

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 ooquistes, 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 ooquistes, los cuales una vez maduros presentan la forma característica de los zoítos de *Apicomplexa*. Como primer objetivo, decidimos realizar un estudio fenotípico de ooquistes 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 ooquistes, observamos que los cultivos de parásitos que sobreexpresan PbHSP27 producían un número muy pequeño de ooquistes comparados con los parásitos salvajes, a pesar que las gametas PbHSP27 mCherry presentaban una capacidad de exflagelación normal. Al analizar el fenotipo de los ooquistes que sobreexpresan la proteína PbHSP27 fusionada a mCherry observamos que los mismos no adquieren la forma polarizada y alargada característica de los ooquistes 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 *Pbbsp27*, 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.

Palabras clave: Plasmodium; pequeñas chaperonas de choque térmico; regulación del citoesqueleto

Abstract: Malaria disease is caused by the protozoan *Plasmodium spp.*, belonging to the phylum Apicomplexa. The parasite is transmitted by a vector insect, the female mosquito of the *Anopheles* species. Vector transmission begins when the female *Anopheles* mosquito ingests gametocytes from the blood of an infected host. Inside the mosquito, the gametes fuse to form a zygote, which becomes a polarized, motile ookinete that invades the epithelial cells of the vector's midgut. It then differentiates to form oocysts, within which numerous sporozoites develop. These are the infectious forms of the parasite that will initiate the replication cycle again in a mammalian host. Small heat shock proteins (sHSPs) are ubiquitous proteins involved in multiple cellular processes. In various cellular systems, these proteins have been reported to participate in cytoskeleton regulation mechanisms. In *Plasmodium berghei*, it has been shown that HSP20 affects sporozoite motility, specifically by decreasing gliding speed and increasing the adhesion of the zoite to the substrate. This has a critical impact on the natural transmission of malaria. Recently, our laboratory identified a 27 kDa protein, PbHSP27, which shares the characteristic C-terminal alpha-crystallin domain of the sHSP family. The expression of this chaperone was determined fusing the protein with the fluorescent tag mCherry, and it was observed that PbHSP27 is expressed in the sexual stages in the host's blood, particularly in schizonts, and also in zygotes and ookinetes—stages that occur within the mosquito vector. Our working hypothesis is that PbHSP27 plays an important role in the development of *P. berghei* during the mature schizont, zygote, and ookinete stages. In order to migrate and invade the mosquito midgut, zygotes differentiate into ookinetes, which, once mature, display the characteristic shape of Apicomplexa zoites. As a first objective, we decided to conduct a phenotypic study of ookinetes that overexpress PbHSP27 fused to the mCherry tag. When we performed *in vitro* assays, which mimic the parasite cycle from gamete maturation to ookinete formation, we observed that cultures of parasites overexpressing PbHSP27 produced a much smaller number of ookinetes compared to wild-type parasites, even though the PbHSP27-mCherry gametes displayed normal exflagellation capacity. When analyzing the phenotype of ookinetes overexpressing the PbHSP27-mCherry fusion protein, we observed that they did not acquire the polarized, elongated shape characteristic of mature ookinetes. Instead, most displayed a rounded form, similar to the immature stages of the ookinete. Subsequently, as a second objective, we attempted to generate transgenic parasites lacking the *Pbhs27* gene, but we were unable to obtain a clone with this deletion. Therefore, we concluded that the PbHSP27 protein may not only play a role in the cellular elongation mechanism that enables zygote-to-ookinete differentiation, but it may also be essential during the blood stage of the parasite.

Key words: *Plasmodium berghei*; small heat shock proteins; cytoskeleton regulation.