



Caracterización serológica y evaluación de la funcionalidad de anticuerpos frente a antígenos plasmodiales en relación con los antecedentes de malaria en población de Quibdó, Colombia.

Carlos Alejandro Herrera Sandoval

Microbiólogo y bioanalista

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, con énfasis en Microbiología y Parasitología.

Directora:

Tatiana Lopera Mesa

Comité tutorial

Alberto Tobón Castaño, PhD

Ana María Vásquez Cardona, PhD

Lina Marcela Zuluaga Idárraga, PhD

Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad de Antioquia

Medellín, 2023

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”.

Marie Curie

Agradecimientos

- A mi familia, a mi padre José Herrera y a mi madre Nilda Sandoval, a mis hermanas Tania y Natalia, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.
- A la profesora Tatiana Lopera, por brindarme su conocimiento y asesoría durante todo el proceso.
- Al grupo malaria, a los profesores: Ana, César, Alberto, Lina, Adriana y Gabriel, que con su trabajo y experiencia fueron guías en mi camino.
- A la profesora Fanny Guzmán por brindarme su ayuda en la síntesis de los péptidos.
- A la Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas, y todo el equipo de trabajo docente y administrativo por brindarme las herramientas y ayudas en mi proceso académico.
- A mis amigos y a mis compañeros, gracias por su apoyo.

Índice

1. Resumen.....	9
2. Introducción.....	13
2.1 Planteamiento del problema	13
3. Estado del arte	17
3.1 Generalidades de <i>Plasmodium</i> y ciclo de vida.....	17
3.2 Generalidades en la respuesta inmune frente a <i>Plasmodium</i>	19
3.2.1 Generalidades de la respuesta inmune adaptativa y producción de anticuerpos..	21
3.3 Epidemiología de la malaria en el mundo	22
3.4 Estudios de inmunidad humoral anti- <i>Plasmodium</i> en poblaciones naturalmente expuestas.....	24
3.5 Estudios de inmunidad humoral anti- <i>Plasmodium</i> en Colombia.....	26
3.6 Proteínas y péptidos empleados en la búsqueda de la respuesta inmune adquirida frente a <i>Plasmodium</i>	28
3.6.1 Proteína 1 de superficie del merozoito (MSP1)	29
3.6.2 Antígeno 1 de membrana apical (AMA 1)	30
3.6.3 Proteína rica en glutamato GLURP.....	30
3.6.4 Proteína de unión al antígeno DUFFY (DBP).....	31
4. Objetivo general y específicos, Hipótesis y Pregunta de investigación.....	32
4.1 Objetivo general:.....	32
4.2 Objetivos específicos:.....	32
5. Hipótesis.....	32
6. Preguntas de investigación:.....	32
7. Metodología aplicada	33
7.1 Locación y población de estudio.....	33
7.2 Diseño del estudio.....	34
7.2.1 Criterios de inclusión y exclusión	36
7.2.2 Antígenos de <i>Plasmodium</i> a evaluar.....	36
7.3 Ensayos de laboratorio.....	38
7.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).	38
7.3.2 Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> :	40

7.3.3 Sincronización del cultivo FCB1	41
7.3.4 Concentración del cultivo	42
7.3.5 Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>P. falciparum in vitro</i> :.....	42
7.3.6 Análisis estadístico:.....	44
8 Resultados	45
8.1 Características demográficas y clínicas de la muestra de estudio.....	45
8.3 Frecuencia de reactividad sérica global frente a los péptidos en la muestra evaluada50	
8.4 Frecuencia de reactividad sérica e índices de reactividad por péptido analizado.	53
8.5 Asociaciones entre la reactividad sérica de anticuerpos y variables de exposición e infección en los individuos del estudio.....	55
8.6 Efecto del suero de individuos del estudio en la inhibición del crecimiento de <i>P. falaciparum in vitro</i>	56
9. Discusión	60
10. Conclusiones	65
11. Grado de originalidad	66
12. Referencias Bibliográficas o Cibergráficas.....	66

Índice de Figuras

Figura 1. El proceso de invasión del merozoito de <i>Plasmodium</i>	188
Figura 2. Respuesta de anticuerpos contra antígenos específicos de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> en Colombia 1994-2020.....	288
Figura 3. Flujograma de la metodología del estudio.....	365
Figura 4. Reactividad global frente a los péptidos evaluados en el estudio	521
Figura 5. Dispersogramas del ensayo de inhibición del crecimiento de <i>P. falciparum</i>	575
Figura 6. Dispersograma de los porcentajes de inhibición del suero de los pacientes frente a la cepa FCB1 de <i>P. falciparum</i> . Se observó inhibición del crecimiento en el 22% (22/100) de la muestra de pacientes analizados.....	599

Índice de tablas

Tabla 1. Péptidos empleados para inmunoensayos.....	388
Tabla 2. Características demográficas y clínicas de la muestra de estudio.	476
Tabla 3. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PvAMA1	488
Tabla 4. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PvDBP.....	499
Tabla 5. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PfGLURP.....	49
Tabla 6. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PfMSP1	50
Tabla 7. Frecuencias de positividad e índices de reactividad en la detección de anticuerpos IgG contra antígenos plasmodiales en el suero de los pacientes de Quibdó.	544
Tabla 8. Correlaciones entre variables de exposición e índices de reactividad para cada péptido.....	56
Tabla 9. Correlaciones entre el porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i> con índices de reactividad por péptido evaluado y parasitemia	60

Lista de abreviaturas, acrónimos y siglas

ABS:	Absorbancia
AMA1:	Antígeno 1 de membrana apical
CSP:	Proteína del circumsporozoíto
DBP:	Proteína de unión al antígeno Duffy
DARC:	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
EBLs:	Erythrocyte Binding-Like Proteins
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
IL-1 β :	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
IL-12:	Interleucina 12
INF- γ :	Interferón gamma
IgG:	Inmunoglobulina G
IPA:	Índice parasitario anual
KDa:	Kilodaltones
MHC I:	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC II:	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MSP-1:	Proteína 1 de superficie del merozoito
<i>Pf</i> MSP-1:	Proteína 1 de superficie del merozoito de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pf</i> EMP1:	Proteína 1 de membrana del eritrocito infectado por <i>Plasmodium falciparum</i>

<i>Pf</i> GLURP:	Proteína rica en glutamato de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pf</i> Rhs:	<i>Plasmodium falciparum</i> reticulocyte-binding protein homologs
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>Pv</i> AMA1:	Proteína 1 de membrana apical de <i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pv</i> DBP:	Proteína de unión al antígeno Duffy de <i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pv</i> MSP10:	Proteína 10 de superficie del merozoíto de <i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pv</i> RBP:	Proteínas de unión al reticulocito de <i>Plasmodium vivax</i>
RI:	Rango intercuartílico
RON:	Roptry Neck Protein
TNF:	Factor de necrosis tumoral

1. Resumen

La malaria, es una enfermedad producida por parásitos protozoos del género *Plasmodium*, transmitidos al humano por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Constituye un importante problema de salud pública en el mundo, con 247 millones de casos y 625.000 muertes estimadas para el 2021 (1). Cinco especies de *Plasmodium* son causantes de malaria en humanos (2,3), siendo *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* responsables de la mayor carga de la enfermedad en el mundo (1).

Las poblaciones naturalmente expuestas a estas construyen inmunidad anti-*Plasmodium* de forma lenta, después de repetidas exposiciones al parásito (4,5). En zonas de alta transmisión los individuos experimentan una mayor exposición y adquieren anticuerpos a temprana edad (6,7), los cuales podrían brindar protección frente a la sintomatología o gravedad, pero no evitar nuevas infecciones (7). Esta protección puede perderse cuando las personas abandonan las zonas endémicas (8).

Ensayos funcionales han demostrado la capacidad opsonizante y neutralizante anticuerpos anti-*Plasmodium* (4,9,10) y de activación celular (11,12). Estudios en Mali, Kenia y Benín, muestran asociaciones positivas entre la capacidad de anticuerpos IgG para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* *in vitro* con un menor riesgo de padecer malaria (13–15). La evaluación serológica permite mirar la historia de exposición a *Plasmodium* en las poblaciones (6,16,17) y puede ser útil para monitorear cambios en los patrones de exposición (18,19). Estudios en Brasil y Perú han reportado variación de la seroprevalencia en función del grado de endemia (20–22).

En Colombia hay evidencias de la producción de diversos anticuerpos anti-*Plasmodium* en personas de zonas endémicas, como frente a la variante VAR2CSA de la proteína 1 de membrana del eritrocito infectado por *P. falciparum* (PfEMP1) (23) y la proteína de unión al antígeno Duffy de *P. vivax* (PvDBP) (24). Así como a la proteína del circumsporozoíto (CSP), la proteína 1 de superficie del merozoíto (MSP1) (25), entre otros.

Con el objetivo de investigar la inmunidad humoral inducida por infecciones plasmodiales en poblaciones naturalmente expuestas en Colombia, se planteó un estudio descriptivo exploratorio para evaluar la respuesta de anticuerpos IgG contra antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* en individuos de Quibdó-Chocó, y su asociación con antecedentes de exposición a la infección. Así como evaluar la capacidad del suero de los individuos expuestos para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* *in vitro*. A partir del suero de 100 pacientes con malaria se realizaron ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la detección de anticuerpos IgG contra péptidos de *P. falciparum* (PfMSP1 y Proteína rica en glutamato-

PfGLURP) y de *P. vivax* (proteína 1 de membrana apical-*PvAMA1*, *PvDBP*) (26–30). Además, se evaluó la capacidad del suero para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* in vitro, siguiendo el método descrito por Berthy y cols (31).

Los pacientes presentaron un rango de edad de 2 a 77 años, mediana de 22 años (RI: 15 - 39,5). El 55% fueron de sexo masculino. En cuanto a la etnia, el 88% se autodenominaron afrodescendientes, 5% indígenas y 3% blancos. El 76% de los pacientes presentaron infección por *P. falciparum* y 20% por *Plasmodium vivax*. La mediana de la parasitemia fue 2.736 parásitos/ μ L (RI: 736,0 - 7040,0). El 80% de los pacientes manifestaron haber tenido al menos un episodio previo de malaria.

El 40% de los pacientes presentó anticuerpos contra *PfMSP-1*, 31% contra *PvDBP* y un 28% tanto para *PfGLURP* como para *PvAMA1*. El 22% de los sueros de los pacientes inhibió el crecimiento de *P. falciparum* in vitro (Rango: 0,2% – 77%). No se encontraron correlaciones entre la respuesta de anticuerpos y las variables de exposición a la infección, ni con los porcentajes de inhibición del crecimiento de *P. falciparum* in vitro.

A pesar de no encontrar asociaciones directas con las variables de exposición los resultados obtenidos en este estudio abren un panorama inicial para continuar las investigaciones asociadas a la respuesta inmune naturalmente adquirida y la exploración de los anticuerpos IgG y su papel en la respuesta inmune protectora de las poblaciones afectadas por la malaria en Colombia.

Palabras clave: Anticuerpos, Malaria, Exposición, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Serología.

Abstract

Malaria is a disease caused by protozoan parasites of the *Plasmodium* genus, transmitted to humans through the bite of *Anopheles* mosquitoes. It constitutes a significant public health issue worldwide, with an estimated 247 million cases and 625.000 deaths in 2.021 (1). Five species of *Plasmodium* are responsible for malaria in humans (2,3), with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* being the major contributors to the global burden disease (1).

Naturally exposed populations develop anti-*Plasmodium* immunity slowly, following repeated parasite exposure (4,5). In high-transmission areas, individuals experience greater exposure and acquire antibodies at an early age (6,7), which may offer protection against symptoms or severity but not against new infections (7). This protection can wane when individuals leave endemic areas (8).

Functional assays have demonstrated the opsonizing and neutralizing capacity of anti-*Plasmodium* antibodies (4,9,10) and cellular activation (11,12). Studies in Mali, Kenya, and Benin show positive associations between the ability of IgG antibodies to inhibit *P. falciparum* growth in vitro and a reduced risk of malaria (13–15). Serological assessment provides insight into the history of Plasmodium exposure in populations (6,16,17) and can be useful for monitoring changes in exposure patterns (18,19). Studies in Brazil and Peru have reported seroprevalence variation depending on the level of endemicity (20–22).

In Colombia, there is evidence of the production of various anti-Plasmodium antibodies in people from endemic areas, including those against the VAR2CSA variant of the *P. falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) (23) and the Duffy antigen-binding protein of *P. vivax* (*PvDBP*) (24), as well as the circumsporozoite protein (CSP), and merozoite surface protein 1 (MSP1) (25), among others.

To investigate the humoral immunity induced by *Plasmodium* infections in naturally exposed populations in Colombia, an exploratory descriptive study was conducted to evaluate the IgG antibody response against *P. falciparum* and *P. vivax* antigens in individuals from Quibdó-Chocó, and its association with a history of infection exposure. Additionally, the capacity of serum from exposed individuals to inhibit *P. falciparum* growth in vitro was assessed. ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) were performed on serum samples from 100 malaria patients to detect IgG antibodies against *P. falciparum* peptides (*PfMSP1* and Glutamate-Rich Protein-*PfGLURP*) and *P. vivax* (Apical Membrane Antigen 1-*PvAMA1*, *PvDBP*) (26–30). Furthermore, the ability of serum to inhibit *P. falciparum* growth in vitro was evaluated following the method described by Berthy et al. (31).

Patients ranged in age from 2 to 77 years, with a median age of 22 years (IQR: 15 - 39.5). 55% were male. Regarding ethnicity, 88% self-identified as afro-descendant, 5% as Indigenous, and 3% as White. 76% of the patients had *P. falciparum* infection, and 20% had *Plasmodium vivax* infection. The median parasitemia was 2,736 parasites/ μ L (IQR: 736 – 7040). 80% of patients reported having had at least one previous episode of malaria.

40% of patients had antibodies against PfMSP-1, 31% against PvDBP, and 28% for both PfGLURP and PvAMA1. 22% of patient sera inhibited the growth of *P. falciparum* in vitro (Range: 0.2% – 77%). No correlations were found between antibody response and exposure variables or the percentages of *P. falciparum* growth inhibition in vitro.

Despite not finding direct associations with exposure variables, the results obtained in this study provide an initial perspective for further investigations related to naturally acquired immune response and the exploration of IgG antibodies and their role in the protective immune response of populations affected by malaria in Colombia.

Keywords: Antibodies, Malaria, Exposition, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Serology.

2. Introducción.

2.1 Planteamiento del problema

La malaria es una enfermedad que se considera problema de salud pública a nivel mundial. Es producida por parásitos protozoos del género *Plasmodium*, que son transmitidos de un humano a otro a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. Existen cinco especies de *Plasmodium* que causan de manera natural la malaria en los humanos (2,3) de las cuales *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* son principalmente responsables de la mayor carga de la enfermedad en el mundo (23).

Según el reporte mundial para la malaria, durante el 2021 se presentaron 247 millones de casos y 625.000 muertes en todo el mundo (1). La mayoría de los casos de malaria en 2021 se produjeron en África con aproximadamente 232 millones de casos, correspondientes al 95% casos y a un 96% de la mortalidad global (1). En esta región, *P. falciparum* es la especie más prevalente. En otras zonas geográficas como el centro y sur de América predomina la especie *P. vivax*, la cual es responsable del 75,5 % de los casos de malaria en esta región (1). Entre el 2000 y el 2021 en América los casos de malaria se redujeron en un 60% (de 1.5 millones a 0.6 millones) y la incidencia en un 70% (de 14,1 a 4,2 casos por mil habitantes en riesgo).

En Colombia la malaria también representa un importante problema de salud pública, puesto que en el 2022 según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública se notificaron 71.573 casos, con un predominio de infecciones causadas por *P. vivax* con 43444 casos – 60,7 %, seguido de *P. falciparum* con 27.412 casos – 38,3%. Chocó es el departamento que más casos reporta (23.566 casos – 32,9%) y en esta región co-circulan las dos especies de mayor importancia, con un predominio de casos por *P. falciparum* (13149 casos – 55,8%) seguido de *P. vivax* (10039 casos - 42,6%) (24).

La interacción entre el parásito y el hospedero es un proceso complejo, pues *Plasmodium* presenta varios estadios del ciclo de vida durante la infección en el humano. Al tratarse de un parásito intracelular obligado, que se aloja principalmente en los eritrocitos, se convierte en un obstáculo para el sistema inmune controlar la infección. Los leucocitos reconocen como extrañas todas las proteínas solubles o de membrana del parásito, lo cual activa la respuesta inmune innata y la consecuente generación de células de memoria(25), las cuales reconocerán posteriormente a dichos antígenos. Sin embargo, como *Plasmodium* expresa diversas proteínas durante la fase eritrocitaria de la infección en el humano, y estas a su vez presentan una alta variación antigénica entre un ciclo replicativo a otro (26,27), dificulta aún

más la respuesta efectiva del sistema inmune del hospedero para eliminar a el parásito por completo y resolver así la infección.

Por lo anterior, la variación antigénica le ha garantizado a *Plasmodium spp* su adaptación y sobrevivencia en el hospedero humano, puesto que la amplia variedad de antígenos expresados representa un obstáculo para el sistema inmune frente al desarrollo de una respuesta efectora que brinde protección frente al parásito en el curso de una infección. Esta es una de las razones por las cuales a pesar de las múltiples infecciones maláricas que puedan experimentar las personas durante su vida, no lograran generar y mantener una respuesta inmune que evite nuevas infecciones (4,13,25).

La respuesta inmune frente a *Plasmodium* en poblaciones naturalmente expuestas es variable, puesto que una gran variedad de factores como la intensidad en la trasmisión, las especies circulantes de cada región, el fenotipo y genotipo de los hospederos, así como las características socio epidemiológicas de las poblaciones, hacen que la adquisición de inmunidad anti *Plasmodium* sea un fenómeno complejo y particular de cada zona endémica (4). De modo general, los estudios han demostrado que la inmunidad anti-*Plasmodium* se desarrolla lentamente y después de repetidas exposiciones al parásito (4,5), que los habitantes de zonas con alta intensidad de transmisión, se exponen rápidamente y con mayor frecuencia durante su vida, experimentando varias infecciones, proceso que finalmente les permite adquirir un grado inmunidad frente al parásito a una temprana edad (6,7,37). Se ha demostrado que la inmunidad adquirida se relaciona con un menor riesgo de presentar síntomas clínicos (7), este efecto protector puede perderse cuando las personas abandonan las zonas endémicas, pues se requiere de una exposición constante a los antígenos para generar y conservar células de memoria (8).

Se sabe que los individuos infectados generan anticuerpos específicos frente a proteínas de membrana de estadios eritrocitarios del parásito, algunas de las más estudiadas en las dos principales especies (*P. falciparum* y *P. vivax*) son la MSP1 (13) y la proteína AMA1(29,30), y de forma particular las proteínas de membrana del eritrocito infectado por *P. falciparum* (*PfEMP1*) (16). Además, se ha descrito que los anticuerpos contra la fracción C terminal de la MSP1, pueden inhibir la invasión de eritrocitos por *P. falciparum in vitro* (31,32).

En la búsqueda de posibles candidatos a una vacuna, se han identificado una amplia gama de antígenos de *Plasmodium* (9,11,33–36), a partir de los cuales se han ejecutado ensayos *in vitro* para medir de forma indirecta la capacidad funcional y/o protectora de los anticuerpos contra proteínas y péptidos del parásito, tanto en ensayos de vacunación como en aquellos individuos que experimentan infecciones naturales. Por ejemplo, se evidenció que grupos de personas vacunadas con esporozoítos atenuados desarrollan células T de memoria efectoras pluripotentes específicas que producen interferón-gamma, factor de necrosis tumoral alfa e interleucina-2, mostrando que la presencia de estas células es un marcador inmunológico

prometedor de protección al comparar los resultados con un grupo control, fenómeno similar se observó en pacientes naturalmente expuestos a la infección (37,38).

La detección de anticuerpos a causa de la infección por *Plasmodium* ha permitido el uso de la serología como herramienta para analizar el nivel de exposición al parásito en habitantes de diversas zonas endémicas (7,16,17,39,40). Los estudios basados en serología han permitido caracterizar una gran variedad de proteínas que pueden ser reconocidas por anticuerpos generados por los individuos expuestos (39,41–43). Estos anticuerpos pueden ser empleados como biomarcadores útiles para monitorear cambios en la exposición de las poblaciones en determinados periodos de tiempo (18,19). En Brasil y Perú se han reportado estudios en los cuales se buscó definir las variaciones serológicas en función de la endemicidad de diferentes poblaciones y se han identificado anticuerpos que son más frecuentes en áreas de alta intensidad de transmisión (20–22).

Los resultados que se obtienen a partir de las investigaciones que buscan identificar y medir anticuerpos específicos contra proteínas de *Plasmodium* son específicos y particulares de cada población de estudio, razón por la cual, se hace necesario investigar y describir de forma preliminar la respuesta inmune mediada por anticuerpos y su relación con antecedentes de exposición a *Plasmodium* en zonas endémicas de Colombia.

Estudios en Colombia, han indagado sobre la seroprevalencia contra proteínas específicas del parásito, los resultados muestran una gran variabilidad de respuestas en función de los antígenos evaluados. Terrientes et al, 1994, reportó una seropositividad del 74% frente a la proteína MSP1 de *P. falciparum* en 151 pacientes de Punta Soldado Buenaventura (44). Maestre, et al. 2010, reportó un 60% de positividad de anticuerpos frente a proteínas recombinantes de *P. falciparum* y *P. vivax* en 233 pacientes del Urabá Antioqueño (45). Gnidehou et al, 2019, encontró una seropositividad del 53% en un grupo de 94 niños y adultos con malaria de Puerto Libertador, un porcentaje similar de seropositividad se observó en un grupo de 53 niños y adultos no infectadas de la misma zona (46).

A pesar de contar con estos datos, actualmente no hay suficiente evidencia de estudios donde se asocie la respuesta de anticuerpos contra *P. falciparum* y *P. vivax* con la historia de exposición que experimentan las poblaciones colombianas como consecuencia de la infección natural por *Plasmodium* en zonas endémicas del país, así como investigaciones que evalúen la funcionalidad de los anticuerpos anti *Plasmodium* y su papel en la respuesta inmune protectora de individuos colombianos. El hecho de indagar sobre la respuesta de anticuerpos específicos contra *Plasmodium* en pacientes colombianos, puede brindar información de base para la implementación de herramientas de vigilancia epidemiológica a partir de la serología, así como para dar continuidad a futuras investigaciones asociadas a las respuestas de anticuerpos y su papel en la inmunidad de las poblaciones colombianas.

Con estos antecedentes, se desarrolló un estudio descriptivo para estimar la frecuencia y niveles de anticuerpos contra un set de antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* en habitantes de Quibdó-Choco, zona endémica para malaria en Colombia, y su relación con antecedentes epidemiológicos, además se pretendió comprender la posible capacidad funcionalidad de los anticuerpos que producen las personas de estas poblaciones mediante estudios de inhibición del crecimiento de *P. falciparum* *in vitro*.

Conocer sobre respuesta humoral a partir de anticuerpos anti *Plasmodium* en poblaciones naturalmente expuestas a las dos principales especies del parásito, así como explorar la relación de esta respuesta con variables que reflejen la historia de exposición al parásito, es necesario para generar un primer acercamiento sobre el papel que juega la respuesta de los anticuerpos específicos frente a *P. vivax* y *P. falciparum* de habitantes de zonas endémicas Colombianas donde cohabitan estas dos especies.

Indagar sobre la respuesta inmune adquirida naturalmente empleando herramientas serológicas, presenta una gran ventaja frente a las limitaciones que pueden ofrecer los métodos de diagnóstico parasitológico como la microscopía de luz y la amplificación de ADN, ya que, a diferencia de estas técnicas, la detección de anticuerpos podría lograrse incluso cuando las infecciones ya se han tratado, generando datos que no solo incluyan infecciones activas sino también la huella de anticuerpos de infecciones previas.

Investigar sobre la adquisición natural de anticuerpos frente a *Plasmodium* en Colombia aportará evidencia útil que sirva de base para continuar construyendo un conocimiento sólido sobre la respuesta inmune antiplasmodial de nuestras poblaciones. Adicionalmente la determinación de la frecuencia y funcionalidad de anticuerpos anti plasmodiales aportaría información útil que puede ser empleada en los programas de monitoreo epidemiológico, al implementar nuevos marcadores serológicos de exposición a la infección como una línea de base para la caracterización serológica de las poblaciones afectadas por la malaria en Colombia.

3. Estado del arte

3.1 Generalidades de *Plasmodium* y ciclo de vida.

Plasmodium es un protozoo con un ciclo de vida bastante complejo que comprende una fase asexual o esquizogonia en el hospedero humano, y una fase sexual obligatoria en el mosquito vector. En el humano, la infección comienza con la picadura de la hembra del género *Anopheles* infectada, la cual regurgita el contenido de sus glándulas salivales para poder alimentarse, inyectando así formas del parásito denominadas esporozoítos (25).

Los parásitos recién inoculados en la piel buscan capilares y vasos sanguíneos, mediante un mecanismo denominado “gliding” o motilidad deslizante, éste es un proceso aleatorio que permite que una proporción del parásito alcance y penetre un vaso sanguíneo para ingresar a la circulación del hospedero. Ya en sangre periférica los esporozoítos circulan por un corto periodo de tiempo, pues tienen tropismo por el hígado, cuando llegan a la circulación hepática cruzan la barrera sinusoidal que comprende células endoteliales fenestradas y células de Kupffer similares a los macrófagos, empleando un proceso que se denomina migración transversal (47). La invasión de los hepatocitos está precedida por un recorrido celular del parásito hasta que este encuentra un hepatocito adecuado (48).

Al invadir el hepatocito, el esporozoito forma una vacuola parasitófora, dentro de la cual los parásitos se someten a una esquizogonia durante los siguientes 2 a 10 días. El desarrollo culmina con la liberación de hasta 40,000 merozoítos por hepatocito en el torrente sanguíneo, a través de la gemación de vesículas llenas de parásitos denominadas merosomas (49). La fase hepática de la infección puede durar hasta 12 días para *P. vivax*, además esta especie es capaz de generar formas de latencia, metabólicamente poco activas denominadas hipnozoítos (48).

Una vez liberados al torrente sanguíneo, los merozoítos libres invaden los eritrocitos en un proceso rápido, dinámico, el cual incluye un primer contacto o pre-invasión donde el merozoito se une al eritrocito y la invasión activa(50). El primer contacto entre el merozoito y el eritrocito está mediado por interacciones de baja afinidad entre las proteínas de la superficie del eritrocito y el merozoito, este contacto permite que se produzca la reorientación del parásito, ubicándose así el extremo apical del merozoito en contacto directo con el eritrocito(51). Toda esta serie de eventos se llevan a cabo en aproximadamente 2 minutos.

Posteriormente al contacto estrecho, se presenta una interacción ligando-receptor específica, mediada por dos familias de ligandos de proteínas de membrana de tipo 1 en *P. falciparum*: “EBLs” del inglés erythrocyte binding-like proteins y “PfRh5” *P. falciparum* reticulocyte-

binding protein homologs), las cuales se unen a receptores específicos de la membrana del eritrocito como la glicoforina A, B y C y el receptor del complemento (48).

La formación del complejo *PfRh5* unido a su receptor en el eritrocito activa una cascada de señalización que desencadena la pérdida de calcio citoplasmático en el eritrocito, lo cual causa una leve crenación. Al mismo tiempo micronemas del merozoíto, liberan su material proteico depositando proteínas del complejo RON (Roptry Neck Protein) en la membrana del eritrocito, al cual se une la proteína AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1) para formar una unión móvil.(52) Finalmente, esta unión precede la formación de la membrana de la vacuola parasitófora, la cual encerrará el merozoíto que está invadiendo el eritrocito para que el parásito se establezca en un ambiente intracelular (53) (Figura 1).

Establecido en el eritrocito, *Plasmodium* pasa por varios estadios morfológicos: trofozoíto joven o anillo, trofozoíto maduro y esquizonte eritrocitario. Con la maduración en el estadio de esquizonte se da la división celular (esquizogonia) que da como resultado 16-32 merozoitos, proceso que conlleva a la lisis de los eritrocitos infectados y a la liberación parásitos que invadirán nuevos eritrocitos, junto a muchas otras proteínas liberadas por *Plasmodium* (48).

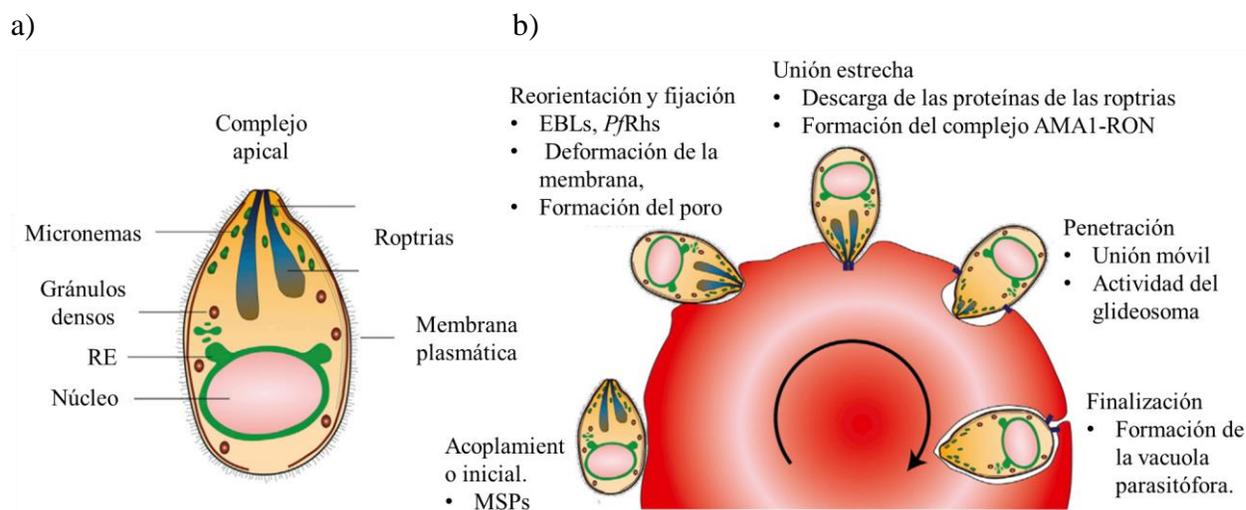


Figura 1. El proceso de invasión del merozoíto de *Plasmodium* a) Representación gráfica del merozoíto y sus partes. RE; retículo endoplasmático. b) Representación del proceso de invasión del eritrocito por un merozoíto de *Plasmodium*. Imagen adaptada de Cowman et al, 2017. *The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>

Los merozoítos de *P. falciparum* invaden eritrocitos normocíticos, es decir eritrocitos con tamaño promedio o normales. Al examen microscópico de la sangre se pueden distinguir algunas características en las infecciones ocasionadas por esta especie, se observan predominantemente trofozoítos inmaduros o anillos y alta parasitemia. En infecciones causadas por *P. vivax* la parasitemia suele ser menor en comparación con *P. falciparum*, puesto que los merozoítos de *P. vivax* invaden preferencialmente reticulocitos, los cuales representan una baja población celular en la sangre (48).

Durante subsecuentes ciclos de replicación en la fase eritrocitaria, una proporción de parásitos experimenta un cambio en su desarrollo que direcciona la formación de gametos masculinos y femeninos. La maduración de los gametocitos se lleva a cabo en la médula ósea (54) pues el parásito evita el aclaramiento esplénico hasta emerger a sangre periférica cuando ha madurado para que sean ingeridos por el vector (55). Este proceso dura once días para la especie *P. falciparum*, mientras que para *P. vivax* tan solo son necesarios cuatro días.

Una vez el parásito entra al intestino medio del mosquito, ocurre la maduración y la fertilización entre gametocitos masculino y femenino dando origen a un cigoto. El cigoto se transforma en un ooquinetto, la cual se puede movilizar y atravesar el epitelio intestinal del mosquito, allí se establece y se transforma en un ooquiste. Enquistado en el tejido luminal el parásito se replica por esporogonia dando lugar a cientos de esporozoítos, los cuales una vez maduran y se liberan, migran a las glándulas salivares del mosquito empleando su flagelo móvil, donde se formará nuevamente un inóculo que podrá infectar al humano, dándole perpetuidad al ciclo de vida del parásito (48).

3.2 Generalidades en la respuesta inmune frente a *Plasmodium*

Teniendo en cuenta la primera interacción entre *Plasmodium* y el humano, con la liberación de los esporozoítos en la piel, clínicamente no genera síntomas más allá de la inflamación que ocasiona la picadura del vector. La respuesta inmune en la piel a expensas de fagocitos como las células dendríticas, reconocen antígenos extraños como la proteína del circumsporozoito (CSP), proceso que activa funciones de fagocitosis y la subsecuente migración de estas células a los nódulos linfáticos para presentar los péptidos procesados a partir de las proteínas fagocitadas por medio del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) a los linfocitos T CD4+ (25) pero también mediante el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) a los linfocitos T CD8+(56).

Algunas evidencias apuntan a que la presencia de células T reguladoras en piel (Treg) específicas de *Plasmodium* pueden mediar en la tolerancia inmune a los esporozoítos en este tejido. El entorno inmunorregulador de la piel puede verse reforzado por la activación inmune

de forma crónica o la desregulación inmune debido a las repetidas exposiciones a los esporozoitos (25). Por estas razones la respuesta inmune de la piel no logra contener la infección y los esporozoitos migran hacia el hígado para continuar su ciclo (57).

En la fase hepática de la infección, la respuesta inmune celular puede eliminar los parásitos intracelulares mediante la activación de mecanismos de muerte celular a expensas de linfocitos T CD8+ y CD4+, los cuales implican citólisis por medio de la liberación de perforinas y granzimas, como también la activación de vías no citolíticas, como la del óxido nítrico inducido por INF- γ (25,57), sin embargo, estos procesos no se logran en la mayoría de los casos, ya que el parásito posee estrategias para evitar el reconocimiento por parte de la respuesta inmune, como los son la formación de los merozomas (49) y la interrupción en la producción de radicales libres (58).

Debido a que *Plasmodium* se comporta como parásito intracelular obligado en el hospedero humano, la invasión de los eritrocitos es un proceso fundamental para su sobrevivencia. Esta célula le brinda los nutrientes para su desarrollo y además le permite evadir la respuesta inmune innata. La ausencia de núcleo en el eritrocito hace de esta célula más susceptible debido a que no expresa moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, generando una menor respuesta inflamatoria (48). Sin embargo cuando son liberados nuevos merozoitos producto de la ruptura de esquizontes sanguíneos, las proteínas solubles del parásito son blanco para los monocitos circulantes y otras células fagocíticas, quienes se activan para producir citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (59,60). Estas citoquinas inducen la producción de radicales libres del oxígeno y óxido nítrico en respuesta a los antígenos parasitarios. Además, pueden activar células asesinas naturales o NK (natural killer), linfocitos T y macrófagos en función de eliminar al parásito (61).

Debido a la gran carga antigénica liberada en cada ciclo eritrocitario, se exagera la producción de citoquinas pro inflamatorias y la inflamación excesiva que se activa como mecanismo para controlar la parasitemia puede generar la aparición de sintomatología intensa en el hospedero, caracterizada por fiebre intermitente producida cada 48 horas, lo que ocasiona que muchas de las proteínas del parásito se expongan al sistema inmune luego de la ruptura del esquizonte sanguíneo (60).

Durante el ciclo eritrocitario *P. falciparum* emplea el fenómeno del secuestro para hacer que los glóbulos rojos infectados se unan a los receptores en el endotelio vascular, por lo cual puede llegar a causar obstrucción microvascular, isquemia local e inflamación en el cerebro y otros órganos vitales exacerbando la gravedad de la infección. Algunos autores sugieren

que el secuestro ayuda al parásito a evitar la remoción y destrucción de los glóbulos rojos infectados cuando la sangre pasa por el bazo (25,62).

3.2.1 Generalidades de la respuesta inmune adaptativa y producción de anticuerpos

Una vez son reconocidos los antígenos plasmodiales, las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas migran a tejidos linfoides secundarios para estimular células T virgen, éstas reconocen los diferentes péptidos antigénicos procesados y presentados mediante el MHC-II. De forma paralela los linfocitos B reconocen los antígenos por medio de su receptor BCR, proceso que desencadena la endocitosis y procesamiento del antígeno plasmodial; algunos de los péptidos procesados se exportan y se presentan mediante el MHC-II del linfocito activado (57,63).

Activadas ambas poblaciones celulares, tanto T como B, el linfocito T interactúa mediante su receptor (TCR), con el MHC-II cargado con el epítotope, expresado en la superficie del linfocito B. El contacto entre ambas células genera un intercambio de señales de activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B en subpoblaciones, donde las más caracterizadas son las células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria (63,64)

Coincidiendo con la ruptura de los eritrocitos infectados y la liberación de merozoitos, la respuesta inmune adquirida en materia de anticuerpos también juega un papel importante, puesto que estas formas parasitarias expresan antígenos que son prominentes blancos de anticuerpos adquiridos por el hospedero (65) además, se han descrito anticuerpos específicos frente a estas proteínas de superficie del merozoito que pueden inhibir el proceso de invasión por parte del parásito a los eritrocitos, controlando así la densidad parasitaria en sangre (5,31,66,67).

Investigaciones previas apuntan a que los anticuerpos que se producen en respuesta a un nuevo antígeno tienen una afinidad relativamente baja, lo que significa que no se unen al antígeno con tanta fuerza como los anticuerpos de alta afinidad. Estos anticuerpos primarios son secretados por células plasmáticas de vida corta, generadas tras la interacción entre células B nativas y células T auxiliares específicas de antígeno (63).

Una vez que la infección está controlada, la población de células efectoras específicas del antígeno y células B de memoria disminuye, dejando un pequeño número de células de memoria de larga vida, pero se cree que el conjunto de estas células aumenta con cada nueva infección que experimentan los pacientes, aumentando la capacidad de las respuestas futuras, pues se ha hipotetizado que algunas de las células plasmáticas se diferencian en células

plasmáticas de larga vida que migran a la médula ósea y continúan produciendo anticuerpos incluso en ausencia del antígeno(4)

Varios estudios inmunoepidemiológicos han demostraron que altos niveles de anticuerpos contra antígenos específicos del parásito en la etapa sanguínea se correlacionan con la protección contra la sintomatología de la enfermedad (27,28,38,65) Los anticuerpos pueden controlar el desarrollo de síntomas clínicos al dirigirse a la invasión de los merozoitos del parásito en la etapa sanguínea y redirigir su eliminación por células fagocíticas a través de los receptores Fc y del complemento (9,10). Además, ensayos *in vitro* han demostrado la posible función efectora de los anticuerpos dirigidos contra antígenos del parásito. Por ejemplo, proteínas expresadas en los eritrocitos infectados pueden promover la fagocitosis opsónica (35), bloquear la adherencia a la microvasculatura, interrumpir la formación de rosetas con eritrocitos no infectados y prevenir la ruptura de los eritrocitos y la salida del parásito (4,25,38).

3.3 Epidemiología de la malaria en el mundo

Para el 2.021 a nivel mundial se estimaron 247 millones de casos en 84 países donde la malaria es endémica, esta cifra aumentó en comparación con los 245 millones de casos de malaria reportados para en el año 2.020. La incidencia a nivel mundial fue de 59 casos por cada 1.000 habitantes en riesgo en 2.020 comparada con una incidencia de 57 casos por mil habitantes en 2.019 (1). En cuanto a la mortalidad se reportaron 625.000 muertes por malaria y el porcentaje total de muertes por malaria en niños menores de 5 años fue del 76% para el 2021 (1).

En el África subsahariana se estimaron 234 millones de casos en 2.021, los cuales representaron alrededor del 95% de los casos mundiales. La incidencia en esta región fue de 229 casos por mil habitantes para el 2021, con una tendencia a la reducción frente a los 234 casos por mil habitantes estimados en el 2020. El 99% de los casos en esta región fueron atribuidos a la especie *P. falciparum*, donde se estimaron 593.000 muertes para el 2.021 (1).

En América, los casos de malaria se redujeron en un 60% (de 1,5 millones a 0,6 millones) y la incidencia de casos en un 70% (de 14 a 4) entre los años 2.000 y 2.022. En Brasil, Colombia y Venezuela se presentan más del 79% de todos los casos de esta región. Las muertes por malaria se redujeron en un 64% (de 919 a 334) y la tasa de mortalidad en un 73% (de 0,8 a 0,2). El 78% de las muertes en esta región se presentaron en la población adulta (1).

El aporte de la especie *P. vivax* a nivel mundial se concentra en la región de Asia Sudoriental con un 40% de los casos reportados para el 2021, donde la mayoría de estos fueron reportados

en India (79%) y este mismo país aportó el 89% de la mortalidad para la región asiática sudoriental. En América *P. vivax* es la especie predominante, pues las infecciones por esta especie representaron el 71% de los casos de malaria en este continente para el 2.021(1).

En Colombia, la malaria se caracteriza por presentar una transmisión baja e inestable, sin embargo, hay regiones endémicas con altos niveles de transmisión(68,69). El hecho de que el país se ubique en una zona tropical le brinda las características geográficas (cerca del 85% del territorio se encuentra por debajo de los 1 600 metros sobre el nivel del mar), las condiciones epidemiológicas y climáticas que permiten la presencia del vector y la transmisión de la enfermedad (30).

En Colombia según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública se notificaron 71.573 casos, con un predominio de infecciones causadas por *P. vivax* con 43.444 casos – 60,7 %, seguido de *P. falciparum* con 27.412 casos – 38,3%. Chocó es el departamento que más casos reporta (23.566 casos – 33%) y en esta región co-circulan las dos especies de mayor importancia, con un predominio de casos por *P. falciparum* (13.149 casos – 56%) seguido de *P. vivax* (10.039 casos - 44%) (34).

La situación de malaria en Colombia para el periodo de captación de los pacientes entre el 2.018 y 2.019 no difirió sustancialmente en comparación con los datos reportados para el 2.021. Durante el 2.018, se notificaron 63.143 casos, de estos 62.194 casos correspondieron a infecciones no complicadas; el 50% de los casos (31.078) fueron diagnosticado con infección ocasionada por *P. vivax*, el 48% (29.906 casos) por *P. falciparum* y 2% (1.210 casos) atribuidos a malaria mixta. Cabe resaltar que se notificaron 949 casos de malaria complicada, 584 por *P. vivax*, 328 por *P. falciparum* y 37 por infección mixta (70).

Para el primer semestre de 2.019, los casos de malaria en Colombia fueron ocasionados predominantemente por *P. falciparum* con un 51,6%, mientras que los casos de malaria complicada en su mayoría fueron causados por *P. vivax* (59,6%). El 59% de los casos notificados para este periodo procedieron de la región pacífica del país y Chocó fue el departamento con más casos de malaria no complicada reportados (35,6%) (24) .

Para finales del 2.019 se reportaron 78.513 casos, los departamentos con más carga de la enfermedad y basados en los resultados reportados según el índice parasitario anual (IPA), el cual mide el riesgo de enfermar por malaria en una área y tiempo determinado (número de casos confirmados /población en riesgo por 1.000 habitantes) son Chocó con un IPA de 49,4, seguido de Guainía (IPA 46,7), Nariño (37,3) Amazonas (22,9) y Norte de Santander (22,2) (24).

A pesar del progreso significativo hacia el control y la eliminación de la malaria que se ha logrado en América del sur durante la década del 2.000, esta enfermedad sigue siendo un grave problema de salud pública en la región. La mayoría de los casos de malaria provienen de las áreas de la selva tropical del Amazonas en los países del norte como Brasil, Colombia y Perú, donde más de la mitad de la malaria es causada por *P. vivax*, mientras que la incidencia de casos por *P. falciparum* ha disminuido en los últimos años (69).

Según estudios epidemiológicos se ha encontrado que Colombia se caracteriza por presentar una transmisión inestable, en algunas zonas geográficas se observan marcadas disminuciones de casos, mientras que en otras se presentan rápidos aumentos. *P. falciparum* y *P. vivax* son prevalentes en la Cuenca Amazónica Norte, el Caribe y los departamentos de Sucre, Antioquia y Córdoba. Algunas de las etnias más afectadas son las poblaciones indígenas y afrocolombianas debido a la transmisión domiciliaria en las zonas endémicas donde residen estas etnias (68).

3.4. Estudios de inmunidad humoral anti-*Plasmodium* en poblaciones naturalmente expuestas

Para comprender cómo los anticuerpos adquiridos de forma natural están participando en el control de la infección, ya sea por su capacidad directa para controlar la parasitemia, es decir, para inhibir la invasión de los eritrocitos por parte de los merozoitos, o de forma indirecta mediante la activación de mecanismos propios de la respuesta inmune, se han llevado a cabo un numerosas investigaciones y revisiones (4,25,34,38,45,62,65).

La prevalencia y la intensidad de transmisión son claves para comprender los procesos de inmunización natural, puesto que la generación de una respuesta inmune duradera en teoría depende de la exposición repetida frente a los antígenos de *Plasmodium*. Uno de los primeros en investigar este fenómeno fue Robert Koch, quien concluyó de sus observaciones en áreas endémicas, que la malaria tiende a mostrar espectros clínicos mucho más fuertes en pacientes de temprana edad en comparación con adultos, y que aquellos individuos constantemente expuestos al parásito tendían a presentar infecciones asintomáticas. Por otra parte en sus hallazgos Koch discute que hay una alta probabilidad de que individuos inmigrantes expuestos a especies diferentes de *Plasmodium* puedan adquirir una inmunidad protectora, a expensas de anticuerpos heterólogos (71).

En un estudio prospectivo realizado en Mali, 185 individuos de 2 a 25 años muestran que las células B y los anticuerpos específicos de memoria contra *P. falciparum* se adquieren gradualmente durante años de exposiciones repetidas al parásito. Tanto las células B de memoria específicas de *P. falciparum* como los títulos de anticuerpos contra el antígeno de

membrana apical 1 (AMA1, apical membrane antigen 1) y la proteína 1 de superficie del merozoito (MSP1, merozoite surface protein 1) aumentaron después de que los pacientes experimentaran episodios maláricos agudos, interesantemente, después de seis meses de una disminuida exposición al parásito, las mediciones de anticuerpos y células disminuyeron de forma no significativa comparado con las mediciones previas a la infección (72).

Se ha descrito que anticuerpos frente a la proteína AMA 1, inhiben la invasión del eritrocito *in vitro* (33), en una revisión sistemática, se concluyó que la alta seroprevalencia de estos anticuerpos tuvo asociación con la protección frente a la sintomatología de la malaria (73). En otro estudio, se encontró que anticuerpos contra los esporozoítos de *P. falciparum*, activan el complemento cuando reconocen el antígeno mayor de superficie del esporozoíto y la proteína del circumsporozoíto (CSP), y que los subtipos de inmunoglobulinas encontradas, fueron de la clase IgG1, IgG3 e IgM, activan el complemento mediante el reclutamiento de la fracción C1q y la activación de la vía clásica (10), otros investigadores reportan resultados similares en cuanto a la funcionalidad de los anticuerpos para mediar procesos de opsonización y activación del complemento cuando son reconocidas las proteínas de superficie del merozoito: MSP1 y MSP2, asociando dicho hallazgo con la protección frente a la malaria clínica (35).

En cuanto a *P. vivax*, se ha descrito que anticuerpos específicos frente a dominios de proteínas de unión al reticulocito (*PvRBPs*), como *PvRBP2c* y *PvRBP1a*, inhiben la invasión del parásito a los reticulocitos, pues después de realizar ensayos *in vitro* con reticulocitos e IgG purificadas de individuos naturalmente expuestos y comparar dichos datos con la reactividad de los sueros medidos por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), los autores concluyen que se desarrolla una inmunidad naturalmente adquirida frente a los antígenos mencionados, y que es un mecanismo de neutralización frente a las infecciones por *P. vivax* (74).

En un estudio donde se han implementado ensayos *in vitro* con sueros de personas expuestas a la malaria se demostró que la fagocitosis mediada por procesos de opsonización por anticuerpos específicos contra proteínas de unión a reticulocitos (*PvRBP*), es un mecanismo que puede contribuir a la inmunidad protectora, puesto que hay una correlación entre la opsonización, y la protección contra las manifestaciones clínicas, ya que se encontró asociación de la fagocitosis mediada por anticuerpos con un menor riesgo de padecer malaria clínica (75).

En un estudio realizado en la frontera de China y Myanmar empleando una cohorte de pacientes que presentaban malaria aguda, se demostró que habitantes de un área hipoendémica donde coexisten *P. vivax* y *P. falciparum* pueden montar respuestas rápidas de anticuerpos contra MSP-1 de cada especie. Los autores sugieren que los anticuerpos

específicos contra PvMSP1 podrían servir como biomarcadores de exposición reciente a *P. vivax* en estudios epidemiológicos (18).

Particularmente anticuerpos frente a la proteína 10 de superficie del merozoito de *P. vivax* (PvMSP10), se han implementado como biomarcadores de exposición reciente de la infección por *Plasmodium vivax* en la Amazonía Brasileña y Peruana (21,32). El uso de este antígeno ha mostrado que las personas con anticuerpos anti-PfMSP10 presentaron menor riesgo de padecer malaria con alto grado de sintomatología (76).

La proteína rica en glutamato de *P. falciparum* (GLURP), la cual también ha sido objeto de investigación, se expresa en todos los estadios eritrocitarios del parásito, como los esquizontes y en la superficie de merozoitos recién liberados y también se encuentra en la membrana de la vacuola parasitófora de *P. falciparum* en fase hepática(77). La detección de anticuerpos naturalmente adquiridos frente a GLURP se ha correlacionado con bajas densidades parasitarias en habitantes de Ghana (78). Además, se ha encontrado que anticuerpos anti-GLURP pueden activar monocitos e inhibir el crecimiento del parásito *in vitro* (79,80)

En África, en un estudio donde se detectaron anticuerpos frente a las proteínas AMA-1, MSP1, 2, 3 y GLURP de *P. falciparum*, se midió la capacidad funcional de estos, mediante ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro*, y se encontró que después de realizar un seguimiento de 18 meses en lactantes de Benín, los niveles de anticuerpos cuantificados se correlacionaron fuertemente con la exposición a la infección, sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre los grupos sintomáticos y asintomáticos(13).

En otro estudio longitudinal realizado con una población infantil de Papúa Nueva Guinea, en la cual se emplearon como blanco de detección los anticuerpos específicos contra las proteínas MSPDBL1 y MSPDBL2, dos miembros poco usuales de la familia de las MSP-3 *P. falciparum*, se encontró que la presencia de estos anticuerpos de forma natural se asocia con la protección frente a los episodios clínicos de la enfermedad y pueden tanto opsonizar como inhibir el crecimiento del parásito *in vitro* (5).

3.5 Estudios de inmunidad humoral anti-*Plasmodium* en Colombia

En Colombia, se indagó sobre la respuesta inmune naturalmente adquirida en un estudio donde se detectó la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína MSP1 de *P. falciparum* en un grupo de 151 individuos de Punta Soldado, Buenaventura, encontrándose una seroprevalencia 74% en esta población(44).

En otro estudio se midió la frecuencia de la seropositividad frente a los antígenos CSP y MSP1 de *P. falciparum* y *P. vivax*, así como de la proteína PvDBP (*Plasmodium vivax* Duffy binding protein) en una muestra de 233 habitantes de Turbo y Apartadó. Los resultados mostraron una reactividad global del 60%. Los hallazgos mostraron una mayor respuesta de anticuerpos anti- PvDBP y anti-PvMSP1 en individuos heterocigotos para el gen DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) en comparación con aquellos homocigotos. (45).

Otro estudio reportó la detección de anticuerpos contra motivos de la proteína alfa helicoidal de *P. vivax* en una muestra de 227 pacientes de los municipios de Tierralta, Buenaventura y Tumaco. Se encontró un porcentaje de seropositividad del 46.3% y los índices de reactividad contra de anticuerpos contra las proteínas analizadas mostró un aumento en función de la edad (81).

Recientemente se han realizado estudios para evaluar el riesgo de la infección malárica mediante la cuantificación de anticuerpos IgG contra extractos de glándulas salivales de *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* y *Anopheles (Nys.) darlingi* en la costa pacífica colombiana (82), como también frente a péptidos específicos de *Anopheles gambiae* y *Anopheles albimanus* en poblaciones de dos municipios de Antioquia (83) y el potencial que pueden tener como biomarcadores de exposición frente a la picadura del vector en poblaciones endémicas.

Requena y colaboradores evaluaron la presencia de anticuerpos específicos contra proteínas de *P. falciparum* y *P. vivax* en mujeres gestantes de cinco países endémicos con diferentes niveles de transmisión, incluyendo a Colombia, en sus resultados sugieren que la adquisición de anticuerpos anti-PvDBP (*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein) podría conferir protección frente a complicaciones como el bajo peso al nacer a consecuencia de la infección por *Plasmodium* en las maternas(84).

Lopez-Perez y colaboradores cuantificaron los niveles de IgG frente a PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) y VAR2CSA un subtipo de PfEMP1 en personas adultas, niños y gestantes de Colombia, los resultados obtenidos sugieren que al igual que en otras poblaciones endémicas la producción de anticuerpos IgG frente a VAR2CSA solo se producía durante la gestación por su ligando condroitin sulfato A (CSA) expresado en las células placenta (85).

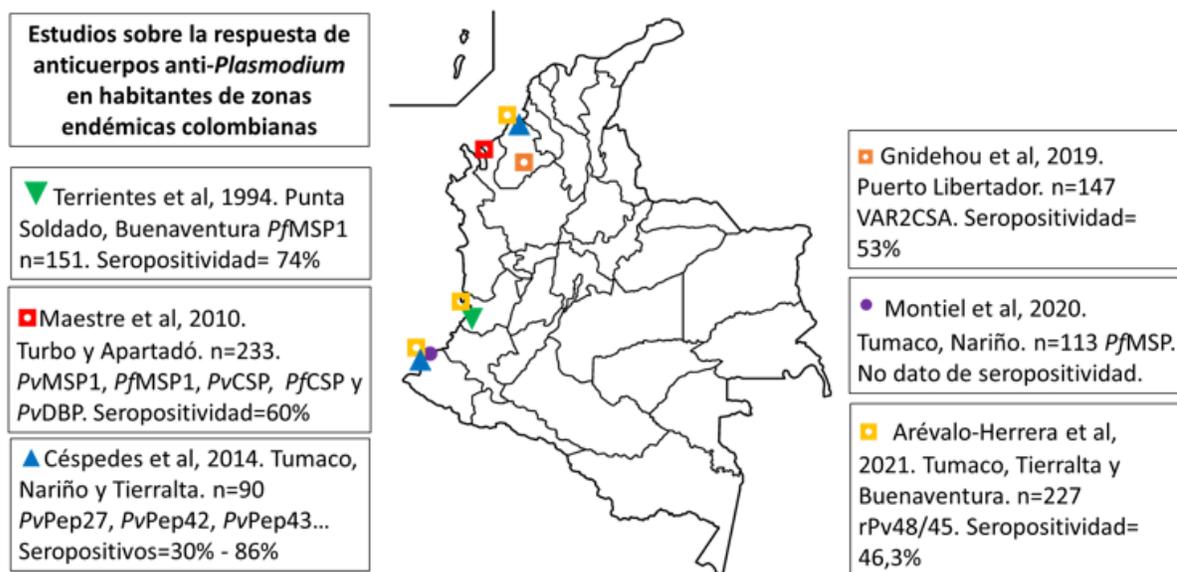


Figura 2. Respuesta de anticuerpos contra antígenos específicos de *P. falciparum* y *P. vivax* en Colombia 1994-2020.

3.6 Proteínas y péptidos empleados en la búsqueda de la respuesta inmune adquirida frente a *Plasmodium*.

En la actualidad existen numerosos estudios que han demostrado la infinidad de proteínas antigénicas que generan anticuerpos en el humano, puesto que gracias a la genómica y a la proteómica se hizo posible mapear todo el ADN codificante del parásito y así predecir las secuencias peptídicas como también la configuración de las estructuras proteicas de *Plasmodium*.

Un gran grupo de proteínas han sido ampliamente estudiadas dada su importancia crucial para la supervivencia del parásito, sobre todo aquellas que están implicadas en la invasión de los glóbulos rojos. Estas proteínas pueden encontrarse en diferentes localizaciones dentro del merozoíto, incluyendo la superficie, o en sus organelos citoplasmáticos: roptrias, micronemas y gránulos densos (48,52,57) .

Un grupo de proteínas cruciales en la interacción entre *Plasmodium* y el eritrocito, así como la activación y reconocimiento por parte del sistema inmune son las proteínas de la superficie del merozoito, denominadas familia de proteínas de la superficie del merozoito o MSPs que van desde la MSP-1 a la MSP-10. Algunas de estas proteínas, como la MSP-1, MSP-2, MSP-4, MSP-5, MSP-8 y MSP-10, se encuentran ancladas a la membrana del merozoito en unión

al glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que otras, como la MSP-3, MSP-6, MSP-7 y MSP-9, son solubles y pueden estar débilmente unidas a la superficie del merozoito o asociadas con otras proteínas de membrana (86,87).

En el proceso de invasión del eritrocito, los merozoítos también desempeñan un papel fundamental al utilizar proteínas de unión a eritrocitos (EBPs) localizadas en los micronemas. Estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con diversos receptores en la membrana de los glóbulos rojos, facilitando así la invasión del parásito. Desde un punto de vista estructural, estas proteínas presentan notables similitudes, con dos dominios tipo Duffy-binding-like (DBL) en el extremo N-terminal, una región rica en cisteínas en el extremo C-terminal, una región transmembrana y una pequeña cola citoplasmática. La relevancia de los dominios DBL en estas proteínas radica en su papel directo en la unión a los glóbulos rojos (45,88).

Se ha agrupado a estas proteínas en la familia conocida como DBL-EBP (Duffy-binding-like - proteínas de unión a eritrocitos), que comprende los productos codificados por los genes de la familia EBL de *Plasmodium falciparum*. Algunos miembros destacados de esta familia incluyen el antígeno de unión a eritrocitos 175 (EBA-175), EBA-140, EBA-181, EBA-165 y el ligando de unión a eritrocitos (EBL) (89). En este estudio se tuvieron en cuenta las proteínas que se mencionan a continuación:

3.6.1 Proteína 1 de superficie del merozoito (MSP1)

Siendo uno de los principales candidatos a vacuna, la proteína de superficie del merozoito 1, es la proteína más abundante expresada en la superficie de los merozoítos, y se caracteriza por ser una proteína altamente conservada entre las especies de *Plasmodium spp.* (87). La MSP1 se sintetiza como una proteína precursora de ~ 200 kilo dáltones (KDa), unida a la superficie del merozoito por su región carbono terminal a una molécula GPI, la proteína MSP1 luego se procesa en cuatro fragmentos principales (83, 30, 38 y 42 KDa) antes de que ocurra la ruptura del esquizonte (90).

Uno de los productos procesados, el fragmento C-terminal de 42 KDa, experimenta una escisión adicional por parte de la proteasa SUB-2 durante la invasión del eritrocito, generando dos porciones: una de 33 KDa y otra de 19KDa. Finalmente, MSP1 33 se libera a circulación y MSP1 19 es el único fragmento que permanece en la superficie del merozoito, la cual es posible detectar en el eritrocito recién invadido (91).

El fragmento de MSP1 19 está localizado en el extremo C-terminal es altamente conservado. Varios estudios han demostrado que este fragmento de la proteína MSP1 es altamente inmunogénico en las infecciones humanas (18,92,93). Los anticuerpos adquiridos

naturalmente contra la MSP1 19 pueden inhibir el crecimiento del parásito *in vitro* (94,95) y están asociados con la inmunidad protectora contra la infección por *Plasmodium* (13,31). Las últimas investigaciones han descrito un grupo de proteínas asociadas a MSP1, conocidas como las proteínas de superficie del merozoíto con dominio de unión a duffy 1 y 2 (MSPDBL1 Y 2) (Chiu et al., 2015; Sakamoto et al., 2012) y se ha demostrado que anticuerpos frente a estas proteínas inhiben el crecimiento del parásito *in vitro*.

3.6.2 Antígeno 1 de membrana apical (AMA 1)

Como su nombre lo indica, esta proteína se localiza en la membrana apical del merozoíto, es una proteína de membrana tipo I que comprende una región citoplásmica o amino terminal de aproximadamente 450 aminoácidos, un solo segmento transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático en su porción carboxilo terminal (29).

Siendo uno de los principales candidatos a vacuna, el antígeno 1 de membrana apical (AMA1), está implicado en la invasión de eritrocitos, puesto que se ha caracterizado su interacción con proteínas de las roptrias como la proteína de cuello de roptria 2 (29). En el humano, esta proteína se expresa principalmente en los estadios maduros del ciclo eritrocitario, es decir, en trofozoítos maduros y esquizontes. Inicialmente, AMA1 se expresa como un precursor de 83 kDa localizado en los micronemas del parásito. En el momento de la ruptura del esquizonte y la liberación de nuevos merozoítos el fragmento de 83 KDa se procesa generando un fragmento de 66 kDa que permanece unido a la membrana (96). Posteriormente el fragmento de 66 KDa se transloca al extremo apical del merozoíto para participar en el proceso de invasión mediante la interacción con la proteína del cuello de roptria 2 (RON2)(97).

Los anticuerpos frente a *PvAMA1* se han detectado con alta prevalencia en las personas naturalmente expuestas a la malaria y se ha observado un aumento en la frecuencia de seropositividad en función de la edad (73). Estudios prospectivos han evidenciado que la detección de anticuerpos anti-AMA1 se han asociado con un menor riesgo de presentar episodios clínicos durante la infección (98,99). También hay evidencia sobre el papel que pueden jugar los anticuerpos anti-AMA1 en la inhibición de la invasión parasitaria de eritrocitos (33,100).

3.6.3 Proteína rica en glutamato GLURP

La proteína GLURP, del inglés glutamate-rich protein es un antígeno expresado en todas las etapas del desarrollo del ciclo de vida del parásito en huéspedes humanos, esta proteína de 220 kilo dáltones se expresa incluso en la superficie de merozoítos recién liberados (77).

Estructuralmente la proteína rica en glutamato contiene una región amino terminal no repetitiva (R0), una región central no repetitiva (R1) y una región repetitiva en su porción carboxilo terminal (R2). El gen que codifica GLURP exhibe bajo polimorfismo entre aislados de *P. falciparum* geográficamente distintos (101).

La importancia potencial de GLURP en la inmunidad contra la malaria se ha demostrado en varios estudios. En un estudio realizado a partir de una cohorte de niños de Ghana, se encontró que los niveles de anticuerpos anti-GLURP se correlacionan con un menor riesgo de presentar malaria febril, ya que estos anticuerpos pueden opsonizar merozoítos favoreciendo la fagocitosis en ensayos *in vitro* (102). En otro estudio longitudinal realizado en el mismo país, en el cual se evaluó la respuesta de anticuerpos frente a las porciones R0, R1 Y R2 de GLURP, se evidenció que los anticuerpos específicos de la región R0 tienen mayor asociación con la protección frente a la malaria causada por *P. falciparum* en población infantil(102).

En una zona endémica de Brasil, los anticuerpos contra la región R0 de esta proteína parecen jugar un papel importante en el control de la parasitemia, pues estos logran promover una potente inhibición del crecimiento del parásito *in vitro*(101).

3.6.4 Proteína de unión al antígeno DUFFY (DBP)

La proteína DBP es una proteína de superficie del parásito que interactúa específicamente con el receptor de membrana Duffy en los glóbulos rojos humanos. El receptor Duffy es un antígeno presente en la superficie de los reticulocitos denominado DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines). La interacción entre la proteína DBP de *P. vivax* y el receptor DARC es esencial para que el parásito pueda infectar las células del hospedero (45).

La longitud de la proteína DBP en *P. vivax* puede oscilar entre aproximadamente 500 a 800 aminoácidos, lo que corresponde a un peso molecular de alrededor de 55 a 90 kilodaltones (kDa).

La diversidad genética de la proteína DBP es notable, y existen múltiples alelos de DBP en diferentes cepas de *P. vivax*. Esta diversidad se ha relacionado con las variaciones en la capacidad de unión del parásito al receptor Duffy y, por lo tanto, con la susceptibilidad y la gravedad de la infección por *P. vivax* en diferentes poblaciones humanas (103).

Los datos disponibles demuestran que los anticuerpos naturales contra la DBP prevalecen entre las personas que viven en áreas endémicas para *P. vivax*, y que estos anticuerpos pueden inhibir la interacción DBP-DARC(88,88,104). Estos antecedentes sugieren que este antígeno puede ser un buen candidato para la búsqueda de la huella inmune en poblaciones naturalmente expuestas a la malaria causada por la especie *P. vivax*.

4. Objetivo general y específicos, Hipótesis y Pregunta de investigación

4.1 Objetivo general:

Describir la respuesta y funcionalidad de anticuerpos naturalmente adquiridos frente a antígenos de *Plasmodium* en individuos residentes de Quibdó, Chocó.

4.2 Objetivos específicos:

1. Cuantificar los niveles de anticuerpos frente a antígenos específicos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* en individuos de Quibdó, Chocó.
2. Explorar la asociación del nivel de anticuerpos séricos frente a antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* con la especie infectante, la edad, el tiempo de residencia y los antecedentes de infección en la población de Quibdó, Chocó.

Determinar la capacidad del suero de individuos expuestos a la malaria en Quibdó, para inhibir el crecimiento de *Plasmodium falciparum in vitro*.

5. Hipótesis

La población con malaria en Quibdó-Chocó presenta anticuerpos tipo IgG frente a péptidos específicos de *P. falciparum* y *P. vivax*, y estos anticuerpos pueden estar relacionados con variables de exposición a la infección y con la capacidad inhibitoria de los sueros de los pacientes para controlar el crecimiento de *P. falciparum in vitro*.

6. Preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la frecuencia de positividad de anticuerpos contra un set de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* en una población expuesta a la malaria en Quibdó- Chocó?
2. ¿Los niveles de anticuerpos tienen relación con variables propias del hospedero que reflejan la historia de exposición, como la edad, el estado de infección actual, el

tiempo de residencia y el número de episodios previos auto reportados en habitantes de Quibdó?

3. ¿Existe inhibición del crecimiento de *Plasmodium falciparum in vitro*, cuando se cultiva en presencia de muestras de suero de individuos expuestos a *Plasmodium* en Quibdó-Chocó?

7. Metodología aplicada

7.1 Locación y población de estudio.

Los pacientes incluidos en este estudio fueron derivados de un macroproyecto titulado "Evaluación del desempeño de los analizadores hematológicos Sysmex XN-30, XN-20 y XN 450 en el diagnóstico de malaria", llevado a cabo por investigadores del Grupo Malaria de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. El macroproyecto captó pacientes con síndrome febril agudo entre mayo de 2018 y diciembre de 2019 en Quibdó, Chocó.

El municipio de Quibdó, (8.0952° N, 76.7285° W), se encuentra en una zona geográfica propicia para la circulación de los vectores que transmiten la malaria, y es una de las zonas endémicas más representativas del país, con infecciones ocasionadas por las dos especies de *Plasmodium* más prevalentes: *P. falciparum* y *P. vivax*. Quibdó se caracteriza por presentar una temperatura media de 28 °C y una altitud de 43 metros sobre el nivel del mar con una extensión de 3337.5 km² y la principal actividad económica es la minería de oro, plata y platino.

Quibdó es la capital del departamento del Chocó y reportó el 23.51 % de los casos de malaria durante el 2022 para este departamento, correspondientes a 5542 casos, de los cuales 5490 fueron catalogados como malaria no complicada según las cifras publicadas en los informes de evento del Instituto Nacional de Salud (105).

En el departamento chocoano, se han reportado índices parasitarios anuales (IPA) de 43.23 para el año 2022 (105) en comparación con 34.1 para el año 2018 y 49.4 para el año 2019 (70). Estos datos reflejan la persistencia y la importancia de la malaria en el departamento de Chocó, y respaldan la relevancia de llevar a cabo investigaciones sobre la respuesta y funcionalidad de los anticuerpos frente a antígenos de *Plasmodium* en la población de Quibdó.

En el macroproyecto se capturaron un total de 2475 pacientes con síndrome febril agudo (SFA) residentes de Quibdó, con un rango de edad comprendido entre 0 y 92 años, y una media de

29 años. Del total de pacientes, el 49,9% correspondieron al sexo masculino y el 50,1% al sexo femenino.

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron mediante punción digital y por flebotomía utilizando el sistema Vacutainer. Para obtener el suero, las muestras se sometieron a centrifugación a 2000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, una vez separados, todas las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido y enviadas a Medellín donde se almacenaron a una temperatura de -80°C en el laboratorio del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia.

Se realizó el diagnóstico microscópico de la malaria utilizando la técnica de gota gruesa. Esta técnica permite la visualización de los parásitos de *Plasmodium* en la muestra de sangre. Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la detección de secuencias de ADN específicas de *Plasmodium*. La combinación de estos dos métodos de diagnóstico, la microscopía y la PCR, brinda una mayor precisión y confiabilidad en la identificación de la presencia de infecciones por *Plasmodium* y la especie específica.

De los pacientes captados, aproximadamente 530 casos fueron confirmados como infecciones por *P. falciparum*, 201 casos como infecciones por *P. vivax* y 69 9% casos como malaria mixta, lo cual indica la presencia de ambas especies de *Plasmodium* en la población de estudio.

En el marco del macroproyecto se obtuvieron consentimientos informados de todos los pacientes incluidos en el estudio. Los pacientes mayores de edad firmaron personalmente el consentimiento informado, mientras que los pacientes menores de edad tuvieron el consentimiento informado firmado por su acudiente legal. Se recopiló información socio epidemiológica y sobre la historia de infecciones maláricas previas mediante la participación de los pacientes y sus acudientes. El 58,70% de los pacientes (1543) reportaron haber tenido al menos un episodio previo de malaria durante su vida, lo cual sugiere una alta incidencia de la enfermedad en la región.

7.2 Diseño del estudio.

Este estudio se llevó a cabo como un enfoque descriptivo exploratorio.

Para poder describir la respuesta y funcionalidad de anticuerpos anti-*Plasmodium* en las personas naturalmente expuestas a la malaria en Quibdó, se seleccionaron por conveniencia 100 pacientes con infección malárica aguda (Maláricos) empleando muestreo aleatorio simple del total de pacientes infectados (N=800) que fueron incluidos en el macroproyecto.

Se realizaron análisis de detección de anticuerpos anti-*P. falciparum* y anti-*P. vivax* utilizando ensayos de ELISA. Estos ensayos permitieron determinar la presencia y cuantificación de los anticuerpos específicos contra péptidos representativos de antígenos de *Plasmodium* en el suero de los pacientes. Con el objetivo de analizar si las respuestas de anticuerpos obtenidas en los pacientes pudiesen estar influenciadas por el episodio malárico actual se seleccionaron por conveniencia 30 pacientes con síndrome febril agudo y diagnóstico negativo para malaria, conformando así un grupo adicional. Estos pacientes se incluyeron empleando un muestreo aleatorio simple de todos los pacientes sin malaria del total incluidos en el macroproyecto (SFA no maláricos).

De forma paralela, se evaluó la capacidad del suero de los pacientes para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* *in vitro*, como una medición indirecta del posible papel de los anticuerpos específicos presentes en el suero y su capacidad para interferir con el crecimiento del parásito. Estos ensayos solo se realizaron con la muestra de pacientes con malaria y no se incluyeron los 30 pacientes SFA no maláricos.

Además, se realizaron análisis estadísticos para investigar las posibles correlaciones entre los resultados obtenidos por estas técnicas y las variables de exposición a la infección de los pacientes analizados. En estas variables fueron incluidos los antecedentes de infección, número de episodios previos, edad y tiempo de residencia en la zona endémica

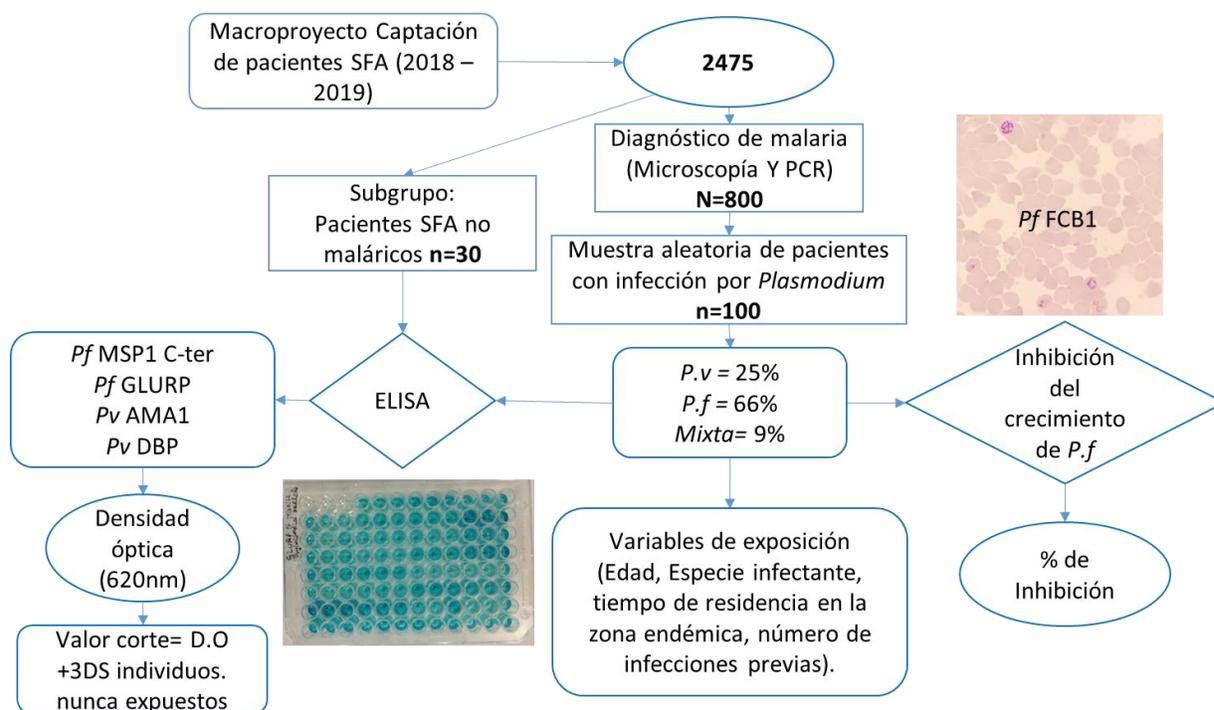


Figura 3. Flujograma de la metodología del estudio. Esquema visual del diseño del estudio, proporcionando una representación gráfica de cómo se relacionan las diferentes etapas y técnicas utilizadas en la investigación.

7.2.1 Criterios de inclusión y exclusión

En el marco del macroproyecto los criterios de inclusión para la captación de pacientes con síndrome febril agudo fueron los siguientes: fiebre (temperatura axilar mayor a 37,5 °C) o antecedentes de fiebre en las 72 horas antes del ingreso, menos de 7 días de evolución de la fiebre, ninguna otra causa aparente de fiebre (focos localizados de infección y/o enfermedades autoinmunes) y residencia en cualquier área de transmisión de malaria. Edad mayor a 2 años y peso mayor a 12 kilogramos (106).

En este proyecto se incluyeron pacientes con síndrome febril agudo e infección activa por *P. vivax* y/o *P. falciparum* confirmados por microscopía y PCR. Adicionalmente se incluyeron pacientes con suficiente volumen de muestra de suero almacenada a -80°C (3 alícuotas de 1 ml por paciente) para realizar los ensayos inmunoenzimáticos y funcionales.

La infección aguda podría potenciar la cantidad de anticuerpos tipo IgG a expensas de la memoria adquirida en infecciones previas. Estudios previos han mostrado una respuesta de anticuerpos IgG más intensa durante la fase aguda de la infección (44,81,93,95,99,102), pues los antígenos parasitarios como las proteínas de superficie de membrana del parásito y las proteínas expresadas en la superficie del eritrocito pueden ser reconocidas y activar células B de memoria para la generación de anticuerpos IgG (63,64,107).

7.2.2 Antígenos de *Plasmodium* a evaluar.

Para explorar la reactividad del suero de los pacientes seleccionados frente a antígenos de *Plasmodium*, se llevó a cabo una búsqueda de péptidos en la base de datos Immune Epitope Database (IEDB) (108). Esta base de datos contiene datos experimentales sobre anticuerpos y epítopes en linfocitos T y linfocitos B, recopilados de investigaciones en humanos, primates no humanos y otras especies animales, en el contexto de enfermedades infecciosas, alergias, autoinmunidad y trasplantes.

Utilizando la plataforma proporcionada por el IEDB, se realizaron filtros para identificar la mayor cantidad de artículos en los cuales se reportaron secuencias peptídicas utilizadas en diversos ensayos *in vitro* para la detección de anticuerpos anti *Plasmodium* en humanos. Estos péptidos fueron seleccionados como posibles antígenos para evaluar la reactividad del suero de los pacientes seleccionados en nuestro estudio.

Es importante destacar que la utilización de la base de datos IEDB permitió acceder a información previamente publicada y validada, lo cual garantiza la calidad y la relevancia de los péptidos seleccionados para esta investigación.

Para filtrar la información se emplearon los siguientes criterios de búsqueda:

1. Tipo de epítipo: Lineal.
2. Fuente del epítipo: *P. falciparum*/ *P. vivax*
3. Hospedero: Homo sapiens
4. Ensayo: Únicamente ensayos positivos, células B.
5. Complejo mayor de histocompatibilidad, MHC: Sin restricción.
6. Enfermedad: Malaria.

La búsqueda arrojó un total de 333 antígenos y 1234 epítopes para *P. falciparum* y 20 antígenos y 340 epítopes para *P. vivax*. Posteriormente se seleccionaron aquellos antígenos con mayor número de ensayos registrados en la literatura y cuyos estudios estuvieran enfocados en explorar la respuesta inmune naturalmente adquirida en poblaciones residentes de zonas endémicas para la malaria en zonas próximas a Colombia. El resultado final fue la selección de cuatro péptidos, dos para *P. falciparum* y dos para *P. vivax*. (Tabla 2).

Estos péptidos fueron seleccionados con base en la evidencia del papel que juegan las proteínas de las cuales hacen parte, con procesos como la invasión del eritrocito por parte del parásito, su expresión durante el ciclo eritrocitario, así como hallazgos importantes sobre su detección asociada a la protección clínica en poblaciones naturalmente expuestas a la infección. Se ha demostrado que los anticuerpos frente a las proteínas de las cuales se derivan los péptidos seleccionados pueden inhibir el crecimiento del parásito *in vitro* (94) y su presencia se ha relacionado con la protección frente a la presentación clínica de la enfermedad (22,31,79).

ESPECIE	PROTEÍNA	SECUENCIA PEPTIDICA	RESIDUOS	REFERENCIA
<i>Plasmodium falciparum</i>	Merozoite surface protein 1 (MSP-1)	QGMLNISQHQCVK KQCPQNS	1542 - 1561	(109)
	Glutamate-rich protein (GLURP)	DSEPFPRQKHKKV D	216 - 229	(80,110)
<i>Plasmodium vivax</i>	Duffy-binding protein (DBP)	VNNTDTNFHSDITF R	254 - 268	(111)

Apical membrane protein- SASDQPTQYEEEM 1(AMA-1)	TDYQK	290 - 307	(112)
--	-------	-----------	-------

Tabla 1. Péptidos empleados para inmunoensayos.

Estos péptidos fueron empleados para realizar la detección de anticuerpos en los pacientes de la muestra. Los péptidos fueron sintetizados por la investigadora Fanny Guzmán Quimbayo de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, quien posee una amplia experiencia en la síntesis química de péptidos. Para obtener un mejor rendimiento, fue necesario seleccionar secuencias lineales, cuyos residuos no fueran mayores de 20 aminoácidos ya que sintetizar fragmentos de este tamaño aseguraba mejores características del producto y menores problemas de plegamiento y agregación. Además, la elección de secuencias lineales cortas permite enfocarse en regiones inmunodominantes y conservadas, con las cuales se podrían detectar respuestas séricas en los pacientes de Quibdó.

7.3 Ensayos de laboratorio

7.3.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Fundamento:

Los anticuerpos presentes en individuos de una población pueden ser medidos por técnicas *in vitro* no funcionales. Entre estos ensayos, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA resulta la técnica de elección para determinar la cantidad de anticuerpos presentes en el suero o plasma de los individuos expuestos ya sea para evaluar la inmunidad poblacional o la seroconversión inducida por una vacuna (113).

El ensayo ELISA se basa en la capacidad de los anticuerpos o antígenos de unirse a una matriz sólida, que puede ser una placa de micro titulación, tubo, membrana u otro soporte, y retener la interacción de las moléculas de interés presentes en la muestra. En el caso de la detección de anticuerpos, se utiliza una matriz sólida previamente recubierta con el antígeno de interés. Cuando se añade la muestra (suero, plasma u otro fluido biológico) que contiene los anticuerpos, estos se unen específicamente al antígeno en la matriz sólida. Luego se realiza un lavado para eliminar las moléculas no unidas (113).

A continuación, se añade un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, como la peroxidasa de rábano picante. Este anticuerpo secundario tiene afinidad por los anticuerpos presentes en la muestra y forma un complejo inmune (antígeno-anticuerpo-anticuerpo

secundario unido a la enzima). Después de un segundo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido, se añade un sustrato que es dragado por la enzima unida al anticuerpo, esta reacción genera un producto detectable, asociado a un cambio de color en la solución (113) .

La cantidad de producto generado es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra original. Por lo tanto, al medir la intensidad de la señal generada por el producto (a menudo mediante espectrofotometría), se puede cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en la muestra, cuando se cuentan con estándares con concentraciones conocidas de antígeno o de anticuerpos (113).

El ELISA se puede diseñar en diferentes formatos según el tipo de anticuerpo o antígeno que se desea detectar, como ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de captura o ELISA competitivo, entre otros. Para detectar los anticuerpos anti-*Plasmodium* en la muestra de pacientes de Quibdó, se empleó una ELISA indirecta tipo sándwich, siguiendo los protocolos empleados por Londoño y cols. (83,83) con ligeras modificaciones.

Procedimiento para la estandarización:

Para estandarizar las ELISAs, se evaluaron dos condiciones: la concentración del péptido empleada para sensibilizar los platos de ELISAs y el tiempo de incubación para la lectura de la absorbancia. Se evaluaron concentraciones entre 1 y 5 µg/ml de péptido para determinar la concentración óptima de sensibilización de placas de 96 pozos.

Los péptidos liofilizados se suspendieron en agua destilada estéril, por ejemplo: para evaluar una concentración de 10 µg/ml del péptido PvAMA1, se suspendió 1 mg de liofilizado del en 1 mL de agua destilada estéril. A continuación, se tomaron 10 µl de esta solución y se diluyeron en 10 mL de solución de buffer fosfato salino (PBS) 1X filtrado. Se realizaron modificaciones en la dilución para obtener diferentes concentraciones de cada uno de los péptidos que se utilizarían en los ensayos.

Para realizar la sensibilización, se agregaron 100 µL del péptido en cada pozo y se incubó durante 18 horas a 4°C, seguido de una incubación adicional a 37°C durante una hora. Después de este proceso de sensibilización, se llevaron a cabo cinco lavados utilizando una PBS con un 0.05% de Tween 20 (PBS/T 0.05%) para eliminar cualquier exceso de péptido no unido a los pozos.

Para evitar uniones inespecíficas, se realizó un bloqueo utilizando una solución de PBS/T 0.05% con un 5% de leche descremada (PBS/T 0.05% L5%) y se incubaron las placas durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron lavados para eliminar el exceso de bloqueador y se agregaron 100 µL de la muestra de suero diluida 1:100 en PBS/T 0.05% L5%. Luego, se

llevó a cabo una incubación de 1 hora a 37°C para permitir la interacción de los anticuerpos presentes en la muestra con los péptidos sensibilizados en los pozos. Después de la incubación, se realizaron lavados adicionales para eliminar cualquier anticuerpo no unido.

A continuación, se agregaron 100 µL de un anticuerpo anti-IgG humana (Abcam) conjugado con peroxidasa de rábano picante (Horseradish Peroxidase HRP) diluido 1:1000 en PBS/T 0.05% L5% a cada pozo y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, se realizaron lavados para eliminar el exceso de anticuerpo conjugado.

Finalmente, se llevó a cabo la revelación de la reacción de unión antígeno-anticuerpos agregando 100 µL de sustrato Tetra metil benzinina (TMB) y se incubó durante 5, 10 y 15 minutos. La reacción del sustrato con la enzima HRP generó un producto con cambio de color detectable: azul celeste, el cual se utilizó para cuantificar la presencia de anticuerpos específicos en la muestra, para este caso no se empleó solución de parada siguiendo el protocolo empleado por Barrera et al. 2018 (114).

Finalmente se leyeron las absorbancias de los pozos utilizando un lector de microplacas de ELISA (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™) empleando lectura de absorbancia a una longitud de onda de 650 nanómetros (nm), la cual es específica para la detección del producto de reacción generado por la enzima HRP.

Para asegurar la reproducibilidad y homogeneidad en las mediciones se incluyeron montajes con duplicados de los siguientes controles:

- Un control positivo, que lo conformó un grupo de sueros de 6 pacientes del estudio macro caracterizados por presentar un síndrome febril agudo, con una edad promedio de 18 a 65 años con infección aguda y con historia de residencia en Quibdó, los cuales presentaron una parasitemia de 107 a 12000 parásitos/µl y auto reportaron más de 10 episodios previos de malaria durante su vida.
- Un control negativo, correspondiente a un grupo de sueros de personas sanas de 18 a 35 años, residentes de Medellín Antioquia, zona no endémica para la malaria, y quienes auto reportaron nunca haber viajado antes a una zona endémica durante su vida.

En este caso, se utilizaron duplicados de controles positivos y controles negativos para cada péptido ensayado. El punto de corte para definir la seropositividad se calculó a partir de los valores de densidad óptica del grupo control negativo, como el promedio más tres desviaciones estándar de la densidad óptica leída a 620 nm, para cada péptido.

7.3.2 Cultivo de *Plasmodium falciparum*:

Para este estudio se empleó el cultivo de la cepa FCB1 de *Plasmodium falciparum*, esta cepa proviene de un aislado de Caquetá, Colombia(115). El mantenimiento del cultivo se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Traeger y Jensen con modificaciones (116), las condiciones de incubación fueron constantes, empleando una temperatura de 37°C, con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 25 mM HEPES (Sigma), NaHCO₃ (21,6 mM), gentamicina (16 µg/L), hipoxantina (0,2 Mm) y 10% de suero humano A positivo y empleando un hematocrito al 20% de eritrocitos O negativo de donantes sanos. El uso de eritrocitos O negativo permitió descartar posible lisis por incompatibilidad con los anticuerpos de los sueros de los pacientes evaluados al poseer otros grupos sanguíneos.

Para evaluar el crecimiento del cultivo se realizaron extendidos delgados a partir del sedimento de células en las botellas. Las láminas se fijaron con metanol al 100% y posteriormente se colorearon empleando Giemsa al 5%. En objetivo de inmersión 100X, se contó la cantidad de parásitos en 100 campos microscópicos para calcular la parasitemia según protocolo previo (116,117). Para mantener la viabilidad del cultivo se realizaron diluciones de la parasitemia empleando eritrocitos sanos O negativo, a necesidad ajustando el porcentaje final de parásitos. Además, el medio de cultivo se renovó diariamente para proporcionar los nutrientes necesarios y eliminar los productos de desecho.

7.3.3 Sincronización del cultivo FCB1

La cepa FCB1, al igual que otras cepas de *P. falciparum*, puede presentar una multiplicidad de infección, al infectar asincrónicamente a los eritrocitos se presentan parásitos en diferentes etapas de desarrollo en una misma botella de cultivo (118). Para asegurar resultados consistentes, se realizó una sincronización y una concentración de los parásitos antes de comenzar los ensayos de inhibición del crecimiento. Este proceso implica la selección de una etapa de desarrollo específica de los parásitos como punto de partida del ensayo.

Los cultivos de FCB1 inicialmente se sincronizaron empleando D-sorbitol al 5% (119). El sorbitol es un azúcar alcohol que actúa como un agente osmótico, lo que significa que puede alterar el equilibrio de la membrana del eritrocito infectado por el parásito. De este modo, las formas maduras del parásito, que están en una etapa de trofozoíto o esquizonte, se lisan debido al cambio brusco en la concentración osmótica.

Brevemente, el cultivo se centrifugó 1500 rpm por 5 minutos en un tubo cónico de 15 mL, se retiró el sobrenadante. Al pellet resultante se le añadió solución de sorbitol al 5% (sigma) en una relación 1:1 vol/vol y se homogenizó empleando vortex, luego se llevó a incubación a 37°C por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó la preparación y se realizaron una serie de 3 lavados empleando medio RPMI incompleto. Se verificó el resultado del proceso empleando

extendido delgado, se estimó la parasitemia y posteriormente se ajustó el hematocrito y demás condiciones generales del cultivo para llevar a incubación.

7.3.4 Concentración del cultivo

Los cultivos con porcentajes de formas maduras mayores al 6% fueron sometidos al proceso de concentración. Resumidamente, el cultivo de *P. falciparum* se transfirió a tubo cónicos y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Seguidamente al pellet restante, libre de sobrenadante se le agregó solución de gelatina porcina al 1% (Sigma) en RPMI1640 incompleto (1 volumen de pellet/10 volúmenes de gelatina). Esta preparación se incubó a 37°C por 40 minutos. Los parásitos maduros, que tienen una menor densidad suspendidos en la parte superior del tubo, se recolectaron aspirando todo el sobrenadante y se lavaron con medio de cultivo RPMI-1640 incompleto por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se estimó la parasitemia empleando recuento en extendido delgado.

Para los ensayos, se concentraron eritrocitos infectados con formas maduras presumiblemente expresando knobs en su superficie (trofozoítos y esquizontes), mediante el protocolo de flotación en gelatina. Los cultivos de *P. falciparum* se transfirieron a tubos cónicos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Luego se retiró el medio de cultivo y se adicionó al pellet de Ei una solución de gelatina porcina al 1% (Sigma) en RPMI1640 incompleto (1 volumen de pellet/10 volúmenes de gelatina). La mezcla se incubó en baño maría a 37°C por 40 minutos, permitiendo la separación de dos fases. Luego, la fase superior que contiene los estadios maduros se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 mL y se lavó con medio de cultivo RPMI-1640 incompleto por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se verificó la parasitemia del obtenida por recuento de Ei en extendido delgado.

El objetivo de sincronizar los parásitos en esquizontes fue el simular un ciclo completo de vida desde la liberación de los merozoitos hasta la formación de nuevos esquizontes *in vitro*, de esta manera se puede esperar evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes de merozoitos recién liberados, mecanismo que podría evitar el proceso de invasión del parasito a los eritrocitos sanos, y este efecto podría verse reflejado en el porcentaje del crecimiento del parasito en el cultivo con respecto al control de crecimiento empleado.

7.3.5 Ensayo de inhibición del crecimiento de *P. falciparum in vitro*:

Después de sincronizar y concentrar los parásitos en esquizontes y formas maduras, se procedió a realizar los montajes en platos de cultivo de 96 pozos (Greiner), siguiendo el protocolo descrito por Berthi et al. en 2018 (120). En primer lugar, se añadieron 25 µl de glóbulos rojos parasitados a los pozos del plato. La parasitemia inicial de los glóbulos rojos parasitados fue de 0,5% y se utilizó un hematocrito del 2% de eritrocitos O negativo.

Posteriormente, se añadieron 25 µl de suero de los pacientes que se deseaban analizar a los pozos correspondientes. Según literatura previa la inactivación o purificación de anticuerpos no mostró una diferencia marcada de los resultados obtenidos en ensayos de inhibición del crecimiento de *P. falciparum* al emplear diferentes métodos de pretratamiento o purificación de anticuerpos del suero a evaluar (121,122), por lo cual en nuestros ensayos se emplearon los sueros sin ningún pretratamiento. Además, las muestras se tomaron antes del inicio de tratamiento, por lo cual se redujo en gran medida las posibles interferencias o sesgos en las mediciones a causa de antimaláricos circulantes.

Los platos de cultivo se llevaron a cámara de incubación, se inyectó mezcla de gases por 5 min (5% de CO₂, un 5% de O₂ y un 90% de N₂) y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Luego se agregaron 50 µL de SYBR Green al 0.4% a cada pocillo. Esta molécula tiene la capacidad de intercalarse en la doble hélice del ADN, lo que permitió marcar específicamente al parásito dentro del eritrocito infectado, ya que los eritrocitos carecen de núcleo y no contienen ADN. Posterior a una incubación de 20 minutos, se procedió a la medición de células fluorescentes, es decir, de cada eritrocito infectado, utilizando el citómetro de flujo BD Accuri™ C6. La emisión de fluorescencia fue leída a una longitud de onda de 485 nm de excitación y de 530 nm de emisión.

Se incluyeron controles de crecimiento de parásitos para asegurar la validez de los resultados en cada plato de cultivo. Estos controles consistieron en un pozo con 25 µl de medio RPMI y 25 µl de parásitos, que sirvió como control de crecimiento del parásito. También se utilizó un blanco cuyos pozos correspondieron a eritrocitos no parasitados, es decir, 25 µl de medio de cultivo y 25 µl de eritrocitos para llegar a un hematocrito del 4% en el medio de cultivo, con estos pozos se estandarizó el punto de corte para definir un evento con fluorescencia.

La inhibición del crecimiento de los parásitos se calculó como un porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left(\frac{\% \text{ eventos con fluorescencia muestra experimental}}{\% \text{ eventos control crecimiento } E_i} \times 100 \right)$$

- Donde % eventos control crecimiento E_i , se calculó como el promedio de las lecturas obtenidas por citometría de flujo del número de eritrocitos infectados en tres pozos control.

- Donde % de eventos con fluorescencia de la muestra, es el promedio de los tres pozos con suero de un paciente.

Para lograr tener resultados reproducibles en los ensayos de inhibición del crecimiento se emplearon las mismas condiciones para la realizar los montajes y lecturas del cultivo con la cepa FCB1. Se realizaron montajes por triplicado de las muestras de suero, los pozos blancos y el control de crecimiento. Se calcularon los promedios de las tres lecturas, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los montajes con un coeficiente de variación superior al 20% fueron repetidos.

7.3.6 Análisis estadístico:

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo tomando como variable de interés los niveles de anticuerpos como variable continua expresados en Índices de reactividad (IR) y como variable dicotómica la presencia o ausencia de anticuerpos en los pacientes analizados.

Los datos obtenidos, fueron analizados por el software SPSS 25.0 y Microsoft Excel 2018. Para definir la normalidad para la distribución de los datos se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Esto permitió evaluar si los datos seguían una distribución normal para determinar el empleo de métodos paramétricos o no paramétricos.

En cuanto a la variable continua, se calcularon las concentraciones de anticuerpos para cada antígeno, promediando los triplicados de cada paciente, teniendo en cuenta que aquellas muestras que superaran un coeficiente de variación del 10% deberían repetirse para garantizar la calidad en la repetibilidad de las mediciones. Los datos obtenidos mediante ELISA fueron transformados en IR con el objetivo de normalizar los resultados entre los cuatro péptidos empleados debido a las diferencias entre los puntos de corte. El IR se calculó como el cociente entre la absorbancia de la muestra y el punto de corte calculado para cada péptido.

Para los análisis descriptivos de los resultados de los ensayos de ELISA, se emplearon medidas de tendencia central como la media o la mediana y medidas de dispersión como la desviación estándar y el rango intercuartílico.

Para el objetivo número dos, se realizaron análisis de manera independiente para cada una de las respuestas específica por antígeno (péptido). Se empleó la Prueba de Kruskal-Wallis tanto para comprar las medianas de los IR de cada péptido con respecto a la especie infectante como para comparar los IR entre el tiempo desde la última infección y cada uno de los péptidos evaluados.

Se calcularon las correlaciones entre el IR con variables continuas como lo fueron la parasitemia, la edad y el número de episodios previos respectivamente, para esto se calcularon coeficientes de correlación de Pearson o Spearman según el cumplimiento del supuesto de normalidad. Estas correlaciones se calcularon de manera independiente para cada péptido analizado.

Para comparar los grupos según la presencia o ausencia de anticuerpos en función de las variables: especie de la infección actual, edad, reporte de diagnóstico previo y tiempo de residencia en la zona se hicieron comparaciones de medias o medianas y se empleó la prueba T-student o U-Mann Whitney.

Para el análisis de los datos obtenidos en el ensayo de inhibición del crecimiento y cumplir con el objetivo número tres, se calcularon los promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación para cada medición realizada por triplicado. Los porcentajes de inhibición fueron evaluados con los índices de reactividad para cada péptido y la parasitemia empleando índices de correlación de Spearman.

8 Resultados

8.1 Características demográficas y clínicas de la muestra de estudio.

El grupo malárico presentó un rango de edad de 2 a 77 años, con una mediana de 22 años; el 55% de los participantes fueron hombres. Se encontró una mayor frecuencia de pacientes de la etnia negra con respecto a las otras etnias. En cuanto al tiempo de residencia de los pacientes en la zona endémica, se encontró una mediana de 6,5 años residiendo en Quibdó. El 80% de los pacientes reportó haber experimentado episodios previos de malaria, con un

53,2% dijeron haber sufrido entre 2 a 5 episodios previos. La especie infectante más frecuente fue *P. falciparum* con un 76% de las infecciones maláricas en los pacientes.

Por su parte el grupo SFA no malárico presentó un rango de edad similar al grupo con malaria: 4 a 79 años, con una mediana de 23 años. Las proporciones de pacientes en cuanto a sexo y etnia también fueron similares a las del grupo malárico. Entre otras características el 53,3% de los pacientes no maláricos reportaron haber experimentado episodios previos de malaria, de los cuales el 43,75% presentaron de 2 a 5 episodios. (Tabla 2).

Información demográfica	Maláricos n=100	SFA no maláricos n=30
Edad - años; Me (RI)	2(15,0 - 39,5)	23 (7 - 46,5)
Sexo; n (%)		
Masculino n (%)	55 (55,0)	16 (53,4)
Femenino n (%)	45 (45,0)	14 (46,6)
Grupo étnico por autodenominación; n (%)		
Afrodescendiente	88 (88,0)	28 (94,0)
Blanco	3 (3,0)	1 (0,3)
Indígena	5 (5,0)	1 (0,3)
Mestizo	4 (4,0)	0
Tiempo de residencia en la zona endémica - años; Me (RI)	6,5 (2 - 15,5)	9,5 (4 - 24,5)
Información clínica y epidemiológica		
Antecedente de episodios maláricos; n (%)	80 (80,0)	16(53,3)
Número de episodios previos en toda la vida; n (%)		
1	20 (25,0)	6(37,5)
2 a 5	42 (52,5)	7(43,7)
6 a 10	12 (15,0)	1(6,3)
>10	6 (7,5)	2(12,5)
Tiempo transcurrido desde la última infección; n (%)		
< 1mes	1 (1,3)	0(0,0)
1 a 6 meses	26 (32,3)	3(18,7)
7 a 12 meses	11 (13,8)	2(12,5)
> 1 año	33 (41,3)	10(62,5)

No recuerda	9 (11,3)	1(6,25)
Diagnóstico por microscopia (gota gruesa); n (%)		
<i>Plasmodium vivax</i>	19 (19,0)	N/A
<i>Plasmodium falciparum</i>	80 (80,0)	N/A
Mixta	1 (1,0)	N/A
Diagnóstico molecular (PCR); n (%)		
<i>Plasmodium vivax</i>	20 (20,0)	N/A
<i>Plasmodium falciparum</i>	76 (76,0)	N/A
Mixta	4 (4,0)	N/A
Parasitemia (parasitas/μl de sangre); Me (RI)	2736 (736 – 7040)	N/A

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de la muestra de estudio.

8.2 Estandarización de ELISAS

En la etapa de estandarización de las ELISAs, se llevó a cabo una evaluación inicial de los sueros de los grupos control utilizando el péptido PvAMA1 a una concentración de 10 μg/ml. En este primer ensayo, no se observaron diferencias significativas en las absorbancias medidas a 620 nm entre los sueros control: maláricos con un promedio de absorbancia de 0.945 (DS 0.10 CV=10.7%) y el grupo no expuesto promedio de absorbancia de 0.881 (DS 0.10 CV=12.3%)

Debido a esto, se decidió realizar un nuevo ensayo utilizando una concentración de 5 μg/ml y 10 μg/ml de péptido y se registraron las lecturas de absorbancia a los 5, 10 y 15 minutos de incubación de la reacción enzima-sustrato. Como resultado se observó una mejor diferencia entre los datos obtenidos del control de individuos no expuestos y los individuos con malaria cuando se leyeron absorbancias a los 15 min empleando una concentración de 5ug/mL de péptido (Absorbancias de 0,582 para el grupo no expuesto y de 0,751 para el grupo con malaria) en comparación de las absorbancias empleando una concentración de 10ug/ml (0,482 para el grupo no expuesto y de 0,556 para el grupo con malaria). Tabla 3.

PvAMA1	5ug/ml		10ug/ml	
	Abs 620nm (DS – CV%)		Abs 620nm (DS – CV%)	
	Maláricos	No expuestos	Maláricos	No Expuestos

5 min	0,543(0,13 – 31,3)	0,508 (0,11 – 22,8)	0,301(0,09 – 21,0)	0,232(0,07 – 31,9)
10 min	0,635(0,23 – 36,7)	0,507(0,13 – 26,4)	0,536(0,13 – 24,4)	0,385(0,08 – 21,8)
15 min	0,751(0,20 – 26,6)	0,582(0,17 – 30,5)	0,556 (0,14 – 25,3)	0,482(0,22 – 46,5)

Tabla 3. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PvAMA1.

Para comprobar la reproducibilidad de los montajes de ELISA empleando solo una muestra de suero control, se decidió unir las muestras de suero de los seis pacientes con malaria en una sola alícuota, así como para el grupo no expuesto. Luego de realizar el montaje con una concentración de 5ug/mL las diferencias entre las lecturas de las absorbancias se mantuvieron (0,651 DS=0,09 CV=14,45% para el grupo de sueros no expuestos y 0,885 DS=0,14 CV=1,59% para el grupo malárico) por lo cual para los ensayos que se montaron para los péptidos restantes y las muestras fueron empleados los sueros control como un grupo y no de forma individual. Este procedimiento fue empleado para evaluar el péptido PvDBP (Tabla 4) Para el péptido PfMSP-1 y PfGLURP se evaluaron las mismas condiciones empleando concentraciones de 1 a 5ug/ml de cada péptido y lecturas de absorbancia a los 5, 10 y 15 minutos de incubación de la reacción enzima-sustrato (Tablas 5 y 6).

PvDBP	5ug/ml		10ug/ml	
	Abs 620nm (DS – CV%)		Abs 620nm (DS – CV%)	
	Maláricos	No expuestos	Maláricos	No Expuestos
5 min	0,459(0,10 – 23,4)	0,407 (0,07 – 18,6)	0,356(0,06 – 19,1)	0,406(0,08 – 19,7)
10 min	0,573(0,11 – 19,4)	0,487 (0,08 – 17,1)	0,415 (0,09 – 23,3)	0,469(0,09 – 19,1)

15 min	0,547 (0,04 – 8,7)	0,386(0,03 – 0,8)	0,621 (0,11 – 17,7)	0,628(0,11 – 18,5)
--------	--------------------	-------------------	---------------------	--------------------

Tabla 4. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PvDBP.

<i>PfGLURP</i>	5 min		10 min		15 min	
	Abs 650nm (DS – CV%)		Abs 650nm (DS – CV%)		Abs 650nm (DS – CV%)	
	Maláricos	No expuesto	Maláricos	No Expuesto	Maláricos	No Expuesto
1 ug/ml	0,518(0,14 – 2,7)	0,456(0,02 – 5,0)	0,541(0,13 – 24,0)	0,493(0,12 – 12,7)	0,584(0,02 – 4,1)	0,495(0,03 – 7,7)
2 ug/ml	0,534(0,03 – 7,1)	0,534(0,03 – 7,1)	0,521(0,03 – 5,75)	0,530(0,06 – 11,3)	0,621(0,00 – 1,25)	0,630(0,06 – 10,4)
3 ug/ml	0,741(0,08 – 12,0)	0,574(0,03 – 6,7)	0,752(0,02 – 2,65)	0,591 (0,08 – 13,5)	0,820 (0,10 – 12,6)	0,623(0,02 – 3,2)
4 ug/ml	0,649 (0,06 – 10,3)	0,585 (0,03 – 5,9)	0,652 (0,07 – 10,7)	0,596 (0,04 – 6,7)	0,634(0,08 – 12,8)	0,557(0,02– 3,9)
5 ug/ml	0,507(0,05 – 11,5)	0,414(0,15 – 37,2)	0,621 (0,03 – 4,8)	0,482 (0,03 – 6,2)	0,628(0,11 – 17,8)	0,467(0,15 – 43,4)

Tabla 5. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de *PfMSP1*.

<i>PfMSP1</i>	5 min		10 min		15 min	
	Abs 650nm (DS – CV%)		Abs 650nm (DS – CV%)		Abs 650nm (DS – CV%)	
	Maláricos	No expuesto	Maláricos	No Expuesto	Maláricos	No Expuesto
1 ug/ml	0,338(0,09 – 29,5)	0,594(0,09 – 15,7)	0,491(0,12 – 24,7)	0,483(0,07 – 16,0)	0,594(0,13- 23,2)	0,594(0,09 – 15,7)

2 ug/ml	0,405(0,01 – 4,4)	0,278(0,02 – 8,27)	0,519(0,02 – 3,9)	0,364(0,02 – 7,4)	0,619(0,01 – 2,9)	0,446(0,035 – 8,0)
3 ug/ml	0,321(0,02 – 6,4)	0,233(0,00 – 4,0)	0,466 (0,02 – 5,1)	0,353 (0,01 – 4,5)	0,561 (0,02 – 3,9)	0,429 (0,01 – 4,4)
4 ug/ml	0,475 (0,00 – 1,1)	0,400 (0,03 – 8,8)	0,637 (0,00 – 1,4)	0,548 (0,04 – 7,6)	0,686(0,01 – 1,5)	0,595(0,04 – 7,8)
5 ug/ml	0,523(0,03 – 6,5)	0,272(0,00 – 2,1)	0,637 (0,03 – 5,5)	0,310 (0,03 – 12,1)	0,739(0,03 – 5,1)	0,410(0,01 – 4,42)

Tabla 6. Estandarización de la concentración y tiempo de lectura para la ELISA de PfMSP1.

De modo general se observó una mejor diferencia de absorbancias cuando se emplearon 5µg/ml de péptido para el caso de PvAMA-1, PvDPB y PfMSP-1. En cuanto al péptido PfGLURP se observó una mejor diferencia al emplear una concentración de 3µg/ml; para los cuatro péptidos la lectura con mejor desempeño para discriminar entre no expuestos y maláricos fue a los 15 minutos de incubación luego de adicionar el sustrato.

Teniendo en cuenta las anteriores condiciones, de todos los montajes empleados se promediaron las absorbancias obtenidas para el grupo de sueros no expuestos, y se calculó la desviación estándar de estas mediciones. Al promedio de la absorbancia del grupo no expuesto se le sumaron tres desviaciones estándar para definir el punto de corte de positividad para cada péptido, datos presentados en la tabla 7.

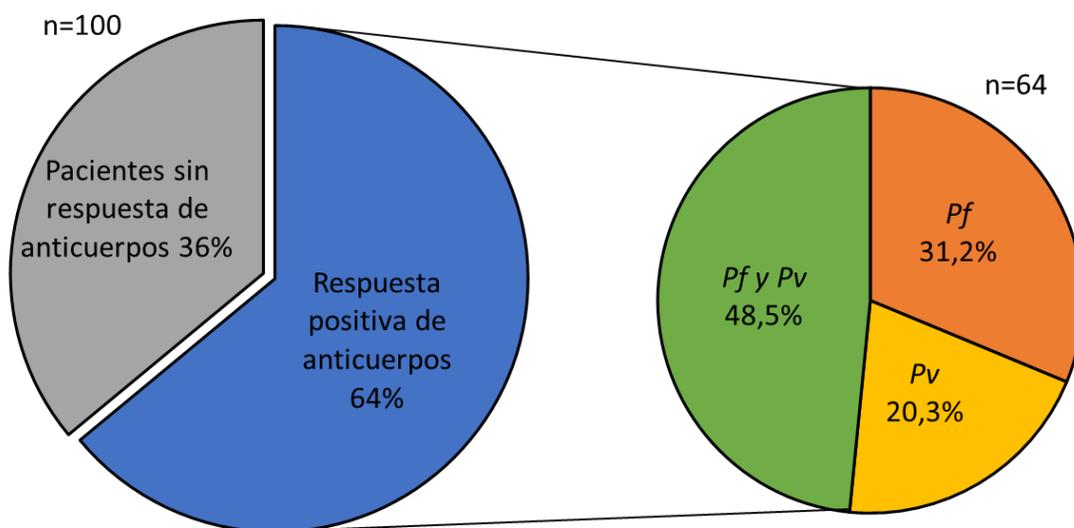
8.3 Frecuencia de reactividad sérica global frente a los péptidos en la muestra evaluada:

De forma global el 64% (64/100) de los pacientes maláricos presentaron reactividad frente al menos uno de los cuatro péptidos evaluados mediante ELISA, el grupo SFA no malárico presentó un 40% de reactividad (12/30). Estos resultados reflejan la exposición de los participantes a péptidos específicos de *P. falciparum* y *P. vivax*. Cabe resaltar que la presencia de anticuerpos en el grupo SFA no malárico demuestra que incluso en pacientes no infectados se generó una exposición previa contra antígenos de *Plasmodium* y que las respuestas encontradas en la muestra de este estudio no están mediadas únicamente por el estímulo generado durante la infección aguda.

En el grupo malárico, la frecuencia de respuestas de los 64 pacientes con anticuerpos contra los péptidos evaluados fue la siguiente: 48.5% (31/64) de los pacientes presentaron

anticuerpos contra péptidos de *P. vivax* y *P. falciparum*, el 31.2% (20/64) solo contra péptidos de *P. falciparum* y el 20.3% (13/64) contra péptidos de *P. vivax*. (Figura 4a).

a)



b)

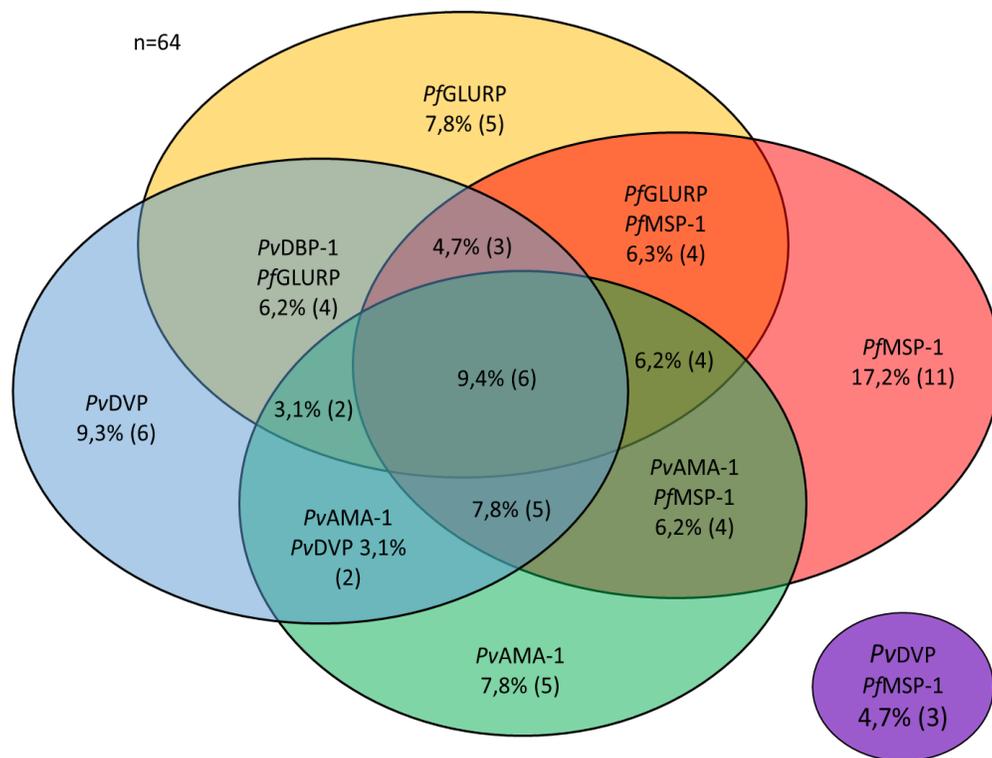


Figura 4. Reactividad global frente a los péptidos evaluados en el estudio. a) Respuestas positivas y respuestas negativas y subconjunto con respuestas por especie infectante. **b)** Frecuencia de respuestas positivas en función de los cuatro péptidos evaluados.

Al analizar las repuestas de anticuerpos, encontramos que 51 pacientes del grupo con malaria presentaron anticuerpos contra péptidos de *P. falciparum* (51/100), de estos el 45,1 % (n=23/51) presentaron anticuerpos contra *PfMSP-1*, el 21,6% (11/51) contra *PfGLURP* y 33,3% (17/51) presentaron anticuerpos frente a los dos péptidos de esta especie. Cuando se realizó este mismo análisis para *P. vivax* encontramos que el 44% (44/100) presentaron anticuerpos contra esta especie, de los cuales el 36,4% (16/44) fueron positivos contra *PvDBP*, el 29.6% (13/44) contra *PvAMA-1* y 34.1% (15/44) fueron positivos para ambos péptidos de *P. vivax*.

Estos resultados indican que una proporción significativa de pacientes presentaron anticuerpos contra diferentes péptidos de *P. falciparum* y *P. vivax*. Además, se observa una mayor frecuencia de anticuerpos específicos contra *PfMSP-1* y *PvDBP*, lo que sugiere que estos péptidos mostraron mejor desempeño de reactividad entre los cuatro péptidos evaluados en la muestra analizada con nuestra metodología.

En el grupo de pacientes con malaria, se encontró que el 27% (27/100) de los pacientes maláricos mostró reactividad frente a un solo péptido y el 37% (37/100) mostró una respuesta positiva de anticuerpos frente a dos o más de los cuatro péptidos evaluados. Esto sugiere que estos pacientes han desarrollado una respuesta inmune contra múltiples antígenos de *Plasmodium*, tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax*.

Interesantemente, se observaron 7 pacientes que fueron positivos frente a los péptidos de *P. vivax* y al menos uno de los péptidos de *P. falciparum*. De estos, 2 pacientes mostraron reactividad frente a *PfGLURP* y 5 para *PfMSP-1*. Por otro lado, se encontraron 7 pacientes que presentaron positividad frente a los dos péptidos de *P. falciparum* y al menos uno de los péptidos de *P. vivax*. Específicamente 4 para *PvAMA-1* y 3 para *PvDBP* (figura 4b).

En el grupo de pacientes maláricos, se encontró que 17 pacientes presentaron positividad únicamente en dos de los péptidos evaluados. Específicamente 3 pacientes presentaron anticuerpos contra *PvDBP* y *PfMSP1*, 4 contra *PvAMA-1* Y *PfMSP-1*, 4 contra *PfGLURP* y *PfMSP-1* (figura 4b). Además, 4 pacientes fueron positivos para los dos péptidos de *P. falciparum* y solo 2 pacientes fueron positivos exclusivamente contra los péptidos de *P. vivax*.

Al analizar las respuestas de anticuerpos por especie infectante al ingreso de estudio encontramos que el 25% de los pacientes con *P. vivax* (5/20) presentaron anticuerpos anti *Pv-AMA1*, y un 40% (8/20) fueron positivos para *P.vDBP*. El 30% de los pacientes (6/20) fue positivo tanto para *PfMSP1* como para *PfGLRUP*.

En el grupo con infección por *P. falciparum*, las respuestas de anticuerpos específicas contra los péptidos de la misma especie fueron las siguientes: 45% (34/76) fueron positivos para *PfMSP1* y 27% (21/76) para *PfGLURP*. En cuanto a los péptidos de *P. vivax*, se observó un 29% (22/76) de pacientes con anticuerpos contra *PvDBP* y un igual porcentaje contra *PvAMA1*.

8.4 Frecuencia de reactividad sérica e índices de reactividad por péptido analizado.

El 40% (40/100) de los pacientes en el grupo malárico mostraron reactividad contra al péptido *PfMSP-1*, 31% (31/100) contra el péptido *PvDBP* y un igual porcentaje del 28% (28/100) para los péptidos *PvAMA-1* y *PfGLURP* (Tabla 7). Por su parte en el grupo SFA no malárico los porcentajes reactividad fueron menores comparados con los observados para el grupo malárico, con un 16.7% (5/30) contra *PvAMA-1*, 13,3% (4/30) contra *PfMSP1* y un 3,3 % (1/30) contra *PvDBP* (Tabla 7). Para el péptido *PfGLURP* el porcentaje de reactividad

fue del 36,7% (11/30), mayor comparado con el 28% (28/100) de positividad en el grupo Malárico.

Péptidos analizados	<i>Pf</i> MSP-1	<i>Pv</i> AMA-1	<i>Pv</i> DBP	<i>Pf</i> GLURP
Punto de corte= \bar{X} D.O + 3DS pool no expuestos.	0,819	0,908	0,662	1,020
Frecuencia de positividad en maláricos n=100; n (%)	40 (40)	28 (28)	31 (31)	28 (28)
Frecuencia de positividad SFA no malárico n=30; n (%)	4(13,3)	5 (16,7)	1 (3,3)	11 (36,7)
IR Maláricos (n=100) ; Me(RI)	0,92 (0,73-1,10)	0,84 (0,70– 1,01)	0,84 (0,65 – 1,08)	0,79 (0,67 – 1,05)
IR SFA no malaricos (n=30); Me(RI)	0,77 (0,67– 0,96)	0,81 (0,67– 0,87)	0,52 (0,45– 0,64)	0,95 (0,80– 1,10)

Tabla 7. Frecuencias de positividad e índices de reactividad en la detección de anticuerpos IgG contra antígenos plasmodiales en el suero de los pacientes de Quibdó. Se presentan punto de corte de acuerdo con las densidades ópticas (D.O) del pool de sueros de individuos no expuestos, la frecuencia de positividad por péptido y los índices de reactividad (IR) con mediana (Me) y rango intercuartílico (RI).

Los datos mostraron que la mediana del IR para los péptidos *Pv*AMA-1, *Pf*GLURP y *Pf*MSP-1 fue muy similar en ambos grupos (maláricos y SFA no maláricos). La mediana del IR contra el péptido *Pv*DBP fue significativamente mayor para el péptido *Pv*DBP (0,84) en comparación con el grupo SFA no malárico (0,52). Esta diferencia indica que, en promedio, los pacientes con malaria presentaron un mayor nivel de reactividad específico contra el péptido *Pv*DBP en comparación con los pacientes sin malaria. En cuanto al péptido *Pf*GLURP la diferencia fue significativamente mayor en la mediana del IR del grupo SFA no malárico, comparada con el grupo malárico (Figura 5).

Para asegurar la discriminación entre positivos y negativos se estableció un punto de corte de tres desviaciones estándar adicionales a la media del pool de sueros de individuos no expuestos (Figura 5). Así se pudo definir con más rigor la identificación de las muestras

positivas en los péptidos evaluados en este estudio, considerando valores de reactividad superiores a 1 (IR > 1) como reactivos contra los péptidos analizados.

La dispersión de los datos es un indicador de la variabilidad de los valores de reactividad observados en la muestra de pacientes analizada. Los resultados mostraron que, en los pacientes con sueros reactivos, los IR no alcanzaron niveles muy altos en comparación con el punto de corte establecido (Figura 5).

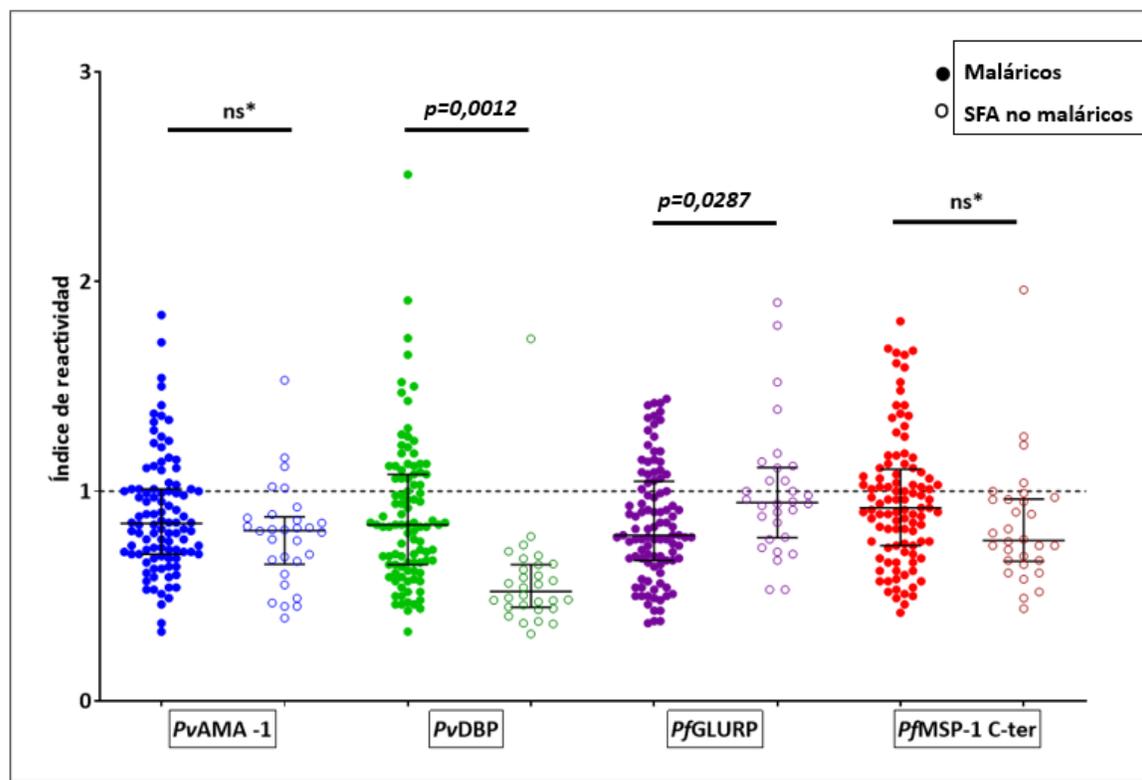


Figura 5. Dispersograma de los índices de reactividad del suero de los pacientes frente a los péptidos evaluados. Valores de reactividad significativamente superiores IR > 1 fueron considerados como reactivos contra los péptidos analizados. La línea punteada establece el punto de corte. Comparaciones entre medianas (Mann-Whitney U significancia $\alpha = 0.05$). ns*= no significancia estadística.

8.5 Asociaciones entre la reactividad sérica de anticuerpos y variables de exposición e infección en los individuos del estudio.

Para comprender si variables propias de la infección y de la exposición de los pacientes al parásito tenían asociación con el nivel y el tipo de anticuerpos detectados se empleó el

análisis de correlación de Spearman. Se buscaron asociaciones entre los índices de reactividad para cada péptido y cada una de las siguientes variables: edad, tiempo de residencia en zona endémica, número de infecciones previas, y parasitemia.

No se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de anticuerpos (índices de reactividad) para cada péptido y las variables de edad, el tiempo de residencia en zona endémica, el número de infecciones previas y la parasitemia. A pesar de que los coeficientes de correlación no son significativos, la variable de edad parece mostrar una mayor tendencia a la asociación positiva con la reactividad a PvAMA1 (Tabla 8).

Variables evaluadas	Índices de reactividad			
	PvAMA1	Pv DBP	PfGLURP	PfMSP1
Edad	0,245 (0,007)	-0,033 (0,372)	0,109(0,141)	-0,072(0,238)
Tiempo de residencia en zona endémica	0,067 (0,253)	-0,041 (0,344)	-0,019 (0,427)	0,003 (0,487)
Número de infecciones previas	-0,005 (0,481)	-0,154 (0,063)	-0,054 (0,296)	-0,005(0,48)
Parasitemia	-0,147 (0,144)	0,064(0,527)	-0,135(0,179)	-0,071(0,484)

Tabla 8. Correlaciones entre variables de exposición e índices de reactividad para cada péptido. En cada casilla se muestran coeficientes de correlación Spearman ($p < 0.05$).

8.6 Efecto del suero de individuos del estudio en la inhibición del crecimiento de *P. falaciparum in vitro*.

El valor de fluorescencia de los controles negativos para fluorescencia (eritrocitos no infectados) fue del 0,06% DS 0,0002, estandarizar este valor fue muy importante, ya que se debía garantizar con múltiples lavados la separación de la suspensión de eritrocitos empleada en los ensayos, y minimizar la presencia de leucocitos que pudiesen generar ruido en las lecturas de fluorescencia (Figura 5a).

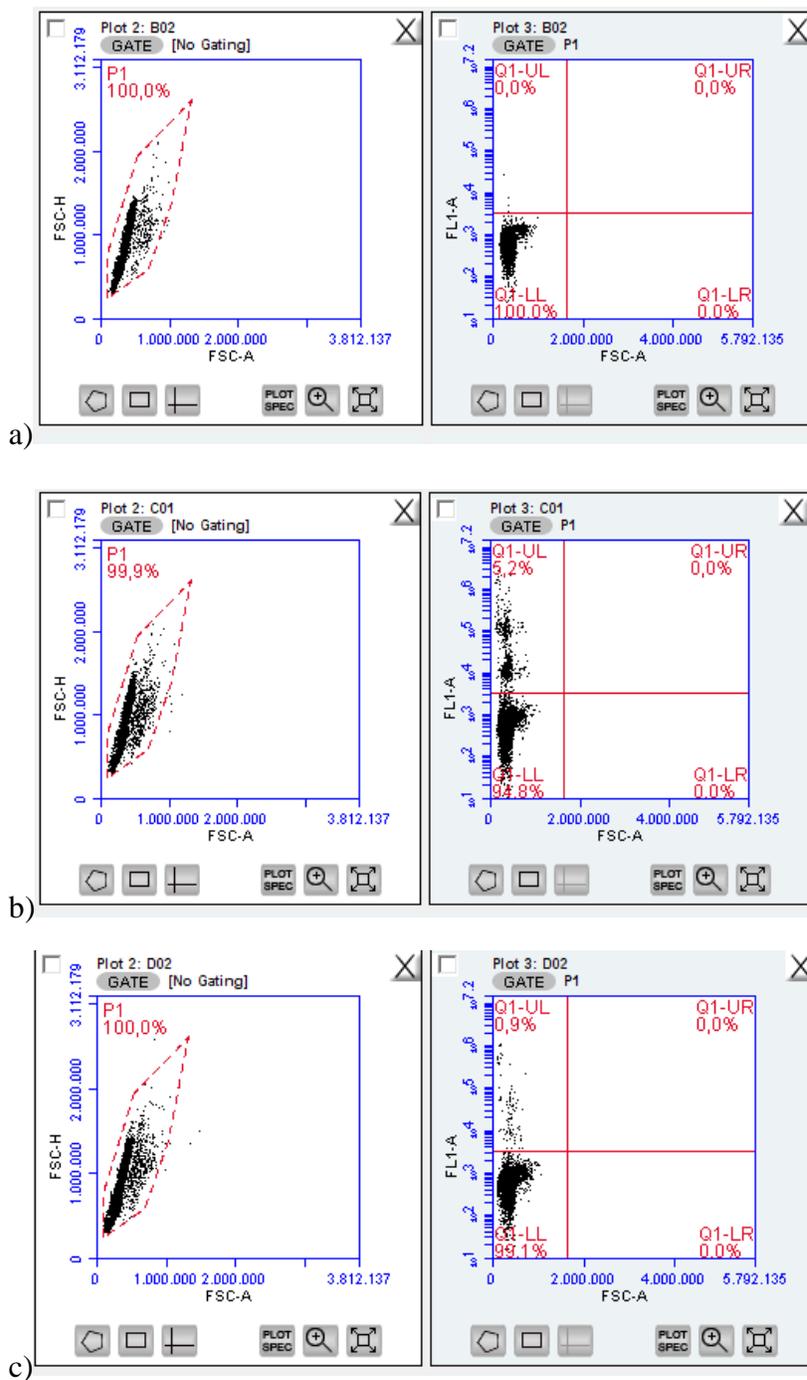


Figura 5. Dispersogramas del ensayo de inhibición del crecimiento de *P. falciparum*. a) Eritrocitos no infectados en cultivo. b) Control de crecimiento con parasitemia del 5,2%. c) Muestra de uno de los pacientes con un porcentaje de crecimiento del 0.9%. Para los tres grupos de dispersogramas a, b y c se delimitaron las poblaciones celulares en el 99.9% de los eventos leídos por el citómetro de flujo (Plot 2). Empelando los datos obtenidos por el

canal de fluorescencia (FLI-4) definió el punto de corte para diferenciar fluorescencia basal de aquellos eventos correspondiente a eritrocitos infectados (Plot 3). En el cuadrante inferior izquierdo de los dispersogramas (Plot 3) se ubicaron los eventos sin fluorescencia. En el cuadrante superior izquierdo se ubicaron los eritrocitos infectados, el porcentaje de estos eventos corresponde al crecimiento del parásito en el cultivo con respecto al control sin parásitos.

Según los resultados globales, se encontró que el 22% de los sueros de pacientes presentaron algún grado de inhibición del crecimiento de *P. falciparum*, (Figura 6). En este grupo de pacientes, se observó un rango de inhibición del crecimiento desde 0,27% hasta el 74,06%. Esto indica que algunos sueros tenían una alta capacidad para inhibir el crecimiento del parásito, como el paciente presentado en la Figura 5c.

Por otro lado, en los sueros de pacientes que no mostraron inhibición del crecimiento de *P. falciparum* (78%) se observó mayor parasitemia, que incluso superó el porcentaje de crecimiento del control. Esto puede ser atribuido al hecho de que la cantidad de suero adicionada enriqueció el medio de cultivo, lo que permitió una mayor disponibilidad de suero para los parásitos.

Estos hallazgos sugieren que la capacidad de inhibición del suero puede variar entre los pacientes y que la adición de suero de los pacientes en el cultivo puede tener un efecto estimulante en el crecimiento del parásito, y que no hay evidencia de anticuerpos específicos anti-*Plasmodium* u otros componentes que medien la inhibición de la invasión y por consiguiente el crecimiento del parásito.

Otro hallazgo encontrado es que, del total de pacientes con sueros inhibidores, 19 pacientes (86,36%) tenían infección activa por *P. falciparum* (uno de estos con infección mixta), mientras que los 3 restantes (13,64%) estaban infectados únicamente por *P. vivax*. Esto sugiere una probable asociación entre la capacidad de los sueros para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* y la presencia de una infección activa por este parásito. Interesantemente pacientes correspondieron a tres menores de 4 años, dos de ellos sin antecedentes de episodios previos y uno con un episodio malárico en el mes previo al ingreso del estudio.

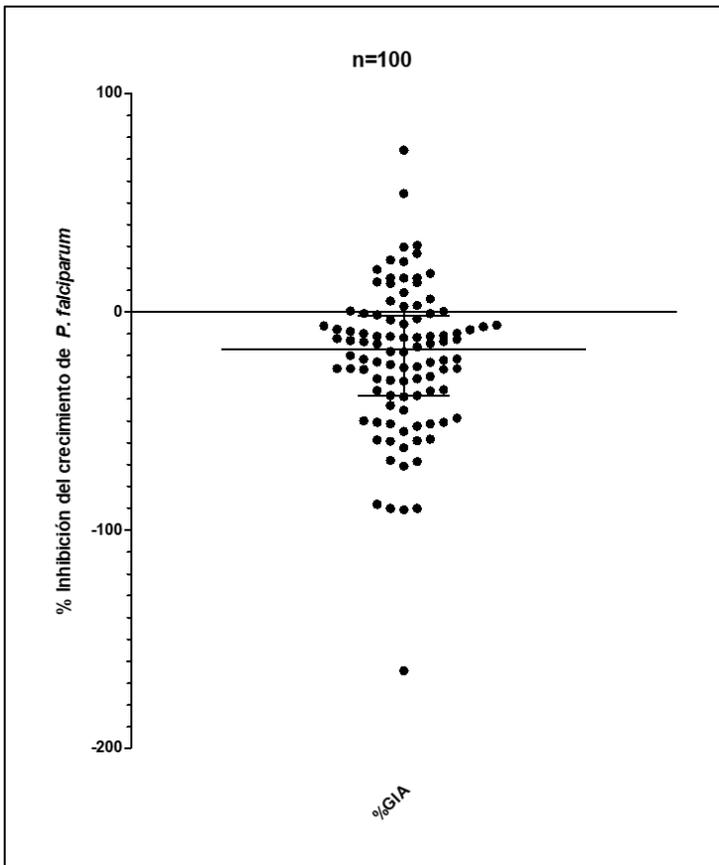


Figura 6. Dispersograma de los porcentajes de inhibición del suero de los pacientes frente a la cepa FCB1 de *P. falciparum*. Se observó inhibición del crecimiento en el 22% (22/100) de la muestra de pacientes analizados.

Los resultados mostraron débiles correlaciones entre las variables de exposición y el porcentaje de inhibición del crecimiento (Tabla 6). En este estudio no se encontró una asociación estadística entre el porcentaje de inhibición del crecimiento y las respuestas de anticuerpos expresadas en IR en los pacientes de Quibdó. A pesar de que la correlación entre el porcentaje de inhibición del crecimiento y la parasitemia observada en los pacientes durante el ingreso al estudio fue baja ($-0,207$ $p= 0.039$), de las variables analizadas fue la que mostró una mayor tendencia correlacionarse de forma significativa y de manera inversamente proporcional con los porcentajes de inhibición del crecimiento.

Correlaciones % de Inhibición del crecimiento n=100	Coefficiente de correlación Spearman; (p)
IR PvAMA-1	0,113(0,132)
IR PvDBP	0,225(0,012)
IR PfGLURP	0,204(0,021)
IR PfMSP1 C-ter	0,019(0,426)
Parasitemia	-0,207(0,039)

Tabla 9. Correlaciones entre el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. falciparum* in vitro con índices de reactividad por péptido evaluado y parasitemia. Los valores indican el coeficiente de correlación de Spearman y el valor p, n=100.

9. Discusión

En resumen, en este estudio los resultados de las ELISAs muestran una alta frecuencia (64%) de anticuerpos específicos contra péptidos de *P. falciparum* y *P. vivax* en pacientes maláricos de Quibdó, Chocó, estudios previos realizados en poblaciones colombianas muestran frecuencias similares, Maestre et al, encontró un 60% de respuesta de anticuerpos frente a proteínas recombinantes de *P. falciparum* y *P. vivax* (45).

En un área de transmisión inestable en el sudeste de Asia donde cocirculan *P. falciparum* y *P. vivax*, Wang et al, encontraron un porcentaje de reactividad de anticuerpos anti *PfMSP-1 recombinante* del 78.2%, en 389 pacientes con malaria aguda (18). En un estudio realizado en el 2003 en una zona el nordeste de Brasil, en población general de 7 meses a 77 años de edad se encontró una prevalencia de 51% de anticuerpos anti *PfMSP-1 recombinante* (31). En comparación nuestros resultados mostraron una frecuencia de reactividad del 40% contra el péptido de la misma proteína, resultados que contrastan con las condiciones de transmisión del sudeste asiático pero que se asemejan más a lo que se observa en zonas endémicas de América del sur (21).

La frecuencia de seropositividad que encontramos frente a los péptidos evaluados fue variable, para *PfGLURP* fue del 28%, para *PvAMA1* del 28% y para *PvDBP* del 31%. Estudios encontraron diferentes frecuencias de estos péptidos: Theisen, M et al. reportó una frecuencia de 48,1% de positividad para el mismo péptido de *PfGLURP* en un grupo de 79 pacientes adultos de Liberia (África occidental) (110). Soares, R et al. reportó una frecuencia

de positividad del 53% de contra el péptido de *PvAMA1* en 57 pacientes con malaria aguda del Brasil, luego esta frecuencia aumentó al 55% y 81% a los 60 y 80 días de convalecencia respectivamente (112). Finalmente, Xianili et al. reportó una frecuencia de 9% de positividad para anticuerpos contra *PvDBP* en 69 residentes de una zona endémica de Papúa Nueva Guinea (111).

A pesar de la variabilidad de las respuestas observadas en la reactividad contra los péptidos analizados, la magnitud de las respuestas fue baja, pues cuando se analizaron las medianas del IR todas fueron menores a 1 para los cuatro péptidos empleados. La amplitud de las respuestas en nuestro estudio mostró que de los 64 pacientes maláricos con anticuerpos el 42,3% presentó anticuerpos contra un solo péptido, el 26,5% contra solo 2 péptidos, el 21,8% solo 3 péptidos y el 9,4 % de los pacientes presentó anticuerpos contra todos los péptidos evaluados. Un estudio realizado por King. Et al, en el 2015, muestra que la magnitud y la amplitud de la respuesta de anticuerpos contra un set de 300 antígenos de *P. vivax* en un grupo de pacientes colombianos es significativamente baja comparada con la que se observó en pacientes de otras zonas endémicas analizadas como Brasil y Papúa Nueva Guinea. Estos resultados muestran similitud con los hallazgos de nuestro estudio y generan posibles hipótesis sobre las respuestas que se observan en Colombia.

Los datos mostraron que la mediana del IR para los péptidos *PvAMA-1*, *PfGLURP* y *PfMSP-1* fue muy similar en ambos grupos (maláricos y SFA no maláricos). Esto sugiere que la exposición previa a las especies de *Plasmodium* evaluadas es similar entre los pacientes, independientemente de si tienen una infección activa. Para el caso de *PvDPB* observamos que la mediana del IR en el grupo SFA no malárico fue mayor comparada con la del grupo malárico.

Es importante destacar que las respuestas de anticuerpos adquiridas contra *P. falciparum* no brindan una inmunidad esterilizante completa (4). En su lugar, se ha observado que se requiere una exposición repetida al parásito para desarrollar un nivel de protección contra las formas graves de la enfermedad. La tasa de adquisición de anticuerpos contra proteínas de *P. falciparum* está influenciada por varios factores, como la edad del huésped humano, la intensidad de transmisión y el tipo de antígeno (25).

En general estudios en poblaciones expuestas a la malaria muestran que los niveles de anticuerpos aumentan tanto con la edad como con una mayor intensidad de transmisión (14,20,21). Los anticuerpos contra diferentes antígenos se adquieren a lo largo de las exposiciones que experimentan los pacientes a proteínas del parásito, siendo las respuestas más fuertes observadas típicamente para los anticuerpos dirigidos contra proteínas

extracelulares o de la membrana plasmática y proteínas que son altamente abundantes durante la etapa sanguínea de la infección por *P. falciparum*.

Este es el primer estudio donde se busca relacionar la intensidad de las respuestas de anticuerpos específicos contra *P. falciparum* y *P. vivax* con variables de exposición en pacientes colombianos. A diferencia de lo que muestran otras investigaciones, en este escenario no se observaron correlaciones entre la intensidad de la respuesta de anticuerpos con variables como la edad, el número de episodios previos ni el tiempo de residencia en la zona endémica, a pesar de emplear cuatro de los principales péptidos que corresponden a proteínas extracelulares de *Plasmodium*. Esto indica que estas variables no influyen de manera significativa en la respuesta de anticuerpos detectada en la muestra evaluada con el diseño experimental implementado en este estudio.

Una limitación importante de este estudio es el método utilizado para detectar los anticuerpos, ya que podría mejorarse empleando microarreglos o estandarizando ELISAs con secuencias con secuencias proteicas de aislados colombianos. Además, el tamaño muestral y la selección de la población de referencia podrían generar sesgos que no se han controlado en los análisis. Sería ideal calcular un tamaño muestral representativo de la población general y realizar un seguimiento longitudinal para obtener una mayor certeza en las variables de exposición analizadas, considerando que los datos relacionados con el historial de exposición empleados en este estudio provienen de un autoinforme o percepción personal manifestada por cada uno de los pacientes. y esto puede generar sesgos no controlados en los análisis.

Las proteínas recombinantes pueden ser más sensibles en la detección de anticuerpos, ya que presentan una estructura tridimensional más completa y pueden contener epítopes lineales y conformacionales que los péptidos pueden no capturar por completo. Adicionalmente los péptidos pueden tener una mayor propensión a generar reacciones cruzadas con anticuerpos no específicos debido a que se emplean secuencias peptídicas bastante cortas. Por lo tanto, se requiere un diseño cuidadoso y validación adicional para garantizar la especificidad de los resultados obtenidos

La falta de correlación encontrada teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio podría deberse también a que en el contexto de las poblaciones colombianas no se observa una alta intensidad de transmisión y por ende la exposición al parásito no es suficiente para que se generen respuestas inmunes protectoras a lo largo de los años, refiriéndose a respuesta protectora como aquella capaz de controlar o inhibir el parásito *in vivo*, la cual si ha sido documentada en investigaciones realizadas con poblaciones caracterizadas con una alta intensidad de transmisión, sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar este fenómeno y su posible relación con la endemidad que se presenta en Colombia.

En cuanto a la inhibición del crecimiento, los resultados de este estudio mostraron que no hubo correlación de los porcentajes de inhibición con variables de exposición a la infección como la edad. Es importante tener en cuenta que las correlaciones débiles pueden indicar una falta de relación lineal entre las variables o que otros factores no analizados podrían estar influyendo en la falta de asociación.

Estudios en poblaciones del África subsahariana muestran resultados diferentes a los que se evidenciaron en nuestros experimentos. Dent, et al, 2008, encontró que los porcentajes de inhibición del crecimiento disminuían con la edad, y que aquellos individuos que mostraron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento se asociaron con menor riesgo de infección en una población de niños en Kenya (117). Probablemente las diferencias metodológicas y de población de estudio son clave en las diferencias de los resultados que muestran este estudio comparado con nuestro estudio, pues mientras que nosotros empleamos suero en el estudio de Dent et al, 2008, se usaron plasmas dializado para realizar los ensayos de inhibición en tres cepas de cultivo provenientes de aislados africanos y en una muestra proveniente de una zona con alta intensidad de transmisión.

Crompton et al, 2009, demostró mediante análisis de regresión logística, que la edad y un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento se asociaron significativamente con un menor riesgo de padecer malaria en una cohorte de niños en Mali (15). Si bien estos resultados mostraron una asociación directa, a diferencia de nuestro estudio, los autores emplearon inmunoglobulinas G purificadas, realizaron análisis empleando controles con anticuerpos purificados anti *PfAma-1* con porcentajes de inhibición conocidas en otras cepas de laboratorio como la 3D7, además de que las poblaciones tuvieron un seguimiento longitudinal y que el escenario de transmisión es totalmente distinto a las características que presentan los pacientes colombianos.

Es importante reconocer que los anticuerpos naturalmente adquiridos contra *Plasmodium* no solo actúan neutralizando al merozoito, o no están dirigidos exclusivamente contra proteínas de membrana del parásito, si no también pueden reconocer proteínas expresadas en la superficie de los eritrocitos infectados, proceso que facilitaría la fagocitosis (123,124) y evitar también la citoadherencia de eritrocitos infectados al endotelio vascular (125,126). Estos estudios muestran la necesidad de evaluar la funcionalidad de los anticuerpos de los pacientes colombianos mediante diferentes metodologías, donde se apunte a reconocer varios de los mecanismos previamente descritos por los cuales el sistema inmune pueda controlar en cierto grado la densidad parasitaria.

Otro hallazgo para discutir es sobre la correlación entre el porcentaje de inhibición del crecimiento y la parasitemia, pues a pesar de no ser significativa, fue la única correlación que mostró un valor negativo: -0.207 ($p=0,039$). Esto genera la hipótesis de si una mayor

capacidad del suero para inhibir el crecimiento del parásito *in vitro* puede relacionarse con una menor parasitemia del paciente “*in vivo*”, pues bajo los métodos empleados y las muestras analizadas para este estudio no se observó este supuesto, por lo cual es necesario realizar nuevas investigaciones para confirmar esta hipótesis.

Una fortaleza de este estudio es la implementación de cuatro péptidos para la búsqueda de anticuerpos específicos contra las dos principales especies de *Plasmodium*, en una zona endémica colombiana. Proponer el uso de péptidos definitivamente revela que secuencias conservadas pueden ser reconocidas por diferentes poblaciones independientemente del parásito o aislamiento del cual fueron obtenidas y por lo tanto existe un fuerte grado de especificidad a la hora de detectar anticuerpos contra el parásito.

El uso de péptidos en ELISAs para la detección de anticuerpos tiene ventajas y consideraciones específicas en comparación con el uso de proteínas recombinantes. Una primera característica es que los péptidos suelen tener una mayor estabilidad y vida útil en comparación con las proteínas recombinantes. Esto facilita su almacenamiento y uso a largo plazo. Los péptidos suelen ser más económicos de adquirir en comparación con las proteínas recombinantes, lo que puede ser beneficioso especialmente en estudios a gran escala o con presupuestos limitados. Los péptidos pueden diseñarse para contener secuencias cortas y específicas de antígenos relevantes. Esto permite una detección más específica de anticuerpos frente a regiones determinadas del antígeno de interés, sin embargo, las proteínas recombinantes pueden tener mejor desempeño en cuanto a que presentan más de un epítipo y por lo tanto las señales detectadas pueden ser mucho más robustas.

Los resultados obtenidos en este estudio abren un panorama para continuar las investigaciones asociadas a la respuesta inmune naturalmente adquirida en poblaciones colombianas. Teóricamente este primer acercamiento demuestra que en zonas de baja transmisión los mecanismos de la respuesta inmune humoral parecen desviarse por completo de lo que se observa en zonas de alta transmisión, por lo cual es necesario implementar nuevos estudios que evalúen mecanismos específicos asociados a la producción de anticuerpos y células B de memoria en Colombia.

Es necesario estudiar las dinámicas de exposición natural a *Plasmodium* implementando un diseño longitudinal, donde se pueda hacer seguimiento a poblaciones en riesgo de infección así como en pacientes asintomáticos y sintomáticos de varias poblaciones endémicas en Colombia, pues esto brindaría nuevas premisas de cómo se comporta la respuesta inmune y que factores específicos pueden determinar que en los colombianos se puedan generar anticuerpos protectores contra la infección por *P. falciparum* y *P. vivax*.

A pesar de emplear secuencias conservadas para los análisis de detección de anticuerpos en futuros estudios sería ideal, seleccionar secuencias peptídicas a partir de aislados propios de la zona de estudio, así como evaluar de forma general todo el proteoma empleando microarreglos u otras tecnologías basadas en genómica y proteómica que permitan la búsqueda de péptidos y proteínas altamente inmunogénicas, para a partir de estas realizar análisis de detección y cuantificación de anticuerpos y la consecuente purificación de los mismos para poder evaluar su funcionalidad empleando varios ensayos *in vitro*, como los ensayos de fagocitosis, ensayos de activación del complemento, ensayos de activación de neutrófilos, entre otros, que permitan un análisis multifuncional de los anticuerpos en varias etapas del ciclo de vida del parásito en el hospedero humano.

Este estudio propone el uso de péptidos como una nueva alternativa de bajo costo para implementar inmunoensayos y validar técnicas que pueden ser útiles para la vigilancia epidemiológica, como por ejemplo para evaluar la detección anticuerpos en pacientes asintomáticos, así como en la implementación de nuevos prototipos de vacunas polipeptídicas.

10. Conclusiones

En general, se encontró que las muestras de suero de pacientes con malaria del municipio de Quibdó, Chocó, presentaron respuestas de anticuerpos específicas frente a péptidos sintéticos de secuencias pertenecientes a las especies *P. vivax* y *P. falciparum*. Además, estas muestras también mostraron porcentajes significativos de la inhibición del crecimiento de *P. falciparum in vitro*.

Estos resultados en conjunto sugieren la adquisición de anticuerpos específicos que podrían estar involucrados activamente en la respuesta inmune contra la malaria en las poblaciones colombianas. Esto indica que los pacientes han desarrollado una respuesta inmunológica dirigida contra los parásitos de la malaria, lo que sugiere una cierta protección o control del crecimiento de los parásitos.

A pesar de no encontrarse una correlación de los resultados obtenidos con las variables de exposición a la infección por *Plasmodium*, estos hallazgos son importantes para comprender de forma preliminar como se puede estar generando la a respuesta inmune de memoria contra *Plasmodium* en pacientes de una zona endémica colombiana y muestran la necesidad de continuar investigando este fenómeno implementando ensayos que se fundamentan en ciencias básicas pero que estén fuertemente asociados al uso de nuevas tecnologías y su

validación para la detección de anticuerpos y células B de memoria específicos contra *P. falciparum* y *P. vivax*.

Los resultados obtenidos en este estudio abren un panorama para continuar las investigaciones asociadas a la respuesta inmune naturalmente adquirida en poblaciones colombianas. Teóricamente este primer acercamiento muestra de manera descriptiva una frecuencia moderada de anticuerpos presentes en los pacientes con malaria en Quibdó, sin embargo, son necesarias nuevas investigaciones para entender mejor como se adquiere la inmunidad a través de años de exposición y posibles mecanismos que pueden ejercer los anticuerpos de estos pacientes para controlar la infección o proteger a los pacientes en función de la exposición a la cual se ven sometidos en esta zona endémica.

11. Grado de originalidad

Este es un primer estudio exploratorio donde se emplean péptidos que representan proteínas de *Plasmodium* a partir de secuencias publicadas en bases de datos bibliográficas, para la búsqueda y correlación de la respuesta inmune humoral naturalmente adquirida en una población endémica para la malaria en Colombia. Ampliar el panorama en este tema es fundamental, desde las ciencias básicas es posible aportar hacia la construcción del conocimiento sobre la respuesta inmune a la malaria y la historia de exposición en las poblaciones de zonas endémicas colombianas.

12. Referencias Bibliográficas o Cibergráficas

1. World malaria report 2022 [Internet]. [citado 15 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
2. Ansari HR, Templeton TJ, Subudhi AK, Ramaprasad A, Tang J, Lu F, et al. Genome-scale comparison of expanded gene families in *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* with *Plasmodium malariae* and with other *Plasmodium* species. Vol. 46, Int J Parasitol. 2016. p. 685-96.
3. Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. *Plasmodium* genomics: an approach for learning about and ending human malaria. Vol. 118, Parasitol Res. 2019. p. 1-27.
4. Fowkes FJ, Boeuf P, Beeson JG. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. Vol. 143, Parasitology. 2016. p. 139-53.

5. Chiu CY, Hodder AN, Lin CS, Hill DL, Li Wai Suen CS, Schofield L, et al. Antibodies to the Plasmodium falciparum Proteins MSPDBL1 and MSPDBL2 Opsonize Merozoites, Inhibit Parasite Growth, and Predict Protection From Clinical Malaria. Vol. 212, J Infect Dis. 2015. p. 406-15.
6. Baird JK. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum. Vol. 11, Parasitol Today. 1995. p. 105-11.
7. Baird JK, Krisin, Barcus MJ, Elyazar IR, Bangs MJ, Maguire JD, et al. Onset of clinical immunity to Plasmodium falciparum among Javanese migrants to Indonesian Papua. Vol. 97, Ann Trop Med Parasitol. 2003. p. 557-64.
8. Moncunill G, Mayor A, Jiménez A, Nhabomba A, Casas-Vila N, Puyol L, et al. High antibody responses against Plasmodium falciparum in immigrants after extended periods of interrupted exposure to malaria. Vol. 8, PLoS One. 2013. p. e73624.
9. Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspelung-Jones H, et al. Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. Vol. 42, Immunity. 2015. p. 580-90.
10. Kurtovic L, Behet MC, Feng G, Reiling L, Chelimo K, Dent AE, et al. Human antibodies activate complement against Plasmodium falciparum sporozoites, and are associated with protection against malaria in children. Vol. 16, BMC Med. 2018. p. 61.
11. Alanine DGW, Quinkert D, Kumarasingha R, Mehmood S, Donnellan FR, Minkah NK, et al. Human Antibodies that Slow Erythrocyte Invasion Potentiate Malaria-Neutralizing Antibodies. Vol. 178, Cell. 2019. p. 216-228.e21.
12. Mustaffa KMF, Storm J, Whittaker M, Szeszak T, Craig AG. In vitro inhibition and reversal of Plasmodium falciparum cytoadherence to endothelium by monoclonal antibodies to ICAM-1 and CD36. Vol. 16, Malar J. 2017. p. 279.
13. Adamou R, Chénou F, Sadissou I, Sonon P, Dechavanne C, Djilali-Saïah A, et al. Plasmodium falciparum infection and age influence parasite growth inhibition mediated by IgG in Beninese infants. Vol. 159, Acta Trop. 2016. p. 111-9.
14. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. Vol. 107, Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. p. 6958-63.
15. Crompton PD, Miura K, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss G, et al. In vitro growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in mali. Infect Immun. febrero de 2010;78(2):737-45.

16. Cham GK, Kurtis J, Lusingu J, Theander TG, Jensen AT, Turner L. A semi-automated multiplex high-throughput assay for measuring IgG antibodies against Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) domains in small volumes of plasma. Vol. 7, Malar J. 2008. p. 108.
17. Helb DA, Tetteh KK, Felgner PL, Skinner J, Hubbard A, Arinaitwe E, et al. Novel serologic biomarkers provide accurate estimates of recent Plasmodium falciparum exposure for individuals and communities. Vol. 112, Proc Natl Acad Sci U S A. 2015. p. E4438-47.
18. Wang Q, Zhao Z, Zhang X, Li X, Zhu M, Li P, et al. Naturally Acquired Antibody Responses to Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. Vol. 11, PLoS One. 2016. p. e0151900.
19. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? Vol. 23, Trends Parasitol. 2007. p. 575-82.
20. Cunha MG, Silva ES, Sepúlveda N, Costa SP, Saboia TC, Guerreiro JF, et al. Serologically defined variations in malaria endemicity in Pará state, Brazil. Vol. 9, PLoS One. 2014. p. e113357.
21. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MV, Drakeley CJ, Braga É. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. Vol. 16, Malar J. 2017. p. 107.
22. Bendezu J, Villasis E, Morales Ruiz S, Garro K, Infante B, Gutierrez-Loli R, et al. Evaluation of Plasmodium falciparum MSP10 and its development as a serological tool for the Peruvian Amazon region. Vol. 18, Malar J. 2019. p. 327.
23. Milner DA. Malaria Pathogenesis [Internet]. Vol. 8, Cold Spring Harb Perspect Med. 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28533315>
24. INS. Informe de evento Malaria 2019. 2019.
25. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. Vol. 32, Annu Rev Immunol. 2014. p. 157-87.
26. Lyke KE. Steady progress toward a malaria vaccine. Vol. 30, Curr Opin Infect Dis. 2017. p. 463-70.
27. Trieu A, Kayala MA, Burk C, Molina DM, Freilich DA, Richie TL, et al. Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel P. falciparum antigens. Vol. 10, Mol Cell Proteomics. 2011. p. M111.007948.

28. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. Vol. 80, *Am J Trop Med Hyg.* 2009. p. 452-9.
29. Maskus DJ, Królik M, Bethke S, Spiegel H, Kapelski S, Seidel M, et al. Characterization of a novel inhibitory human monoclonal antibody directed against *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1. Vol. 6, *Sci Rep.* 2016. p. 39462.
30. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômado AN, Rodrigues MM, Kocken CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. Vol. 35, *Int J Parasitol.* 2005. p. 185-92.
31. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Scopel KK, Braga EM, Bastos M a S, Wunderlich G, et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. Vol. 102, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007. p. 943-51.
32. Rosas-Aguirre A, Patra KP, Calderón M, Torres K, Gamboa D, Arocutipa E, et al. Anti-MSP-10 IgG indicates recent exposure to *Plasmodium vivax* infection in the Peruvian Amazon [Internet]. Vol. 5, *JCI Insight.* 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31770108>
33. Drew DR, Wilson DW, Elliott SR, Cross N, Terheggen U, Hodder AN, et al. A novel approach to identifying patterns of human invasion-inhibitory antibodies guides the design of malaria vaccines incorporating polymorphic antigens. Vol. 14, *BMC Med.* 2016. p. 144.
34. Guilbride DL, Gawlinski P, Guilbride PD. Why functional pre-erythrocytic and bloodstage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model. Vol. 5, *PLoS One.* 2010. p. e10685.
35. Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, et al. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. Vol. 12, *BMC Med.* 2014. p. 108.
36. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. Vol. 13, *PLoS One.* 2018. p. e0207244.
37. Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, van Gemert GJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. Vol. 361, *N Engl J Med.* 2009. p. 468-77.

38. Teo A, Feng G, Brown GV, Beeson JG, Rogerson SJ. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. Vol. 32, Trends Parasitol. 2016. p. 887-98.
39. Kerkhof K, Canier L, Kim S, Heng S, Sochantha T, Sovannaroth S, et al. Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in Southeast Asian pre-elimination areas. Vol. 14, Malar J. 2015. p. 338.
40. Koffi D, Touré AO, Varela ML, Vigan-Womas I, Béourou S, Brou S, et al. Analysis of antibody profiles in symptomatic malaria in three sentinel sites of Ivory Coast by using multiplex, fluorescent, magnetic, bead-based serological assay (MAGPIX™). Vol. 14, Malar J. 2015. p. 509.
41. Ondigo BN, Park GS, Gose SO, Ho BM, Ochola LA, Ayodo GO, et al. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple Plasmodium falciparum recombinant antigens. Vol. 11, Malar J. 2012. p. 427.
42. Perraut R, Richard V, Varela ML, Trape JF, Guillotte M, Tall A, et al. Comparative analysis of IgG responses to Plasmodium falciparum MSP1p19 and PF13-DBL1 α 1 using ELISA and a magnetic bead-based duplex assay (MAGPIX®-Luminex) in a Senegalese meso-endemic community. Vol. 13, Malar J. 2014. p. 410.
43. Varela ML, Mbengue B, Basse A, Loucoubar C, Vigan-Womas I, Dièye A, et al. Optimization of a magnetic bead-based assay (MAGPIX. Vol. 17, Malar J. 2018. p. 324.
44. Terrientes ZI, Kramer K, Herrera MA, Chang SP. Naturally acquired antibodies against the major merozoite surface coat protein (MSP-1) of Plasmodium falciparum acquired by residents in an endemic area of Colombia. Vol. 89 Suppl 2, Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994. p. 55-61.
45. Maestre A, Muskus C, Duque V, Agudelo O, Liu P, Takagi A, et al. Acquired antibody responses against Plasmodium vivax infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). Vol. 5, PLoS One. 2010. p. e11437.
46. Gnidehou S, Mitran CJ, Arango E, Banman S, Mena A, Medawar E, et al. Cross-Species Immune Recognition Between Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Antibodies and the Plasmodium falciparum Surface Antigen VAR2CSA. J Infect Dis. 1 de enero de 2019;219(1):110-20.
47. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. Journal of Experimental Medicine. 6 de mayo de 2013;210(5):905-15.

48. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. octubre de 2016;167(3):610-24.
49. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Vol. 313, Science*. 2006. p. 1287-90.
50. Weiss GE, Gilson PR, Taechalertpaisarn T, Tham WH, Jong NWM de, Harvey KL, et al. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*. 27 de febrero de 2015;11(2):e1004670.
51. Paul AS, Saha S, Engelberg K, Jiang RHY, Coleman BI, Kosber AL, et al. Parasite Calcineurin Regulates Host Cell Recognition and Attachment by Apicomplexans. *Cell Host & Microbe*. 8 de julio de 2015;18(1):49-60.
52. Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular Microbiology*. 2011;13(6):797-805.
53. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host & Microbe*. 20 de enero de 2011;9(1):9-20.
54. Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science Translational Medicine*. 9 de julio de 2014;6(244):244re5-244re5.
55. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Vol. 8, Front Cell Infect Microbiol*. 2018. p. 34.
56. Sinnis P, Zavala F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. *Vol. 34, Semin Immunopathol*. 2012. p. 787-92.
57. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Vol. 240, Immunol Rev*. 2011. p. 297-316.
58. Llewellyn D, Miura K, Fay MP, Williams AR, Murungi LM, Shi J, et al. Standardization of the antibody-dependent respiratory burst assay with human neutrophils and *Plasmodium falciparum* malaria. *Vol. 5, Sci Rep*. 2015. p. 14081.
59. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Vol. 72, Infect Immun*. 2004. p. 5630-7.

60. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, et al. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. Vol. 177, *J Immunol*. 2006. p. 5736-45.
61. Arora G, Hart GT, Manzella-Lapeira J, Doritchamou JY, Narum DL, Thomas LM, et al. NK cells inhibit [Internet]. Vol. 7, *Elife*. 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29943728>
62. Koepfli C, Colborn KL, Kiniboro B, Lin E, Speed TP, Siba PM, et al. A high force of *plasmodium vivax* blood-stage infection drives the rapid acquisition of immunity in papua new guinean children. Vol. 7, *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. p. e2403.
63. Portugal S, Pierce SK, Crompton PD. Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. Vol. 190, *J Immunol*. 2013. p. 3039-46.
64. Ly A, Hansen DS. Development of B Cell Memory in Malaria. Vol. 10, *Front Immunol*. 2019. p. 559.
65. Richards JS, Arumugam TU, Reiling L, Healer J, Hodder AN, Fowkes FJ, et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. Vol. 191, *J Immunol*. 2013. p. 795-809.
66. Jäschke A, Coulibaly B, Remarque EJ, Bujard H, Epp C. Merozoite Surface Protein 1 from *Plasmodium falciparum* Is a Major Target of Opsonizing Antibodies in Individuals with Acquired Immunity against Malaria [Internet]. Vol. 24, *Clin Vaccine Immunol*. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28877929>
67. Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. Vol. 9, *Malar J*. 2010. p. 77.
68. Feged-Rivadeneira A, Ángel A, González-Casabianca F, Rivera C. Malaria intensity in Colombia by regions and populations. Vol. 13, *PLoS One*. 2018. p. e0203673.
69. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. diciembre de 2017;16(1):273.
71. Professor Koch's Investigations on Malaria: Fourth Report to the Colonial Department of the German Colonial Office. Vol. 1, *Br Med J*. 1900. p. 1597-8.
72. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtabe D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. Vol. 6, *PLoS Pathog*. 2010. p. e1000912.

73. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. Vol. 24, Trends Parasitol. 2008. p. 74-84.
74. 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. Vol. 215, J Infect Dis. 2017. p. 1558-68.
75. Tran TM, Ongoiba A, Coursen J, Crosnier C, Diouf A, Huang CY, et al. Naturally acquired antibodies specific for Plasmodium falciparum reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. Vol. 209, J Infect Dis. 2014. p. 789-98.
76. Nagaoka H, Kanoi BN, Jinoka K, Morita M, Arumugam TU, Palacpac NMQ, et al. The N-Terminal Region of. Vol. 10, Front Immunol. 2019. p. 2669.
77. Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. Vol. 49, Mol Biochem Parasitol. 1991. p. 119-31.
78. Amoah LE, Nuvor SV, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. Natural antibody responses to Plasmodium falciparum MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. Vol. 10, Parasit Vectors. 2017. p. 395.
79. Dodoo D, Aikins A, Kusi KA, Lamptey H, Remarque E, Milligan P, et al. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. Vol. 7, Malar J. 2008. p. 142.
80. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of Plasmodium falciparum is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. Vol. 66, Infect Immun. 1998. p. 11-7.
81. Céspedes N, Li Wai Suen CSN, Koepfli C, França CT, Felger I, Nebie I, et al. Natural immune response to Plasmodium vivax alpha-helical coiled coil protein motifs and its association with the risk of P. vivax malaria. Vol. 12, PLoS One. 2017. p. e0179863.
82. Montiel J, Carbal LF, Tobón-Castaño A, Vásquez GM, Fisher ML, Londono-Rentería B. IgG antibody response against Anopheles salivary gland proteins in asymptomatic Plasmodium infections in Narino, Colombia. Vol. 19, Malar J. 2020. p. 42.

83. Londono-Renteria B, Drame PM, Montiel J, Vasquez AM, Tobón-Castaño A, Taylor M, et al. Identification and Pilot Evaluation of Salivary Peptides from [Internet]. Vol. 21, *Int J Mol Sci*. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31973044>
84. Requena P, Arévalo-Herrera M, Menegon M, Martínez-Espinosa FE, Padilla N, Bôtto-Menezes C, et al. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to. Vol. 8, *Front Immunol*. 2017. p. 163.
85. Lopez-Perez M, Larsen MD, Bayarri-Olmos R, Ampomah P, Stevenson L, Arévalo-Herrera M, et al. IgG Responses to the Plasmodium falciparum Antigen VAR2CSA in Colombia Are Restricted to Pregnancy and Are Not Induced by Exposure to Plasmodium vivax [Internet]. Vol. 86, *Infect Immun*. 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29784859>
86. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. Van Ooij C, editor. *FEMS Microbiology Reviews*. mayo de 2016;40(3):343-72.
87. del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of Plasmodium vivax reveals sequences conserved between different Plasmodium species. Vol. 88, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. p. 4030-4.
88. Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JR, Tang ML, Sanchez BAM, Sousa TN, et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *PLoS One*. 7 de abril de 2014;9(4):e93782.
89. Gunalan K, Gao X, Liew KJL, Preiser PR. Differences in Erythrocyte Receptor Specificity of Different Parts of the Plasmodium falciparum Reticulocyte Binding Protein Homologue 2a ▽. *Infect Immun*. agosto de 2011;79(8):3421-30.
90. Cheng Y, Wang Y, Ito D, Kong DH, Ha KS, Chen JH, et al. The Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of P. vivax. Vol. 81, *Infect Immun*. 2013. p. 1585-95.
91. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. Vol. 172, *J Exp Med*. 1990. p. 379-82.
92. Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 19- and 42-kiloDalton fragments expressed in Escherichia coli. Vol. 72, *Infect Immun*. 2004. p. 5775-82.

93. Yman V, White MT, Asghar M, Sundling C, Sondén K, Draper SJ, et al. Antibody responses to merozoite antigens after natural *Plasmodium falciparum* infection: kinetics and longevity in absence of re-exposure. Vol. 17, *BMC Med.* 2019. p. 22.
94. Alaro JR, Partridge A, Miura K, Diouf A, Lopez AM, Angov E, et al. A chimeric *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine induces high titers of parasite growth inhibitory antibodies. Vol. 81, *Infect Immun.* 2013. p. 3843-54.
95. Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. Vol. 21, *Parasite Immunol.* 1999. p. 133-9.
96. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CH, Thomas AW, Blackman MJ. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. Vol. 276, *J Biol Chem.* 2001. p. 31311-20.
97. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. Vol. 72, *Infect Immun.* 2004. p. 154-8.
98. Polley SD, Mwangi T, Kocken CH, Thomas AW, Dutta S, Lanar DE, et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. Vol. 23, *Vaccine.* 2004. p. 718-28.
99. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. Vol. 51, *Am J Trop Med Hyg.* 1994. p. 730-40.
100. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. Vol. 69, *Infect Immun.* 2001. p. 3286-94.
101. Pratt-Riccio LR, Bianco C, Totino PR, Perce-Da-Silva D e S, Silva LA, Riccio EK, et al. Antibodies against the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. Vol. 106 Suppl 1, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011. p. 34-43.
102. Kana IH, Adu B, Tiendrebeogo RW, Singh SK, Dodoo D, Theisen M. Naturally Acquired Antibodies Target the Glutamate-Rich Protein on Intact Merozoites and Predict Protection Against Febrile Malaria. Vol. 215, *J Infect Dis.* 2017. p. 623-30.
103. 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. *Infect Immun.* marzo de 2010;78(3):1089-95.
104. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de junio de 2008;105(24):8363-8.
 105. Microsoft Power BI [Internet]. [citado 9 de junio de 2023]. Disponible en: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMzI2MTYyZDYtYWJhYy00NjU1LTk0NWEtZGFjODkxMWM0ZGE2IiwidCI6ImE2MmQ2YzdiLTlmNTktNDQ2OS05MzU5LTM1MzcxNDc1OTRiYiIsImMiOiR9>
 106. Zuluaga-Idárraga L, Rios A, Sierra-Cifuentes V, Garzón E, Tobón-Castaño A, Takehara I, et al. Performance of the hematology analyzer XN-31 prototype in the detection of *Plasmodium* infections in an endemic region of Colombia. *Sci Rep.* 4 de marzo de 2021;11:5268.
 107. Bortnick A, Chernova I, Quinn WJ, Mugnier M, Cancro MP, Allman D. Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. Vol. 188, *J Immunol.* 2012. p. 5389-96.
 108. IEDB.org: Free epitope database and prediction resource [Internet]. [citado 9 de junio de 2023]. Disponible en: <http://www.iedb.org>
 109. Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate Molecular Interactions of *P. falciparum* Merozoite Proteins Involved in Invasion of Red Blood Cells and Their Implications for Vaccine Design. *Chem Rev.* 10 de septiembre de 2008;108(9):3656-705.
 110. Theisen M, Soe S, Jessing SG, Okkels LM, Danielsen S, Oeuvray C, et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing. *Vaccine.* 15 de septiembre de 2000;19(2):204-12.
 111. Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, et al. Epitope-Specific Humoral Immunity to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Infect Immun.* mayo de 2003;71(5):2508-15.
 112. Soares RR, Nakaie CR, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva RL, Lima-Junior J da C, Scopel KKG. Main B-cell epitopes of PvAMA-1 and PvMSP-9 are targeted by naturally acquired antibodies and epitope-specific memory cells in acute and convalescent phases of vivax malaria. *Parasite Immunology.* 2020;42(5):e12705.
 113. Ruiz Moreno Y, Donato ST, Nogueira F, Sousa Silva M. Comparative Analysis of the Serological Reactivity of Individuals with Clinical History of Malaria using Two

- Different ELISA Tests [Internet]. Vol. 9, Diagnostics (Basel). 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31671536>
114. Evaluación y uso de un péptido sintético para la detección de anticuerpos específicos contra *Plasmodium falciparum* [Internet]. [citado 18 de junio de 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702018000200011
 115. T CE, Moreno E, Guerra P, Vega PDL. Aislamiento y caracterización de cepas colombiana de *plasmodium falciparum*. *Biomédica*. 1982;2(3):118-28.
 116. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 20 de agosto de 1976;193(4254):673-5.
 117. Antibody-Mediated Growth Inhibition of *Plasmodium falciparum*: Relationship to Age and Protection from Parasitemia in Kenyan Children and Adults | PLOS ONE [Internet]. [citado 16 de junio de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003557>
 118. Arango E, Carmona-Fonseca J, Blair S. Susceptibilidad in vitro de aislamientos colombianos de *Plasmodium falciparum* a diferentes antipalúdicos. *Biomédica*. junio de 2008;28(2):213-23.
 119. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *The Journal of Parasitology*. 1979;65(3):418-20.
 120. Berthi W, González A, Rios A, Blair S, Cogollo Á, Pabón A. Anti-plasmodial effect of plant extracts from *Picrolemma huberi* and *Picramnia latifolia*. Vol. 17, *Malar J*. 2018. p. 151.
 121. Dent AE, Bergmann-Leitner ES, Wilson DW, Tisch DJ, Kimmel R, Vulule J, et al. Antibody-Mediated Growth Inhibition of *Plasmodium falciparum*: Relationship to Age and Protection from Parasitemia in Kenyan Children and Adults. *PLOS ONE*. 29 de octubre de 2008;3(10):e3557.
 122. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, Duncan EH, Khan F, Waitumbi J, Angov E. Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malaria Journal*. 14 de julio de 2008;7(1):129.
 123. Quintana MDP, Anabire NG, Hviid L. Measuring Naturally Acquired Phagocytosis-Inducing Antibodies to *Plasmodium falciparum* Parasites by a Flow Cytometry-Based Assay. *J Vis Exp*. 6 de agosto de 2020;(162).
 124. Musasia FK, Nkumama IN, Frank R, Kipkemboi V, Schneider M, Mwai K, et al. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* ring-stage parasites predicts protection against malaria. *Nat Commun*. 14 de julio de 2022;13(1):4098.

125. Ndour PA, Lopera-Mesa TM, Diakité SAS, Chiang S, Mouri O, Roussel C, et al. Plasmodium falciparum Clearance Is Rapid and Pitting Independent in Immune Malian Children Treated With Artesunate for Malaria. *J Infect Dis*. 15 de enero de 2015;211(2):290-7.
126. Diatta AM, Marrama L, Tall A, Trape JF, Dieye A, Garraud O, et al. Relationship of Binding of Immunoglobulin G to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes with Parasite Endemicity and Antibody Responses to Conserved Antigen in Immune Individuals. *Clin Diagn Lab Immunol*. enero de 2004;11(1):6-11.
127. 2020_Boletin_epidemiologico_semana_53.pdf [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_53.pdf