



Universidad de Panamá

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Escuela de Biología

Departamento de Genética y Biología Molecular

“PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES *VAR* EN *PLASMODIUM FALCIPARUM*
SELECCIONADOS SOBRE CÉLULAS VERO-E6”

Por:

Catalina del C. Chen Z.

Trabajo de graduación presentado a la
Escuela de Biología para optar por el
título de Licenciada en Biología con
Orientación en Genética y Biología
Molecular.

Panamá, República de Panamá

2024



PROFESORES ASESORES

Título:

“PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES VAR EN *PLASMODIUM FALCIPARUM*
SELECCIONADOS SOBRE CÉLULAS VERO-E6”

Por:

Catalina del C. Chen Z. _____

8-965-145

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como
requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en
Genética y Biología Molecular.

PROF. ARIEL MAGALLÓN _____

Asesor Principal

PROF. LUIS JAÉN _____

Co-Asesor

PROF. ALONSO SANTOS MURGAS _____

Co-Asesor

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a las personas que me han apoyado y siempre han estado a mi lado durante mi vida. A mis padres, Hui Fang Zou y Huo Kui Chen, por todo lo que han sacrificado para que yo llegara a esta meta. A mis hermanas, Qi Feng Chen y Katuska Chen, por su paciencia y siempre preocuparse por mi bienestar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ariel Magallón-Tejada por la oportunidad de realizar el presente proyecto en su laboratorio. Por su constante guía y paciencia, por compartir su conocimiento, experiencia y pasión por la ciencia.

A mis amigos, que me escucharon y animaron durante todo el proceso. Por su ayuda cuando la necesité.

Al ICGES por brindarme la oportunidad de desarrollar el estudio en sus instalaciones y aprender a trabajar en un laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	16
1. Malaria	17
1.1 Historia de la malaria.....	17
1.2 Malaria en el mundo	18
1.3 Malaria en Panamá	19
1.4 Tipos de malaria	19
1.4.1 Malaria no complicada.....	19
1.4.2 Malaria severa	20
1.5 Síntomas	20
1.6 Diagnóstico	21
1.7 Tratamientos.....	21
1.8 Prevención	22
1.9 Especies causantes de malaria.....	22
2. <i>Plasmodium falciparum</i>	23
2.1 Generalidades	23
2.2 Genoma	24
2.3 Ciclo de vida en humanos	25
2.4 Ciclo de vida en el mosquito <i>Anopheles</i>	25
2.5 Citoadhesión	26
2.6 Receptores de citoadhesión	27
2.6.1 CD36.....	28

2.6.2 ICAM-1	28
2.6.3 EPCR	28
2.6.4 CSA	29
2.6.5 HA	29
2.6.6 PECAM-1	29
2.7 Genes var	29
2.8 Las proteínas PfEMP1	30
2.9 Dominios de adhesión	31
2.9.1 DBL	31
2.9.2 CIDR	32
2.9.3 <i>Domain cassettes</i>	32
3. Células VERO-E6	33
3.1 Generalidades	33
3.1 Usos	34
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	36
1. Cultivo de Parásitos	37
1.1 Preparación de medio de cultivo de parásitos (RPMI)	37
1.2 Preparación de sangre humana para cultivo de parásitos	37
1.3 Descongelación de parásitos	37
1.4 Mantenimiento de parásitos	38
1.5 Sincronización de parásitos	38
2. Cultivo de Células	38
2.1 Preparación de medio de cultivo de células (MEM)	38
2.2 Descongelación de células	39
2.3 Mantenimiento de células	39
3. Selección	39
4. Tinción de platos Petri	40
5. TRIzol	40
6. Extracción de ARN	40
7. Eliminación de ADN genómico por tratamiento con DNase	41
8. Síntesis de ADNc	41
9. Q-PCR	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Figuras y Cuadros Suplementarios	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	26
Fig. 2	34
Fig. 3	49
Fig. 4	49
Fig. 5	50
Fig. 6	50
Fig. 7	51
Fig. 8	51
Fig. 9	52
Fig. 10	53
Fig. 11	69
Fig. 12	69
Fig. 13	70
Fig. 14	70

RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa conocida y de gran relevancia para la salud pública, se considera una enfermedad endémica en al menos 90 países, que representan casi el 40% de la población de la Tierra. Existen 5 especies de *Plasmodium* que causan malaria en el humano, transmitidas por mosquitos femeninos *Anopheles*. En 2022 se estimaron 249 millones de casos de malaria en 85 países endémicos de malaria. Más del 90% de la mortalidad por malaria en todo el mundo es causada por la infección por *Plasmodium falciparum*, ya que es el principal agente causal de las formas graves de malaria. Además, causa el secuestro de eritrocitos infectados y no infectados mediante receptores endoteliales humanos en la microvasculatura. Este proceso está mediado por la expresión de la proteína *P. falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1) en la superficie de los glóbulos rojos del huésped infectado. PfEMP1 está codificada por un conjunto de aproximadamente 60 genes *var*, que tienen la capacidad de regular la variación antigénica y la citoadherencia de los eritrocitos infectados. El modelo de infección de malaria, *P. falciparum*-Aotus, se ha utilizado ampliamente para estudiar la biología de estos parásitos y algunos mecanismos de patogénesis. Las células VERO-E6 son un linaje celular obtenido del riñón del mono verde africano. Se desconocen los receptores en primates que puedan ser utilizados por este parásito para acumularse en los órganos. En el presente estudio, se identificaron indirectamente los receptores endoteliales a través del análisis transcripcional de los genes *var*/PfEMP1 en parásitos seleccionados sobre células VERO-E6. Se realizó un co-cultivo de eritrocitos infectados con *P. falciparum* con células VERO-E6. Se extrajo el ARN y se sintetizó ADN_c que se analizó mediante Q-PCR tiempo real para obtener los perfiles de expresión. El gen *var30* mostró la mayor expresión observada en el estudio en la muestra *pre-panning*, pero disminuyó a niveles casi nulos en la muestra *post-panning* adherente. Se encontró que el gen mayormente transcrito en la muestra *post-panning* adherente fue el *var3*, que forma parte del grupo A con un dominio CIDR α 1 que se une al receptor endotelial EPCR. Otros genes con niveles de transcripción notables fueron *var32*, *var33*, *var29* y *var28*, los cuales pertenecen al grupo C con dominios CIDR α 2-6 que se unen al receptor CD36.

ABSTRACT

Malaria is a known infectious disease of great relevance to public health. It is considered an endemic disease in at least 90 countries, representing almost 40% of the Earth's population. There are 5 species of *Plasmodium* that cause malaria in humans, transmitted by female *Anopheles* mosquitoes. In 2022, there were an estimated 249 million cases of malaria in 85 malaria-endemic countries. More than 90% of malaria mortality worldwide is caused by *Plasmodium falciparum* infection, as it is the main causative agent of severe forms of malaria. Additionally, it causes sequestration of infected and uninfected erythrocytes via human endothelial receptors in the microvasculature. This process is mediated by the expression of the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (*PfEMP-1*) protein on the surface of the red blood cells of the infected host. *PfEMP1* is encoded by a set of approximately 60 *var* genes, which have the ability to regulate antigenic variation and cytoadhesion of infected erythrocytes. The malaria infection model, *P. falciparum*-*Aotus*, has been widely used to study the biology of these parasites and some mechanisms of pathogenesis. VERO-E6 cells are a cell lineage obtained from the kidney of the African green monkey. The receptors in primates that can be used by this parasite to accumulate in organs are unknown. In the present study, endothelial receptors were indirectly identified through transcriptional analysis of *var/PfEMP1* genes in parasites selected on VERO-E6 cells. Co-culture of *P. falciparum*-infected erythrocytes with VERO-E6 cells was performed. RNA was extracted and cDNA was synthesized and analyzed by real-time Q-PCR to obtain expression profiles. The *var30* gene showed the highest expression observed in the study in the pre-panning sample but decreased to almost null levels in the adherent post-panning sample. It was found that the most transcribed gene in the adherent post-panning sample was *var3*, which is part of group A, with a CIDR α 1 domain that binds to the endothelial receptor EPCR. Other genes with notable transcription levels were *var32*, *var33*, *var29* and *var28*, which belong to group C, with CIDR α 2-6 domains that bind to the CD36 receptor.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad infecciosa conocida y de gran relevancia para la salud pública (Silva Junior et al., 2017). La malaria se considera una enfermedad endémica en al menos 90 países, que representan casi el 40% de la población de la Tierra (García, 2010).

La malaria es causada por un organismo protozoario del género *Plasmodium*. Se transmite cuando mosquitos hembra del género *Anopheles*, portadores de parásitos, se alimentan de un huésped vertebrado (Breman, 2009).

Las especies que suelen causar la enfermedad en humanos son *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri* y *Plasmodium malariae* (Cowman et al., 2016; Mace et al., 2018).

En 2021, se notificaron alrededor de 247 millones de casos de malaria en 84 países endémicos, lo que representó un aumento con respecto a los 245 millones de casos reportados en el año 2020 (*World Malaria Report, 2022*).

En 2022 se estimaron 249 millones de casos de malaria en 85 países endémicos de malaria, esto se tradujo en un incremento de casos en comparación a 2021 (*World Malaria Report, 2023*).

En el intervalo entre 2000-2019, las muertes causadas por la malaria disminuyeron de 897 000 en 2000 a 577 000 en 2015 y a 568 000 en 2019. En el año 2020, estas cifras aumentaron un 10% en comparación con el año 2019, a aproximadamente 625 000. En 2021, las muertes se redujeron a 619 000. Entre los años 2019 y 2021, alrededor de 63 000 muertes causadas por la malaria se atribuyeron a la suspensión de algunos servicios contra la malaria debido a la pandemia de COVID-19 (*World Malaria Report, 2022*).

Más del 90% de la mortalidad por malaria en todo el mundo es causada por la infección por *Plasmodium falciparum* (Snow, 2015). La enfermedad causada por *P. falciparum* puede provocar una amplia gama de síntomas clínicos, que van desde parasitemia asintomática, malaria no complicada, malaria grave, hasta la muerte (Plewes et al., 2019).

Entre las manifestaciones clínicas de *P. falciparum* se pueden encontrar desde parasitemia asintomática, fiebre, acidosis metabólica, malaria cerebral, afectación multiorgánica y anemia potencialmente mortal (Wassmer *et al.*, 2015).

P. falciparum es el principal agente causal de las formas graves de malaria (Plewes *et al.*, 2019) porque causa síntomas como insuficiencia hepatorenal, somnolencia, dificultad respiratoria, acidosis y shock (Milner, 2018). Además, causa secuestro agudo en el cerebro, causando congestión e inflamación cerebral (malaria cerebral) que culmina en casos de coma y posterior muerte (Milner, 2018).

El proceso de secuestro tiene consecuencias para el organismo del huésped, una de las cuales es la obstrucción física del flujo sanguíneo, esto a su vez conduce a la hipoxia, culminando con la liberación de toxinas del parásito y mediadores inflamatorios (Beeson & Brown, 2002).

Los glóbulos rojos que están infectados con las etapas asexuales maduras de *P. falciparum* se adhieren a receptores endoteliales humanos en la microvasculatura, siendo efectivamente secuestrados de la circulación periférica (Meibalan & Marti, 2017).

Esta adhesión a los diferentes receptores en el organismo huésped está mediada por la expresión de la proteína *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) en la superficie de los glóbulos rojos del huésped infectado, que se manifiesta en estructuras en forma de protuberancias en la membrana de estas células (Meibalan & Marti, 2017).

La familia PfEMP1 está codificada por un conjunto de genes *var*, que tienen la capacidad de regular la variación antigénica y la citoadherencia de los eritrocitos infectados (Su *et al.*, 1995). El genoma de cada parásito contiene aproximadamente 60 genes *var* que se han clasificado en grupos A, B o C de acuerdo con la posición del gen en el cromosoma y la región *upstream* del gen (Lavsten *et al.*, 2003).

Plasmodium falciparum se ha adaptado para infectar primates de diferentes especies, incluido *Aotus* (WHO, 1972). Este modelo de infección de malaria, *P. falciparum*-*Aotus*, se ha utilizado ampliamente para estudiar la biología de estos parásitos y algunos mecanismos

de patogénesis, así como también para evaluar drogas y vacunas antimaláricas (Sá *et al.*, 2018).

Estudios previos han evidenciado que el parásito no pierde la capacidad de citoadhesión al infectar primates no humanos (David *et al.*, 1983). Se desconocen los receptores en primates que puedan ser utilizados por este parásito para acumularse en los órganos.

En el presente estudio, se identificaron genes *var*/PfEMP1 transcritos por parásitos seleccionados sobre células VERO-E6, los cuales poseen fenotipos con potencial adhesión a receptores humanos específicos.

HIPÓTESIS

El perfil transcripcional de genes *var* en *P. falciparum* reflejará diferencias al ser seleccionados sobre células de mono VERO-E6.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el perfil transcripcional de genes *var* en *P. falciparum* seleccionados sobre células de mono VERO-E6.

Objetivos Específicos

1. Establecer co-cultivo de eritrocitos infectados con *P. falciparum* y células VERO-E6.
2. Analizar el perfil transcripcional de genes *var* en parásitos seleccionados sobre células VERO-E6.
3. Identificar por análisis *in silico* potenciales receptores para *P. falciparum* en células VERO-E6.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1. Malaria

La malaria es una enfermedad que se transmite a humanos mediante la picadura de mosquitos *Anopheles* que han sido infectados con parásitos del género *Plasmodium* (Espinoza, 2019). Es una de las enfermedades endémicas más prevalentes en el planeta que impacta a una porción significativa de la población mundial, especialmente a aquellos que viven en países tropicales. Asia, África y América Latina son las áreas endémicas de malaria más afectadas (Silva Junior *et al.*, 2017).

En algunas partes de Asia y en el continente de África se puede encontrar individuos padeciendo de malaria muy comúnmente, ya que estas áreas cuentan con la mayoría de los casos endémicos (Talapko *et al.*, 2019).

1.1 Historia de la malaria

Los primeros casos escritos son documentos encontrados en Grecia (850 a. C.) y China (2700 a. C.) que contienen registros de fiebres que se consideran fueron a causa de parásitos de la malaria (Nosten *et al.*, 2022). En un documento chino del 2700 a. C., tabletas de arcilla de Mesopotamia del 2000 a. C., papiros egipcios del 1570 a. C. y textos hindúes del siglo VI a. C. se encuentran menciones que con mayor seguridad se consideran casos de malaria (Cox, 2010).

El nombre de la enfermedad es una combinación de “marismas” y “fiebres intermitentes”, dando como resultado “mal-aria”. Este término apareció por primera vez en libros médicos ingleses en 1827 por J. Macculloch (Nosten *et al.*, 2022).

El 6 de noviembre de 1880, el cirujano del ejército francés Charles Louis Alphonse Laverán encontró organismos en la sangre de un soldado afectado por la malaria. Los describió como “filamentos móviles o flagelos, cuyos movimientos extremadamente rápidos y variados no dejaban dudas sobre su naturaleza”. Laverán determinó que estaba observando organismos específicos de la malaria, ya que no se asemejaban a componentes normales de la sangre (Drouin *et al.*, 2024).

Debido a su descubrimiento, Laverán recibió el Premio Nobel en 1907, pero sus observaciones no incitaron gran interés o credibilidad (Nosten *et al.*, 2022).

C. Golgi fue el primero en descubrir que el parásito tenía un ciclo de vida en estadios sanguíneos que influenciaban la sintomatología clínica que presentaban los pacientes (Nosten *et al.*, 2022).

E. Marchiafava y A. Bignami fueron los primeros en establecer que el parásito descubierto por Láveran era *P. falciparum*, y que el mismo era responsable de la forma más grave de malaria debido a la obstrucción de microvasculatura cerebral (Nosten *et al.*, 2022).

Hipócrates se considera como el primer malariólogo por sus descripciones de fiebres intermitentes en sus Libros de Epidemias (Nosten *et al.*, 2022).

1.2 Malaria en el mundo

Hacia mediados del siglo XIX, en la mayoría de los países la malaria era común. Se extendía hasta el círculo polar ártico en el hemisferio norte y se calcula que el 90% de la población del mundo vivía en zonas maláricas. Entre los países que no sufrían malaria se encontraban las islas del Pacífico. Extensas regiones del norte y centro de Europa y América del Norte quedaron libres de malaria en la segunda mitad del siglo XIX, probablemente como resultado de cambios en el uso del suelo agrícola y la mejora de las viviendas. Antes de la Segunda Guerra Mundial, la mayoría de los países del norte de Europa occidental eliminaron la malaria prácticamente mediante el uso de control focal de mosquitos y la ampliación del diagnóstico y el tratamiento. Esto se debió a los importantes acontecimientos de la última parte del siglo XIX, como el descubrimiento del parásito de la malaria en 1880 y su modo de transmisión en 1897 (Mendis *et al.*, 2009).

A nivel mundial, los rangos de la tasa de mortalidad por malaria son del 0.3% al 2.2%, la cifra aumenta del 11% al 30% con casos de formas graves de la enfermedad en las regiones tropicales del mundo (Talapko *et al.*, 2019).

Se estima que en 2022 hubo 249 millones de casos de malaria a nivel mundial en 85 países y zonas endémicas de malaria (incluyendo el territorio de la Guayana Francesa), un incremento de 5 millones de casos en comparación con 2021 (*World Malaria Report*, 2023). En el año 2022, el 95% de casos de malaria en el mundo se concentraron en 29 países. Casi la mitad de todos los casos de ese año tuvieron lugar en cuatro países: Nigeria (27%),

República Democrática del Congo (12%), Uganda (5%) y Mozambique (4%) (*World Malaria Report, 2023*).

1.3 Malaria en Panamá

Panamá se comprometió a eliminar todos los casos de transmisión autóctona en el país para el 2020 y conseguir la certificación libre de malaria de la OMS para el 2025 (MINSAL, 2021). Estos objetivos se hicieron imposibles de alcanzar, ya que entre los años 2000 a 2019, los casos reportados de malaria han aumentado, especialmente en regiones indígenas, con un alto número de casos en niños menores de 5 años y prevalencia de pacientes masculinos (Hurtado *et al.*, 2020). En Darién, entre 2015 a 2017, se reportó un incremento notable de casos de infección de malaria (Carrera *et al.*, 2019).

Además, se ha reportado desde el 2015, en el este del país, un retorno de infecciones de malaria por *Plasmodium falciparum* (Hurtado *et al.*, 2020). Sin embargo, Santamaría *et al.*, 2020 concluyeron que los casos por infección de *P. falciparum* no fueron causados por infecciones importadas.

Se han empleado tácticas para combatir la malaria como el Rociado Residual Intradomiciliario y el uso de Mosquiteros Impregnados con Insecticida de Larga Duración, en regiones persistentes como Guna Yala (Ávila *et al.*, 2021).

Rigg *et al.*, 2019 sugieren que los cambios en la dinámica de población de los vectores de malaria son donde se puede hallar la sensibilidad de la transmisión de la enfermedad en Panamá.

1.4 Tipos de malaria

1.4.1 Malaria no complicada

La malaria no complicada se presenta con una etapa fría, caracterizada por frío y escalofríos; y una etapa caliente, caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, sudoración y, en ocasiones, convulsiones. Dependiendo de la especie infectante, los síntomas generalmente persisten de 6 a 10 horas y aparecen cada 2 a 3 días (Schantz-Dunn & Nour, 2009).

La malaria *falciparum* no complicada tiene una tasa de mortalidad del 0,1% si se trata correcta y oportunamente. Sin embargo, la mortalidad aumenta significativamente cuando se produce una disfunción de órganos vitales o la proporción total de eritrocitos infectados aumenta al 42% (más de 1 012 parásitos en un adulto) (Breman, 2009).

1.4.2 Malaria severa

La causa es generalmente una infección por *P. falciparum* y tiene características clínicas como daño orgánico o anomalías sanguíneas, como anemia grave, insuficiencia renal, síndrome de dificultad respiratoria aguda, malaria cerebral, colapso cardiovascular, edema pulmonar, trombocitopenia y hemólisis. Se caracteriza microscópicamente por un nivel de parasitemia superior al 5% (Schantz-Dunn & Nour, 2009).

Existen variaciones entre adultos y niños en cuanto a las presentaciones clínicas. Los adultos, en particular, presentan una mayor tasa de mortalidad e impacto incrementado en los sistemas multiorgánicos en comparación a los niños. Los riñones, el cerebro, los pulmones y el hígado son los principales órganos afectados por la malaria grave en adultos (Wassmer *et al.*, 2015).

Un importante predictor de mortalidad en la malaria cerebral pediátrica es la inflamación de la microvasculatura cerebral. El secuestro de glóbulos rojos parasitados por *Plasmodium falciparum* en la vasculatura cerebral está relacionado con la malaria cerebral (Kessler *et al.*, 2017).

1.5 Síntomas

Dolores de cabeza, cansancio, fiebre, escalofríos y vómitos son síntomas de la enfermedad. A pesar de que la malaria se puede prevenir y tratar, la enfermedad no tratada con frecuencia se asocia con anemia y esplenomegalia. Los casos de *P. falciparum* en específico generalmente avanzan a condiciones potencialmente mortales como malaria cerebral, disfunción orgánica e incluso muerte (Espinoza, 2019).

P. falciparum puede causar fallas orgánicas (malaria grave) y acumularse en los capilares cerebrales (malaria cerebral), lo que conduce al coma y eventualmente a la muerte si no se trata (Biamonte *et al.*, 2013).

1.6 Diagnóstico

La observación clínica de signos y síntomas de la malaria puede ayudar al diagnóstico de la enfermedad. Debido a la similitud de los síntomas de la malaria con otras enfermedades tropicales y la posibilidad de coinfección, el diagnóstico clínico de la malaria es poco preciso (Fikadu & Ashenafi, 2023).

La detección de parásitos en frotis de sangre y las pruebas de diagnóstico rápido basadas en antígenos son otras formas de diagnosticar la malaria. El segundo es basado en la detección inmunológica de varios antígenos de la malaria, como la aldolasa, lactato deshidrogenasa (LDH) y la proteína-2 rica en histidina (HRP-2), en una muestra de sangre (Fikadu & Ashenafi, 2023).

Las pruebas inmunocromatográficas para detectar antígenos del parásito se denominan Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) para la detección de antígenos en sangre. Estas pruebas no requieren equipo eléctrico, habilidades especiales o experiencia previa. La primera prueba RDT fue aprobada por la FDA en 2007 (Talapko *et al.*, 2019).

Algunos esfuerzos para mejorar o desarrollar nuevas técnicas de detección y diagnóstico de la malaria incluyen: técnicas de detección de ácidos nucleicos, técnicas de biodetección con o sin canales de microfluidos, ensayos inmunoquímicos de alto rendimiento e identificación de biomarcadores. Estas técnicas se enfocan en la identificación de biomarcadores específicos de enfermedades, a diferencia de las tradicionales que se basan en la detección del patógeno (Krampa *et al.*, 2017).

1.7 Tratamientos

El Programa Mundial de Erradicación de la Malaria se enfocó principalmente en la fumigación residual de interiores con diclorodifeniletano (DDT) (DDT-IRS), junto con la administración de medicamentos en gran cantidad (Meibalan & Marti, 2017).

En la actualidad, las terapias combinadas basadas en artemisinina (ACT) son el tratamiento de primera línea en todo el mundo (Meibalan & Marti, 2017). Para prevenir la resistencia a los medicamentos, el tratamiento requiere una terapia combinada con al menos dos antipalúdicos eficaces con diferentes mecanismos de acción (Plewes *et al.*, 2019).

Las vacunas contra la malaria se dividen en tres categorías, cada una de las cuales se enfoca en diferentes etapas del crecimiento del parásito: etapas preeritrocíticas (esporozoítos e hígado), eritrocíticas asexuales y de transmisión sexual (Takashima *et al.*, 2021).

En partes de Kenya, Ghana y Malawi (Takashima *et al.*, 2021), se implementó de manera piloto una vacuna de primera generación en 2021, RTS,S/AS01 (Vekemans *et al.*, 2021).

Al menos 28 países de la Región Africana de la OMS han expresado interés en introducir la vacuna contra la malaria desde que la OMS recomendó el uso de RTS,S en octubre de 2021. De estos, 18 países ya han autorizado el lanzamiento de esta vacuna contra la malaria (*World Malaria Report, 2023*).

La OMS recomendó la vacuna contra la malaria R21/Matrix-M (R21) en octubre de 2023 para prevenir la malaria en niños que viven en zonas de riesgo, convirtiéndola en la segunda vacuna contra la malaria aprobada por la entidad (*World Malaria Report, 2023*).

Actualmente se están desarrollando varias vacunas candidatas, algunas de las cuales tienen el potencial de contribuir a la reducción de la carga si se confirman que funcionan bien en condiciones de exposición natural y si son susceptibles de un suministro módico e implementación programática accesible (Vekemans *et al.*, 2021).

Algunas de las vacunas en desarrollo incluyen la vacuna preeritrocítica atenuada por radiación PfSPZ y la vacuna contra la subunidad antiesporozoíto R21 (Vekemans *et al.*, 2021).

1.8 Prevención

Los esfuerzos para controlar los vectores, como los mosquiteros tratados con insecticidas y la terapia combinada contra la malaria, que incluye un medicamento que bloquea la transmisión, son las herramientas que se utilizan actualmente para reducir la transmisión (Meibalan & Marti, 2017).

1.9 Especies causantes de malaria

Seis especies de *Plasmodium* representan una amenaza significativa para la salud humana, y *Plasmodium falciparum* es generalmente considerado el más mortal. *Plasmodium vivax* es una de las principales causas de padecimiento en gran parte del mundo, y cada vez se

argumenta más que las muertes causadas por este parásito se han subestimado (Naing *et al.*, 2014).

Las infecciones causadas por las especies por *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale curtisi* y *Plasmodium ovale wallikeri* son mucho menos comunes. En Malasia y otras partes del sudeste asiático, el parásito simio *Plasmodium knowlesi* ha surgido como una causa local pero significativa de enfermedades, incluidas enfermedades graves (Cowman *et al.*, 2016).

2. *Plasmodium falciparum*

2.1 Generalidades

Los organismos pertenecientes al género de protozoos *Plasmodium* forman parte de la familia Plasmodidae, orden Haemosporida y filo Apicomplexa Levine 1970 (Gray, 2013). Los parásitos obligados de huéspedes vertebrados, como reptiles, aves, roedores y primates (Escalante & Ayala, 1994), son miembros del género. Los parásitos de *Plasmodium sp.* no viven en grupos vertebrados importantes como anfibios, marsupiales, carnívoros y ungulados (Sutherland & Polley, 2011).

Debido a la gran cantidad de casos graves y mortales de malaria causados por *P. falciparum*, así como a su capacidad para multiplicarse como parásito en etapas sanguíneas *in vitro*, *P. falciparum*, es el plasmodio que infecta a los humanos con más estudios realizados. El parásito se encuentra ampliamente al norte del Trópico de Cáncer (como Afganistán) y al sur del Trópico de Capricornio (Sutherland & Polley, 2011). La malaria tropical es causada por *Plasmodium falciparum*. El ciclo de vida complejo del eucariota unicelular implica ser parásito intracelular de hepatocitos (clínicamente silenciosos) y eritrocitos (Maier *et al.*, 2019).

P. falciparum se multiplica en los eritrocitos repetidamente cada 48 horas, lo que conduce a un crecimiento exponencial y un rápido avance de la enfermedad (Maier *et al.*, 2019).

Ningún otro patógeno ha ejercido una presión de selección mayor sobre el genoma humano debido a que es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a los niños (Maier *et al.*, 2019). La coevolución de las especies de *Plasmodium* y sus huéspedes ha dejado señales

relevantes de selección en el genoma del huésped, siendo muy conocidas las variantes estructurales de la hemoglobina del *Homo sapiens* (como la deficiencia de G6PD, las talasemias y la anemia falciforme), que brindan una medida de protección contra la malaria. Por lo tanto, estos genotipos se han asentado en poblaciones con riesgo de infección por *Plasmodium*. Señales de selección muy fuertes, como *PfEMP1*, se pueden encontrar en el genoma de los parásitos, en respuesta al sistema inmunitario de los mamíferos (Sutherland & Polley, 2011). Se ha evidenciado que otros factores genéticos del huésped, como el grupo sanguíneo 0 y los polimorfismos en varios receptores, protegen contra la malaria. El grupo sanguíneo 0 reduce el riesgo de contraer malaria grave. Sin embargo, recientemente se demostró que las RIFIN (familias repetitivas intercaladas de polipéptidos) ayudan en el secuestro principalmente a través de la interacción con el antígeno del grupo sanguíneo A (Persson, 2016).

2.2 Genoma

Plasmodium falciparum tiene un total de tres genomas: un genoma nuclear de 23,2 Mb que codifica para 5370 genes, un genoma mitocondrial de 6 kb y un genoma apicoplasto de 35 kb (Maier *et al.*, 2019). Este es el ADNmt más pequeño que se ha descubierto. Además de las secuencias codificantes de ARN ribosomal (ARNr) de subunidad pequeña y subunidad grande, este ADNmt contiene solo tres genes codificadores de proteínas (Gray, 2013).

Posee un núcleo de 4 500 genes de *Plasmodium* conservados en las regiones centrales de sus 14 cromosomas y genes específicos que evolucionan rápidamente debido a presiones selectivas específicas de la etapa. Durante el ciclo de vida de los parásitos, se pueden observar cuatro estrategias de expresión genética: limpieza; asociado al anfitrión; etapa específica; tácticas específicas relacionadas a invasión, replicación y desarrollo sexuales (Hall *et al.*, 2005).

Es la única especie de *Plasmodium* que puede causar secuestros tisulares vastos debido a la expresión de proteínas codificadas por el parásito que causan protuberancias en la membrana de los eritrocitos infectados (Maier *et al.*, 2019).

2.3 Ciclo de vida en humanos

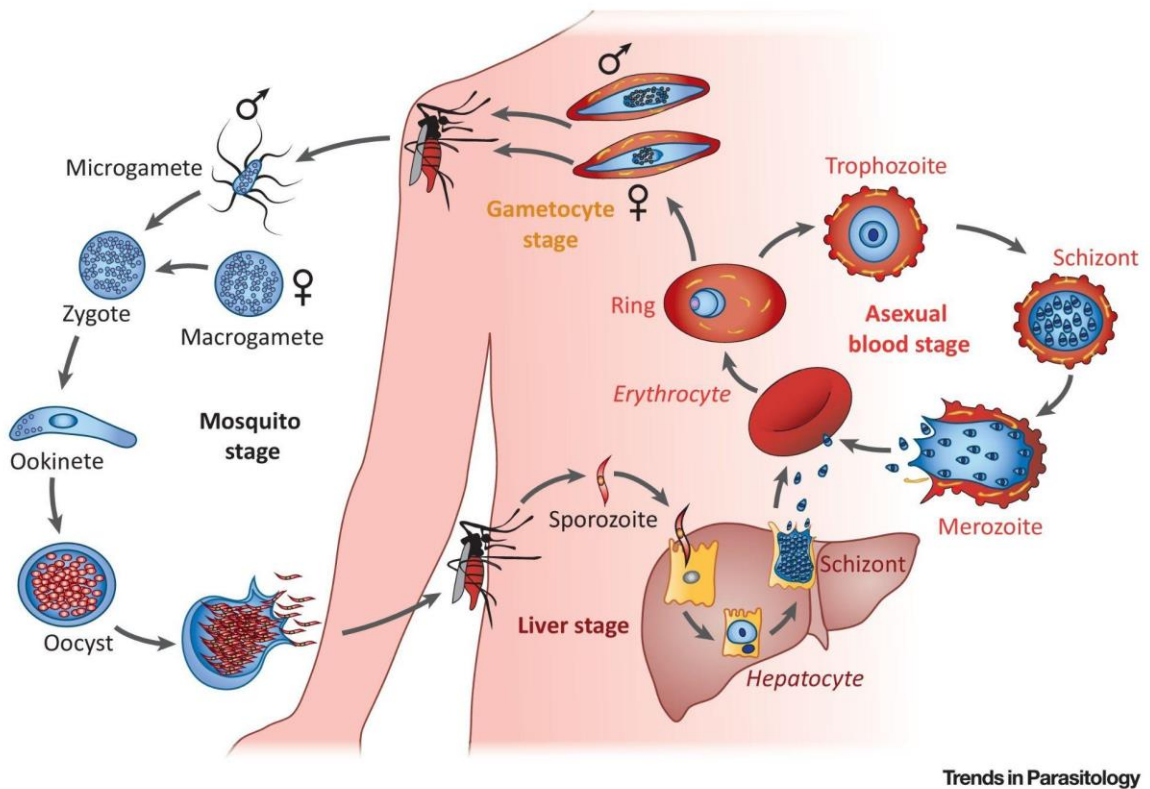
Los parásitos (esporozoitos) son introducidos por los mosquitos en el tejido subcutáneo y, menos frecuentemente, directamente en el torrente sanguíneo. De allí, los esporozoitos se dirigen hacia el hígado. Cada esporocito comienza a replicarse allí (esquizontes) dentro del hepatocito (Miller *et al.*, 2002). Después de 5 a 10 días, las células del hígado revientan y los merozoitos invaden los eritrocitos, donde incrementan rápidamente. Cada parásito maduro produce alrededor de 20 merozoitos, y cada merozoito tiene la capacidad de invadir otros eritrocitos, lo que provoca fiebres altas y patología (Biamonte *et al.*, 2013).

Los merozoitos experimentan múltiples transformaciones durante su fase intraeritrocítica (Biamonte *et al.*, 2013). Un merozoíto invade un eritrocito y se desarrolla hasta tomar la forma de un anillo, luego un trofozoíto y finalmente un esquizonte. El esquizonte se rompe y libera merozoíto que pueden invadir de nuevos eritrocitos (Persson, 2016).

Un pequeño porcentaje de parásitos asexuales se convierte en gametocitos, necesarios para transmitir la infección a otros huéspedes a través de las hembras de los mosquitos *Anopheles* (**Fig. 1**) (Miller *et al.*, 2002).

2.4 Ciclo de vida en el mosquito *Anopheles*

Después de que el parásito es ingerido, en el intestino medio del mosquito, los gametocitos maduros de *P. falciparum* se liberan de su célula huésped, se diferencian en gametos masculinos y femeninos debido a la disminución de la temperatura, el aumento del pH y la concentración de ácido xanturénico. Luego, ocurre la fertilización para formar un cigoto diploide. El cigoto se transforma en oocinetos móviles que penetran en el intestino medio del mosquito y se convierten en ooquistes. Los ooquistes maduran durante 11 a 16 días antes de liberar esporozoitos infecciosos que viajan a las glándulas salivales para ser transmitidos a otro huésped (**Fig. 1**) (Meibalan & Marti, 2017).



Trends in Parasitology

Fig. 1

Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. Un mosquito *Anopheles* inyecta esporozoitos al huésped humano, que se dirigen al hígado. Se replican en los hepatocitos, pasando a ser esquizontes, que liberan merozoitos cuando las células estallan. Etapa asexual intraeritrocítica: los merozoitos infectan eritrocitos, pasando por las fases de anillo, trofozoito y esquizonte. Cada esquizonte puede producir cerca de 20 merozoitos, que pueden infectar otros eritrocitos. Etapa sexual: una porción de los parásitos se convierte en gametocitos, que son ingeridos por un mosquito. En el intestino medio los gametocitos se diferencian en macrogameteo y microgameteo, que se fertilizan para formar el cigoto diploide. El cigoto se desarrolla en oocinete móvil que penetra la pared del intestino del mosquito y se convierte en ooquiste. El ooquiste madura en 11-16 días y libera esporozoitos que viajan a las glándulas salivales para infectar otro huésped (Maier *et al.*, 2019).

2.5 Citoadhesión

Miembros de la familia de la proteína 1 de la membrana de los eritrocitos (*PfEMP1*) de *P. falciparum*, codificados por genes *var* y receptores en las superficies de las células endoteliales interactúan entre sí para mediar la citoadhesión (Smith *et al.*, 2013).

Las adhesinas *PfEMP-1* de alto peso molecular derivadas de parásitos se encuentran en la membrana de los eritrocitos. El parásito exporta activamente antígenos de superficie

variantes a la membrana de los eritrocitos (Malpede & Tolia, 2014). Están codificadas por la familia de genes *var* e interactúan con moléculas endoteliales que están subvertidas como receptores para causar la adherencia (McCormick *et al.*, 1997).

Las infecciones por *Plasmodium falciparum* presentan el secuestro, que es la adherencia de eritrocitos infectados con etapas tardías del desarrollo del parásito (trofozoítos y esquizontes) al endotelio de capilares y vénulas (David *et al.*, 1983). El secuestro ayuda al desarrollo del parásito al protegerlo de la acción filtrante del bazo. Es responsable de los casos graves de malaria cerebral, donde los parásitos secuestrados obstruyen los capilares cerebrales (David *et al.*, 1983).

Los eritrocitos infectados secuestrados irrumpen el flujo sanguíneo microvascular y provocan disfunción endotelial delimitada al deteriorar la integridad de la barrera endotelial e inducir vías proinflamatorias, proadhesivas y de coagulación. Debido a la adherencia de eritrocitos infectados en la microvasculatura del cerebro y la placenta, este fenotipo adhesivo también se asocia con complicaciones de enfermedades específicas, como malaria cerebral y malaria placentaria (Smith *et al.*, 2013).

El roseteo es cuando los eritrocitos no infectados se unen a los eritrocitos infectados para formar un grupo relativamente grande de células con un eritrocito infectado en el centro y eritrocitos no infectados rodeándolo (Wiser, 2023).

La malaria por *P. falciparum* fue la primera vez que se describió la formación de rosetas de eritrocitos; comúnmente se observaban más de 10 eritrocitos unidos a una sola célula infectada y a veces se podían encontrar rosetas gigantes, agregados de hasta 20 eritrocitos infectados y de 40-50 no infectados (Carlson *et al.*, 1990).

La generación de rosetas depende de la heparina dependiente de la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} / Mg^{2+}) y la interacción entre células sensibles al pH (Carlson *et al.*, 1990).

2.6 Receptores de citoadhesión

Algunas moléculas endoteliales son utilizadas por el parásito como receptores en el proceso de citoadhesión. Varias moléculas del huésped, como CD36, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), el receptor de proteína C endotelial (EPCR), sulfato de condroitina

A (CSA), ácido hialurónico (HA) y molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias 1 (PECAM-1), se han evidenciado que se utilizan de esta manera (McCormick *et al.*, 1997).

2.6.1 CD36

La característica de adhesión más común en los parásitos es la unión a CD36, seguida de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). En condiciones de flujo, estos dos receptores pueden trabajar juntos para facilitar la unión de los eritrocitos infectados al endotelio de la microvasculatura (Janes *et al.*, 2011).

Se ha encontrado que la mayoría de las muestras de *P. falciparum* aisladas directamente de pacientes humanos se adhieren al receptor CD36 (Sulistyaningsih *et al.*, 2022).

La propiedad de adhesión más frecuente de las variantes de *PfEMP1* es la unión de CD36, que está limitada a las estructuras de cabeza de los grupos B y C (dominios CIDR α 2 a CIDR α 6) (Avril *et al.*, 2016).

2.6.2 ICAM-1

Estudios previos han asociado la unión de ICAM-1 con la malaria cerebral (Janes *et al.*, 2011).

Un subgrupo de proteínas *PfEMP1* incluye la propiedad de unión de ICAM-1 (Avril *et al.*, 2016).

La unión de ICAM-1 es mediante el dominio DBL β inmediatamente después de la estructura de cabeza de *PfEMP1*, pero no todos los *PfEMP1* que contienen DBL β se unen a ICAM-1. Se ha demostrado que la unión de ICAM-1 está relacionada con DBL β 5 en las proteínas del grupo B y C, así como con DBL β 3 en las proteínas del grupo A (Smith, 2014; Wiser, 2023).

2.6.3 EPCR

Los resultados de Turner *et al.* (2013) sugieren que la unión de EPCR es una propiedad de *PfEMP1*. Esto indica que los parásitos que provocan malaria grave en los niños expresaron *PfEMP1* de unión a EPCR. La unión de EPCR solo puede ocurrir con estructuras principales del grupo A con dominios CIDR α 1 (~11%) (Avril *et al.*, 2016).

2.6.4 CSA

La primera instancia en que se reconoció el CSA (sulfato de condroitina A) como un receptor de adhesión del parásito fue en la superficie de las células de ovario y las células endoteliales del hámster chino (Beeson *et al.*, 2001).

Se ha demostrado con ensayos *in vitro* que la adhesión a CSA es una característica usual de parásitos placentarios aislados. La mayoría de los aislados placentarios demostraron adhesión a CSA purificado y tejido placentario o sincitiotrofoblastos. Aislados parasitarios de mujeres no embarazadas, niños y hombres raramente se unieron a CSA (Beeson *et al.*, 1999; Fried & Duffy, 1996; Gysin *et al.*, 1999; Maubert *et al.*, 2000; Rogerson *et al.*, 1999). El gen *var2csa* es distintivo porque solo se expresa en parásitos que causan la malaria placentaria, y se une a CSA (Salinas *et al.*, 2019).

2.6.5 HA

El HA, también conocido como ácido hialurónico, se ha demostrado que promueve la adhesión de eritrocitos infectados por *P. falciparum in vitro* y aparenta ser un receptor suplementario para el secuestro de eritrocitos infectados en la placenta (Beeson *et al.*, 2001).

2.6.6 PECAM-1

Ha sido relacionado con la activación y agregación plaquetaria, así como con la inflamación. Los dominios que se unen a PECAM-1 son DBL/CIDR α o DBL δ 2, por lo que se ha considerado que DC5 puede adherirse a este receptor (Wiser, 2023).

2.7 Genes *var*

Los genes *var* son una familia de genes grande y clonalmente variante que media la unión de eritrocitos infectados (Sampath *et al.*, 2015).

Dos exones están presentes en los genes *var*: el exón I es grande y codifica la parte extracelular variable de la proteína, así como una región de dominio transmembrana; el exón II es más pequeño y codifica la parte intracelular conservada (Dahlbäck *et al.*, 2010).

Aproximadamente 60 genes *var* distintos se codifican por cada genotipo de parásito, que se expresan de manera mutuamente excluyente. El cambio en los genes *var* ayuda al parásito a escapar de la respuesta inmunitaria y altera la especificidad de unión de los eritrocitos infectados (Smith *et al.*, 2013). Los eritrocitos infectados pueden evadir la inmunidad del huésped con cambios en la expresión del gen *var* al cambiar el tropismo de unión del parásito (Janes *et al.*, 2011).

Según la secuencia *upstream* (UpsA, UpsB, UpsC) y la ubicación en los cromosomas, *PfEMP1* se clasifica en tres grupos principales: A, B y C; dos grupos intermedios, el grupo B/A y el grupo B/C, que representan las transiciones entre los tres grupos principales (Lavstsen *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 1997); y tres variantes atípicas trascendentes de cepa *var1csa*, *var2csa* y *var 3* (Wahlgren *et al.*, 2017).

El grupo *var* mejor definido, el grupo A, contiene genes teloméricos transcritos hacia los telómeros que codifican *PfEMP1*, con estructuras de dominio complejas que difieren del tipo dominante de 4 dominios de los grupos C y B (Lavstsen *et al.*, 2003).

2.8 Las proteínas *PfEMP1*

La familia de proteínas citoadherentes de la proteína de membrana de eritrocitos 1 (*PfEMP1*) de *P. falciparum* es de alto peso molecular (200-450 kD) (Hviid & Jensen, 2015) y juega un rol importante en la enfermedad causada por la malaria. Esta familia de genes muy variada se expresa en la superficie de los eritrocitos en un patrón clonalmente variante (Smith *et al.*, 2000). Las proteínas *PfEMP1* son principalmente responsables de mediar el secuestro de eritrocitos infectados (Hviid & Jensen, 2015).

PfEMP1 se sintetiza en los parásitos y se libera desde la vacuola parasitófora a la superficie de los eritrocitos infectados. Allí, se combina con las proteínas de perilla y diferentes proteínas de superficie para formar estructuras similares a "perillas" que facilitan la adhesión (Wahlgren *et al.*, 2017). Las proteínas se transportan a las membranas de los eritrocitos infectados, donde interactúan con los receptores humanos y provocan el secuestro (Khunrae & Higgins, 2010).

La forma y la rigidez de la membrana del glóbulo rojo cambian a medida que el parásito madura en los eritrocitos. Las proteínas *PfEMP1* ayudan a los parásitos a evitar los

mecanismos de destrucción dependientes del bazo al secuestrar eritrocitos infectados maduros en espacios microvasculares. La forma en que las proteínas *PfEMP1* interactúan con varios conjuntos de receptores puede determinar la capacidad del parásito para producir enfermedades (Robinson *et al.*, 2003).

2.9 Dominios de adhesión

Los dominios *PfEMP1* comparten elementos estructurales conservados con los dominios DBL de otras adhesinas de *Plasmodium* y se consideran entidades funcionales con características de unión específicas. El descubrimiento resultó en la idea de que los dominios de las proteínas *PfEMP1* están ordenados como "perlas en un hilo", con cada dominio mostrando una afinidad potencial por un receptor huésped específico (Dahlbäck *et al.*, 2010). Los dominios de unión a Duffy (DBL) y las regiones interdominios ricas en cisteína (CIDR) son componentes extracelulares de las proteínas *PfEMP1* (Dahlbäck *et al.*, 2010).

Los dominios de adhesión DBL y CIDR en la región extracelular *PfEMP1* pertenecen a diferentes tipos según la similitud de secuencia (Avril *et al.*, 2016).

Se ha encontrado que *PfEMP1* se presenta con una estructura de cabeza semiconservada adyacente al extremo N terminal con un dominio en tándem DBL α 1-CIDR α 1. Puede seguir al segundo dominio en tándem DBL-CIDR u otros tipos de dominio DBL (Sulistyaningsih *et al.*, 2022).

Cada alelo *PfEMP1* tiene una combinación y un orden de tipos de secuencia DBL y CIDR únicos, lo que influye mucho en la especificidad de unión del parásito (Wiser, 2023)

2.9.1 DBL

Es un dominio de unión en *PfEMP1* que media la adhesión a un receptor endotelial específico. Se puede clasificar en DBL $\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon/\xi/\chi$, y también se divide en subtipos que se nombran con números que se encuentran después de las letras griegas (Bernabeu & Smith, 2017; Wiser, 2023).

Los dominios DBL se describieron por primera vez como módulos adhesivos en proteínas de *Plasmodium* que facilitan la invasión de eritrocitos (Dahlbäck *et al.*, 2010).

Parecen tener una amplia gama de receptores y tienen una forma de *boomerang* característica estabilizada por extensos puentes disulfuro (Malpede & Tolia, 2014).

Se ha observado que DBL α 2/ α 1.1/2/4/7 y DBL β 3 se encuentran en genes del grupo A, los cuales presentan afinidad hacia el receptor EPCR (Lavstsen *et al.*, 2003). Mientras que DBL β 5, DBL δ 1 y DBL α 0 se han reportado en genes de los grupos B y C, a los cuales se les ha atribuido adhesión al receptor CD36 (Storm *et al.*, 2019; Wichers *et al.*, 2021)

Todos los DBL mantienen pliegues DBL y tienen estructura secundaria y presencia de puentes de cisteína canónicos, según estudios estructurales de los dominios N-terminales de *PfEMP1* (Wahlgren *et al.*, 2017).

2.9.2 CIDR

Es un dominio de unión en *PfEMP1* que media la adhesión a un receptor endotelial específico. Se puede clasificar en CIDR $\alpha/\beta/\gamma/\delta/PAM$ y también se divide en subtipos con números que se corresponden a las letras griegas (Bernabeu & Smith, 2017; Wiser, 2023).

Los genes *var* de tipo UpsA tienen una mayor relación entre sí que otros genes *var*, y todos codifican dominios CIDR de tipo que no se unen a CD36. Sin embargo, la mayoría de las proteínas *PfEMP1* de los grupos UpsB y UpsC tienen dominios CIDR que sí se unen a CD36 (Cabrera *et al.*, 2014).

En las variantes de los grupos B y C, el dominio CIDR está fuertemente seleccionado para unirse a CD36, pero no en las variantes de los grupos A y B/A (Cabrera *et al.*, 2014).

Los dominios CIDR α 2-6 se unen a CD36, el CIDR α 1 presenta adhesión a EPCR (Bernabeu & Smith, 2017), mientras que los dominios CIDR β , CIDR γ y CIDR δ se han asociado a la formación de rosetas (Wahlgren *et al.*, 2017).

2.9.3 Domain cassettes

Es común que ciertos subtipos de dominio DBL y CIDR se combinen para formar casetes de dominio (DC) (Wiser, 2023).

Algunos DC contienen solo unos pocos dominios, mientras que otros contienen proteínas *PfEMP1* completas. Su presencia con frecuencia indica la especificidad del receptor del *PfEMP1* (Hviid & Jensen, 2015).

Un subconjunto de genes *var* A y B/A, llamados DC8 y DC13, se ha relacionado con la malaria grave mediante la unión al EPCR expresado en la microvasculatura cerebral. Además, los transcritos *var* principales DC8 y DC13 se han encontrado en varios tipos de células endoteliales microvasculares; incluidos pulmón, corazón, médula ósea y cerebro (Cabrera *et al.*, 2014).

DC13 es una variante del grupo A, mientras que DC8 es un gen quimérico raro e inusual que surge de un evento de recombinación entre un gen *var* del grupo B y un gen del grupo A (B/A). El DC8 tiene 4 dominios (DBL α 2-CIDR α 1.1-DBL β 12 DBL γ 4/6), mientras que el DC13 tiene 2 dominios (DBL α 1.7-CIDR α 1.4) (Smith, 2014).

Además, se han descubierto tres genes *var* distintos que no pertenecen a un casete de dominio. Estos son *var1*, *var2csa* y *var3*, y cada uno de ellos contiene módulos DBL y CIDR únicos que no se encuentran en otros alelos *PfEMP1* (Wiser, 2023).

3. Células VERO-E6

3.1 Generalidades

La línea celular VERO fue immortalizada en 1962 por Yoshihiro Yasumura a partir de células epiteliales del riñón de un mono verde africano (Konishi *et al.*, 2022). Debido a un análisis genómico realizado de las células VERO se determinó que la línea celular originalmente provino de un individuo femenino de la especie *Chlorocebus sabaesus* (Osada *et al.*, 2014). *Chlorocebus sabaesus*, conocido como el mono verde africano, es uno de los monos más comunes del mundo (Kavanagh, 1978).

Se evidenció, mediante un análisis de la secuencia del genoma completo, que la línea celular VERO-E6 es un derivado clonal de la línea celular VERO 76 (**Fig. 2**) (Konishi *et al.*, 2022). El grupo de genes de interferón tipo I y los genes inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina se perdieron en las células Vero debido a una deleción homocigótica de aproximadamente 9 Mb en el cromosoma 12, lo que las hace susceptibles a muchos virus (Osada *et al.*, 2014).

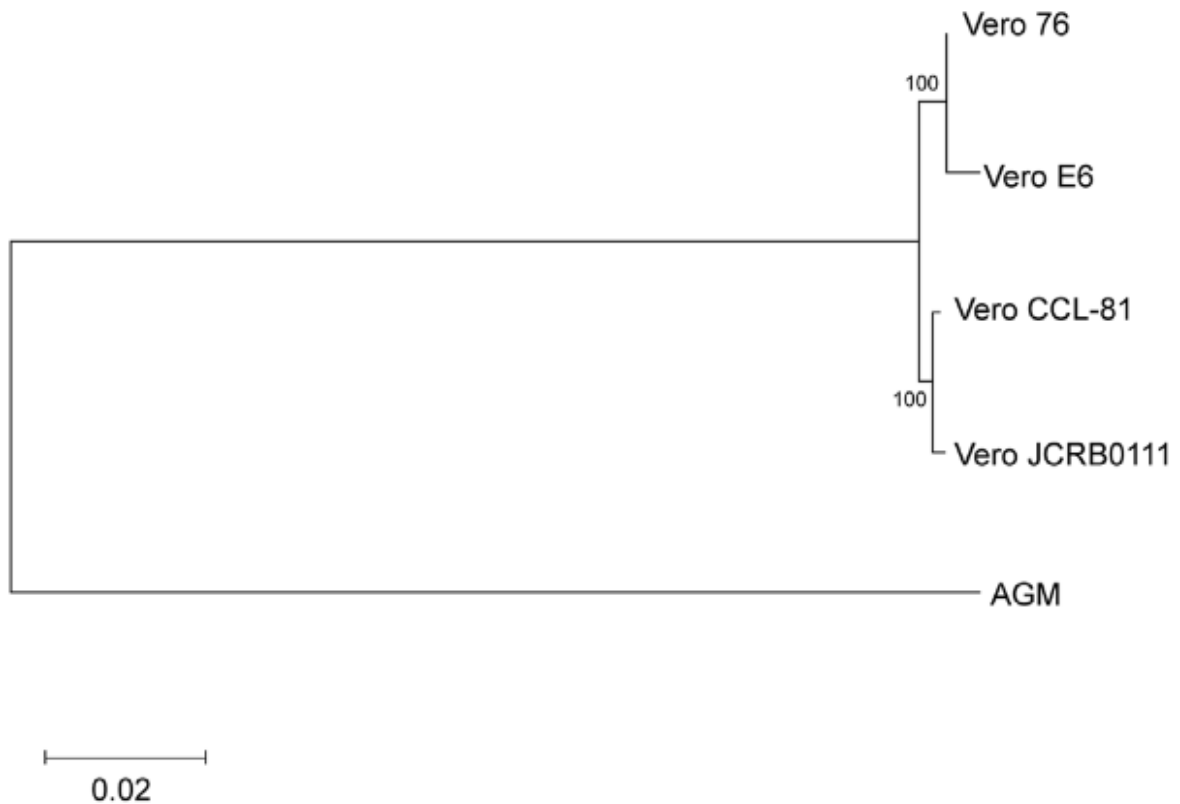


Fig. 2

Cladograma de cuatro sub-líneas de VERO analizadas. El método de neighbor-joining se utilizó para la reconstrucción del árbol y las distancias genéticas se midieron empleando estadísticas f_2 . Los valores de bootstrap están mostrados en las ramas (Konishi *et al.*, 2022).

3.1 Usos

La línea celular VERO se ha empleado ampliamente en estudios de virología, pero también se ha utilizado para muchos otros análisis, como la propagación y el estudio de bacterias y parásitos intracelulares, y la evaluación de cómo productos químicos, toxinas y otras sustancias afectan a nivel molecular las células de mamíferos (Kiesslich & Kamen, 2020).

Además, se han utilizado en todo el mundo para la producción de otros virus (Rhim *et al.*, 1969), como el reovirus (Berry *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2000), el virus de la rabia (Rourou *et al.*, 2019) y el virus de la encefalitis japonesa (Sugawara *et al.*, 2002; Toriniwa & Komiya, 2007). En los Estados Unidos, las células VERO se han autorizado para la producción de vacunas virales vivas (Kiesslich & Kamen, 2020; Wu *et al.*, 2017) e inactivadas (Barrett *et al.*, 2009, 2017; Jiang *et al.*, 2019; Kurokawa & Sato, 2011).

Debido a la pandemia de Covid (provocada por el SARS-CoV-2 en 2019), muchos investigadores utilizaron células VERO E6 para contribuir a la información disponible de este virus, además de probar diferentes tratamientos potenciales contra el mismo (Essaidi-Laziosi *et al.*, 2021; Melis *et al.*, 2024; Ogando *et al.*, 2020; Pruijssers *et al.*, 2020).

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

1. Cultivo de Parásitos

1.1 Preparación de medio de cultivo de parásitos (RPMI)

El medio RPMI completo para parásitos se elaboró disolviendo 15.89 g de RPMI 1640 en 700 mL de agua inyectable estéril. A la mezcla se le agregó 30 mL de NaHCO₃ al 7.5%, 2 mL de solución de glucosa al 45%, 4 mL de solución de hipoxantina 0.1 M en NaOH 1 M y 300 µL de gentamicina. Se aforó la solución hasta 900 mL con agua inyectable estéril y se filtró. Luego, se agregó 100 mL de suero humano estéril y se mezcló mediante inversión. El medio se rotuló y se extrajeron alícuotas para uso diario.

1.2 Preparación de sangre humana para cultivo de parásitos

Se realizó la extracción de sangre de voluntarios con sangre de tipo O⁺ por tecnólogos médicos idóneos.

Se transfirieron 5 mL de Ficoll filtrado a tubos cónicos de 15 mL y se agregaron lentamente 7 mL de la sangre extraída por las paredes del tubo, para formar dos capas. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min a 25 °C, con desaceleración 3.

Se descartaron las capas superiores para conservar el pellet de eritrocitos. Se lavaron los eritrocitos con PBS 1X dos veces.

Se igualó el volumen de eritrocitos con medio RPMI incompleto para conseguir hematocrito al 50%, se rotularon los tubos y se conservaron a 4 °C.

1.3 Descongelación de parásitos

Se descongelaron parásitos *Plasmodium falciparum* cepa HB3 siguiendo el protocolo de descongelación de parásitos estandarizado en el laboratorio.

Se dejó el criovial en la superficie de la cámara de flujo laminar para que se descongelara. Se transfirió el contenido del criovial descongelado a un tubo cónico de 50 mL y se tomó nota del volumen. Luego, se agregaron $\frac{1}{5}$ volúmenes de NaCl 12%, gota a gota mientras se agitó el tubo en movimientos circulares constantemente. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Luego, se agregaron 9 volúmenes de NaCl 1.67% gota a gota mientras se agitó el tubo en movimientos circulares y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5

min. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 25 °C. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, dejando un poco para resuspender el pellet. Se agregaron 9 volúmenes de NaCl 0.9% gota a gota, agitando el tubo en movimientos circulares. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 25 °C y se descartó el sobrenadante. Los parásitos se resuspendieron en medio RPMI completo y se le añadió 100 µL de eritrocitos. Se transfirieron a un T-Flask de cultivo, se gaseó con una mezcla de gases (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂) para asegurar un ambiente anóxico.

1.4 Mantenimiento de parásitos

Se revisaron los cultivos de parásitos diariamente para verificar los estadíos de los parásitos y los niveles de parasitemia. Esto se realizó mediante frotis de sangre de los cultivos y analizando las placas fijadas y teñidas bajo un microscopio.

De acuerdo con la parasitemia calculada, se ajustaron los volúmenes de eritrocitos en los cultivos, se cambió el medio y se gaseó el T-Flask de cultivo con la mezcla de gases para conservarlos en una incubadora a 37 °C.

1.5 Sincronización de parásitos

Los parásitos fueron sincronizados con Gelaspan a temperatura ambiente.

Se lavaron los cultivos con PBS 1X y se retiró el sobrenadante. Se agregó 1.4 volúmenes de RPMI incompleto o PBS 1X al pellet. Se resuspendió el pellet en 2.4 volúmenes de Gelaspan. Se incubó por 20 min a 37 °C. Se separaron las dos fases y ambas se lavaron con RPMI incompleto o PBS 1X. Se retiró el sobrenadante y se cultivaron las fases deseadas.

2. Cultivo de Células

2.1 Preparación de medio de cultivo de células (MEM)

Se disolvió un sobre de medio MEM en 1 L de agua inyectable estéril y se le agregaron 2.2 g de NaHCO₃. Se ajustó el pH a un rango de 7.2 a 7.4 con HCl 1 M y se filtró la solución. Para preparar medio de mantenimiento, a 245 mL del medio MEM se le agregaron 250 µL de gentamicina y 5 mL de suero fetal bovino estéril. El medio se filtró y se almacenó a 4 °C.

Para preparar medio de crecimiento, a 200 mL del medio MEM se le agregó 250 μ L de gentamicina y 50 mL de suero fetal bovino estéril. El medio se filtró y se almacenó a 4 °C.

2.2 Descongelación de células

Se descongelaron células de mamífero siguiendo el protocolo de descongelación de células estandarizado en el laboratorio.

Se dejó el criovial en la superficie de la cámara de flujo laminar para que se descongelara. Se transfirió el contenido a un tubo cónico con PBS 1X a temperatura ambiente y se centrifugó a 1400 rpm por 5 min a 25 °C. El pellet de células se resuspendió en medio de crecimiento y se transfirió a un T-Flask con filtro. Se incubó a 37 °C en 5% CO₂.

2.3 Mantenimiento de células

Se revisaron los cultivos de células a diario para verificar el crecimiento y la confluencia. Se cambió el medio diariamente y se realizaron pasajes de acuerdo con la confluencia que se observó.

3. Selección

Se atemperó el medio RPMI a 37 °C, se ajustó el pH a 7.20 y se filtró.

Los cultivos de parásitos se resuspendieron en medio RPMI, de acuerdo con la cantidad de eritrocitos del cultivo para alcanzar una concentración aproximada de 50 μ L de eritrocitos infectados para cada cultivo de células. Se mezcló por inversión para resuspender.

Se retiró el medio de los cultivos celulares y se agregó aproximadamente 5 mL del cultivo de parásitos a cada uno.

Los T-Flasks y platos Petri se dejaron en un Orbital Shaker-Incubator a 37 °C, 90 rpm por un mínimo de 1 h.

Cuando el tiempo concluyó, se transfirió el contenido de los T-Flasks a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 25 °C. Se retiró el medio RPMI y se lavó el pellet con PBS 1X a temperatura ambiente. Se retiró el PBS y se resuspendió el pellet en

medio RPMI completo y se transfirió a un T-Flask nuevo, se agregó el volumen necesario de eritrocitos y se gaseó el cultivo para ser incubado a 37 °C.

Los T-Flasks y platos Petri con los cultivos de células se lavaron con PBS 1X, se les agregó medio RPMI completo, se añadió el volumen necesario de eritrocitos y se gaseó el cultivo para ser incubado a 37 °C.

Los platos Petri se fijaron con paraformaldehído para su posterior tinción y observación.

4. Tinción de platos Petri

Los platos Petri fijados con paraformaldehído se tiñeron con PureBlu DAPI Nuclear Staining Dye de BIO RAD (Cat no. 1351303).

Se disolvió 5 µg del DAPI en 500 µL de agua de grado molecular para una solución 100X. Se preparó una dilución 1X a partir de la solución 100X, mezclando en un tubo 60 µL del DAPI 100X con 5 940 µL PBS 1X. Se mezcló mediante resuspensión con una micropipeta. Se descartó el paraformaldehído y se lavaron los platos Petri con PBS 1X. Se tiñó cada plato Petri con 2 mL de la solución DAPI 1X por 15 min. Se descartó la solución DAPI, se lavaron los platos con PBS 1X y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

5. TRIzol

Un volumen de los cultivos de parásitos se extrajo *pre panning* para ser tratado con TRIzol, además de los cultivos de parásitos *post panning* (no adherentes y adherentes).

Los cultivos se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 1500 rpm a 5 min a 25 °C. El medio RPMI se extrajo y se agregó 15X el volumen del pellet en TRIzol. Se mezcló con un vortex, se rotularon los tubos, se sellaron con parafilm y se conservaron a -70 °C para su posterior análisis.

6. Extracción de ARN

Las muestras de TRIzol se descongelaron a 37 °C y se homogenizaron con un vortex. Se transfirió 1 mL de cada muestra a microtubos de 1.5 mL. Se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló por inversión por 15 s. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 3 min.

Luego, se centrifugaron a 10 000 rpm a 4 °C por 15 min. Se transfirió la capa superior acuosa a microtubos de 1.5 mL libre de ARN.

Se siguió el protocolo del kit de extracción de ARN PureLink RNA Mini Kit de Invitrogen (Cat no. 12183018A), en conjunto con PureLink DNase de Invitrogen (Cat no. 12185-010).

7. Eliminación de ADN genómico por tratamiento con DNase

Las muestras se trataron para la eliminación de trazas de ADN remanentes con el kit TURBO DNA-free de Invitrogen (Ref. AM1906).

Se preparó 10 µL de TURBO DNase mix para cada 20 µL de muestra de ARN, conteniendo: 6 µL de TURBO DNase (2U/µL), 3 µL de TURBO DNase buffer 10X y 1 µL de agua libre de DNasa/RNasa. Se agregó el TURBO DNase mix a cada muestra, se mezcló con un vortex y se incubó a 37 °C por 30 min.

Para confirmar la ausencia de ADN en las muestras de ARN tratadas, se realizó una Q-PCR con seryl.

Cuando las muestras amplificaron, se trató con rDNase I. A 95 µL de ARN se le agregó 2 µL rDNase I, se incubó a 37 °C por 60 min, se inactivó la DNasa con 20 µL de DNase Inactivation Reagent y se incubó a 37 °C por 10 min.

Se confirmó la eliminación de ADN de las muestras cuando no hubo amplificación.

8. Síntesis de ADNc

Se sintetizó ADNc a partir del ARN que se extrajo de los cultivos de parásitos con el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen (Ref. 18080-051).

Se transfirieron 60 µL de cada muestra de ARN a tubos de PCR y se preparó el Priming mix. Se preparó 14 µL de Priming mix para cada 30 µL de muestra de ARN, conteniendo: 4 µL de Oligo(dT), 4 µL de hexámeros aleatorios, 4 µL de dNTPs y 2 µL de agua libre de DNasa/RNasa. Se agregó 28 µL del Priming mix a cada tubo y se incubaron los tubos a 65 °C por 5 min. Luego se transfirieron los tubos a una nevera de 4 °C por 1 min. Se centrifugaron los tubos brevemente.

Se preparó 40 µL del SS III RT mix para cada 40 µL de las muestras anteriores, conteniendo: 8 µL de buffer RT 10X, 16 µL de MgCl₂ (25 mM), 8 µL de DTT, 4 µL de RNaseOUT

(40U/ μ L) y 4 μ L Super Script III RT (200/ μ L). Se agregaron 80 μ L del SS III RT mix a cada tubo y se mezcló con un vortex. Los tubos se incubaron en un termociclador, programado con los siguientes ciclos: 25 °C por 10 min, 50 °C por 50 min y 85 °C por 5 min. Se extrajeron los tubos del termociclador para agregar 2 μ L de RNase H, se resuspendió con la micropipeta y se incubó por 37 °C por 20 min. Se centrifugaron los tubos.

Se realizó una Q-PCR con 5 μ L de cada muestra para confirmar la síntesis de ADNc.

Las muestras se mantuvieron en una nevera de 4 °C para su uso posterior.

9. Q-PCR

Se realizó Q-PCR en platos de 96 pocillos para cada una de las 3 muestras, en el termociclador de Applied Biosystems QuantStudio 6 y los resultados obtenidos fueron visualizados en el programa informático QuantStudio Software V1.5.

Las muestras de ADNc se diluyeron con el mismo volumen en agua de grado molecular, para obtener un volumen final de 340 μ L. Se realizaron las Q-PCR con cebadores de 49 genes *var* de *Plasmodium falciparum* cepa HB3 y 3 genes *housekeeping* (Aldolasa, Fructosa y Seryl). A cada pocillo se le añadió 10 μ L de SybrGreen, 4 μ L de cebador *forward* (5 μ M), 4 μ L de cebador *reverse* (5 μ M), 2 μ L de H₂O de grado molecular y 5 μ L de ADNc para un volumen de reacción total de 25 μ L.

Los platos se insertaron en el termociclador programado con los siguientes ciclos: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min (etapa de espera), 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min (etapa de PCR), 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min y 95 °C por 1 s (etapa de curva de fusión). Se programaron 40 ciclos con la temperatura de la cobertura a 105 °C.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se planteó identificar indirectamente los receptores endoteliales de citoadherencia a través del análisis transcripcional de los genes *var*/PfEMP1 en parásitos *Plasmodium falciparum* seleccionados sobre células VERO-E6. Los resultados muestran la expresión de genes *var* específicos en diferentes niveles, de acuerdo con la etapa del ensayo realizado.

Se logró iniciar y mantener cultivos de *Plasmodium falciparum* cepa HB3, hasta que se alcanzó una parasitemia de 1-2%, lo cual se verificó mediante la observación de frotis del cultivo bajo un microscopio óptico.

Además, se consiguió mantener cultivos de células VERO-E6, con una confluencia mínima de 90% para el co-cultivo.

En ambos casos, la complicación más común fue la contaminación de los cultivos, probablemente a causa del manejo incorrecto.

Se realizó el co-cultivo con los cultivos de eritrocitos infectados por *P. falciparum* seleccionados sobre células VERO-E6 y se confirmó la adhesión de eritrocitos infectados a las células mediante el microscopio de fluorescencia (**Fig. 5, Fig. 6, Fig. 8**).

Cuando se realizaron las Q-PCR tiempo real de las muestras (pre-*panning* y post-*panning* adherente), se obtuvieron los diferentes perfiles de expresión de los 49 genes *var* evaluados (**Fig. 9**)

El gen *var3* mostró una expresión incremental en las muestras, aumentó en el análisis de la muestra post-*panning* adherente en comparación con el nivel de expresión en la muestra de pre-*panning* (**Fig. 9**).

En un estudio previo con células endoteliales de cerebro humano (HBEC-5i), se encontró que el gen *HB3var3* fue el gen con el aumento más notable, con una regulación positiva de hasta 61 veces en promedio de las cinco sondas. El gen *HB3var3* codifica en el extremo N-terminal los dominios DBL α 1.7/CIDR α 1.4, que se conocen como DC13 (Claessens *et al.*, 2012). Este casete de dominio se encuentra en algunos genes *var* del grupo A (Smith, 2014) y se ha vinculado a complicaciones graves de la malaria y a malaria grave en niños (Lavstsen *et al.*, 2003).

El gen *HB3var5*, incluido en el ensayo mencionado, no presentó regulación positiva, a pesar de las similitudes en dominios de los dos genes, por lo que se determinó que la región de unión funcional comprende los dominios distintos del gen *var3* en el extremo N-terminal. *HB3var3* se propuso como ligando de adhesión parasitaria para la unión HBEC-5i (Claessens *et al.*, 2012).

Los parásitos que expresan *var3* son viables *in vivo* y pueden proporcionar poblaciones significativas de parásitos en niños enfermos de malaria, según datos presentados en un artículo. Se encontró que niños de hasta un año reaccionaron con *var3 PfEMP1*, y el nivel de reconocimiento parecía aumentar con la edad hasta los primeros tres años (Wang *et al.*, 2012).

El gen *var5* en el presente estudio presentó una muy baja expresión en la muestra *pre-panning*, la cual incrementó ligeramente en la muestra *post-panning* adherente.

El gen *var5* codifica en el extremo N-terminal los dominios DBL α 1.6-CIDR δ 1, la cual es una combinación conocida como DC16 y se ha asociado a la formación de rosetas (Wichers *et al.*, 2021). Además, inmediatamente después del DC16, el gen contiene otro casete de dominio, el DC5 (DBL γ 12-DBL δ 5-CIDR β 3-DBL β 7) (Berger *et al.*, 2013). Este casete de dominio se expresa con mayor probabilidad en pacientes pediátricos con malaria grave que en pacientes con malaria no complicada, y se ha propuesto como el intermediario en la adhesión del receptor endotelial PECAM-1 (Smith, 2014). PECAM-1 se expresa en células endoteliales, monocitos, plaquetas y granulocitos, y los parásitos aislados en el campo a menudo se adhieren a este receptor (Berger *et al.*, 2013).

La baja expresión del gen *var1csa* se mantuvo relativamente similar en las muestras analizadas, incrementando ligeramente en la muestra *post-panning* adherente.

Los genes *var3*, *var5* y *var1csa* se encuentran en el grupo A y contienen un dominio CIDR α 1 en el extremo N-terminal, que se une al receptor endotelial EPCR (Joste *et al.*, 2020). Se ha demostrado que niños con malaria cerebral, anemia palúdica grave y anemia grave tienen niveles más altos de transcripciones de *PfEMP1* de unión a EPCR (Bhandari *et al.*, 2021; Shabani *et al.*, 2017). La ruta de proteína C EPCR regula las propiedades de los coágulos sanguíneos y las barreras endoteliales (Smith, 2014). Al unirse a EPCR, los eritrocitos infectados interfieren con la producción de la proteína C activada, iniciando así la cascada

de coagulación, lo que lleva a una mayor producción de trombina y al potencial de causar activación endotelial proinflamatoria (Storm *et al.*, 2019).

Los subtipos CIDR α 1.1, como el *var1csa*, y α 1.4 en la estructura de la cabeza de PfEMP1 participan en una interacción de unión clave con las células endoteliales del cerebro y los dominios CIDR de DC8 y DC13 pueden unirse al mismo receptor (Avril *et al.*, 2013).

Los genes *var27* y *var50* mostraron una expresión muy baja en la muestra pre-*panning*, que incrementó sutilmente en la muestra post-*panning* adherente (**Fig. 9**).

Fue notorio el gen *var30*, que mostró la mayor expresión observada en el estudio en la muestra pre-*panning*. La expresión de este gen disminuyó drásticamente en la muestra post-*panning* adherente, donde la expresión del gen fue casi nula.

El gen *var7* presentó una expresión notable en la muestra pre-*panning*, que disminuyó completamente en la muestra post-*panning* adherente.

Los genes *var27*, *var30*, *var7* y *var50* forman parte del grupo B (Kraemer *et al.*, 2007). El dominio CIDR en la estructura principal semiconservada de PfEMP1 juega un papel importante en la unión de eritrocitos infectados. En la mayoría de las variantes PfEMP1 del grupo B y C, este dominio tiene una fuerte selección para unirse al receptor CD36 del huésped (Avril *et al.*, 2013).

Mientras el *var27* codifica un dominio CIDR α 3.1 ausente en *var30*, *var7* y *var50*, los cuatro contienen un dominio DBL δ 1. Estos dominios, presentes en los grupos B y C, han sido asociados a casos de malaria no grave. Los cuatro genes codifican también un dominio DBL α 0 en el extremo N-terminal, que se encuentra en mayor proporción significativa en casos de pacientes expuestos a malaria previamente. Los adultos con malaria suelen presentar niveles más altos de dominios típicos de proteínas PfEMP1 de unión a CD36 (Wichers *et al.*, 2021).

En el gen *var 29* se observó una baja expresión en la muestra pre-*panning*, la cual incrementó en la muestra post-*panning* adherente. Perfiles con tendencias similares se observaron en los genes *var32* y *var33*. Después del gen *var3*, los genes con mayor expresión de todas las

muestras post-*panning* adherente, en orden decreciente, fueron *var32* seguido de *var33* y el más bajo fue *var29* (**Fig. 9**).

El gen *var28* presentó expresión casi nula en la muestra pre-*panning*, la cual incrementó en la de post-*panning* adherente. Los genes *var31* y *var36* presentaron perfiles idénticos entre sí, que fueron similares al *var28*.

Los genes *var29*, *var32*, *var33*, *var28*, *var31* y *var36* son parte del grupo C (Kraemer *et al.*, 2007). Las variantes de *PfEMP1* del grupo C codifican secuencias de tipo CIDR α 2-6 que usualmente se unen a CD36 (Avril *et al.*, 2013). En un estudio se encontró que la unión a CD36 solo fue más frecuente en pacientes con malaria no complicada que en pacientes con malaria cerebral (Tuikue Ndam *et al.*, 2017).

Se ha sugerido que el parásito se dirige a una sección de CD36 crítica para su función fisiológica de absorción de ácidos grasos, lo que reduce la probabilidad de que el huésped humano pueda escapar de la unión de *PfEMP1* cambiando su CD36 (Hsieh *et al.*, 2016).

Los genes *var33* y *var32* contienen los dominios CIDR α 3.1 y DBL δ 1, en comparación a los genes *var29*, *var28*, *var31* y *var36* que cuentan solo con el dominio DBL δ 1. Estos dos dominios han sido asociados con casos no graves de malaria. Los seis genes codifican un dominio de tipo DBL α 0 inmediatamente después del NTS, lo cual se ha demostrado que está relacionado con pacientes previamente expuestos a malaria y pacientes que desarrollaron casos de malaria no grave (Wichers *et al.*, 2021). Se ha encontrado que pacientes con malaria no complicada presentan anticuerpos contra *PfEMP1* del grupo C y contra *PfEMP1* que no eran DC5, DC8, o DC13 (Duffy *et al.*, 2016).

Los genes *var2csaA* y *var2csaB* mostraron una baja expresión en la muestra pre-*panning*, que aumentó levemente en la de post-*panning* adherente (**Fig. 9**).

Ambos genes pertenecen al grupo E y tienen dominios idénticos (Kraemer *et al.*, 2007). El interdominio 2 (ID2) de *var2csa* es parcialmente homólogo a los dominios CIDR, por lo que se incluyó como CIDRpam. Sin embargo, es muy diferente de otros dominios CIDR (Rask *et al.*, 2010)

var2csa es la causa principal de la mayor parte de malaria en el embarazo. Las mujeres que han sobrevivido a la primera infección suelen desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz. Se ha descubierto que las mujeres embarazadas contienen altos niveles de anticuerpos (IgG)

contra *var2csa* en las regiones africanas con prevalencia de *P. falciparum* (Lalchhandama, 2020). Dentro del espacio intervilloso de la placenta, se acumulan eritrocitos infectados por parásitos. La capacidad de la placenta para interactuar con el componente CSA del CSPG (proteoglicano de sulfato de condroitina) que llena el espacio intervilloso está relacionada con la acumulación de eritrocitos infectados en la placenta (Khunrae *et al.*, 2010). Se ha encontrado que las transcripciones de *var2csa* fueron significativamente más altas en muestras de paludismo materno que en muestras de malaria cerebral o no complicada (Bertin *et al.*, 2013).

A

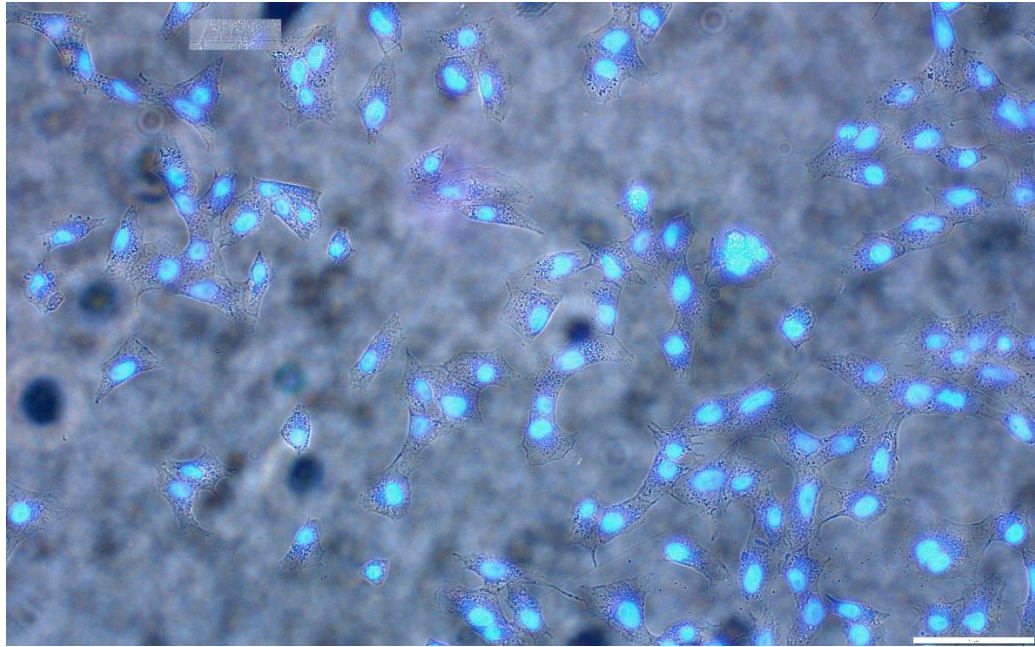


Fig. 3

Células VERO-E6 pre-*panning* (imagen de campo claro unida con imagen de fluorescencia)

B

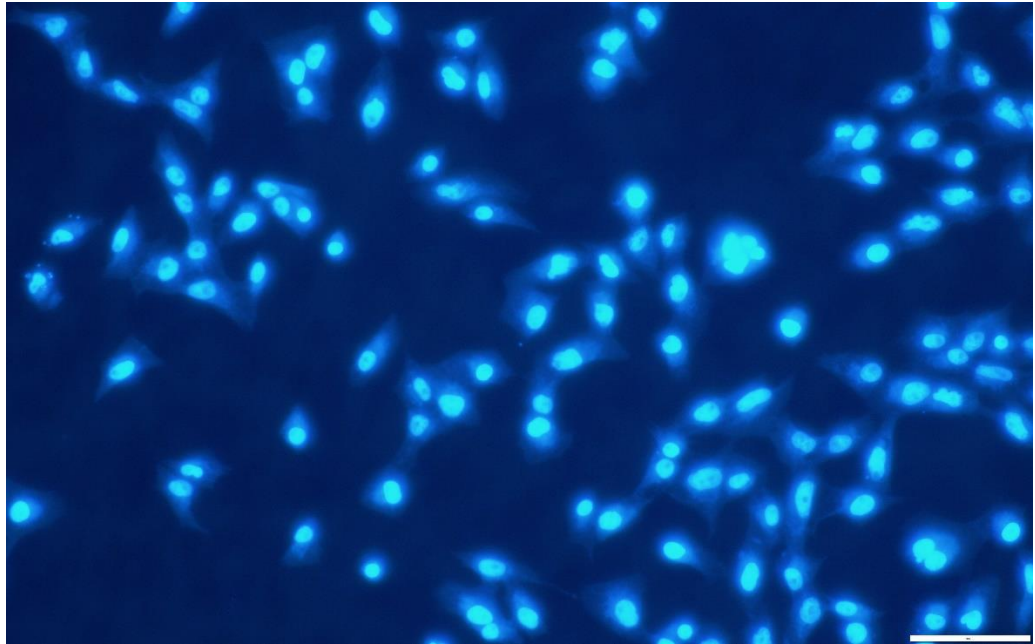


Fig. 4

Células VERO-E6 pre-*panning* bajo microscopio de fluorescencia.

A

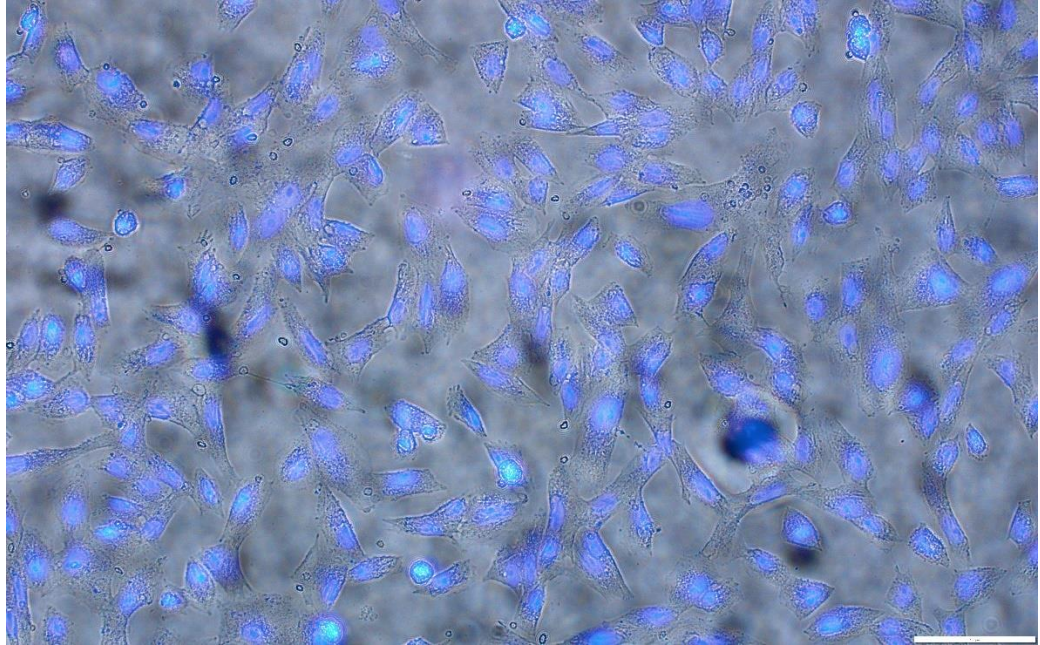


Fig. 5

Células VERO E-6 post-*panning* (imagen de campo claro unida con imagen de fluorescencia)

B

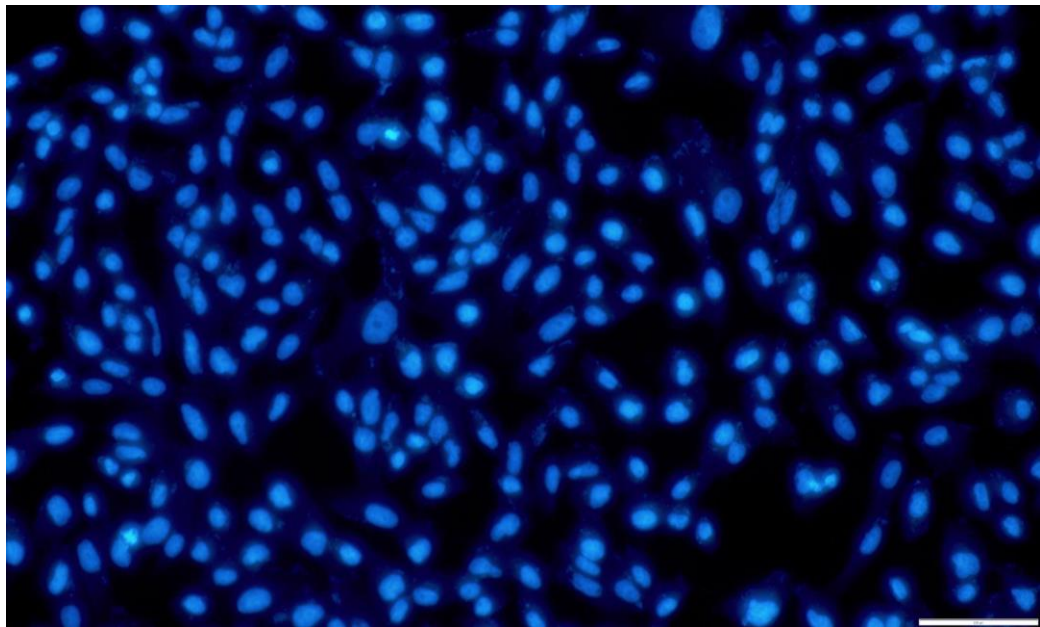
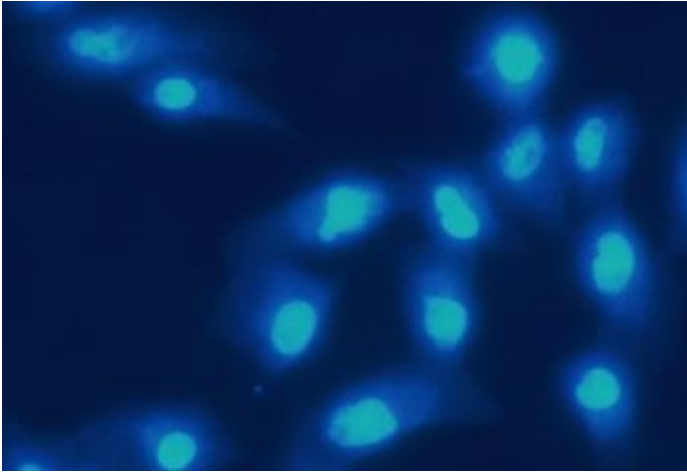
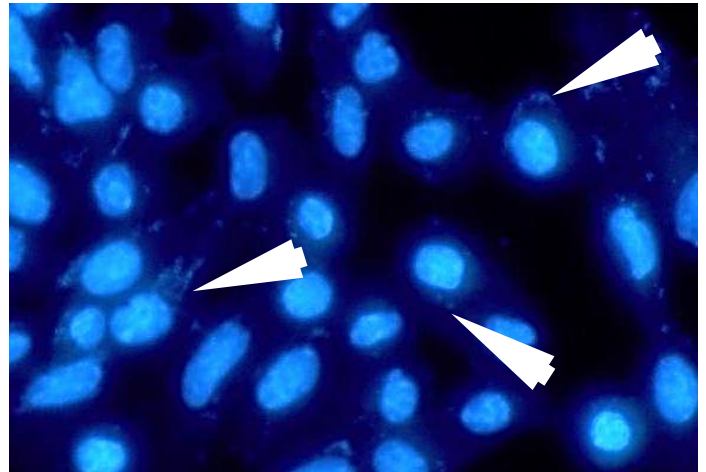


Fig. 6

Células VERO-E6 post-*panning* con eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* con los núcleos definidos

A**Fig. 7****B****Fig. 8**

Células VERO-E6, (A) *pre-panning* y (B) *post-panning*, las flechas blancas muestran el patrón punteado que indica la adhesión de parásitos *P. falciparum* HB3. Los núcleos de las células VERO-E6 y de los parásitos se tiñeron con DAPI. 1X.

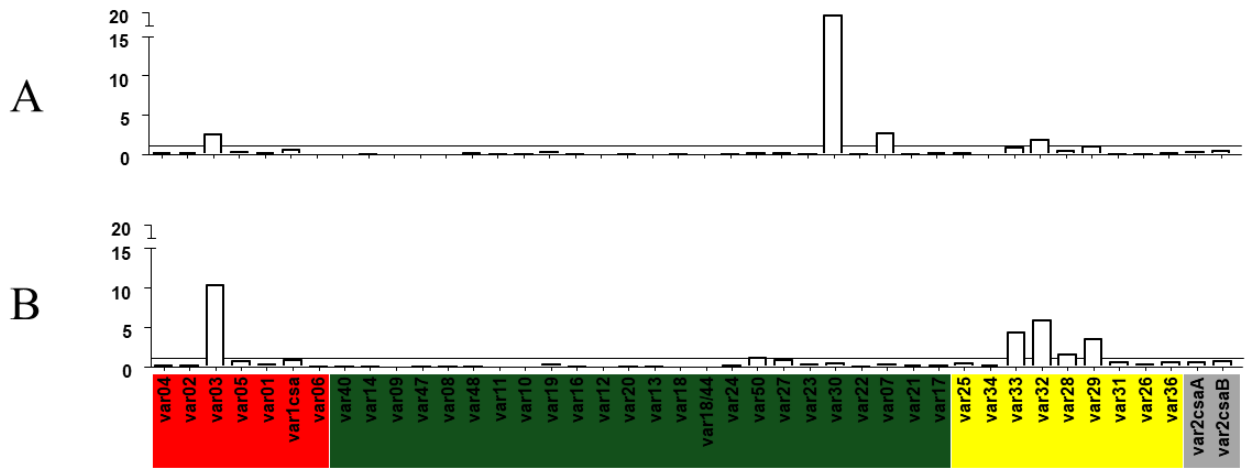


Fig. 9

Gráficos de expresión de los genes *var* analizados en el estudio. En los ejes “y” se encuentran las muestras pre-panning (A) y post-panning adherente (B). En los ejes “x” se representan los genes *var*, clasificados en grupos: grupo A (rojo), grupo B (verde), grupo C (amarillo) y grupo E (gris).

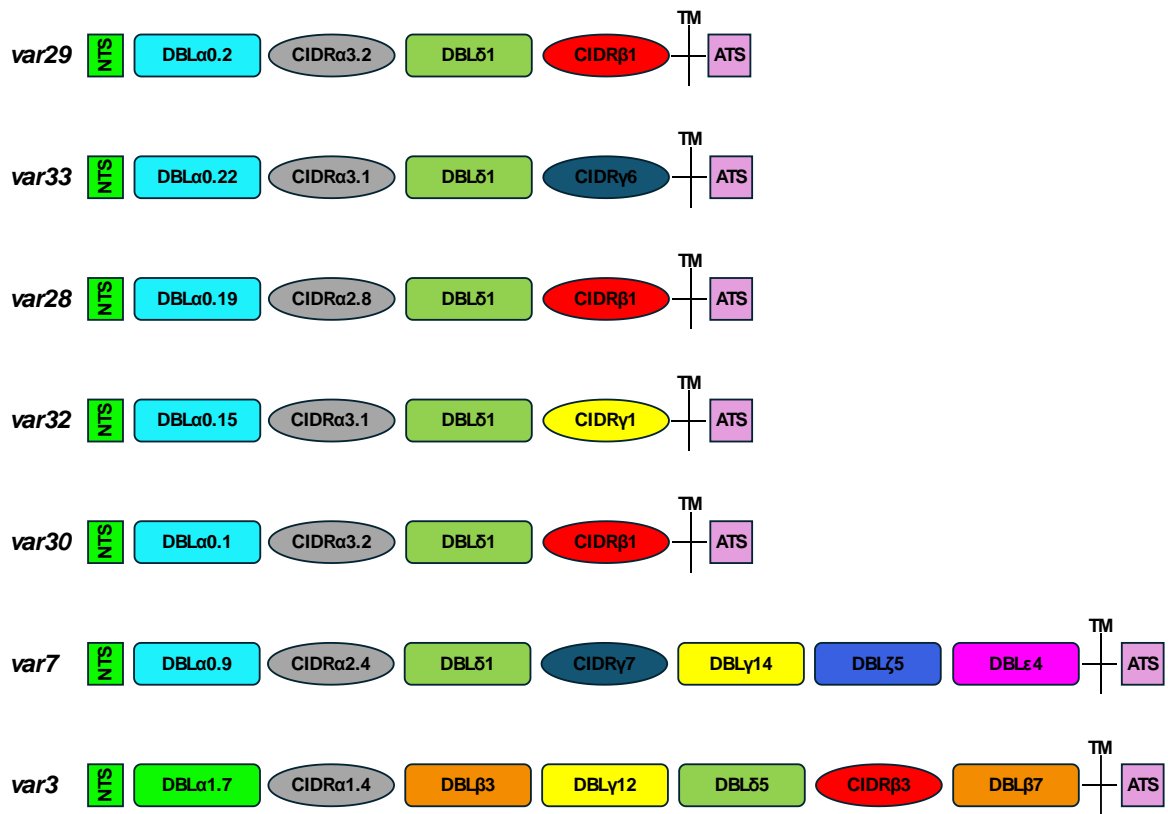


Fig. 10

Diagrama de la arquitectura de los dominios extracelulares de algunos genes *var* analizados en el estudio. NTS, N-terminal segment; TM, Transmembrane; ATS, Acidic terminal segment.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Se logró establecer co-cultivos de eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* y células VERO-E6, con el fin de seleccionar parásitos con fenotipos adhesivos hacia las células VERO-E6, para realizar los ensayos transcripcionales.
2. El gen *var3*, el cual presenta un fenotipo predictivo de adhesión hacia el receptor EPCR, fue el que mostró la mayor regulación positiva en los parásitos adherentes obtenidos en el *post-panning*. Por otra parte, los genes *var32*, *var33*, *var29* y *var28* con fenotipo de adhesión a CD36, presentaron menores niveles de transcripción.
3. En base al análisis de los genes *var* con regulación positiva en co-cultivo (*post-panning*) con células VERO-E6 de monos, potencialmente moléculas con homología a los receptores endoteliales humanos EPCR y CD36 serán los receptores de mono con afinidad a las *PfEMP1* sobre-expresadas.

RECOMENDACIONES

Utilizar otras cepas de *P. falciparum* (Dd2, IT4) y otras líneas celulares (VERO, CALU) para comparar los niveles de transcripción de genes *var* de acuerdo con las líneas celulares/receptores utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, M. I., Vajda, É. A., Gutiérrez, E. J., Gibson, D. A., Renteria, M. M., Presley, N., O'Reilly, D., Burton, T. A., Tatarsky, A., & Lobo, N. F. (2021). Anopheles drivers of persisting malaria transmission in Guna Yala, Panamá: An operational investigation. *Malaria Journal*, 20(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03972-z>
- Avril, M., Bernabeu, M., Benjamin, M., Brazier, A. J., & Smith, J. D. (2016). Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. *mBio*, 7(4), e00615-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00615-16>
- Avril, M., Brazier, A. J., Melcher, M., Sampath, S., & Smith, J. D. (2013). DC8 and DC13 var Genes Associated with Severe Malaria Bind Avidly to Diverse Endothelial Cells. *PLOS Pathogens*, 9(6), e1003430. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003430>
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O., & Howard, M. K. (2009). Vero cell platform in vaccine production: Moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(5), 607–618. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
- Barrett, P. N., Terpening, S. J., Snow, D., Cobb, R. R., & Kistner, O. (2017). Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. *Expert Review of Vaccines*, 16(9), 883–894. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1357471>
- Beeson, J. G., Brown, G. V., Molyneux, M. E., Mhango, C., Dzinjalama, F., & Rogerson, S. J. (1999). Plasmodium falciparum Isolates from Infected Pregnant Women and Children Are Associated with Distinct Adhesive and Antigenic Properties. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(2), 464–472. <https://doi.org/10.1086/314899>
- Beeson, J. G., Reeder, J. C., Rogerson, S. J., & Brown, G. V. (2001). Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends in Parasitology*, 17(7), 331–337. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01917-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01917-1)
- Berger, S. S., Turner, L., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Kraft, M., Lusingu, J. P. A., Mmbando, B., Marquard, A. M., Bengtsson, D. B. A. C., Hviid, L., Nielsen, M. A., Theander, T. G., & Lavstsen, T. (2013). Plasmodium falciparum Expressing Domain

- Cassette 5 Type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) Bind PECAM1. *PLOS ONE*, 8(7), e69117.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069117>
- Bernabeu, M., & Smith, J. D. (2017). EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends in Parasitology*, 33(4), 295–308.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.004>
- Berry, J. M., Barnabé, N., Coombs, K. M., & Butler, M. (1999). Production of reovirus type-1 and type-3 from Vero cells grown on solid and macroporous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1), 12–19.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990105\)62:1<12::AID-BIT2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990105)62:1<12::AID-BIT2>3.0.CO;2-G)
- Bertin, G. I., Lavstsen, T., Guillonneau, F., Doritchamou, J., Wang, C. W., Jespersen, J. S., Ezimegnon, S., Fievet, N., Alao, M. J., Lalya, F., Massougbojji, A., Ndam, N. T., Theander, T. G., & Deloron, P. (2013). Expression of the Domain Cassette 8 Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Is Associated with Cerebral Malaria in Benin. *PLOS ONE*, 8(7), e68368.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068368>
- Bhandari, S., Krishna, S., Patel, P. P., Singh, M. P., Singh, N., Sharma, A., & Bharti, P. K. (2021). Diversity and expression of *Plasmodium falciparum* var gene in severe and mild malaria cases from Central India. *International Journal of Infectious Diseases*, 103, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.022>
- Biamonte, M. A., Wanner, J., & Le Roch, K. G. (2013). Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(10), 2829–2843.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.067>
- Breman, J. G. (2009). Eradicating Malaria. *Science Progress*, 92(1), 1–38.
<https://doi.org/10.3184/003685009X440290>
- Butler, M., Burgener, A., Patrick, M., Berry, M., Moffatt, D., Huzel, N., Barnabé, N., & Coombs, K. (2000). Application of a Serum-Free Medium for the Growth of Vero Cells and the Production of Reovirus. *Biotechnology Progress*, 16(5), 854–858.
<https://doi.org/10.1021/bp000110+>
- Cabrera, A., Neculai, D., & Kain, K. C. (2014). CD36 and malaria: Friends or foes? A decade of data provides some answers. *Trends in Parasitology*, 30(9), 436–444.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.006>

- Carlson, J., Helmby, H., Wahlgren, M., Carlson, J., Helmby, H., Wahlgren, M., Hill, A., Brewster, D., & Greenwood, B. M. (1990). Human cerebral malaria: Association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *The Lancet*, *336*(8729), 1457–1460. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93174-N](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93174-N)
- Carrera, L. C., Victoria, C., Ramirez, J. L., Jackman, C., Calzada, J. E., & Torres, R. (2019). Study of the epidemiological behavior of malaria in the Darien Region, Panama. 2015–2017. *PLOS ONE*, *14*(11), e0224508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224508>
- Claessens, A., Adams, Y., Ghumra, A., Lindergard, G., Buchan, C. C., Andisi, C., Bull, P. C., Mok, S., Gupta, A. P., Wang, C. W., Turner, L., Arman, M., Raza, A., Bozdech, Z., & Rowe, J. A. (2012). A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(26), E1772–E1781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120461109>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell*, *167*(3), 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors*, *3*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
- Dahlbäck, M., Nielsen, M. A., & Salanti, A. (2010). Can any lessons be learned from the ambiguous glycan binding of PfEMP1 domains? *Trends in Parasitology*, *26*(5), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.02.002>
- David, P. H., Hommel, M., Miller, L. H., Udeinya, I. J., & Oligino, L. D. (1983). Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: Spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(16), 5075–5079. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.16.5075>
- Drouin, E., Hautecoeur, P., & Markus, M. (2024). Who was the first to visualize the malaria parasite? *Parasites & Vectors*, *17*(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06145-4>
- Duffy, M. F., Noviyanti, R., Tsuboi, T., Feng, Z.-P., Trianty, L., Sebayang, B. F., Takashima, E., Sumardy, F., Lampah, D. A., Turner, L., Lavstsen, T., Fowkes, F. J. I., Siba, P.,

- Rogerson, S. J., Theander, T. G., Marfurt, J., Price, R. N., Anstey, N. M., Brown, G. V., & Papenfuss, A. T. (2016). Differences in PfEMP1s recognized by antibodies from patients with uncomplicated or severe malaria. *Malaria Journal*, *15*(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1296-4>
- Escalante, A. A., & Ayala, F. J. (1994). Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(24), 11373–11377. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11373>
- Espinoza, J. L. (2019). Malaria Resurgence in the Americas: An Underestimated Threat. *Pathogens*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010011>
- Essaidi-Laziosi, M., Rodriguez, F. J. P., Hulo, N., Jacqueroiz, F., Kaiser, L., & Eckerle, I. (2021). Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. *The Lancet Microbe*, *2*(11), e571. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00216-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00216-0)
- Fikadu, M., & Ashenafi, E. (2023). Malaria: An Overview. *Infection and Drug Resistance*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/IDR.S405668>
- Fried, M., & Duffy, P. E. (1996). Adherence of *Plasmodium falciparum* to Chondroitin Sulfate A in the Human Placenta. *Science*, *272*(5267), 1502–1504. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1502>
- Garcia, L. S. (2010). Malaria Update for the Clinical Microbiology Laboratory: A New Species, *Plasmodium knowlesi*, and New Diagnostic Tests. *Clinical Microbiology Newsletter*, *32*(17), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2010.08.001>
- Gray, M. W. (2013). Mitochondrial DNA. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 436–438). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00958-X>
- Gysin, J., Pouvelle, B., Fievet, N., Scherf, A., & Lépolard, C. (1999). Ex Vivo Desequestration of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes from Human Placenta by Chondroitin Sulfate A. *Infection and Immunity*, *67*(12), 6596–6602. <https://doi.org/10.1128/iai.67.12.6596-6602.1999>
- Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., Carlton, J. M., Kooij, T. W. A., Berriman, M., Florens, L., Janssen, C. S., Pain, A., Christophides, G. K., James, K., Rutherford, K., Harris, B., Harris, D., Churcher, C., Quail, M. A., Ormond, D., Doggett, J., Trueman, H. E., ... Sinden, R. E. (2005). A Comprehensive Survey of the *Plasmodium* Life Cycle by

- Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analyses. *Science*, 307(5706), 82–86.
<https://doi.org/10.1126/science.1103717>
- Hsieh, F.-L., Turner, L., Bolla, J. R., Robinson, C. V., Lavstsen, T., & Higgins, M. K. (2016). The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nature Communications*, 7(1), 12837. <https://doi.org/10.1038/ncomms12837>
- Hurtado, L., Cumbreira, A., Rigg, C., Perea, M., Santamaría, A. M., Chaves, L. F., Moreno, D., Romero, L., Lasso, J., Caceres, L., Saldaña, A., & Calzada, J. E. (2020). Long-term transmission patterns and public health policies leading to malaria elimination in Panamá. *Malaria Journal*, 19(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03329-y>
- Hviid, L., & Jensen, A. T. R. (2015). PfEMP1 – A Parasite Protein Family of Key Importance in *Plasmodium falciparum* Malaria Immunity and Pathogenesis. En D. Rollinson & J. R. Stothard (Eds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 88, pp. 51–84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.004>
- Janes, J. H., Wang, C. P., Levin-Edens, E., Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Melcher, M., Mercereau-Puijalon, O., & Smith, J. D. (2011). Investigating the Host Binding Signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 Protein Family. *PLoS Pathogens*, 7(5), e1002032. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002032>
- Jespersen, J., Wang, C., Mkumbaye, S., Minja, D., Petersen, B., Louise, T., Petersen, J., Lusingu, J., Theander, T., & Lavsten, T. (2016). Plasmodium falciparum var genes expressed in children with severe malaria encode CIDRa1 domains. *EMBO Mol Med*, 8, 839–850. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606188>
- Jiang, Y., van der Welle, J. E., Rubingh, O., van Eikenhorst, G., Bakker, W. A. M., & Thomassen, Y. E. (2019). Kinetic model for adherent Vero cell growth and poliovirus production in batch bioreactors. *Process Biochemistry*, 81, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.010>
- Joste, V., Guillochon, E., Fraering, J., Vianou, B., Watier, L., Jafari-Guemouri, S., Cot, M., Houzé, S., Aubouy, A., Faucher, J. F., Argy, N., Bertin, G. I., & NeuroCM study group. (2020). PfEMP1 A-Type ICAM-1-Binding Domains Are Not Associated with Cerebral Malaria in Beninese Children. *mBio*, 11(6), 10.1128/mbio.02103-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.02103-20>

- Kessler, A., Dankwa, S., Bernabeu, M., Harawa, V., Danziger, S. A., Duffy, F., Kampondeni, S. D., Potchen, M. J., Dambrauskas, N., Vigdorovich, V., Oliver, B. G., Hochman, S. E., Mowrey, W. B., MacCormick, I. J. C., Mandala, W. L., Rogerson, S. J., Sather, D. N., Aitchison, J. D., Taylor, T. E., ... Kim, K. (2017). Linking EPCR-Binding PfEMP1 to Brain Swelling in Pediatric Cerebral Malaria. *Cell Host & Microbe*, 22(5), 601-614.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.009>
- Khunrae, P., & Higgins, M. K. (2010). Structural insights into chondroitin sulfate binding in pregnancy-associated malaria. *Biochemical Society Transactions*, 38(5), 1337–1341. <https://doi.org/10.1042/BST0381337>
- Kiesslich, S., & Kamen, A. A. (2020). Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology Advances*, 44, 107608. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
- Konishi, K., Yamaji, T., Sakuma, C., Kasai, F., Endo, T., Kohara, A., Hanada, K., & Osada, N. (2022). Whole-Genome Sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and Comparative Analysis of Four Vero Cell Sublines. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801382>
- Kraemer, S. M., Kyes, S. A., Aggarwal, G., Springer, A. L., Nelson, S. O., Christodoulou, Z., Smith, L. M., Wang, W., Levin, E., Newbold, C. I., Myler, P. J., & Smith, J. D. (2007). Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in *Plasmodium falciparum*: Comparisons of geographically diverse isolates. *BMC Genomics*, 8(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-45>
- Krampa, F. D., Aniweh, Y., Awandare, G. A., & Kanyong, P. (2017). Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria. *Diagnostics*, 7(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7030054>
- Kurokawa, M., & Sato, S. (2011). Growth and poliovirus production of Vero cells on a novel microcarrier with artificial cell adhesive protein under serum-free conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5), 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.018>
- Lalchandama, K. (2020). *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *WikiJournal of Medicine*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.3316/informit.378801063714668>

- Lavstsen, T., Salanti, A., Jensen, A. T., Arnot, D. E., & Theander, T. G. (2003). Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malaria Journal*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-27>
- Mace, K. E., Arguin, P. M., & Tan, K. R. (2018). *Malaria Surveillance—United States, 2015*. 67(7).
- Maier, A. G., Matuschewski, K., Zhang, M., & Rug, M. (2019). *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, 35(6), 481–482. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>
- Malpede, B. M., & Tolia, N. H. (2014). Malaria adhesins: Structure and function. *Cellular Microbiology*, 16(5), 621–631. <https://doi.org/10.1111/cmi.12276>
- Maubert, B., Fievet, N., Tami, G., Boudin, C., & Deloron, P. (2000). Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasite Immunology*, 22(4), 191–199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00292.x>
- McCormick, C. J., Craig, A., Roberts, D., Newbold, C. I., & Berendt, A. R. (1997). Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(10), 2521–2529. <https://doi.org/10.1172/JCI119794>
- Meibalan, E., & Marti, M. (2017). Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), a025452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025452>
- Melis, R., Braca, A., Pagnozzi, D., & Anedda, R. (2024). The metabolic footprint of Vero E6 cells highlights the key metabolic routes associated with SARS-CoV-2 infection and response to drug combinations. *Scientific Reports*, 14(1), 7950. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57726-3>
- Mendis, K., Rietveld, A., Warsame, M., Bosman, A., Greenwood, B., & Wernsdorfer, W. H. (2009). From malaria control to eradication: The WHO perspective. *Tropical Medicine & International Health*, 14(7), 802–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02287.x>
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673–679. <https://doi.org/10.1038/415673a>

- Nosten, F., Richard-Lenoble, D., & Danis, M. (2022). A brief history of malaria. *La Presse Médicale*, 51(3), 104130. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104130>
- Ogando, N. S., Dalebout, T. J., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Limpens, R. W. A. L., Meer, Y. van der, Caly, L., Druce, J., Vries, J. J. C. de, Kikkert, M., Bárcena, M., Sidorov, I., & Snijder, E. J. (2020). SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *The Journal of General Virology*, 101(9), 925. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001453>
- Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., & Hanada, K. (2014). The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Research*, 21(6), 673–683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
- Persson, K. E. M. (2016). Malaria, Immunity, and Immunopathology. En *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 94–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.13007-3>
- Plewes, K., Leopold, S. J., Kingston, H. W. F., & Dondorp, A. M. (2019). Malaria. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 39–60. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.002>
- Pruijssers, A. J., George, A. S., Schäfer, A., Leist, S. R., Gralinski, L. E., Dinnon, K. H., Yount, B. L., Agostini, M. L., Stevens, L. J., Chappell, J. D., Lu, X., Hughes, T. M., Gully, K., Martinez, D. R., Brown, A. J., Graham, R. L., Perry, J. K., Du Pont, V., Pitts, J., ... Sheahan, T. P. (2020). Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. *Cell Reports*, 32(3), 107940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107940>
- Rask, T. S., Hansen, D. A., Theander, T. G., Pedersen, A. G., & Lavstsen, T. (2010). Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Diversity in Seven Genomes – Divide and Conquer. *PLOS Computational Biology*, 6(9), e1000933. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000933>
- Rhim, J. S., Schell, K., Creasy, B., & Case, W. (1969). Biological Characteristics and Viral Susceptibility of an African Green Monkey Kidney Cell Line (Vero). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 132(2), 670–678. <https://doi.org/10.3181/00379727-132-34285>

- Rigg, C. A., Hurtado, L. A., Calzada, J. E., & Chaves, L. F. (2019). Malaria infection rates in *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) at Ipetí-Guna, a village within a region targeted for malaria elimination in Panamá. *Infection, Genetics and Evolution*, *69*, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.003>
- Robinson, B. A., Welch, T. L., & Smith, J. D. (2003). Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Molecular Microbiology*, *47*(5), 1265–1278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03378.x>
- Rogerson, S., Tembenu, R., Dobaño Lázaro, C., Plitt, S., Taylor, T., & Molyneux, M. (1999). Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *61*, 467–472. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.467>
- Rourou, S., Ben Zakkour, M., & Kallel, H. (2019). Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. *Vaccine*, *37*(47), 6987–6995. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.092>
- Salinas, N. D., Tang, W. K., & Tolia, N. H. (2019). Blood-Stage Malaria Parasite Antigens: Structure, Function, and Vaccine Potential. *Journal of Molecular Biology*, *431*(21), 4259–4280. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.018>
- Sampath, S., Brazier, A. J., Avril, M., Bernabeu, M., Vigdorovich, V., Mascarenhas, A., Gomes, E., Sather, D. N., Esmon, C. T., & Smith, J. D. (2015). *P lasmodium falciparum* adhesion domains linked to severe malaria differ in blockade of endothelial protein C receptor: Malaria and EPCR interaction. *Cellular Microbiology*, *17*(12), 1868–1882. <https://doi.org/10.1111/cmi.12478>
- Santamaría, A. M., Vásquez, V., Rigg, C., Moreno, D., Romero, L., Justo, C., Chaves, L. F., Saldaña, A., & Calzada, J. E. (2020). *Plasmodium falciparum* Genetic Diversity in Panamá Based on glurp, msp-1 and msp-2 Genes: Implications for Malaria Elimination in Mesoamerica. *Life*, *10*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/life10120319>
- Schantz-Dunn, J., & Nour, N. M. (2009). Malaria and Pregnancy: A Global Health Perspective. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, *2*(3), 186–192.

- Shabani, E., Hanisch, B., Opoka, R. O., Lavstsen, T., & John, C. C. (2017). Plasmodium falciparum EPCR-binding PfEMP1 expression increases with malaria disease severity and is elevated in retinopathy negative cerebral malaria. *BMC Medicine*, *15*(1), 183. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0945-y>
- Silva Junior, G. B. da, Pinto, J. R., Barros, E. J. G., Farias, G. M. N., & Daher, E. D. F. (2017). Kidney involvement in malaria: An update. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *59*, e53. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759053>
- Smith, J. D. (2014). The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Molecular and biochemical parasitology*, *195*(2), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.006>
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013). Malaria's deadly grip: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes: *Plasmodium falciparum* cytoadhesion and var genes. *Cellular Microbiology*, *15*(12), 1976–1983. <https://doi.org/10.1111/cmi.12183>
- Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I., & Miller, L. H. (2000). Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *110*(2), 293–310. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00279-6)
- Snow, R. W. (2015). Global malaria eradication and the importance of Plasmodium falciparum epidemiology in Africa. *BMC Medicine*, *13*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0254-7>
- Storm, J., Jespersen, J. S., Seydel, K. B., Szeszak, T., Mbewe, M., Chisala, N. V., Phula, P., Wang, C. W., Taylor, T. E., Moxon, C. A., Lavstsen, T., & Craig, A. G. (2019). Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Molecular Medicine*, *11*(2), e9164. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809164>
- Sugawara, K., Nishiyama, K., Ishikawa, Y., Abe, M., Sonoda, K., Komatsu, K., Horikawa, Y., Takeda, K., Honda, T., Kuzuhara, S., Kino, Y., Mizokami, H., Mizuno, K., Oka, T., & Honda, K. (2002). Development of Vero Cell-Derived Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine. *Biologicals*, *30*(4), 303–314. <https://doi.org/10.1006/biol.2002.0345>

- Sulistyaningsih, E., Istinaroh, N., Dewi, R., & Hairrudin, H. (2022). Expression and in silico Analysis of CIDR α 1 Recombinant Protein from Plasmodium Falciparum as a Malaria Subunit Vaccine Candidate. *Trends in Sciences*, 19(23), Article 23. <https://doi.org/10.48048/tis.2022.1621>
- Sutherland, C. J., & Polley, S. D. (2011). Genomic Insights into the Past, Current and Future Evolution of Human Parasites of the Genus Plasmodium. En *Genetics and Evolution of Infectious Disease* (pp. 607–635). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00022-4>
- Takashima, E., Tachibana, M., Morita, M., Nagaoka, H., Kanoi, B. N., & Tsuboi, T. (2021). Identification of Novel Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.805482>
- Talapko, J., Škrlec, I., Alebić, T., Jukić, M., & Včev, A. (2019). Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*, 7(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060179>
- Toriniwa, H., & Komiya, T. (2007). Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. *Biologicals*, 35(4), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.02.002>
- Tuikue Ndam, N., Moussiliou, A., Lavstsen, T., Kamaliddin, C., Jensen, A. T. R., Mama, A., Tahar, R., Wang, C. W., Jespersen, J. S., Alao, J. M., Gamain, B., Theander, T. G., & Deloron, P. (2017). Parasites Causing Cerebral Falciparum Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(12), 1918–1925. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix230>
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., & Theander, T. G. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, 498(7455), 502–505. <https://doi.org/10.1038/nature12216>
- Vekemans, J., Schellenberg, D., Bennis, S., O'Brien, K., & Alonso, P. (2021). Meeting report: WHO consultation on malaria vaccine development, Geneva, 15–16 July 2019.

- Vaccine*, 39(22), 2907–2916. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.093>
- Wahlgren, M., Goel, S., & Akhouri, R. R. (2017). Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 479–491. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.47>
- Wang, C. W., Lavstsen, T., Bengtsson, D. C., Magistrado, P. A., Berger, S. S., Marquard, A. M., Alifrangis, M., Lusingu, J. P., Theander, T. G., & Turner, L. (2012). Evidence for in vitro and in vivo expression of the conserved VAR3 (type 3) *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Malaria Journal*, 11(1), 129. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-129>
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., Duraisingh, M. T., & Smith, J. D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3 Suppl), 42–56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0841>
- Wichers, J. S., Tonkin-Hill, G., Thye, T., Krumkamp, R., Kreuels, B., Strauss, J., von Thien, H., Scholz, J. A., Smedegaard Hansson, H., Weisel Jensen, R., Turner, L., Lorenz, F.-R., Schöllhorn, A., Bruchhaus, I., Tannich, E., Fendel, R., Otto, T. D., Lavstsen, T., Gilberger, T. W., ... Bachmann, A. (2021). Common virulence gene expression in adult first-time infected malaria patients and severe cases. *eLife*, 10, e69040. <https://doi.org/10.7554/eLife.69040>
- Wiser, M. F. (2023). Knobs, Adhesion, and Severe *Falciparum* Malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070353>
- World malaria report 2022*. (s/f). Recuperado el 10 de mayo de 2024, de <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
- World malaria report 2023*. (s/f). Recuperado el 10 de mayo de 2024, de <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>
- Wu, W., Orr-Burks, N., Karpilow, J., & Tripp, R. A. (2017). Development of improved vaccine cell lines against rotavirus. *Scientific Data*, 4(1), 170021. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.21>

Figuras y Cuadros Suplementarios

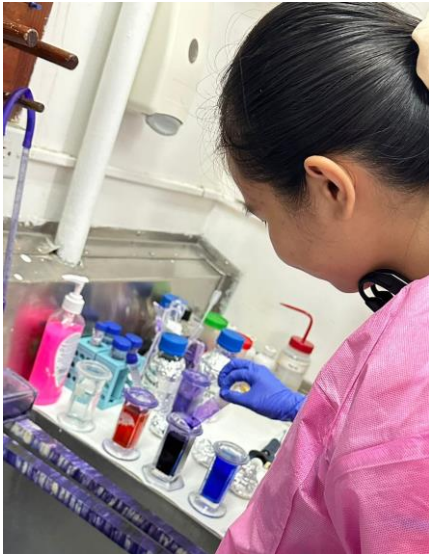


Fig. 11

Tinción de placa de frotis sanguíneo para su observación bajo microscopio óptico

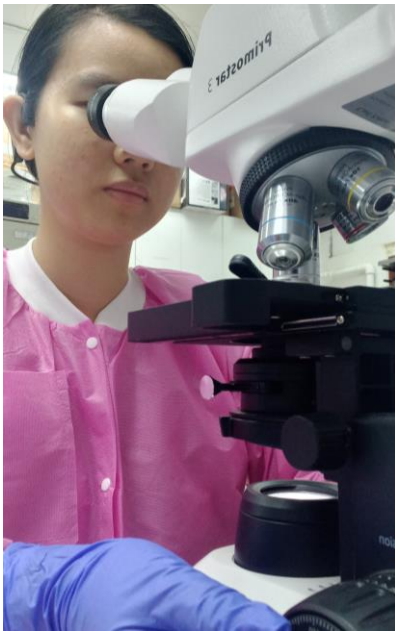


Fig. 12

Determinación de niveles de parasitemia y estadios parasitarios de los cultivos de *P. falciparum*

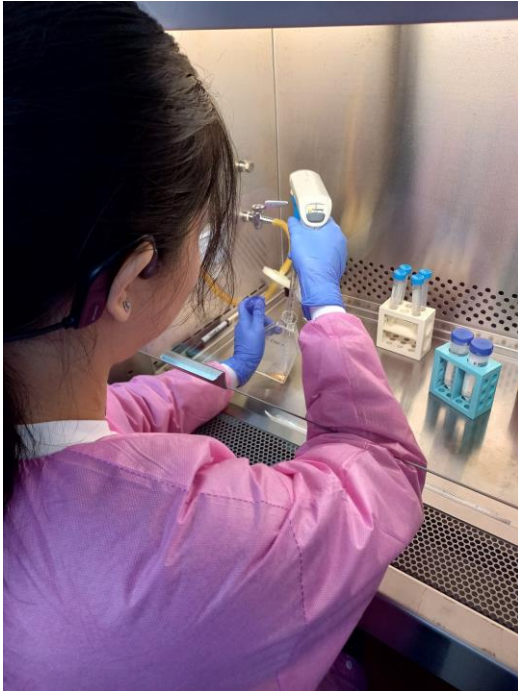


Fig. 13

Mantenimiento de cultivos de VERO-E6

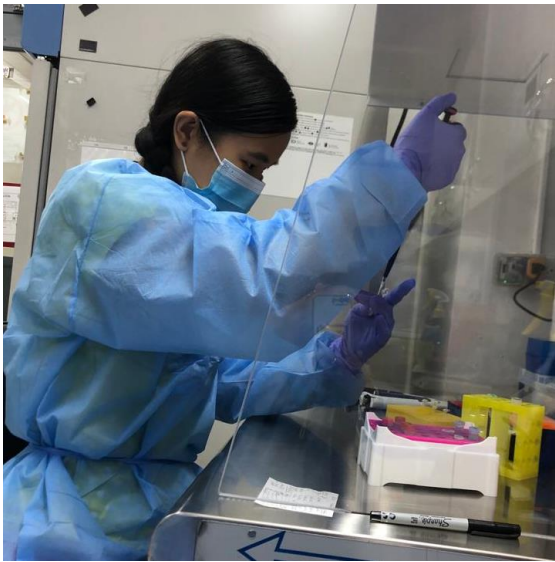


Fig. 14

Preparación del plato de 96 pocillos para la corrida de Q-PCR tiempo real