



REVISTA
INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIVERSIDAD DE BOYACÁ

ISSN: 2389 - 7325 Versión impresa
ISSN: 2539-2018 Versión electrónica en línea

PRÓXIMA PUBLICACIÓN EN LÍNEA

El Comité Editorial de la Revista de Investigación en Salud de la Universidad de Boyacá ha aprobado para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares evaluadores y la calidad del proceso de revisión. Se publica esta versión en forma provisional, como avance en línea de la última versión del manuscrito vinculada al sistema de gestión, previa a la estructura y composición de la maquetación y diagramación, como elementos propios de la producción editorial de la revista.

Esta versión se puede descargar, usar, distribuir y citar como versión preliminar tal y como lo indicamos, por favor, tenga presente que esta versión y la versión final digital e impresa pueden variar.

Artículo de revisión

Sistemas de expresión de proteínas recombinantes para el análisis funcional de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*: una revisión

Gómez Rodríguez Árida Marcela^{1,2*}, Cuy Chaparro Laura Esperanza¹

Camargo Mancipe Anny Jineth^{1,2}

¹. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas, Universidad del Rosario, Bogotá. Colombia

². Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia.

***Autor de correspondencia:** Árida Marcela Gómez Rodríguez. Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia. Carrera 2ª Este No. 64 - 169. Correo electrónico: aligomez@uniboyaca.edu.co. Celular: 3212353632.

Resumen

Introducción. Comprender la función de antígenos de *Plasmodium* spp., involucrados en invasión a células hospederas es necesario para diseñar vacunas. Diferentes estudios han generado proteínas recombinantes utilizando sistemas de expresión heterólogos, obteniendo moléculas semejantes a las nativas. Estos avances son fundamentales para desarrollar estrategias que bloqueen la infección de estos patógenos.

Objetivo. Describir las características y aspectos metodológicos más importantes de sistemas de expresión de proteínas recombinantes en estudios funcionales de *Plasmodium* spp.

Metodología. Revisión descriptiva de estudios publicados en PubMed, Science Direct, Embase y MedLine. Criterios de inclusión: trabajos publicados entre el 2010 y 2020 que incluyeran sistemas recombinantes en células de *Escherichia coli*, de mamífero y libre de células, para estudios funcionales de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Se revisaron 70 artículos originales, 58 cumplieron con los criterios establecidos y 12 utilizaron otros sistemas heterólogos diferentes a los analizados en este estudio.

Resultados. Obtener proteínas recombinantes mediante sistema procariota, de mayor rendimiento y bajo costo, ha permitido estudios funcionales de un número importante de antígenos. Los sistemas con células de mamífero y libre de células, que permiten modificaciones pos-traduccionales y plegamiento adecuado de moléculas, se usan para producir librerías de antígenos con estructura conformacional similar a la nativa.

Conclusión. Estudio de antígenos de *Plasmodium* spp. implicados en infección y desarrollo en células diana, requiere adecuada selección del método de producción recombinante. El refinamiento de procesos de expresión en sistemas procariontes, eucariotes e *in vitro*, mediante ingeniería genética y cultivo celular, permitirá mejores rendimientos y menor costo.

Palabras claves: antígenos, expresión génica, malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*.

Recombinant protein expression systems for functional analysis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens: a review

Abstract

Introduction. Understanding the function of *Plasmodium* spp. Antigens involved in invasion of host cells is necessary to design vaccines. Different studies have generated recombinant proteins using heterologous expression systems, obtaining molecules similar to native ones. These advances are essential to develop strategies that block the infection of these pathogens.

Objective. Describe the most important characteristics and methodological aspects of recombinant protein expression systems in functional studies of *Plasmodium* spp.

Methodology. Descriptive review of studies published in PubMed, Science Direct, Embase and MedLine. Inclusion criteria: works published between 2010 and 2020 that included recombinant systems in *Escherichia coli* cells, mammalian and cell-free, for functional studies of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens. 70 original

articles were reviewed, 58 met the established criteria and 12 used other heterologous systems than those analyzed in this study.

Results. Obtaining recombinant proteins by means of a prokaryotic system, with higher performance and low cost, has allowed functional studies of a significant number of antigens. Mammalian cell and cell free systems, which allow for post-translational modifications and adequate folding of molecules, are used to produce antigen libraries with native-like conformational structure.

Conclusion. *Plasmodium* spp. antigen study involved in infection and development in target cells, requires adequate selection of the recombinant production method. The refinement of expression processes in prokaryotic, eukaryotic and *in vitro* systems, through genetic engineering and cell culture, will allow better yields and lower cost

Key words: antigens, malaria, gene expression, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*.

Introducción

La malaria es considerada un importante problema de salud pública a nivel mundial siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad humana en muchos países tropicales y subtropicales (1). Esta enfermedad es ocasionada por parásitos del género *Plasmodium*, y transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos hembras infectados del género *Anopheles* (2).

La mayoría de estudios e investigaciones se han enfocado en el descubrimiento de una vacuna contra *P. falciparum* por ser la especie que se encuentra más ampliamente distribuida en el continente africano y que causa el tipo de malaria más letal y severa en

humanos. Sin embargo, fuera de África, *P. vivax* es la especie más extendida, con altos niveles de prevalencia en América y Asia (3, 4). Actualmente, gracias al avance en la obtención de los genomas, transcriptomas y proteomas, se ha logrado elucidar un número importante de antígenos de estas especies parasitarias, que podrían estar involucrados en el proceso de invasión a células diana en el hospedero humano (5-9).

Estudios funcionales de estos antígenos han sido pieza clave para la postulación de candidatos vacunales (10-22). Las vacunas de la fase eritrocítica están destinadas a reducir la multiplicación y crecimiento del parásito, además de proteger contra los síntomas clínicos y el desarrollo de enfermedad (23). Algunos estudios evidencian que el uso de antígenos recombinantes del parásito pueden inducir la producción de anticuerpos capaces de bloquear la invasión de *Plasmodium* a eritrocitos, demostrando eficacia protectora en diferentes modelos animales (24-30).

De esta manera, un número importante de investigaciones se han enfocado en el análisis funcional de potenciales candidatos a vacuna de *P. falciparum* y *P. vivax*, mediante la expresión de proteínas recombinantes (PR) en sistemas heterólogos procariontes, eucariotas, y libres de células (31-34), para la obtención de moléculas proteicas con características semejantes a las nativas (proteínas funcionales con estructura tridimensional por los puentes disulfuro y las interacciones no covalentes) (31).

Algunos criterios para escoger un método adecuado, se basan en las propiedades biológicas y químicas de los antígenos, como lo son la secuencia codificante para determinar regiones repetitivas y uso de codones preferenciales, así como la secuencia de aminoácidos para identificar el peso molecular, tipo de modificaciones

postraduccionales y destino (extracelular o intracelular) (35-38). Otras consideraciones adicionales se deben tener en cuenta, tal como las condiciones de operación que requiera cada sistema, la escala de producción según el objeto de estudio y el costo en la producción que incluye la extracción y purificación de proteínas (39, 40).

Esta revisión describe las características más importantes de los sistemas de expresión más ampliamente utilizados para la obtención de PR en células procariotas (cepas de *E. coli*), células eucariotas (células de mamífero) y sistemas libres de células, empleados en estudios funcionales de antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax*. De igual forma, se analizan los aspectos metodológicos para lograr obtener moléculas plegadas de forma nativa y funcionalmente activas.

Metodología

Se realizó una revisión descriptiva sobre sistemas de expresión de proteínas recombinantes procariotas (células bacterianas), eucariotas (células de mamífero) y sistemas libres de células utilizados en estudios funcionales de antígenos de especies *P. falciparum* y *P. vivax*, publicados en revistas indexadas en las bases de datos Embase (<https://www.elsevier.com/solutions/embase-biomedical-research>), MedLine (<https://www.ebsco.com/products/research-databases/medline-complete>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>). Se tuvo en cuenta criterios de inclusión como expresión de antígenos involucrados en la invasión a eritrocitos del hospedero humano (fase asexual del parásito) y la descripción completa del sistema de expresión empleado; asimismo, se seleccionaron artículos disponibles publicados en la ventana de tiempo establecida entre los años 2010 y 2020 escritos en idioma inglés. Se utilizaron los descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)

y Medical Subject Headings (MeSH) para la elección de las palabras clave: antígenos, malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, proteínas y recombinantes.

Se analizaron 70 artículos originales, de los cuales se seleccionaron 58, que explican en la metodología el uso de los sistemas de expresión seleccionados. Se excluyeron 12 por utilizar otros sistemas de expresión heterólogos y/o por no detallar el método de obtención de la recombinante. Con los artículos seleccionados, se elaboró una matriz bibliográfica en Excel, organizada por título, base de datos, autor, palabras clave, resumen del artículo, fecha de publicación, particularidades del antígeno objeto de estudio y tipo de sistema de expresión utilizado. A partir de esa matriz, se generó una tabla con las características y aspectos metodológicos tenidos en cuenta para la expresión de antígenos de *Plasmodium spp.*

Resultados

Análisis funcional de antígenos de *Plasmodium spp*

El análisis de proteínas claves en el proceso de invasión de *Plasmodium spp.* a las células diana, se enfoca principalmente en tres pasos fundamentales: el análisis bioinformático, la caracterización básica y la caracterización funcional. En el primero se utilizan herramientas computacionales de alto rendimiento para el análisis de las proteínas del parásito a partir del genoma, transcriptoma y proteoma, con el fin de conocer los posibles candidatos a vacuna en función de su expresión génica y proteica (5-7).

Así mismo, la caracterización básica se realiza mediante un análisis bioinformática (*in silico*) para identificar las regiones altamente conservadas que podrían estar bajo restricción funcional, esta observación permite la eliminación de moléculas o fragmentos

irrelevantes de las proteínas de *P. falciparum* y *P. vivax* a estudiar (41). Posteriormente, se realiza la validación de los datos obtenidos a partir de los patrones de expresión y de selección de los antígenos de estudio, investigando la capacidad de dichos fragmentos para unirse específicamente a las células blanco de infección (eritrocitos).

En esta última fase, se requieren análisis *in vitro* e *in vivo* para identificar las regiones mínimas del antígeno involucradas en la interacción proteína-célula (41). La producción de proteínas recombinantes es necesaria para el desarrollo de ensayos funcionales que incluyen la unión a las células diana, inhibición de la unión, inhibición de la invasión, producción de anticuerpos policlonales y experimentación en modelos animales (31, 42-44).

De esta forma, la producción de PR es un aspecto determinante en el análisis de candidatos a vacuna contra la malaria. Para obtener estas proteínas, el gen que codifica la proteína de interés se introduce en un plásmido para facilitar su manejo y, a partir de ahí, se transfiere al sistema de expresión donde se producirá la proteína (40). Este tipo de vectores se caracteriza por transportar el material génico y protegerlo de su degradación antes de alcanzar a la célula diana, además cuenta con regiones específicas que permiten su replicación en el hospedero, así como secuencias que permiten la transcripción, la traducción e identificación del gen clonado (39, 45).

Actualmente existen sistemas de expresión recombinante basados en microorganismos y líneas celulares establecidas para su manipulación en el laboratorio. El sistema basado en bacterias (*E. coli*), es uno de los más utilizados por su fácil manejo y por su elevado rendimiento (46-48). Sin embargo, la producción de proteínas del parásito *Plasmodium* requiere, muchas veces, modificaciones postraduccionales que este

sistema no genera. Por tanto, en los últimos años se ha buscado producir proteínas con una estructura y función igual a la nativa, modificando genéticamente líneas células procariotas, utilizando sistemas de expresión eucariotas más complejos y costosos, tales como levaduras, células de insecto, células de mamífero o plantas y recientemente sistemas libre de células (*in vitro*) (38, 48) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los sistemas de expresión procariota, eucariota y libre de células

Tipo de sistema de expresión			
Características	Procariota (<i>E. coli</i>)	Eucariota (células de mamífero)	Libre de células
		<ul style="list-style-type: none"> • Existe un alto nivel de conocimientos sobre su biología y genética. • Facilidad de manipulación. • Alta densidad de cultivo. • Sistema de producción económico. • Amplia variedad de vectores de expresión. • Bajo nivel de secreción de proteínas al medio. • No realiza modificaciones post traduccionales. • Genera proteasas que pueden afectar el rendimiento. • La producción de proteínas heterólogas induce proteólisis celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Genera proteínas con plegamiento correcto y modificaciones post traduccionales, similares a las proteínas nativas o endógenas. • Sistema empleado para la producción de proteínas para usos industriales, especialmente terapéuticos. • Rendimiento de producción bajo. • Tasa de crecimiento lento. • Alto costo debido a los medios de cultivo y adaptación de las células animales. • Sistema vulnerable a contaminación.

En las siguientes secciones se describen algunos de los sistemas de expresión de PR más utilizados para el estudio de potenciales candidatos a vacuna contra el estadió

intraeritrocítico de parásitos de la malaria humana.

Expresión de proteínas recombinantes en sistema procariota: *E. coli*

Uno de los métodos de producción de PR ampliamente utilizados en la obtención de antígenos de *Plasmodium* spp, es el sistema procariota mediante la utilización de la bacteria *E. coli* (Figura 1). Esta plataforma ofrece una serie de ventajas importantes, principalmente relacionadas con el conocimiento del genoma, fisiología y metabolismo de esta bacteria, lo que facilita la manipulación genética y la generación de diferentes cepas para la producción de recombinantes (47, 48). Sin embargo, este método presenta limitaciones como la falta de modificaciones postraduccionales e inadecuado plegamiento en las proteínas generadas, lo que implica la implementación de pasos adicionales al proceso de obtención de PR, haciendo que el sistema se vuelva complejo y demorado. Particularmente, los genes de *P. falciparum* al presentar un alto contenido Adenina/Timina (A / T) versus Citocina/Guanina (C / G), así como un número importante de repeticiones de lisina y arginina en su genoma, producen la terminación temprana del proceso de traducción de ARNm (49). Por lo tanto, la mayoría de PR derivadas de este parásito se expresan solo como formas truncadas o aparecen como cuerpos de inclusión insolubles dentro de las células bacterianas (11, 50-54).

Interesantemente, en los últimos años el rendimiento bacteriano para la producción de PR ha mejorado notablemente gracias al desarrollo de nuevas metodologías genéticas. Estas incluyen la modificación o eliminación de genes que codifican para la producción de proteasas, la implementación de promotores de bacteriófagos T7, polimerasa para lograr niveles altos de expresión y el diseño de cepas para el control de la expresión basal

(BL21 (DE3) pLysS) o la correcta formación de enlaces disulfuro (Origami, Shuffle o CyDisCo) (46, 47).

Así, el uso de este sistema con cepas modificadas, ha permitido la identificación de asociaciones entre las proteínas de superficie del merozoito de *P. falciparum* (MSP1, MSP3, MSP6, MSP7) con proteínas asociadas con roptrias (RAP2) y con el antígeno de repeticiones de serina ubicado en micronemas (SERA5), implicadas en el contacto inicial del parásito al eritrocito, resultando ser futuros componentes de vacunas anti-maláricas (55). De esta forma, la obtención del antígeno de unión a eritrocitos EBA-175 de forma recombinante, permitió profundizar en la interacción de alta afinidad con el receptor Glicoforina A en la superficie de eritrocitos y determinar las diferentes rutas de invasión en las que participa este parásito (56).

En el caso de expresión de proteínas *P. vivax* en *E.coli*, especialmente las proteínas de unión a reticulocitos 1a y 2c (RBP1a y RBP2c), favoreció la identificación de la región N-terminal como el fragmento de unión a células diana y se establecieron estas regiones como objetivos de anticuerpos adquiridos de forma natural (57). Así mismo, este sistema, permitió la identificación de las regiones de unión del complejo RON2 (RON2, 4 y 5) con el antígeno apical de merozoito - AMA1 durante la formación de la unión estrecha entre el parásito y los eritrocitos (14, 58), evidenciando puntos clave de intervención que bloqueen este tipo de interacciones.

Expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero

El uso de células de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes, se basa principalmente en la inserción de genes (transfección) de forma transitoria o estable en

líneas adaptadas para este tipo de procedimientos tales como células de riñón embrionario humano (HEK293) o de ovario de hámster chino (CHO)(38, 59, 60). La expresión transitoria consiste en la expresión de genes, sin una previa integración al ADN cromosómico de la célula hospedera. En comparación, la expresión estable demanda que un porcentaje de las células incorporen el ADN foráneo en un locus cromosómico transcripcionalmente activo y exprese el gen de forma permanente de generación en generación (61).

Las proteínas intracelulares o transmembranales de *Plasmodium* se expresan principalmente de forma transitorias, utilizando vectores que contienen fuertes promotores y/o potenciadores como el citomegalovirus humano (CMV) y que presentan orígenes de replicación del virus de simio 40 (SV40), lo que asegura altos niveles de regulación y expresión génica (38). Actualmente, existe una amplia disponibilidad de técnicas físicas (electroporación, biobalística y microinyección), químicas (liposomas, fosfato de calcio y polímeros catiónico) y biológicas (adenovirus, retrovirus y lentivirus) para la introducción de ADN en estas células, así como medios de cultivo eficientes para las condiciones de cultivo celular (60).

El sistema de expresión recombinante con células de mamífero se ha utilizado en la producción de librerías (ectodominios completos de proteínas) de *P. falciparum* (42 y 62 proteínas) y *P. vivax* (37 proteínas), localizadas en la superficie de merozoito o en organelos secretores invasivos (31, 62, 63). Las proteínas producidas se caracterizaron por mantener conservada su estructura nativa, por lo tanto, fueron utilizadas posteriormente para estudiar las interacciones de tipo proteína-proteína principalmente

entre las proteínas de superficie de membrana *PfMSP7-PfMSP1*, *PvMSP7-PvMSP3* y *P12-P41* en ambas especies parasitarias (31, 62-64).

Con este sistema se identificaron potenciales candidatos a vacuna evaluando la eficacia protectora de anticuerpos contra múltiples combinaciones de antígenos de *P. vivax* (65) y regiones clave de unión del parásito a las células diana. Además, se identificó la interacción entre una proteína de *P. falciparum* homóloga a retoculocitos-5 (RH-5) y su receptor de la superficie celular de los eritrocitos Basigina (66), que resulta ser clave en el proceso de invasión a eritrocitos (67, 68) y ha permitido el desarrollo de la vacuna en etapa eritrocítica de *PfRH-5*(23), *PfEBA* (69), *PfCyRPA* (20, 70).

Expresión de proteínas recombinantes en sistemas libres de células

En los últimos años, la síntesis de proteínas en sistemas libres de células (SLC) ha sido un método atractivo para la producción, de alto rendimiento, de un número importante de moléculas de *Plasmodium* spp (71, 72). Usando maquinaria de traducción utilizada por células, se genera in vitro una reacción que programa el material genético para la expresión rápida de proteínas en pocas horas (73, 74).

Los principales componentes de la reacción de síntesis de proteínas en SLC se organizan en cuatro grupos: 1. la secuencia de ADN que codifica para la proteína objetivo, 2. un lisado celular (eucariota o procariota) que contenga la maquinaria para la transcripción y la traducción incluidos los factores de traducción y los sustratos, 3. Los nucleótidos y amino ácidos, y 4. los componentes necesarios para la generación de energía (ATP) (35). Igualmente, se requiere de la adición de diferentes compuestos químicos para crear

condiciones oxidativas adecuadas, que permitan la formación de enlaces disulfuro para el correcto plegamiento de proteínas (71).

Interesantemente, según las características de las proteínas de estudio, el SLC dispone de una importante variedad de lisados celulares de organismos como arqueas, procariontes, hongos, plantas, insectos y mamíferos (75). Sin embargo, los extractos celulares más empleados para la obtención de proteínas a partir de los parásitos de la malaria, son principalmente el de germen de trigo y el de reticulocitos de conejo, al proporcionar un mejor rendimiento de moléculas con estructuras complejas, generar alta solubilidad y correcto plegamiento de muchos tipos de proteínas de alto peso molecular (37, 76, 77).

Paradójicamente, aunque la síntesis de proteínas sin células se desarrolló hace más de 60 años, es relativamente reciente su uso en estudios de malaria, comparado con otros sistemas. Análisis de inmunoreactividad y patrones de transcripción de 89 proteínas de *P. vivax* mediante microarrays, identificaron un total de 18 antígenos que muestran altas respuestas de anticuerpos IgG en análisis de sueros de pacientes infectados con *P. vivax* (76). De igual modo, Leu et al (2014) identificaron 44 antígenos candidatos inmunodominantes del genoma de *P. vivax*, al producir 152 proteínas con el sistema libre de células y utilizar matrices de proteínas con sueros de pacientes con malaria, concluyendo que la mayoría de proteínas presenta un perfil de inmunoreactividad alto, mayor al 80% (77). Estos resultados muestran una ventaja importante del sistema, al permitir la síntesis y estudio de varias proteínas de forma simultánea (78, 79). Sin embargo, estas ventajas en velocidad y flexibilidad se ven en la mayoría de casos opacadas por la escasa cantidad de proteína que se produce (microgramos por mililitro).

Recientes estudios sobre nuevos candidatos a vacunas contra la malaria a partir de *P. falciparum*, revelaron la producción de 1827 proteínas recombinantes utilizando SLC, lo que representa la expresión del 30% del genoma completo de esta especie (72). Mediante la técnica AlphaScreen, se detectaron las interacciones proteicas entre sueros de personas expuestas a malaria (habitantes de zonas endémicas) y 128 proteínas del parásito, evidenciando una importante asociación de 53 proteínas que presentan péptidoseñal, dominio transmembranal y localización en la superficie del parásito, con una respuesta inmune protectora del hospedero (72). Estos resultados concuerdan con estudios previos de proteínas involucradas en la invasión de eritrocitos como *PfRON4*, *PfRON2* y *PfCLAG3.1* (71, 80-83) y seleccionados para una evaluación adicional como candidatos a vacunas como *PfRON12* (84), *Pv50* (85), *PvRALP1* (86).

Finalmente, la revisión presentada evidencia que existen aún muchos retos y desafíos en la producción de proteínas recombinantes para el análisis funcional de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. En el caso de sistemas bacterianos, se espera lograr exitosamente tanto la producción de proteínas similares a las nativas, con las modificaciones post-traduccionales, como la obtención de moléculas proteicas de elevado peso molecular. Por otra parte, las perspectivas en los sistemas eucariotas, están dirigidas a incrementar los niveles de expresión y disminución de costos; y así mismo, en los sistemas libres de células se proyecta aumentar el nivel de escalamiento, y mejoramiento de los procesos de purificación de forma automatizada

En todos los casos, es necesario seguir estableciendo las variables que pueden influir significativamente en la eficiencia y rendimiento de moléculas recombinantes, incluyendo, por ejemplo, el perfeccionamiento genético de las cepas, los vectores de expresión,

métodos de cultivo y métodos de purificación de estas proteínas. Adicionalmente, es importante destacar que un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares empleados por los diferentes tipos de células para la producción, contribuirán sin duda, a incrementar los rendimientos y abrirán nuevas opciones de procesamiento de proteínas recombinantes de *Plasmodium* spp.

Conclusiones

El avance en la obtención de los genomas, transcriptomas y proteomas de especies de *Plasmodium*, ha permitido identificar antígenos que podrían estar involucrados en el proceso de invasión a las células hospederas humanas. Los desarrollos recientes en la producción sintética de genes y estrategias de clonación, han permitido una producción rápida de proteínas recombinantes en diferentes sistemas, lo que reduce los tiempos requeridos para los ensayos funcionales que permiten identificar el rol de dichas moléculas proteicas durante la invasión del parásito a las células diana.

Los mecanismos postraduccionales y el plegamiento adecuado de las proteínas del parásito de la malaria humana son aspectos críticos a tener en cuenta durante la selección del sistema de expresión. Los métodos de producción de proteínas recombinantes basados en células procariontes de *E. coli*, células eucariotas de mamífero, y sistemas libres de células, han sido claves para la caracterización de un número importante de antígenos candidatos a vacuna en *P. falciparum* y *P. vivax*. Estos avances permiten contribuir al desarrollo de medidas profilácticas y / o terapéuticas que ayudan a mitigar la enfermedad de la malaria, un problema drástico de salud pública en todo el mundo.

Limitaciones

No hubo limitaciones.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Financiación

Los autores declaran financiación de la Universidad de Boyacá de los medios necesarios para llevar a cabo este artículo de revisión.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Boyacá por su apoyo en la elaboración de este estudio.

Referencias

1. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Report. World Health Organization 2019.
2. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
3. Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: Plasmodium vivax endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1814. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001814>
4. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(6 Suppl):79-87. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.79>
5. Venkatesh A, Patel SK, Ray S, Shastri J, Chatterjee G, Kochar SK, et al. Proteomics of Plasmodium vivax malaria: new insights, progress and potential. Expert review of proteomics. 2016;13(8):771-82. <https://doi.org/10.1080/14789450.2016.1210515>
6. Moreno-Perez DA, Degano R, Ibarrola N, Muro A, Patarroyo MA. Determining the

Plasmodium vivax VCG-1 strain blood stage proteome. *J Proteomics*. 2015;113:268-80. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.003>

7. Acharya P, Pallavi R, Chandran S, Chakravarti H, Middha S, Acharya J, et al. A glimpse into the clinical proteome of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proteomics Clinical applications*. 2009;3(11):1314-25. <https://doi.org/10.1002/prca.200900090>

8. Boucher MJ, Ghosh S, Zhang L, Lal A, Jang SW, Ju A, et al. Integrative proteomics and bioinformatic prediction enable a high-confidence apicoplast proteome in malaria parasites. *PLoS biology*. 2018;16(9):e2005895. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005895>

9. Bunnik EM, Batugedara G, Saraf A, Prudhomme J, Florens L, Le Roch KG. The mRNA-bound proteome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol*. 2016;17(1):147. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1014-0>

10. Alam MS, Choudhary V, Zeeshan M, Tyagi RK, Rathore S, Sharma YD. Interaction of *Plasmodium vivax* Tryptophan-rich Antigen PvTRAg38 with Band 3 on Human Erythrocyte Surface Facilitates Parasite Growth. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(33):20257-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644906>

11. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Patino LC, Patarroyo MA. PvRON2, a new *Plasmodium vivax* rhoptry neck antigen. *Malaria journal*. 2011;10:60. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-60>

12. Bartholdson SJ, Bustamante LY, Crosnier C, Johnson S, Lea S, Rayner JC, et al. Semaphorin-7A is an erythrocyte receptor for *P. falciparum* merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. *PLoS pathogens*. 2012;8(11):e1003031. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003031>

13. Batchelor JD, Malpede BM, Omattage NS, DeKoster GT, Henzler-Wildman KA, Tolia NH. Red blood cell invasion by *Plasmodium vivax*: structural basis for DBP engagement of DARC. *PLoS pathogens*. 2014;10(1):e1003869. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003869>

14. Bermudez M, Arevalo-Pinzon G, Rubio L, Chaloin O, Muller S, Curtidor H, et al. Receptor-ligand and parasite protein-protein interactions in *Plasmodium vivax*: Analysing rhoptry neck proteins 2 and 4. *Cellular microbiology*. 2018;20(7):e12835. <https://doi.org/10.1111/cmi.12835>

15. Chen Q, Pettersson F, Vogt AM, Schmidt B, Ahuja S, Liljestrom P, et al. Immunization with PfEMP1-DBL1alpha generates antibodies that disrupt rosettes and protect against the sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2701-12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.02.015>
16. Cheng Y, Lu F, Tsuboi T, Han ET. Characterization of a novel merozoite surface protein of Plasmodium vivax, Pv41. *Acta tropica*. 2013;126(3):222-8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.03.002>
17. Douglas AD, Williams AR, Knuepfer E, Illingworth JJ, Furze JM, Crosnier C, et al. Neutralization of Plasmodium falciparum merozoites by antibodies against PfrH5. *J Immunol*. 2014;192(1):245-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302045>
18. Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, Cowman AF. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4796-801. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730883100>
19. Dundas K, Shears MJ, Sun Y, Hopp CS, Crosnier C, Metcalf T, et al. Alpha-v-containing integrins are host receptors for the Plasmodium falciparum sporozoite surface protein, TRAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(17):4477-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719660115>
20. Favuzza P, Guffart E, Tamborrini M, Scherer B, Dreyer AM, Rufer AC, et al. Structure of the malaria vaccine candidate antigen CyRPA and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife*. 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20383>
21. Khattab A, Bonow I, Schreiber N, Petter M, Schmetz C, Klinkert MQ. Plasmodium falciparum variant STEVOR antigens are expressed in merozoites and possibly associated with erythrocyte invasion. *Malaria journal*. 2008;7:137. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-137>
22. Rathore S, Dass S, Kandari D, Kaur I, Gupta M, Sharma YD. Basigin Interacts with Plasmodium vivax Tryptophan-rich Antigen PvTRAg38 as a Second Erythrocyte Receptor to Promote Parasite Growth. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(2):462-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744367>
23. Salamanca DR, Gomez M, Camargo A, Cuy-Chaparro L, Molina-Franky J, Reyes C, et al. Plasmodium falciparum Blood Stage Antimalarial Vaccines: An Analysis of Ongoing Clinical Trials and New Perspectives Related to Synthetic Vaccines. *Front Microbiol*. 2019;10:2712. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02712>

24. Alanine DGW, Quinkert D, Kumarasingha R, Mehmood S, Donnellan FR, Minkah NK, et al. Human Antibodies that Slow Erythrocyte Invasion Potentiate Malaria-Neutralizing Antibodies. *Cell*. 2019;178(1):216-28 e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.025>
25. Chen L, Xu Y, Wong W, Thompson JK, Healer J, Goddard-Borger ED, et al. Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to *Plasmodium falciparum* protein CyRPA. *eLife*. 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21347>
26. Chootong P, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, et al. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infection and immunity*. 2010;78(3):1089-95. <https://doi.org/10.1128/IAI.01036-09>
27. Gao X, Yeo KP, Aw SS, Kuss C, Iyer JK, Genesan S, et al. Antibodies targeting the PfRH1 binding domain inhibit invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites. *PLoS pathogens*. 2008;4(7):e1000104. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000104>
28. Healer J, Thompson JK, Riglar DT, Wilson DW, Chiu YH, Miura K, et al. Vaccination with conserved regions of erythrocyte-binding antigens induces neutralizing antibodies against multiple strains of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2013;8(9):e72504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072504>
29. Nicolete VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. *J Infect Dis*. 2016;214(10):1539-46. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw407>
30. Zhou AE, Berry AA, Bailey JA, Pike A, Dara A, Agrawal S, et al. Antibodies to Peptides in Semiconserved Domains of RIFINs and STEVORs Correlate with Malaria Exposure. *mSphere*. 2019;4(2). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00097-19>
31. Hostetler JB, Sharma S, Bartholdson SJ, Wright GJ, Fairhurst RM, Rayner JC. A Library of *Plasmodium vivax* Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(12):e0004264. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004264>
32. Draper SJ, Sack BK, King CR, Nielsen CM, Rayner JC, Higgins MK, et al. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe*. 2018;24(1):43-56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>

33. Singh K, Mukherjee P, Shakri AR, Singh A, Pandey G, Bakshi M, et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. *NPJ Vaccines*. 2018;3:48. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0083-3>
34. Zheng J, Pan H, Gu Y, Zuo X, Ran N, Yuan Y, et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9751471. <https://doi.org/10.1155/2019/9751471>
35. Yadavalli R, Ledger C, Sam-Yellowe TY. In vitro human cell-free expression system for synthesis of malaria proteins. *Parasitol Res*. 2012;111(6):2461-5. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3014-7>
36. Srivastava A, Durocher Y, Gamain B. Expressing full-length functional PfEMP1 proteins in the HEK293 expression system. *Methods Mol Biol*. 2013;923:307-19. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_22
37. Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *Chembiochem*. 2015;16(17):2420-31. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500340>
38. Hacker DL, Balasubramanian S. Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Curr Opin Struct Biol*. 2016;38:129-36. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.005>
39. Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2015;80.6 1-6 1 35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>
40. Ferrer-Miralles N, Saccardo P, Corchero JL, Xu Z, Garcia-Fruitos E. General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods Mol Biol*. 2015;1258:1-24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1
41. Patarroyo MA, Arevalo-Pinzon G, Moreno-Perez DA. From a basic to a functional approach for developing a blood stage vaccine against *Plasmodium vivax*. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19(2):195-207. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1733421>
42. Sirima SB, Durier C, Kara L, Houard S, Gansane A, Loulergue P, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel(R) in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. *Vaccine*. 2017;35(45):6218-27.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.027>

43. Gaur D, Singh S, Singh S, Jiang L, Diouf A, Miller LH. Recombinant Plasmodium falciparum reticulocyte homology protein 4 binds to erythrocytes and blocks invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(45):17789-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708772104>

44. Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*. 2006;8(8):2130-7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.012>

45. Gileadi O. Recombinant Protein Expression in *E. coli* : A Historical Perspective. *Methods Mol Biol*. 2017;1586:3-10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_1

46. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*. 2013;32(6):419-25. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

47. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci*. 2019;28(8):1412-22. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

48. Hayat SMG, Farahani N, Golichenari B, Sahebkar A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. *Curr Pharm Des*. 2018;24(6):718-25. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>

49. Flick K, Ahuja S, Chene A, Bejarano MT, Chen Q. Optimized expression of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains in *Escherichia coli*. *Malaria journal*. 2004;3:50. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-50>

50. Reddy KS, Amlabu E, Pandey AK, Mitra P, Chauhan VS, Gaur D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(4):1179-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415466112>

51. Ntumngia FB, Thomson-Luque R, Torres Lde M, Gunalan K, Carvalho LH, Adams JH. A Novel Erythrocyte Binding Protein of Plasmodium vivax Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. *mBio*. 2016;7(4).

<https://doi.org/10.1128/mBio.01261-16>

52. Muh F, Han JH, Nyunt MH, Lee SK, Jeon HY, Ha KS, et al. Identification of a novel merozoite surface antigen of *Plasmodium vivax*, PvMSA180. *Malaria journal*. 2017;16(1):133. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1760-9>

53. Arevalo-Pinzon G, Bermudez M, Curtidor H, Patarroyo MA. The *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 5 is expressed in the apical pole of *Plasmodium vivax* VCG-1 strain schizonts and binds to human reticulocytes. *Malaria journal*. 2015;14:106. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0619-1>

54. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Abril J, Patarroyo MA. Annotation and characterization of the *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 4 (PvRON4). *Malaria journal*. 2013;12:356. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-356>

55. Deshmukh A, Chourasia BK, Mehrotra S, Kana IH, Paul G, Panda A, et al. *Plasmodium falciparum* MSP3 Exists in a Complex on the Merozoite Surface and Generates Antibody Response during Natural Infection. *Infection and immunity*. 2018;86(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00067-18>

56. Sisquella X, Nebl T, Thompson JK, Whitehead L, Malpede BM, Salinas ND, et al. *Plasmodium falciparum* ligand binding to erythrocytes induce alterations in deformability essential for invasion. *eLife*. 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21083>

57. Gupta ED, Anand G, Singh H, Chaddha K, Bharti PK, Singh N, et al. Naturally Acquired Human Antibodies Against Reticulocyte-Binding Domains of *Plasmodium vivax* Proteins, PvRBP2c and PvRBP1a, Exhibit Binding-Inhibitory Activity. *J Infect Dis*. 2017;215(10):1558-68. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix170>

58. Arevalo-Pinzon G, Bermudez M, Hernandez D, Curtidor H, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax* ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain I contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):9616. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10025-6>

59. Chen S, Gray D, Ma J, Subramanian S. Production of recombinant proteins in mammalian cells. *Curr Protoc Protein Sci*. 2001;Chapter 5:Unit5 10.

60. Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*. 2014;588(2):253-60. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>

61. O'Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, Mota LM, Obaidi I, Quigley A, et al. Mammalian

cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnol Adv.* 2020:107552.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>

62. Crosnier C, Wanaguru M, McDade B, Osier FH, Marsh K, Rayner JC, et al. A library of functional recombinant cell-surface and secreted *P. falciparum* merozoite proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(12):3976-86. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.028357>

63. Zenonos ZA, Rayner JC, Wright GJ. Towards a comprehensive *Plasmodium falciparum* merozoite cell surface and secreted recombinant protein library. *Malaria journal.* 2014;13:93. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-93>

64. Franca CT, He WQ, Gruszczyk J, Lim NT, Lin E, Kiniboro B, et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0005014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005014>

65. Franca CT, White MT, He WQ, Hostetler JB, Brewster J, Frato G, et al. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife.* 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.28673>

66. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2011;480(7378):534-7. <https://doi.org/10.1038/nature10606>

67. Rodriguez M, Lustigman S, Montero E, Oksov Y, Lobo CA. PfRH5: a novel reticulocyte-binding family homolog of *plasmodium falciparum* that binds to the erythrocyte, and an investigation of its receptor. *PLoS One.* 2008;3(10):e3300.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003300>

68. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Munoz M, Patarroyo MA, Bermudez A, Patarroyo ME. A single amino acid change in the *Plasmodium falciparum* RH5 (PfRH5) human RBC binding sequence modifies its structure and determines species-specific binding activity. *Vaccine.* 2012;30(3):637-46. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.012>

69. Wanaguru M, Crosnier C, Johnson S, Rayner JC, Wright GJ. Biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen-175 (EBA175)-glycophorin-A interaction: implications for vaccine design. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(45):32106-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484840>

70. Tamborrini M, Hauser J, Schafer A, Amacker M, Favuzza P, Kyungtak K, et al.

Vaccination with virosomally formulated recombinant CyRPA elicits protective antibodies against *Plasmodium falciparum* parasites in preclinical in vitro and in vivo models. *NPJ Vaccines*. 2020;5:9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0158-9>

71. Morita M, Takashima E, Ito D, Miura K, Thongkuiatkul A, Diouf A, et al. Immunoscreening of *Plasmodium falciparum* proteins expressed in a wheat germ cell-free system reveals a novel malaria vaccine candidate. *Sci Rep*. 2017;7:46086. <https://doi.org/10.1038/srep46086>

72. Kanoi BN, Takashima E, Morita M, White MT, Palacpac NM, Ntege EH, et al. Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized *Plasmodium falciparum* proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*. 2017;35(6):873-81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.001>

73. Takeda M, Kainosho M. Cell-free protein production for NMR studies. *Methods Mol Biol*. 2012;831:71-84. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-480-3_5

74. Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, et al. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infection and immunity*. 2008;76(4):1702-8. <https://doi.org/10.1128/IAI.01539-07>

75. Yadavalli R, Sam-Yellowe T. HeLa Based Cell Free Expression Systems for Expression of *Plasmodium* Rhoptry Proteins. *J Vis Exp*. 2015(100):e52772. <https://doi.org/10.3791/52772>

76. Chen JH, Jung JW, Wang Y, Ha KS, Lu F, Lim CS, et al. Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays. *J Proteome Res*. 2010;9(12):6479-89. <https://doi.org/10.1021/pr100705g>

77. Lu F, Li J, Wang B, Cheng Y, Kong DH, Cui L, et al. Profiling the humoral immune responses to *Plasmodium vivax* infection and identification of candidate immunogenic rhoptry-associated membrane antigen (RAMA). *J Proteomics*. 2014;102:66-82. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.029>

78. Arevalo-Pinzon G, Gonzalez-Gonzalez M, Suarez CF, Curtidor H, Carabias-Sanchez J, Muro A, et al. Self-assembling functional programmable protein array for studying protein-protein interactions in malaria parasites. *Malaria journal*. 2018;17(1):270. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2414-2>

79. Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for

accelerating the malaria vaccine research. *Expert Opin Drug Discov.* 2009;4(11):1191-9. <https://doi.org/10.1517/17460440903369813>

80. Curtidor H, Patino LC, Arevalo-Pinzon G, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Identification of the *Plasmodium falciparum* rhoptry neck protein 5 (PfRON5). *Gene.* 2011;474(1-2):22-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.12.005>

81. Hossain ME, Dhawan S, Mohammed A. The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. *Parasitol Res.* 2012;110(5):1711-21. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2690-z>

82. Quintana MDP, Ch'ng JH, Zandian A, Imam M, Hultenby K, Theisen M, et al. SURGE complex of *Plasmodium falciparum* in the rhoptry-neck (SURFIN4.2-RON4-GLURP) contributes to merozoite invasion. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201669>

83. Gardiner DL, Spielmann T, Dixon MW, Hawthorne PL, Ortega MR, Anderson KL, et al. CLAG 9 is located in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 2004;93(1):64-7. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1098-4>

84. Ito D, Takashima E, Yamasaki T, Hatano S, Hasegawa T, Miura K, et al. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* RON12 inhibit merozoite invasion into erythrocytes. *Parasitology international.* 2019;68(1):87-91. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.10.006>

85. Cheng Y, Wang B, Lu F, Ahmed MA, Han JH, Na SH, et al. Identification and characterization of Pv50, a novel *Plasmodium vivax* merozoite surface protein. *Parasites & vectors.* 2019;12(1):176. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3434-7>

86. Cheng Y, Li J, Ito D, Kong DH, Ha KS, Lu F, et al. Antigenicity and immunogenicity of PvRALP1, a novel *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein. *Malaria journal.* 2015;14:186. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0698-z>