 1: gADN KO 27 Clon. Calle 2: gADN KO 27 Pasajes. Se observa amplificación para ambos templados del tamaño esperado del fragmento (1310 pb).

5.4 Generación de parásitos transgénicos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG

Debido a que los ooquistos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a mCherry no se desarrollan correctamente, consideramos la hipótesis de que tal vez la etiqueta mCherry esté impidiendo la función normal de HSP27, interfiriendo con su capacidad de oligomerización por ejemplo. Para ello, nos planteamos cambiar la etiqueta por una de tamaño más pequeño. Por lo tanto, se decidió generar una línea de parásitos transgénicos que sobreexpresan PbHSP27 pero esta vez fusionada a la etiqueta FLAG.

5.4.1 Clonado de la construcción B3D+ HSP27 FLAG para la producción de parásitos transgénicos

Se obtuvo el inserto que contenía la región 5'UTR-ORF hsp27 mediante una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos detallados en la tabla 3, y como templado se utilizó un vector que contenía ambos fragmentos, los cuales se encontraban secuenciados. Al finalizar la reacción de PCR, se corroboró la amplificación del producto deseado mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% (Fig. 28A). Luego se procedió a la digestión, tanto del inserto como del vector, con las enzimas SacII y SpeI (New England Biolabs), y una vez purificados mediante el kit QIAmp DNA Micro (QIAGEN), se realizó la ligación y posteriormente la transformación de *E. coli* químicamente competentes con el producto de ligación.

Para corroborar si se incorporó el inserto correctamente dentro del vector, una vez obtenido el ADN plasmídico a partir de colonias transformadas, este se digirió utilizando las enzimas BamHI y KpnI (New England Biolabs), por lo que si el inserto fue incorporado al vector, se deberían de obtener una banda de 5839 pb y otra de 4236 pb, mientras que si el ADN plasmídico correspondía a vector sin inserto, los productos de la digestión deberían ser de 5839 pb y 2969 pb. Al chequear 24 colonias, se observó que el clon 20 presentaba el patrón de bandas correspondientes con la incorporación de inserto en el vector (Fig. 28B). Sin embargo, debido a que la digestión fue parcial, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos que permiten amplificar la secuencia del gen *Pbhsp27* para corroborar el resultado positivo (Fig. 28C).

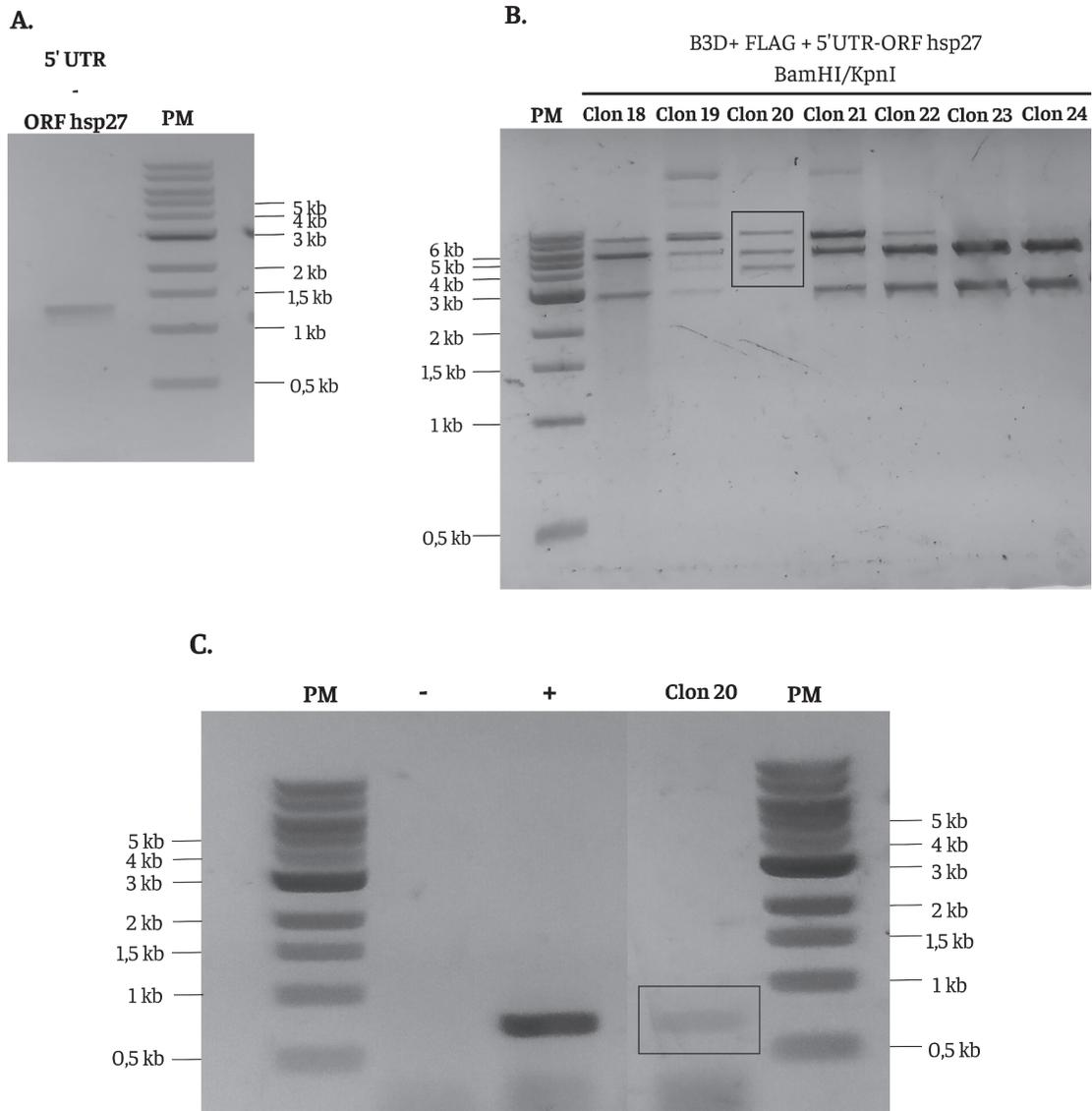


Figura 28: Ligación del inserto 5' UTR-ORF hsp27 dentro del vector B3D+ FLAG. A. Amplificación por PCR del fragmento que contiene la región 5' UTR de *Pbhsp27* seguido del ORF de *Pbhsp27*, el cual presenta un tamaño de 1302 pb. B. Chequeo de presencia del inserto dentro del vector utilizando las enzimas BamHI y KpnI. Se encuentra recuadrado el clon positivo. C. Amplificación por PCR del gen *Pbhsp27* para corroborar la presencia del inserto en el clon 20. Se utilizó como control negativo el vector vacío, y como control positivo se utilizó el vector que previamente se había utilizado de templado en la obtención del inserto.

Por último, se secuenció el vector generado utilizando un oligonucleótido complementario a la secuencia de la etiqueta FLAG, para confirmar que la secuencia incorporada en el vector fuera la correcta.

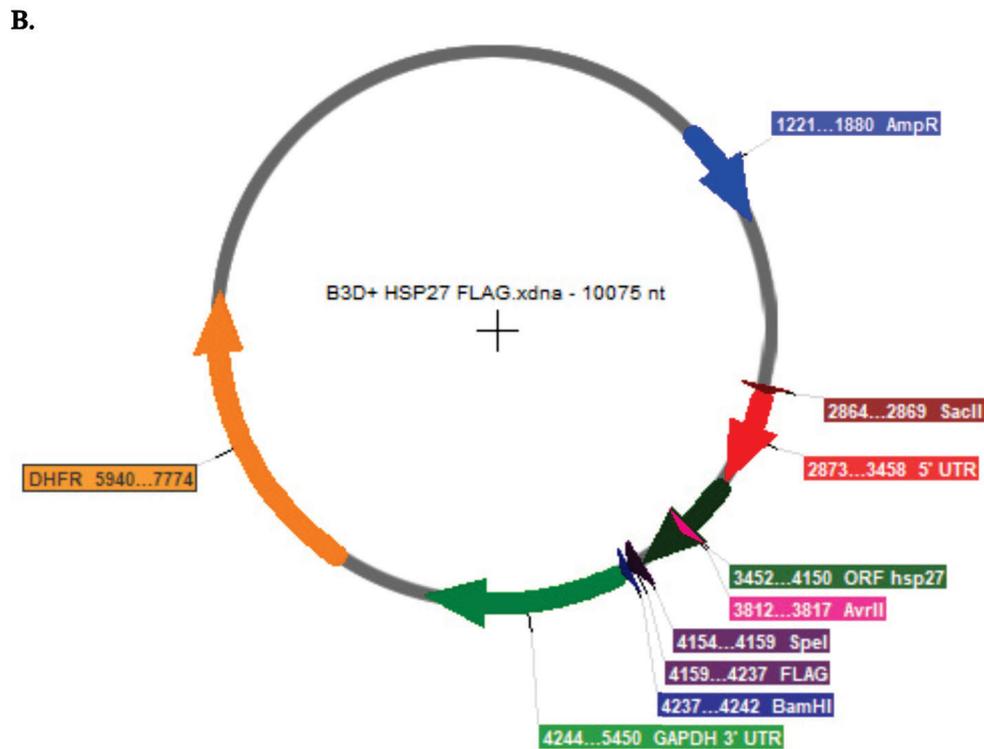
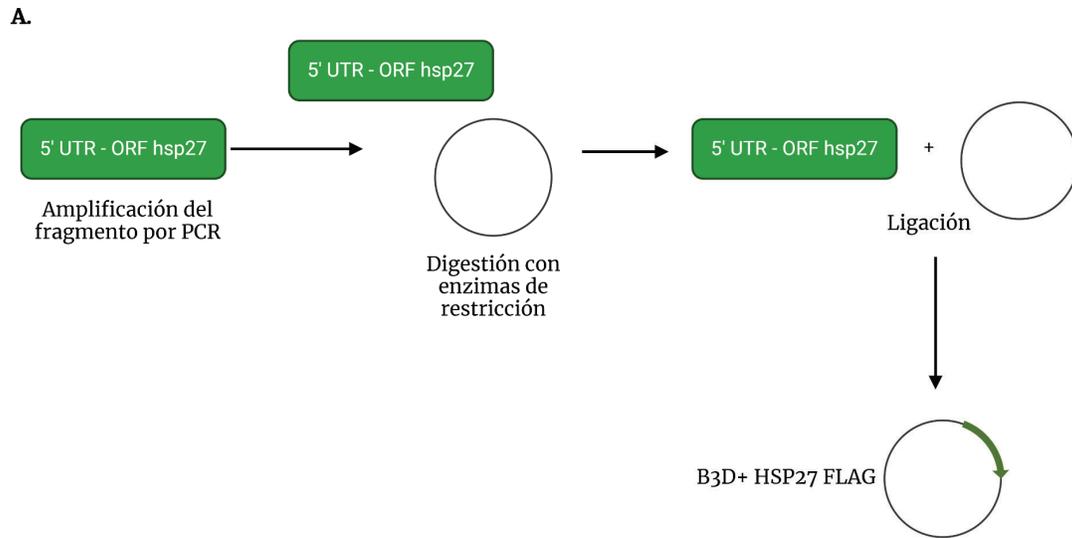


Figura 29: Construcción del vector B3D+ HSP27 FLAG A. Estrategia de clonado para la construcción del vector. Se comenzó amplificando el fragmento que contiene la región 5' UTR y el ORF hsp27. Una vez obtenido el fragmento, este se digirió al igual que el vector B3D+ FLAG con las enzimas SacII y SpeI, para luego ligar ambos elementos, obteniendo el vector final. Imagen creada en Biorender. B. Diagrama del vector final, detallando los sitios de restricción relevantes durante la construcción del vector (SacII, AvrII, SpeI y BamHI) así como la resistencia a ampicilina (AmpR), la resistencia a pirimetamina (DHFR), la etiqueta peptídica FLAG y los fragmentos de interés 5' UTR y el ORF del gen *Pbhsp27*.

5.4.2 Generación de parásitos sanguíneos de *P. berghei* que sobreexpresan la proteína PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG

El vector B3D+ HSP27 FLAG fue digerido con la enzima AvrII (New England Biolabs) para obtener un producto lineal que permita que, una vez introducido dentro del parásito, ocurra un evento de recombinación simple mediante la homología entre las regiones 5' UTR del gen *Pbbsp27* (Fig. 30). Se intentó tres veces realizar la transfección de parásitos con este producto de ADN sin éxito, por lo que no se pudieron obtener poblaciones transgénicas que sobreexpresen PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG.

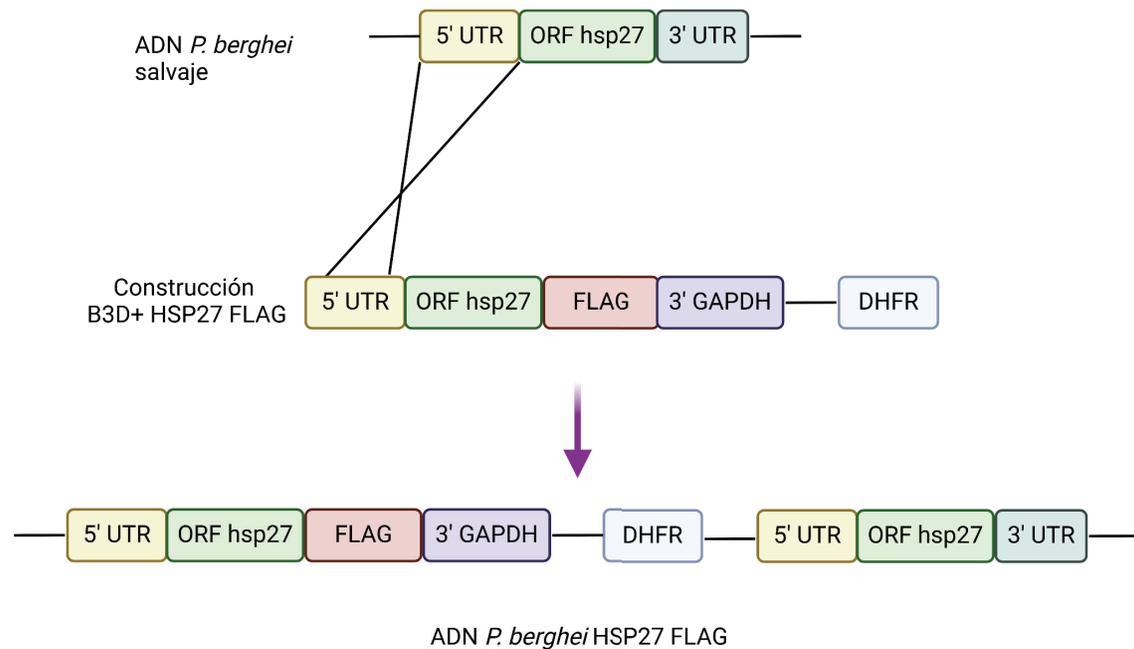


Figura 30: Generación de parásitos que sobreexpresan PbHSP27 fusionada a la etiqueta FLAG. Esquema de la generación de parásitos sanguíneos de *P. berghei* mediante un evento simple de recombinación homóloga a partir del producto generado por la linealización del vector B3D+HSP 27 FLAG al digerirlo con la enzima de restricción AvrII. Imagen creada en Biorender.

5.5 Estudio de la función de PbHSP27 en ooquistos mediante la expresión condicional del gen *Pbbsp27*

Dado que la proteína PbHSP27 pareciera tener un rol esencial en los estadios sanguíneos, generar ooquistos que no posean el gen de esta proteína mediante un evento de recombinación homóloga no sería factible ya que la transfección se realiza durante los estadios sanguíneos, y si no se obtienen estadios sanguíneos KO para el gen *Pbbsp27*, no se obtendrán ooquistos posteriormente. Por lo tanto, para poder estudiar la función de PbHSP27 en ooquistos, se utilizó una estrategia de expresión condicional de PbHSP27 en ooquistos, mediante la estrategia de cambio del promotor. Para ello utilizamos el promotor *Pbama-1*, el cual se expresa durante los estadios sanguíneos pero no en los estadios de ooquistos, lo que permitirá evaluar el fenotipo de ooquistos carentes de PbHSP27⁶⁸.

5.5.1 Síntesis del vector B3D+ *ama* HSP27 FLAG para la generación de parásitos transgénicos

Para diseñar el vector necesario, se obtuvieron por PCR los fragmentos 5' UTR de *Pbbsp27*, 5'UTR de *Pbama1* y ORF de *hsp27*. Se utilizó el mismo fragmento 3' UTR de *Pbbsp27* que se utilizó previamente en la síntesis del vector B3D+ *hsp27* KO FLAG. Se utilizó ADN genómico de *P. berghei* salvaje como templado, y los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 4. La correcta amplificación de los insertos se corroboró corriendo una alícuota de cada reacción de PCR en un gel de agarosa 0,8% (Fig. 31). Cada inserto fue digerido con las enzimas correspondientes (Tabla 4).

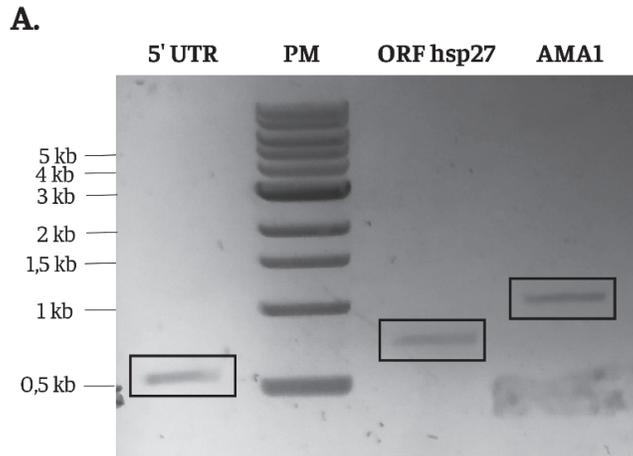


Figura 31: Obtención de insertos para la construcción del vector B3D+ *ama* HSP27 FLAG. Los productos se encuentran encuadrados. 5' UTR: amplificación del fragmento 5' UTR del gen *Pbbsp27*. Tamaño esperado: 568 pb. ORF hsp27: amplificación del gen *Pbbsp27*. Tamaño esperado: 735 pb. AMA1: amplificación del fragmento 5' UTR del gen *Pbama-1*. Tamaño esperado: 1041 pb.

Paralelamente se digirió el vector B3D+ FLAG con las enzimas HindIII y KpnI (New England Biolabs) para incorporar el fragmento 3' UTR de *Pbbsp27* generado previamente. Se obtuvieron 10 colonias que incorporaron el vector, y el ADN plasmídico de cada clon fue chequeado para la incorporación del inserto utilizando las enzimas HindIII y KpnI, por lo que si estaba presente este fragmento 3' UTR de *Pbbsp27*, el mismo iba a ser liberado. En la figura 32 A se puede observar que los clones 2, 4, 5 y 8 liberaron un fragmento que podría corresponder al 3' UTR de *Pbbsp27*. Para corroborarlo, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos que permitan amplificar este fragmento, y en la figura 32 B se observa que únicamente al utilizar el clon 4 como templado se obtuvo amplificación para ese fragmento.

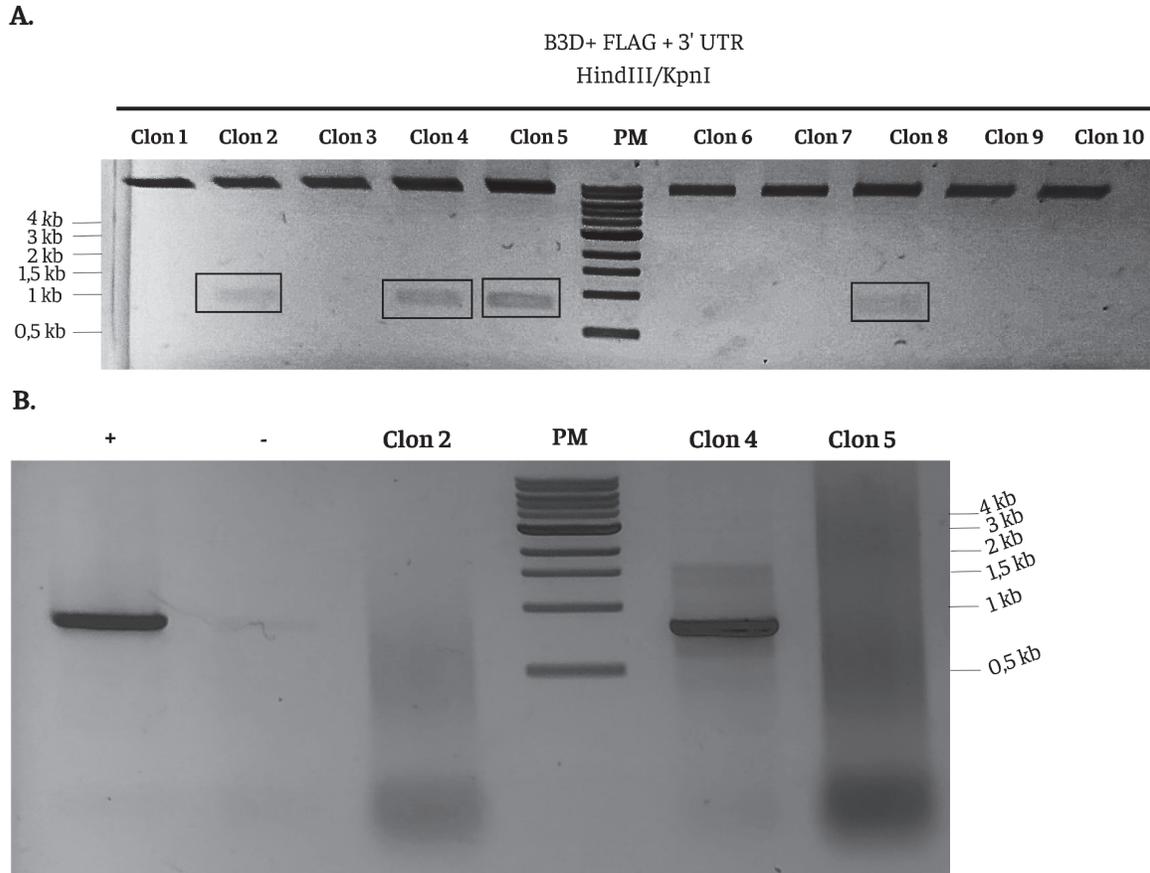


Figura 32: Obtención de insertos y ligación de 3' UTR del gen *Pbhsp27*. **A.** Análisis de la ligación entre el vector B3D+ FLAG y el inserto 3' UTR del gen *Pbhsp27* utilizando las enzimas de restricción HindIII/KpnI. Los clones 2, 4, 5 y 8 son positivos. **B.** Amplificación por PCR del fragmento 3' UTR del gen *Pbhsp27* (Tamaño esperado: 807 pb) para los clones positivos. Control positivo (+): B3D+ *hsp27* KO FLAG. Control negativo (-): Clon 10.

A continuación se digirió el clon 4 con las enzimas SacII y NotI para proseguir con la ligación del fragmento 5' UTR del gen *Pbama-1* (AMA). Una vez realizada la ligación y transformación de bacterias con el producto de la ligación, se obtuvieron 11 colonias resistentes a ampicilina. Luego se obtuvo el ADN plasmídico de todos los clones y se procedió a chequear la presencia del inserto mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción BamHI y KpnI. Se identificó un clon positivo, ya que si el vector no poseía el inserto AMA se debían obtener dos bandas de un peso molecular de 6614 y 2968 pb, mientras que si el vector poseía el inserto AMA, los fragmentos debían de tener un tamaño de 6614 y 3982 pb (Fig. 33A). El clon 2 fue chequeado nuevamente mediante PCR, donde se utilizó un oligonucleótido que reconoce la secuencia del AMA (5'UTR AMA Forward) y un oligo que reconoce una secuencia de la etiqueta FLAG (Flag Reverse). Se observa en la figura 33 B que el clon 2 fue positivo para la amplificación por PCR, ya que se obtuvo un fragmento del peso esperado (1130 pb), por lo que posee el inserto 5' UTR del gen *Pbama-1* y además está orientado de forma correcta.

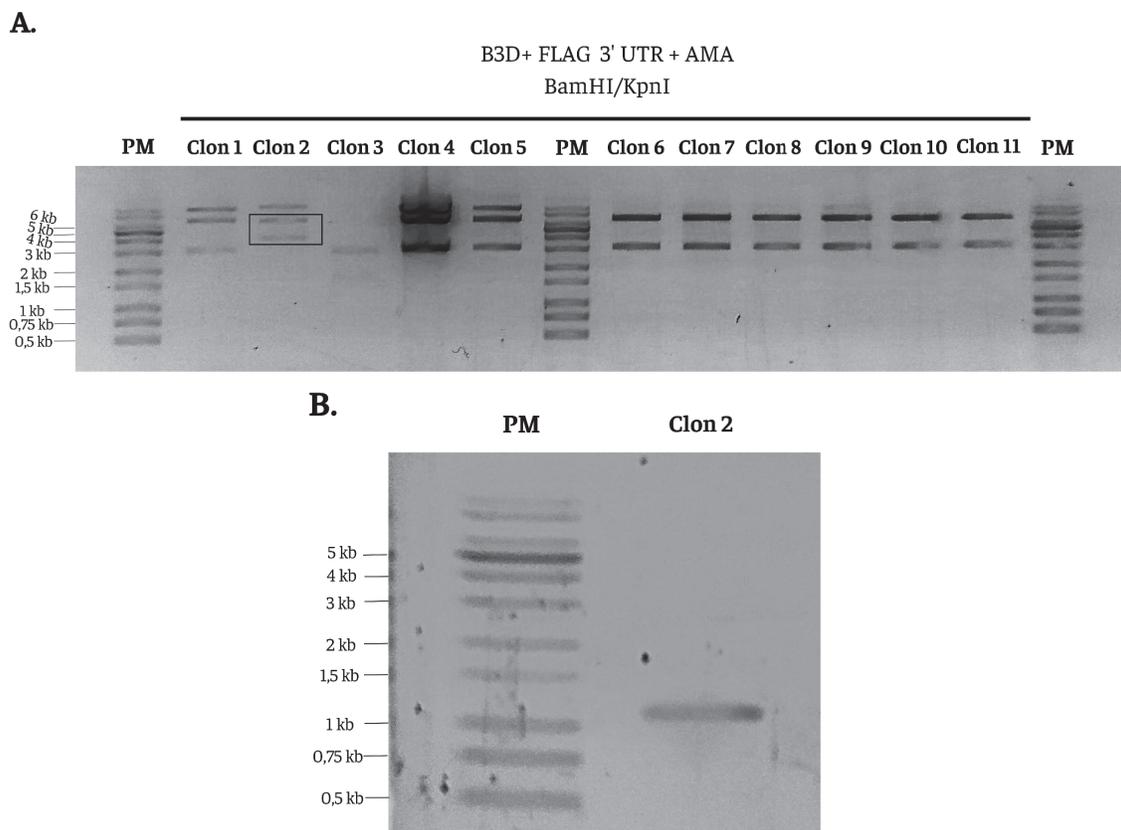


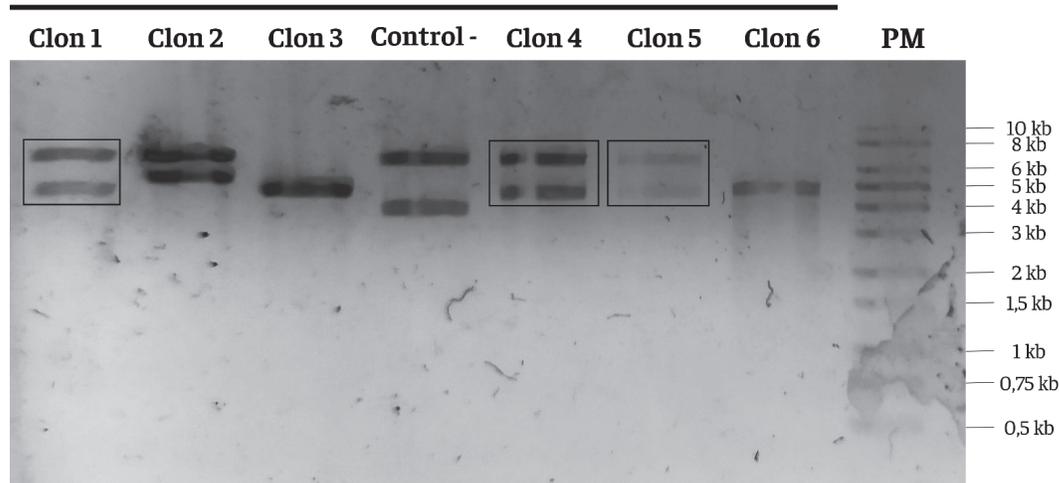
Figura 33: Ligación del inserto 5'UTR del gen *Pbama-1*. A. Chequeo utilizando las enzimas de restricción BamHI/KpnI para determinar los clones que hayan incorporado el gen *Pbama-1*. Se observa que el clon 2 es positivo para la integración del gen. B. Resultado de la reacción de PCR para amplificar el fragmento que contiene al 5'UTR del gen *Pbama-1* seguido de la secuencia de la etiqueta FLAG, el cual en total tiene un peso molecular estimado de 1130 pb.

A continuación, se procedió a ligar el inserto correspondiente al marco de lectura abierto de *Pbbsp27* (ORF hsp27) en el vector derivado del clon 2. Se obtuvieron 6 colonias positivas para la resistencia a ampicilina y a partir del ADN plasmídico extraído de cada colonia, se chequeo la presencia del inserto ORF hsp27 utilizando las enzimas de restricción BamHI y KpnI. Si el vector contenía el inserto ORF hsp27 se debían obtener dos bandas, una de un peso de 6614 pb y otra de 4686 pb, mientras que si no estaba presente el inserto, el resultado debía ser una banda de 6614 pb y otra de 3982 pb.

Como se observa en la figura 34 A, los clones 1, 4 y 5 fueron positivos para la presencia del inserto. Para comprobar la inserción, los clones 1, 4 y 5 fueron digeridos nuevamente utilizando las enzimas de restricción BamHI y SacII, donde si realmente contenían el inserto ORF hsp27, se debía de obtener una banda de 9000 pb y otra banda de 1800 pb, mientras que si no poseían el inserto, las bandas debían presentar un peso molecular de 9000 pb y 1100 pb. Como se observa en la figura 34 B, los tres clones fueron positivos para la incorporación del inserto ORF hsp27, ya que se observa la banda de 1800 pb, siendo el clon 4 el que presentaba la mayor concentración de ADN, por lo cual se utilizó ese clon para proceder con la ligación del inserto 5' UTR *hsp27*.

A.

B3D+ FLAG 3' UTR AMA + ORF hsp27
BamHI/KpnI



B.

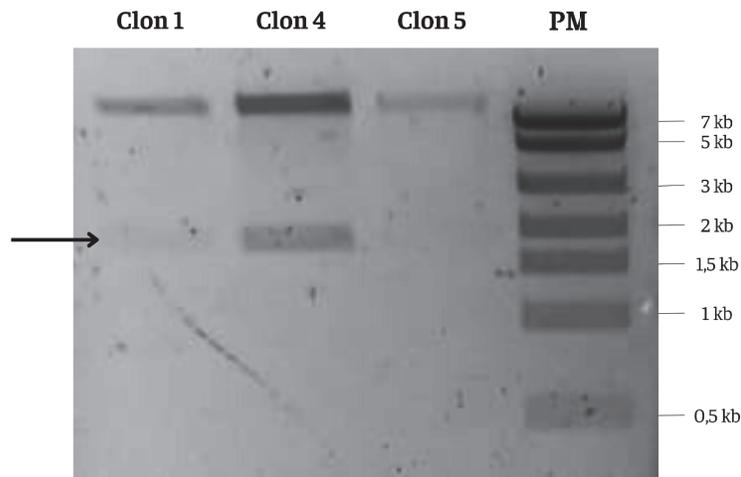


Figura 34: Ligación del marco abierto de lectura del gen *Pbhsp27*. **A.** Chequeo utilizando las enzimas de restricción BamHI/KpnI para determinar los clones que hayan incorporado el ORF hsp27. Se observa que los clones 1, 4 y 5 son positivos para la integración del gen. **B.** Chequeo utilizando las enzimas de restricción BamHI y SacII, donde se observa que los 3 clones (1, 4 y 5) son positivos para la incorporación del ORF del gen *Pbhsp27* ya que liberan un fragmento de aproximadamente 1800 pb.

Por último, para la incorporación del fragmento 5' UTR del gen *Pbhsp27* purificado y digerido con SacII, se digirió el clon 4 con la enzima SacII y se purificó. Luego se procedió con la ligación de ambos, transformando el producto de ligación. Se obtuvieron 12 colonias resistentes a ampicilina. Estas colonias fueron chequeadas por la presencia de inserto utilizando la enzima EcoRI, la cual tiene un sitio de corte dentro del vector y otro sitio de corte dentro del inserto 5' UTR del gen *Pbhsp27* de manera que si el inserto fue incorporado al vector, se deberían obtener dos bandas (una de 8429 pb y otra de 3427 pb) mientras que si el inserto no fue incorporado al vector, se debería obtener una banda de aproximadamente 11300 pb correspondiente a vector linealizado.

En la figura 35 A se observa que los clones 1 y 6 son positivos para la incorporación del inserto 5' UTR del gen *Pbhsp27*. Debido a que el inserto se incorporó utilizando únicamente la enzima de restricción *SacII*, se debió chequear la orientación del inserto para corroborar que haya sido la correcta. Para ello, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos T7 universal, el cual tiene homología con una secuencia del vector que se encuentra río arriba del sitio de clonado *SacII*, y el oligonucleótido 5'UTR HSP27 Reverse (Tabla 3), por lo que si el fragmento se encontraba orientado de forma correcta se debía obtener un producto de amplificación de 610 pb, mientras que si el inserto se encontraba orientado al revés, no se debería obtener producto de amplificación. En la figura 35 B se observa que el clon 6 posee el inserto en la dirección correcta.

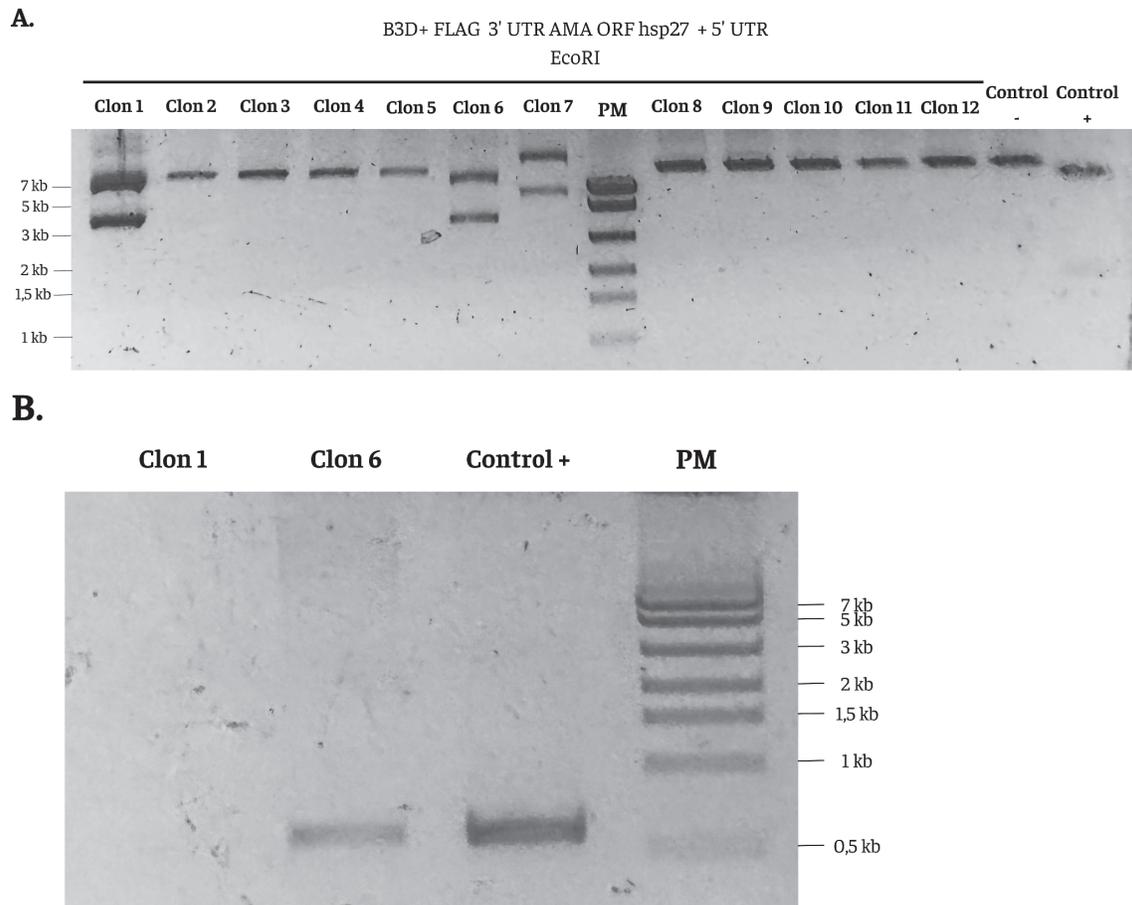
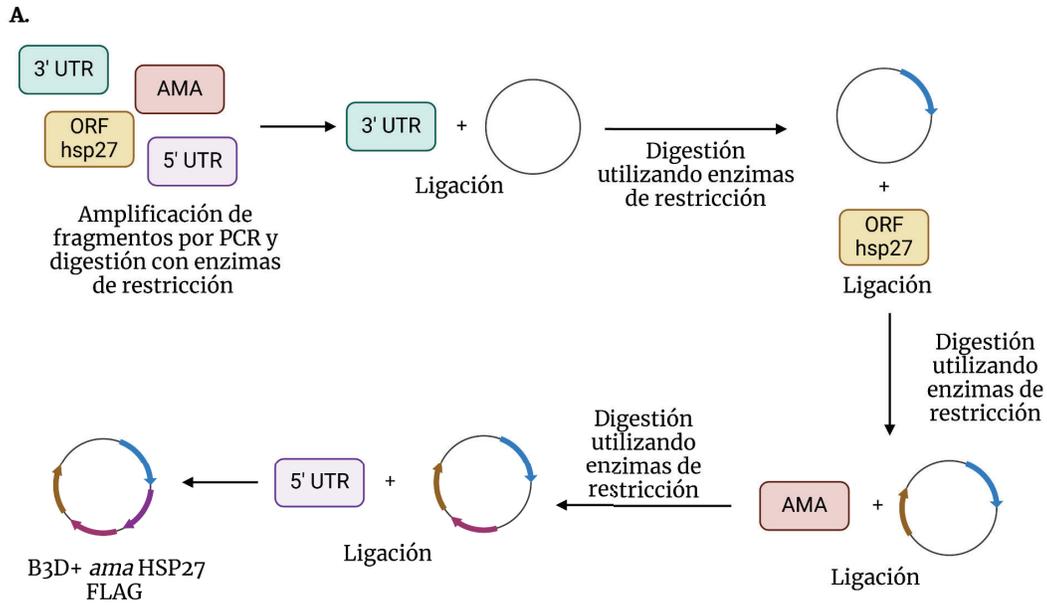


Figura 35: Ligación y chequeo de orientación del inserto 5' UTR hsp27. A. Chequeo utilizando la enzima de restricción *EcoRI* para determinar los clones que hayan incorporado el fragmento 5' UTR hsp27. Se observa que los clones 1 y 6 son positivos para la integración del fragmento, ya que al digerir se liberó una banda de aproximadamente 3427 pb. **B.** Reacción de PCR para determinar la orientación del fragmento 5' UTR hsp27, utilizando los primers T7 universal y 5'UTR hsp27 Reverse *SacII*. Se obtuvo producto de amplificación únicamente en el clon 6, por lo que ese clon posee el fragmento orientado en la dirección correcta. Control +: B3D+ *hsp27* KO FLAG.



B.

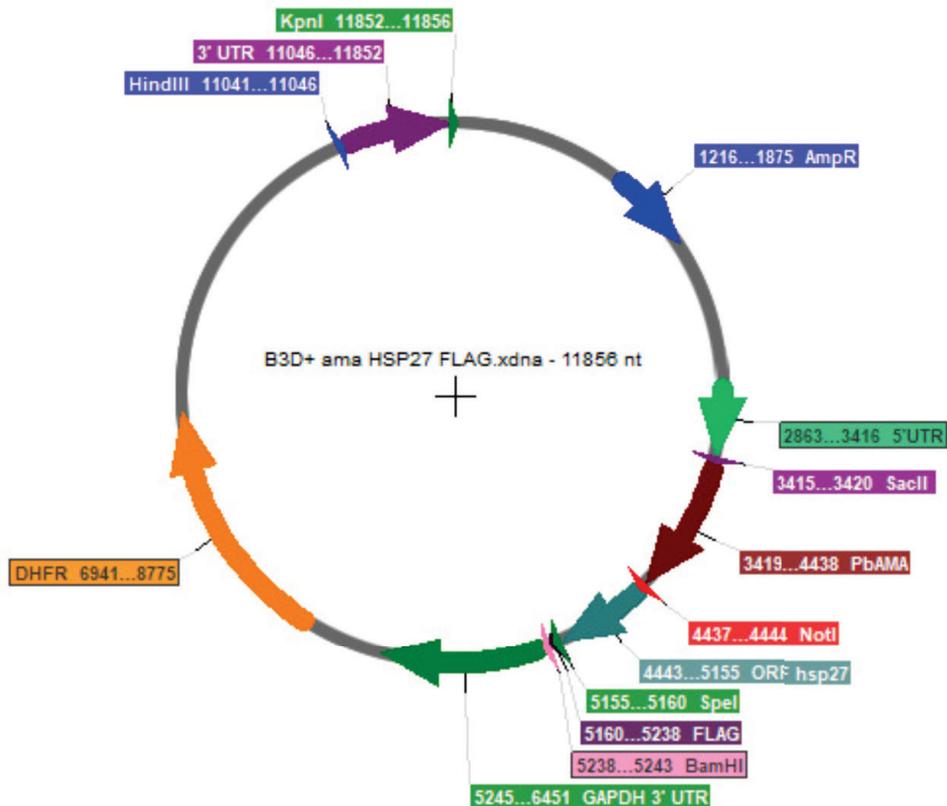


Figura 36: Construcción del vector B3D+ *ama* HSP27 FLAG. **A.** Estrategia de clonado para la construcción del vector. Se comenzó amplificando los fragmentos de interés mediante PCR. **5' UTR:** región correspondiente al gen *Pbhsp27*. **3' UTR:** región correspondiente al gen *Pbhsp27*. **AMA:** 5' UTR correspondiente al gen *Pbama-1*. **ORF hsp27:** corresponde al gen *Pbhsp27*. **B.** Diagrama del vector final, detallando los sitios de restricción relevantes durante la construcción del vector (SacI, AvrII, SpeI, BamHI, HindIII, KpnI) así como la resistencia a ampicilina (AmpR), la resistencia a pirimetamina (DHFR), la etiqueta peptídica FLAG y los fragmentos de interés.

6. Discusión

6.1 La proteína PbHSP27 se expresa tanto en estadios de esquizontes como ooquinetos de *P. berghei*.

Para evaluar la expresión de la proteína PbHSP27 en estadios sanguíneos se utilizaron 4 sueros policlonales anti-PbHSP27 obtenidos previamente por la Dra. Virginia Balouz en el laboratorio del Dr. Carlos Buscaglia. Se comenzó comprobando la especificidad de los 4 sueros utilizando muestras de esquizontes salvajes, donde se obtuvo que el suero 3 es el de mayor especificidad (Fig. 13A), lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente en muestras de ooquinetos por K. Caruso (Fig. 11A)⁶².

Como se muestra en la Figura 13A, este anticuerpo reconoció una banda más ancha por debajo del marcador de 58 kDa que podría corresponder a un dímero, y otra muy tenue a la altura aproximada de 32 kDa, que podría corresponder al monómero de la proteína PbHSP27. Al aumentar las concentraciones de agentes reductores presentes en las muestras de esquizontes, no pudimos observar la PbHSP27 en estado monomérico aunque haya desaparecido la banda ubicada entre 58 y 46 kDa observada en la figura 13A, sino que se observó una única banda con un peso de entre 58 y 80 kDa, que podría corresponder a un dímero que a su vez posea modificaciones post-traduccionales que no hayan podido ser clivadas aun frente al aumento de las condiciones reductoras⁶⁹ (Fig. 13B). En ensayos de WB realizados para analizar sHSPs en *T. gondii*⁶⁰ se observa un patrón de bandas similar a los obtenidos en estos ensayos, ya que al utilizar anticuerpos anti-sHSPs de *T. gondii* se obtuvieron bandas con una migración variable, que podría corresponder tanto a la presencia de modificaciones post-traduccionales como a la formación de oligómeros. Por otro lado, se ha descrito que para degradar los oligómeros formados por sHSPs se requieren concentraciones altas de SDS⁷⁰, por lo que para futuros ensayos de Western Blot se debería desnaturalizar a las muestras utilizando concentraciones de SDS mayores a 1 mM. Suponemos que las bandas reconocidas por el suero 3 son específicas de los estadios sanguíneos de *P. berghei*, ya que no se observa ninguna banda en la calle correspondiente al control que contiene sangre purificada de ratón no infectado, por lo que descartamos que el suero 3 reconozca otros elementos correspondientes a la sangre de ratón. Además agregamos como control adicional un cultivo *in vitro* el cual contenía gametocitos pero no ooquinetos y no se detectó ninguna banda, lo que concuerda con los resultados previos de expresión de PbHSP27 obtenidos mediante estudios de inmunofluorescencia (Fig. 9)⁶².

Al utilizar el suero 3 para analizar la presencia de PbHSP27 por WB en estadios de ooquinetos (Fig. 14B), observamos la presencia de una doble banda a la altura del marcador 25 kDa que coincide con lo reportado anteriormente (Fig. 11B). Esta doble banda podría deberse a posibles modificaciones post-traduccionales de la proteína, ya que al realizar predicciones encontramos dos sitios de acetilación con un score > 1 con el programa PAIL (Prediction of Acetylation on Internal Lysines) y múltiples sitios de fosforilación con un score > 0.9 utilizando el programa NetPhos 2.0 Server (Figura 8A). En este sentido, en la Fig. 11A y en la Fig. 13B, correspondiente a los estadios sanguíneos, se observa una banda delgada entre los marcadores de 58 y 80 kDa en la calle correspondiente al suero 3, que podría corresponder al tamaño de un dímero que también contenga modificaciones post-traduccionales.

Dado que para la generación de la línea transgénica de parásitos de HSP27 mCherry se usó una estrategia de inserción (un solo evento de recombinación, Fig 8B) estos parásitos expresan una copia de PbHSP27 fusionada a mCherry además de la copia endógena de PbHSP27. Para analizar la expresión de la proteína PbHSP27 fusionada a mCherry utilizamos dos anticuerpos anti-mCherry, un anticuerpo monoclonal comercial y un anticuerpo policlonal obtenido en el laboratorio, ambos hechos en ratón. De los resultados obtenidos concluimos que tanto el anticuerpo monoclonal comercial anti-mCherry como el anticuerpo policlonal presenta una alta inespecificidad para las muestras tanto sanguíneas como de ooquistos de *P. berghei* (datos no mostrados). La presencia de ambas formas, PbHSP27 endógena y PbHSP27 mCherry en ooquistos transgénicos hsp27 mCherry ya habían sido demostradas previamente en el laboratorio mediante ensayos de WB utilizando un anticuerpo anti-mCherry policlonal comercial (ab167453, ABCAM). Lamentablemente, no contamos actualmente con este anticuerpo en el laboratorio por lo tanto no pudimos repetir estos ensayos en las mismas condiciones.

Comparando todos los ensayos de Western Blot realizados, se aprecia que para el caso particular de las muestras de estadios sanguíneos de *P. berghei*, el revelado del WB utilizando fluorescencia y el equipo Odyssey DLx funciona correctamente, mientras que para muestras de ooquistos resultó mejor el revelado mediante quimioluminiscencia. Esto concuerda con la literatura, ya que el revelado por quimioluminiscencia tiene una sensibilidad mayor respecto al revelado utilizando fluorescencia⁷¹, por esta razón muestras de ooquistos (10^3 - 10^5 ooquistos) que poseen una menor concentración de parásitos respecto a los estadios sanguíneos (20×10^6 - 50×10^6 RBCs) se detectan con quimioluminiscencia y no por fluorescencia.

Debido a que no pudimos observar en ningún ensayo de WB, tanto los revelados con el suero 3 anti-HSP27 así como los revelados con los anticuerpos anti-mCherry, la banda correspondiente a la proteína HSP27 fusionada a mCherry, también consideramos la posibilidad de que el parásito esté enviando la proteína de fusión PbHSP27-mCherry a rutas de degradación.

6.2 La sobreexpresión de PbHSP27 fusionada a la proteína mCherry impide el desarrollo normal de ooquistos

Durante el protocolo de obtención de ooquistos, la modificación crítica que realizamos y que resultó en la optimización de este proceso fue el agregado de un pasaje previo de los parásitos de interés criopreservados por un ratón BALB/c antes de infectar los ratones C57BL/6 utilizados para el cultivo *in vitro* de ooquistos. Concluimos que al utilizar parásitos metabólicamente activos estos logran seguir una curva de infección más aproximada a la descrita en la literatura para los ratones C57BL/6³⁴. Esto nos permitió observar los eventos de exflagelación de gametocitos previos al cultivo de ooquistos, que no se lograron obtener cuando se inocularon parásitos criopreservados directamente en los ratones C57BL/6. Es importante también respetar las cepas de ratones utilizadas, ya que los ratones C57BL/6 cursan la enfermedad con síntomas más similares a las infecciones de *P. falciparum* en humanos que los ratones de la cepa BALB/c⁵.

Una vez optimizado el protocolo, se procedió a comparar el promedio de eventos de exflagelación por campo entre la cepa salvaje ANKA GFP y la cepa que sobreexpresa PbHSP27 fusionada a mCherry. Como se observa en la figura 17, no hay diferencias significativas entre

ambas cepas para este parámetro, lo cual era esperable ya que no detectamos expresión de PbHSP27 en gametocitos en los ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 9), por lo que las modificaciones a esa proteína no deberían afectar este estadio.

Por otro lado, al evaluar el número de ooquinetos maduros totales en ambas cepas, el cultivo de ooquinetos de la cepa hsp27 mCherry, mostró una disminución estadísticamente significativa del 89% aproximadamente en el número total de ooquinetos maduros respecto al obtenido al utilizar la cepa salvaje (Fig. 18 A). Para nuestra sorpresa, la mayoría de ooquinetos hsp27 mCherry mostraba una forma redondeada similar a la observada en el estadio II de la Figura 3. Cuando discriminamos en ambas muestras la presencia de ooquinetos redondeados y elongados (estadio V, Fig. 3) observamos que la población de parásitos redondeados es del 85% en los cultivos de la cepa hsp27 mCherry, mientras que un 84% de la población en los cultivos de la cepa salvaje corresponde a ooquinetos elongados (Fig. 18 B). Al analizar conjuntamente estos datos, se puede decir que la sobreexpresión de la proteína PbHSP27 fusionada a mCherry podría estar impidiendo que los ooquinetos adquieran la forma alargada característica de los estadios maduros, por lo que se imposibilita el correcto desarrollo de estos zoítos.

Actualmente hay pocas proteínas que se han identificado en el proceso de formación y elongación de los ooquinetos de *Plasmodium*. Wang et al. (2020), demostraron que al eliminar los genes *isp1* e *isp3* que codifican para las proteínas ISP1 e ISP3 en *P. yoelii*, el fenotipo obtenido fue una proporción mayoritaria de ooquinetos inmaduros, arrestados en estadios del I al III^{19,72}. La causa de este fenotipo se asoció a una desorganización de los microtúbulos subpeliculares, lo que conlleva a que los parásitos fueran incapaces de formar y mantener la forma celular. Esta desorganización también se observó en otro trabajo donde se eliminó el gen de una quinesina, la quinesina 20, y por microscopia electrónica se observó una desorganización de los microtúbulos subpeliculares que llevó a un fenotipo de ooquinetos redondeados⁷³. Cuando se suprimió el gen *Rab11a* en los estadios de cigoto y ooquinetos se observó el mismo fenotipo, el cual fue nuevamente una proporción de 99% de ooquinetos redondeados, incapaces de continuar con el desarrollo, causado por una falta de material de membrana y componentes que permitan el ensamblaje del anillo polar apical y por lo tanto, no permite la organización de microtúbulos subpeliculares⁴⁹.

Por lo tanto, dado que la sobreexpresión de la proteína PbHSP27 fusionada a mCherry produce el mismo fenotipo observado en los trabajos mencionados anteriormente, suponemos que esta proteína también podría tener un rol en el proceso de elongación celular que lleva a la maduración y desarrollo completo de los ooquinetos en su formas de zoítos. En humanos, la proteína HSP27 se encuentra activa al dimerizar, por lo que una posible explicación al fenotipo observado en ooquinetos podría ser que la etiqueta mCherry, al poseer un tamaño similar al de la proteína PbHSP27 (25 kDa) esté impidiendo estéricamente la formación de un dímero estable y funcional, por lo que la proteína de fusión no podría activarse y/o estaría siendo degradada por el mismo parásito.

Para poder confirmar la hipótesis de que la etiqueta mCherry está dificultando la función normal de PbHSP27 en ooquinetos, se construyó un vector que, al recombinar con el locus genómico del parásito, introduzca una copia adicional del gen *Pbhsp27* fusionada a la etiqueta FLAG, el cual al ser una etiqueta peptídica mucho más pequeña (aproximadamente 1 kDa) no

debería impedir la correcta dimerización y funcionamiento de PbHSP27. Intentamos realizar la transfección de *P. berghei* tres veces con este vector, pero no tuvimos parásitos al seleccionar con pirimetamina. Lamentablemente este es un problema de la eficiencia del protocolo de transfección que aún estamos poniendo a punto en el laboratorio y descartamos que sea un problema particular de la modificación genética que queremos realizar.

Por último, una forma de agilizar el protocolo es reemplazando la purificación con NH_4Cl 0,35 M, que tiene un tiempo de incubación de una hora, por una purificación utilizando microesferas magnéticas que posean adsorbido en su superficie anticuerpos anti-P28, la cual es una proteína de superficie que se expresa en principalmente en ooquistos⁷⁴, y permitirá una purificación mucho más rápida y eficiente⁷⁵. Para poder obtener estos anticuerpos anti-P28 en el laboratorio, comenzamos con la expresión de la proteína P28 en *E. coli* en forma recombinante. Para ello se utilizó el vector de expresión pTrcHis A y se amplificó el ORF del gen P28. Lamentablemente, no obtuvimos colonias de *E. coli* que contengan este vector fusionado al ORF de P28 antes de la finalización de este trabajo de tesis. A futuro, una vez obtenida la construcción, se procederá con la expresión de la proteína, la que luego se utilizará para inmunizar ratones y obtener el suero que reconozca a la proteína P28.

6.3 La proteína PbHSP27 es esencial para el desarrollo de esquizontes

Para analizar la función de la proteína PbHSP27 en los estadios sanguíneos, se diseñó y clonó un plásmido que contiene las regiones regulatorias 5' y 3' UTR del gen *hsp27*. De manera que, una vez transfectado en los parásitos *P. berghei*, se integre en el genoma mediante un evento de doble recombinación homóloga, generando una línea de parásitos *P. berghei* carentes del gen *Pbhsp27*.

Al analizar los parásitos obtenidos luego del evento de transfección, no pudimos evidenciar mediante PCR que haya ocurrido el evento de doble recombinación e integración al genoma del parásito (Fig. 25C), pero aun así los parásitos demostraron ser resistentes al antibiótico pirimetamina, por lo que surgió la hipótesis de que estos parásitos mantuvieran el plásmido B3D+ *hsp27* KO FLAG de forma episomal, ya que en Janse et al. (2006) se especifica que si los parásitos resistentes aparecen a partir del día 15 post-inoculación, puede haber ocurrido una mutación espontánea que genere resistencia al antibiótico o el gen de la resistencia se encuentre en un episoma⁶⁴. Para poder identificar cuál fue la causa de la resistencia de nuestros parásitos, se procedió a realizar tanto el clonado de la línea transgénica, para eliminar contaminación con parásitos salvajes y obtener una línea transgénica pura, así como paralelamente a partir de la línea parental se realizaron tres pasajes en ausencia del antibiótico pirimetamina y un último pasaje en presencia de pirimetamina, de esta forma, en los pasajes en ausencia de presión de selección, los parásitos podrían eliminar el ADN episomal, debido a que no requieren de la resistencia al antibiótico⁶⁷.

Al genotipificar nuevamente la línea de parásitos transgénicos obtenida luego del evento de clonado, no se observó la amplificación que indicaría que ocurrió el evento de integración al genoma y como control, se obtuvo amplificación correspondiente al gen *Pbhsp27*, lo que confirma que no pudimos deletar el gen (Fig. 26B). Cuando se analizó la presencia del episoma en esta línea,

se obtuvo el producto de amplificación correspondiente a la región 5' UTR - FLAG que sólo se encuentra en el plásmido. Esto indicaría que al momento de la transfección, los únicos parásitos que se mantuvieron fueron aquellos que incorporaron el ADN foráneo en forma episomal, ya que se detectó la presencia de la etiqueta FLAG, que se encuentra únicamente en el plásmido (Fig. 27A).

Además de las PCR realizadas para evidenciar la presencia del plásmido también se intentó extraer el plásmido episomal mediante transformación bacteriana, utilizando el lisado de los parásitos resistentes para transformar *E. coli*, pero no se obtuvieron bacterias transformantes. Esto podría deberse a que el protocolo utilizado para la extracción del plásmido de los parásitos no fue el adecuado y/o el monto de ADN plasmídico fue muy bajo.

Por otro lado, luego de los pasajes sin pirimetamina y posterior pasaje con el antibiótico, se obtuvieron parásitos resistentes. Para evaluar si los parásitos desarrollaron una mutación aleatoria durante el evento de selección con pirimetamina que confiera la resistencia, o el número de pasajes sin presión de selección no fue suficiente para la eliminación del episoma, se realizó una PCR para determinar la presencia de un fragmento que sólo se encuentra presente dentro del vector utilizado para la transfección (3' GAPDH - FLAG) y confirmar de esta manera la presencia del episoma. En la figura 27 B se observa que se obtuvo amplificación del fragmento de interés tanto al utilizar gADN KO27 Clon como al utilizar el ADN genómico de los parásitos que pasaron por el proceso de pasajes sin presión de selección. Por lo tanto, se confirma que estos parásitos mantuvieron el episoma aún luego de pasajes sin presión de selección, por lo que el número de pasajes no fue suficiente, y en próximos ensayos se debería utilizar un número de pasajes mayor. Concluimos entonces que la resistencia a la pirimetamina de estos parásitos está conferida por la expresión del gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) a partir del episoma.

Estos resultados, conjuntamente con datos previos de la Lic. Karina Caruso⁶² y la Dra. Montagna que intentaron múltiples veces generar una población de *P. berghei hsp27* (-) clonal sin éxito, indicarían que este gen es esencial para el desarrollo de los estadios sanguíneos de *P. berghei*. Según el protocolo de transfección descrito por Janse et al. (2006), la cantidad de ADN plasmídico requerida para que la introducción de ADN en los parásitos sea exitosa debe ser de entre 20 a 25 μg^{76} , mientras que la cantidad de ADN lineal requerida es de 5 a 10 μg^{64} . Al momento de evaluar la concentración del ADN que se utilizó en la transfección (Fig. 23) no se pudo apreciar ninguna banda correspondiente al ADN plasmídico circular, es decir no digerido, por lo que su concentración era mucho menor respecto a los fragmentos lineales. Debido a que la única población de parásitos transgénicos obtenidos corresponde a aquellos que incorporaron el ADN de forma episomal, esto implica que la población mayoritaria, aquella que incorporó la construcción linealizada, no sobrevivió al proceso de selección del gen *Pbhsp27*. Sólo los parásitos que conservaron el plásmido de manera episomal sobrevivieron a la selección por antibiótico.

Debido a que la proteína HSP27 es esencial durante los estadios sanguíneos, para poder estudiar la función de esta proteína en ooquinetos, se realizó una construcción que nos permita expresar a PbHSP27 bajo el promotor *Pbama-1* en lugar del promotor endógeno del gen *hsp27*, el cual se encuentra activo en los estadios sanguíneos pero se inactiva en los estadios de cigoto y

ooquineto (estrategia de cambio de promotor, o “promotor swap”)⁶⁸. Durante este trabajo de tesina se logró obtener la construcción para la generación de estos parásitos transgénicos.

7. Conclusiones

En este trabajo podemos concluir que la pequeña chaperona de choque térmico PbHSP27 se expresa tanto en estadios de esquizonte así como ooquinetos. Los experimentos de WB sugieren la presencia de dos isoformas y las mismas podrían deberse a modificaciones post-traduccionales predichas por herramientas de bioinformática.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren PbHSP27 tiene un rol importante durante la formación de ooquinetos maduros.

Por último, la proteína PbHSP27 es esencial en el estadio de esquizonte de *P. berghei* ya que no se pudo obtener una población clonal de parásitos carentes de esta proteína.

8. Referencias

1. Symptoms of Malaria, CDC. *Symptoms of Malaria*
<https://www.cdc.gov/malaria/symptoms/index.html>.
2. Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Boudin, C. & Deloron, P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunol.* **22**, 191–199 (2000).
3. Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**, 610–624 (2016).
4. Battle, K. E. *et al.* Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar. J.* **13**, 144 (2014).
5. Matuschewski, K. Murine infection models for vaccine development: The malaria example. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 450–456 (2013).
6. World Malaria Report 2023, WHO. *World Malaria Report 2023*
<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>.
7. Sherrard-Smith, E. *et al.* The potential public health consequences of COVID-19 on malaria in Africa. *Nat. Med.* **26**, 1411–1416 (2020).
8. Villarroel Martínez, E. I. *et al.* NEW RECORDS OF MOSQUITO SPECIES FROM NORTHERN ARGENTINA. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **40**, 178–181 (2024).
9. Tuteja, R. Malaria – an overview. *FEBS J.* **274**, 4670–4679 (2007).
10. Amino, R. *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* **12**, 220–224 (2006).
11. Cowman, A. F. & Crabb, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* **124**, 755–766 (2006).
12. Francis, S. E., Sullivan, D. J. & Goldberg, A. D. E. HEMOGLOBIN METABOLISM IN THE MALARIA PARASITE *PLASMODIUM FALCIPARUM*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 97–123 (1997).
13. Belachew, E. B. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–6 (2018).
14. Haldar, K. & Mohandas, N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology* **2009**, 87–93 (2009).
15. Chahine, Z. & Le Roch, K. G. Decrypting the complexity of the human malaria parasite biology through systems biology approaches. *Front. Syst. Biol.* **2**, 940321 (2022).
16. Sinden, R. E. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology* **136**, 1427–1434 (2009).
17. Billker, O. *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria

- development in the mosquito. *Nature* **392**, 289–292 (1998).
18. Billker, O., Shaw, M. K., Margos, G. & Sinden, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* *in vitro*. *Parasitology* **115**, 1–7 (1997).
 19. Wang, X., Qian, P., Cui, H., Yao, L. & Yuan, J. A protein palmitoylation cascade regulates microtubule cytoskeleton integrity in *Plasmodium*. *EMBO J.* **39**, e104168 (2020).
 20. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* **3**, 5 (2010).
 21. Baum, J., Gilberger, T.-W., Frischknecht, F. & Meissner, M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Trends Parasitol.* **24**, 557–563 (2008).
 22. Frénel, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M. & Soldati-Favre, D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 645–660 (2017).
 23. Barragan, A. & David Sibley, L. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **11**, 426–430 (2003).
 24. Frevert, U. *et al.* Intravital Observation of *Plasmodium berghei* Sporozoite Infection of the Liver. *PLoS Biol.* **3**, e192 (2005).
 25. Matuschewski, K. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J.* **21**, 1597–1606 (2002).
 26. Soldati, D., Foth, B. J. & Cowman, A. F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol.* **20**, 567–574 (2004).
 27. Harding, C. R. & Frischknecht, F. The Riveting Cellular Structures of Apicomplexan Parasites. *Trends Parasitol.* **36**, 979–991 (2020).
 28. Kan, A. *et al.* Quantitative analysis of *Plasmodium* ookinete motion in three dimensions suggests a critical role for cell shape in the biomechanics of malaria parasite gliding motility. *Cell. Microbiol.* **16**, 734–750 (2014).
 29. Tremp, A. Z. & Dessens, J. T. Malaria IMC1 Membrane Skeleton Proteins Operate Autonomously and Participate in Motility Independently of Cell Shape. *J. Biol. Chem.* **286**, 5383–5391 (2011).
 30. Ripp, J. *et al.* Malaria parasites differentially sense environmental elasticity during transmission. *EMBO Mol. Med.* **13**, e13933 (2021).
 31. Vanderberg, J. P. Studies on the Motility of *Plasmodium* Sporozoites*. *J. Protozool.* **21**, 527–537 (1974).
 32. Frischknecht, F. *et al.* Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes: Imaging *Plasmodium* sporozoites in mosquito salivary glands. *Cell*.

- Microbiol.* **6**, 687–694 (2004).
33. Schüler, H., Mueller, A.-K. & Matuschewski, K. A *Plasmodium* Actin-depolymerizing Factor That Binds Exclusively to Actin Monomers. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4013–4023 (2005).
 34. Montagna, G. N. *et al.* Critical Role for Heat Shock Protein 20 (HSP20) in Migration of Malarial Sporozoites. *J. Biol. Chem.* **287**, 2410–2422 (2012).
 35. Russell, D. G. & Sinden, R. E. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J. Cell Sci.* **50**, 345–359 (1981).
 36. Frischknecht, F. & Matuschewski, K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, a025478 (2017).
 37. Anderson-White, B. R. *et al.* A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*: IMC proteins in *Toxoplasma* cell division. *Cell. Microbiol.* **13**, 18–31 (2011).
 38. Mann, T. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**, 257–268 (2001).
 39. Heintzelman, M. B. & Schwartzman, J. D. A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* **271**, 139–146 (1997).
 40. Foth, B. J., Goedecke, M. C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3681–3686 (2006).
 41. Keeley, A. & Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* **14**, 528–532 (2004).
 42. Herm-Gotz, A. *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J.* **21**, 2149–2158 (2002).
 43. Johnson, T. M., Rajfur, Z., Jacobson, K. & Beckers, C. J. Immobilization of the Type XIV Myosin Complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3039–3046 (2007).
 44. Frénil, K., Marq, J.-B., Jacot, D., Polonais, V. & Soldati-Favre, D. Plasticity between MyoC- and MyoA-Glideosomes: An Example of Functional Compensation in *Toxoplasma gondii* Invasion. *PLoS Pathog.* **10**, e1004504 (2014).
 45. Bennink, S., Kiesow, M. J. & Pradel, G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut: Malaria parasite development in the mosquito midgut. *Cell. Microbiol.* **18**, 905–918 (2016).
 46. Muthuswamy, S. K. & Xue, B. Cell Polarity as a Regulator of Cancer Cell Behavior Plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 599–625 (2012).
 47. Qian, P. *et al.* Apical anchorage and stabilization of subpellicular microtubules by apical polar ring ensures *Plasmodium* ookinete infection in mosquito. *Nat. Commun.* **13**, 7465 (2022).

48. Gao, H. *et al.* ISPI-Anchored Polarization of GC β /CDC50A Complex Initiates Malaria Ookinete Gliding Motility. *Curr. Biol.* **28**, 2763-2776.e6 (2018).
49. Patil, H. *et al.* Zygote morphogenesis but not the establishment of cell polarity in *Plasmodium berghei* is controlled by the small GTPase, RAB11A. *PLoS Pathog.* **16**, e1008091 (2020).
50. Moon, R. W. *et al.* A Cyclic GMP Signalling Module That Regulates Gliding Motility in a Malaria Parasite. *PLoS Pathog.* **5**, e1000599 (2009).
51. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1517–1520 (1993).
52. Janowska, M. K., Baughman, H. E. R., Woods, C. N. & Klevit, R. E. Mechanisms of Small Heat Shock Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a034025 (2019).
53. Garrido, C., Paul, C., Seigneuric, R. & Kampinga, H. H. The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1588–1592 (2012).
54. Salinthon, S., Tyagi, M. & Gerthoffer, W. T. Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* **119**, 44–54 (2008).
55. Rembold, C. M., Foster, D. B., Strauss, J. D., Wingard, C. J. & Van Eyk, J. E. cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery. *J. Physiol.* **524**, 865–878 (2000).
56. Dreiza, C. M. *et al.* Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics. *FASEB J.* **19**, 1–14 (2005).
57. Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M. & Geiger, B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell Biol.* **114**, 255–261 (1991).
58. Montagna, G., N. *Plasmodium* sporozoite motility: an update. *Front. Biosci.* **17**, 726 (2012).
59. Montagna, G. N., Matuschewski, K. & Buscaglia, C. A. Small heat shock proteins in cellular adhesion and migration: Evidence from *Plasmodium* genetics. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 78–84 (2012).
60. De Miguel, N., Echeverria, P. C. & Angel, S. O. Differential Subcellular Localization of Members of the *Toxoplasma gondii* Small Heat Shock Protein Family. *Eukaryot. Cell* **4**, 1990–1997 (2005).
61. Echeverria, P. C. *et al.* *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a Potential Drug Target Whose Expression and Subcellular Localization are Developmentally Regulated. *J. Mol. Biol.* **350**, 723–734 (2005).
62. Caruso, K. Estudo Da Expressão E Função Da Proteína Hsp27 No Ciclo De Vida De *Plasmodium Berghei*. (Tesis de Maestrado Universidad Federal de São Paulo, 2018).
63. Thathy, V. & Ménard, R. Gene Targeting in *Plasmodium berghei*. in *Malaria Methods and Protocols* vol. 72 317–331 (Humana Press, New Jersey, 2002).

64. Janse, C. J., Ramesar, J. & Waters, A. P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.* **1**, 346–356 (2006).
65. Hentzschel, F. *et al.* Host cell maturation modulates parasite invasion and sexual differentiation in *Plasmodium berghei*. *Sci. Adv.* **8**, eabm7348 (2022).
66. Bargieri, D. Y. *et al.* Plasmodium Merozoite TRAP Family Protein Is Essential for Vacuole Membrane Disruption and Gamete Egress from Erythrocytes. *Cell Host Microbe* **20**, 618–630 (2016).
67. Yusuf, N. A. *et al.* The Plasmodium Class XIV Myosin, MyoB, Has a Distinct Subcellular Location in Invasive and Motile Stages of the Malaria Parasite and an Unusual Light Chain. *J. Biol. Chem.* **290**, 12147–12164 (2015).
68. Sato, Y. *et al.* Comparative *Plasmodium* gene overexpression reveals distinct perturbation of sporozoite transmission by profilin. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2234–2244 (2016).
69. Sun, Y. & MacRae, T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2460–2476 (2005).
70. Biswas, A. & Das, K. P. SDS Induced Structural Changes in α -Crystallin and It's Effect on Refolding. *Protein J.* **23**, 529–538 (2004).
71. Kondo, Y. *et al.* Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLOS ONE* **13**, e0191532 (2018).
72. Poulin, B. *et al.* Unique apicomplexan IMC sub-compartment proteins are early markers for apical polarity in the malaria parasite. *Biol. Open* **2**, 1160–1170 (2013).
73. Zeeshan, M. *et al.* Genome-wide functional analysis reveals key roles for kinesins in the mammalian and mosquito stages of the malaria parasite life cycle. *PLOS Biol.* **20**, e3001704 (2022).
74. Tomas, A. M. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J.* **20**, 3975–3983 (2001).
75. Carter, V., Cable, H. C., Underhill, B. A., Williams, J. & Hurd, H. Isolation of *Plasmodium berghei* ookinetes in culture using Nycodenz density gradient columns and magnetic isolation. *Malar. J.* **2**, 35 (2003).
76. Janse, C. J. *et al.* High efficiency transfection of *Plasmodium berghei* facilitates novel selection procedures. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**, 60–70 (2006).

Última versión de la Tesis

Este manuscrito corresponde a la última versión de la tesis, la cual incluye todas las correcciones y sugerencias proporcionadas por los jurados.



Firma del autor: _____

Sofia Paula Cavagnaro



Firma de la directora: _____

Georgina Montagna