

Efecto inmunomodulador de *Plasmodium falciparum* en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos y su efecto en la respuesta frente a fitohemaglutinina.

Juliana Andrea Álvarez Quintero

Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga y Bioanalista

**Asesora
Catalina Álvarez Larrotta
Bacterióloga y Laboratorista Clínica
Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Medellín
2019**

Expreso mi sincera gratitud a todas las personas que contribuyeron e hicieron posible la realización de este proyecto de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de tablas.....	4
Lista de figuras.....	5
Glosario.....	6
Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos.....	10
4. Resultados.....	12
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones.....	19
Agradecimientos.....	20
Declaraciones.....	20
Referencias.....	21

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de sondas y cebadores de las moléculas evaluadas.....	12
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	13
Porcentaje de viabilidad de CMSP expuestas a glóbulos rojos parasitados con <i>P. falciparum</i> y sobrenadante de cultivo.	
Figura 2.....	14
Porcentaje de viabilidad de CMSP expuestas a diferentes tratamientos con la cepa 3D7 y estimuladas con el antígeno PHA.	
Figura 3.....	15
Expresión de las citoquinas IFN- γ e IL-10 en CMSP expuestas a bajas cargas parasitarias de la cepa 3D7 y estimuladas con PHA.	
Figura 4.....	16
Expresión de los mediadores inmunes FoxP3 y TNFR11 en CMSP expuestas a bajas cargas parasitarias de la cepa 3D7 y estimuladas con PHA.	

GLOSARIO

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

PHA: fitohemaglutinina

GRNP: glóbulos rojos no parasitados

GRP: glóbulos rojos parasitarios

RESUMEN

Antecedentes: estudios asocian a *P. falciparum* con alteraciones en la función de células mononucleares de sangre periférica. Esto solo ha sido demostrado en infecciones microscópicas. Las infecciones submicroscópicas son frecuentes y no diagnosticadas por métodos de rutina, además, se consideran infecciones de duración desconocida, y se desconoce su efecto sobre la competencia inmune de las CMSP. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las cargas submicroscópicas de la cepa 3D7 de *P. falciparum* y sobrenadante de cultivo, sobre la respuesta inmune de CMSP frente a fitohemaglutinina.

Métodos: se realizó un estudio experimental con CMSP de 6 individuos exponiéndolos a porcentajes submicroscópicos de glóbulos rojos parasitados por *P. falciparum*, sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* y luego estimulándolos con PHA. La viabilidad celular se cuantificó tras cada tratamiento, además, la respuesta inmune frente a PHA se evaluó determinando la expresión de IL-10, INF- γ , FoxP3 y TNFR11 mediante RT-qPCR.

Resultados: *P. falciparum* modula *in vitro* la respuesta inmune de CMSP de individuos sanos. Las CMSP mantuvieron una viabilidad >90% tras la exposición a *P. falciparum* y PHA. Se observó reducción de viabilidad en las CMSP expuestas a sobrenadante +PHA. La expresión de IFN- γ fue menor en las CMSP expuestas a 0,01%+PHA y 0,001%+PHA en comparación al control. No se observaron diferencias significativas en las moléculas asociadas a regulación inmune tras 24 horas de estímulo con PHA en las CMSP.

Conclusiones: La exposición de CMSP a cargas submicroscópicas de *P. falciparum* reduce la respuesta de IFN- γ frente a PHA.

Palabras Claves: *Plasmodium falciparum*, células mononucleares, inmunomodulación, fitohemaglutinina.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades con mayor prevalencia e incidencia de casos en el mundo. En Colombia, para el año 2018 según el reporte del Instituto Nacional de Salud, en la semana epidemiológica 52 se reportaron 62.141 casos de malaria. Evidenciando un mayor número de casos por la especie *Plasmodium vivax* (50.1%), seguido de *P. falciparum* (47.9%) y malaria mixta (2%).(1)

En la actualidad, la malaria representa un problema de salud pública en Colombia, debido a que alrededor del 85% del territorio posee condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas óptimas para la transmisión de la enfermedad.(1) Para el año 2018, según el Índice Parasitario Anual los principales departamentos afectados fueron: Amazonas, Antioquia, Guainía y Chocó.(2)

Las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. se caracterizan por ser asintomáticas, por tanto, de duración desconocida.(3) Este tipo de infecciones son comunes en áreas endémicas, donde existen condiciones ecoepidemiológicas que facilitan la transmisión de la infección plasmodial.(3) En Colombia, no existe evidencia sobre la prevalencia de infección plasmodial submicroscópica para la población general, sin embargo, recientemente se ha observado un incremento en la frecuencia de infecciones plasmodiales submicroscópicas asociadas al embarazo; en Colombia se estima una frecuencia de infección plasmodial submicroscópica en sangre periférica entre 23% y 49% y en sangre placentaria entre 4,9% y 5,7%.(4, 5) lo que demuestra la importancia de implementar métodos de diagnóstico como PCR para identificar todo tipo de infecciones en especial las submicroscópicas.

Las infecciones crónicas se caracterizan por tener un perfil de inflamación persistente;(6) las infecciones submicroscópicas por *Plasmodium* spp. durante la gestación cursan con un incremento de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF, y antiinflamatorias TGF- β e IL-10.(7, 8) Estas últimas citoquinas, podrían explicar el aumento de células T reguladoras (Treg) y el factor de transcripción FoxP3, tanto en infecciones de sangre periférica como placentarias.(9-11)

Por otra parte, la inmunomodulación se puede presentar como positiva, que denota activación, o negativa, que indica regulación de la respuesta inmune.(12) Estudios muestran que las infecciones por *P. falciparum* y *P. yoelii* pueden modular negativamente la respuesta inmune, aumentando la frecuencia de células y moléculas

asociadas a regulación y afectando la respuesta inmune de células presentadoras de antígeno.(13, 14)

De manera *in vitro*, hay evidencia de la modulación de la respuesta inmune ejercida por *P. falciparum* sobre CMSP, así lo demuestra Chitsanoor et al. mostrando que la estimulación de CMSP con glóbulos rojos parasitados por *P. falciparum* reduce significativamente la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.(15)

En contraste, otro estudio *in vitro* evidenció proliferación de linfocitos T CD4⁺ en CMSP de individuos sanos, tras ser estimulados con antígeno purificado de *P. falciparum*.(16) De igual manera, Troye et al. demostró una alta producción de IFN- γ en linfocitos T estimulados con antígenos de *P. falciparum*.(17) De acuerdo a lo anterior, los estudios permiten evidenciar que la exposición de CMSP a *P. falciparum* puede generar tanto modulación positiva, como negativa, de la respuesta inmune, lo que puede explicar la variedad de fenotipos clínicos de la infección, encontrando desde malaria grave, hasta malaria asintomática y submicroscópica.

En otro contexto, la malaria se ha asociado a alteración en la respuesta inmune frente a la vacunación, incluso, durante infecciones submicroscópicas. La infección plasmodial submicroscópica en gestantes en el último trimestre y la malaria placentaria microscópica se asociaron con niveles bajos de anticuerpos IgG anti toxoide tetánico tras la vacunación.(18, 19) Además, en África Subsahariana se demostró que la malaria placentaria microscópica se asoció con disminución en la respuesta de IFN- γ en CMSP de lactantes a los 12 meses de edad después de la vacunación con BCG.(20)

Por otro lado, la infección microscópica con *P. falciparum* se ha asociado con susceptibilidad para adquirir otras infecciones. En Kenia la malaria fue definida como un cofactor para adquirir el virus del Epstein-Barr, allí se evidenció que esta coinfección puede afectar la maduración de células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, y disminuir la producción de IFN- γ en niños.(21) La malaria también se ha asociado con la adquisición de bacteremia, entre las más comunes se destaca la coinfección con especies de *Salmonella spp.*(22) Una hipótesis se asocia al aumento de IL-10 durante infecciones por *P. falciparum*. La IL-10 puede alterar el control de *Salmonella spp* limitando la migración de neutrófilos, lo que contribuye al establecimiento de la infección.(23) Lo anterior, indica la frecuente asociación de las infecciones plasmodiales microscópicas con la modulación negativa

de la respuesta inmune en diferentes contextos y la poca evidencia de la modulación ejercida por las infecciones submicroscópicas.

Por tal motivo este ensayo se centra en explorar el efecto inmunomodulador de cargas parasitarias submicroscópicas de *P. falciparum in vitro* en CMSP y su efecto sobre la respuesta inmune frente al antígeno PHA.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto inmunomodulador de *P. falciparum in vitro* en CMSP y su efecto sobre la respuesta inmune frente a PHA.

Objetivos específicos

1. Comparar el número y viabilidad de CMSP de individuos sanos estimulados y no estimulados con *P. falciparum*.
2. Comparar el número y viabilidad de CMSP de individuos sanos estimulados con PHA después de la exposición y no exposición a *P. falciparum*.
3. Comparar la expresión de mediadores inmunes de regulación, antiinflamación e inflamación en CMSP de individuos sanos expuestos a *P. falciparum* tras estimulación con PHA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Estudio experimental

Separación de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvo sangre periférica en tubos con EDTA de 6 hombres con un rango de edades entre 20 y 30 años. La sangre se adicionó a HISTOPAQUE -1077 en tubo falcon de 15 ml. Después de centrifugar, se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica y se realizaron 3 lavados con PBS.

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica con *Plasmodium falciparum*

Las células mononucleares, se cultivaron en platos de 4 pozos (Thermo Scientific™ Nunc™) con medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, hepes ácido y suero

fetal bovino al 10%. Los mononucleares fueron estimulados con diluciones de glóbulos rojos parasitados con la cepa 3D7 de *P. falciparum* (0.01%, 0.001% y 0.0001%), adicionalmente, se estimularon con sobrenadante de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* de 42 horas con un porcentaje de parasitemia del 1% en estadio de esquizontes. Como controles se utilizaron glóbulos rojos no parasitados y mononucleares sin glóbulos rojos. Las células se incubaron con los diferentes estímulos durante 28 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica con PHA

Las células mononucleares con los diferentes estímulos, fueron tratadas con sorbitol en una relación 1:1, con el fin de eliminar los estadios de maduración. Después, las células fueron retadas con PHA a una concentración de 10 ug/ml y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Se determinó la viabilidad celular con una dilución 1:1 con azul de tripano, realizando recuento en cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad celular se calculó antes y después de cada tratamiento con *P. falciparum*, y antes y después de la estimulación con PHA.

Extracción de ARN

A las células mononucleares que estaban preservadas en Trizol®, se les adicionó 200 uL de cloroformo, luego de centrifugar se aisló el ARN, se adiciono isopropanol en un volumen 1:1. Luego de 24 horas de incubación, se centrifugo y se adiciono etanol al 75%, luego de centrifugar y descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en agua ultra pura libre de RNAsas.

RT-qPCR

A partir de ARN extraído se realizó síntesis de cDNA utilizando el kit Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis. A partir de cDNA se evaluó la expresión de IFN- γ , como molécula asociada a la respuesta inmune inflamatoria, IL-10, asociada a respuesta inmune antiinflamatoria y se evaluó la expresión de moléculas reguladoras de la respuesta inmune como el FoxP3 y TNFR11, comparando su expresión según el gen constitutivo β - actina, lo anterior mediante el kit Applied biosystems Thermo Fisher Scientific TaqMan Universal PCR Master Mix, usando una

sonda Taqman, mediante el método Δ CT. La secuencia de los cebadores y sondas para las moléculas evaluadas se presentan en la tabla 1.

Molécula	Cebador F (5'-3')	Cebador R (5'-3')	Sonda (5'-3')	Producto (pb)
B-actina	CGAGCGCGGCTACA GCTT	CCTTAATGTCACGCACG ATT	ACCACCACGGCCGAGCG G	58
IL-10	CCTGGAGGAGGTGA TGCCCCA	CAGCGCCGTAGCCTCAG CC	CAAGGCGCATGTGAACTC CCTG	131
IFN- γ	GAAGAATTGGAAAGA GGAGAGTGA	TGGACATTCAAGTCAGT TACCG	TTCCTTGATGGTCTCCACA CTCTTTTGG	218
FoxP3	GAGAAGCTGAGTGC CATGCA	GGAGCCCTTGTCGGATG AT	CCACCTGGCTGGGAAAAT GGCAC	87
TNFR11	CTGCCATGGTGTGT CCCTC	GGCAGGTCACAGAGAGT CAG	CATGGACGTTCCGGGGCAT GCT	88

Tabla 1. Secuencia de sondas y cebadores de las moléculas evaluadas

Análisis Estadístico

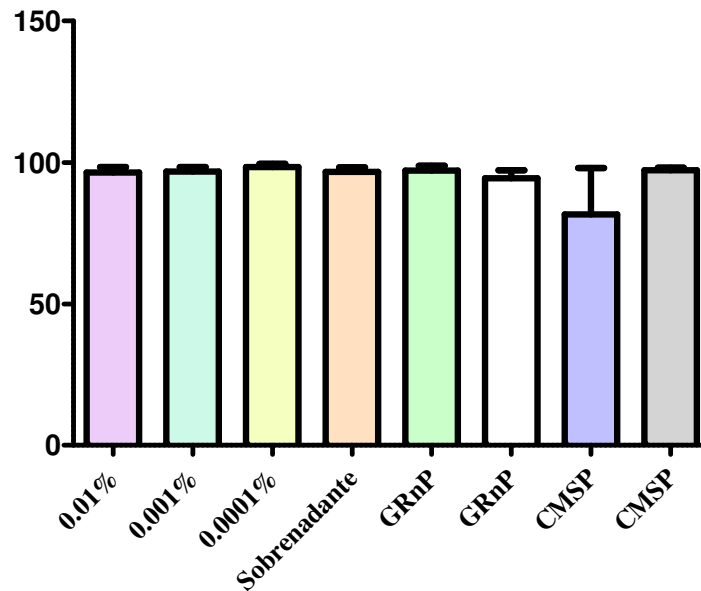
Los datos fueron analizados usando el Software Graphad Prism 5. La prueba de normalidad Shapiro-Wilk fue usada para determinar la distribución de los datos. De acuerdo a lo anterior la prueba Mann-Whitney U fue utilizada para comparar los diferentes tratamientos realizados a las CMSP. Todas las decisiones sobre significación estadística se tomaron con una probabilidad de error del 5%.

4. RESULTADOS

Porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica tras los diferentes tratamientos.

El promedio de viabilidad de las CMSP luego de la separación fue de 98,7%. Posteriormente, la viabilidad de las CMSP fue verificada después de cada tratamiento. Luego de la exposición durante 28 horas de las CMSP a los diferentes estímulos con la cepa 3D7 (glóbulos rojos parasitados 0,01, 0,001 y 0,0001% y sobrenadante de cultivo de *P. falciparum*) y a los glóbulos rojos no parasitados se evidenció una viabilidad mayor a 90% en todos los tratamientos (Figura 1).

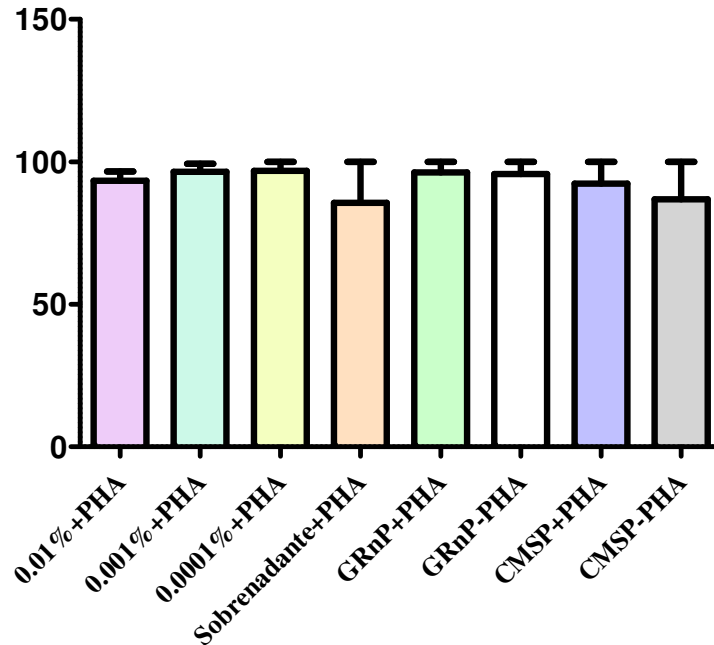
Figura 1. Porcentaje de viabilidad de CMSP expuestas a glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* y sobrenadante de cultivo.



Diferentes tratamientos de la exposición CMSP a la cepa 3D7. Porcentajes de parasitemia 0.01%, 0.001% y 0.0001%. Sobrenadante de cultivo al 1% de *P. falciparum* en estadio de esquizontes. GRnP: glóbulos rojos no parasitados. CMSP células mononucleares de sangre periférica sin exposición al parásito o sus productos.

Luego de la exposición de las CMSP a las diferentes condiciones con la cepa 3D7, estas fueron estimuladas durante 24 horas con PHA. Después de este estímulo la viabilidad celular continuó siendo superior al 90% en todos los pozos (Figura 2). A excepción de las células expuestas a sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* en las que se observó una leve reducción del porcentaje de viabilidad (85,7%).

Figura 2. Porcentaje de viabilidad de CMSP expuestas a diferentes tratamientos con la cepa 3D7 y estimuladas con el antígeno PHA.



Diferentes tratamientos de la exposición CMSP a la cepa 3D7. Porcentajes de parasitemia 0.01%, 0.001% y 0.0001%. Sobrenadante de cultivo al 1% de *P. falciparum* en estadio de esquizontes. GRnP: glóbulos rojos no parasitados. CMSP células mononucleares de sangre periférica sin exposición al parásito o sus productos. +PHA: estimulados con 10µg/mL de PHA; -PHA: sin estímulo de PHA.

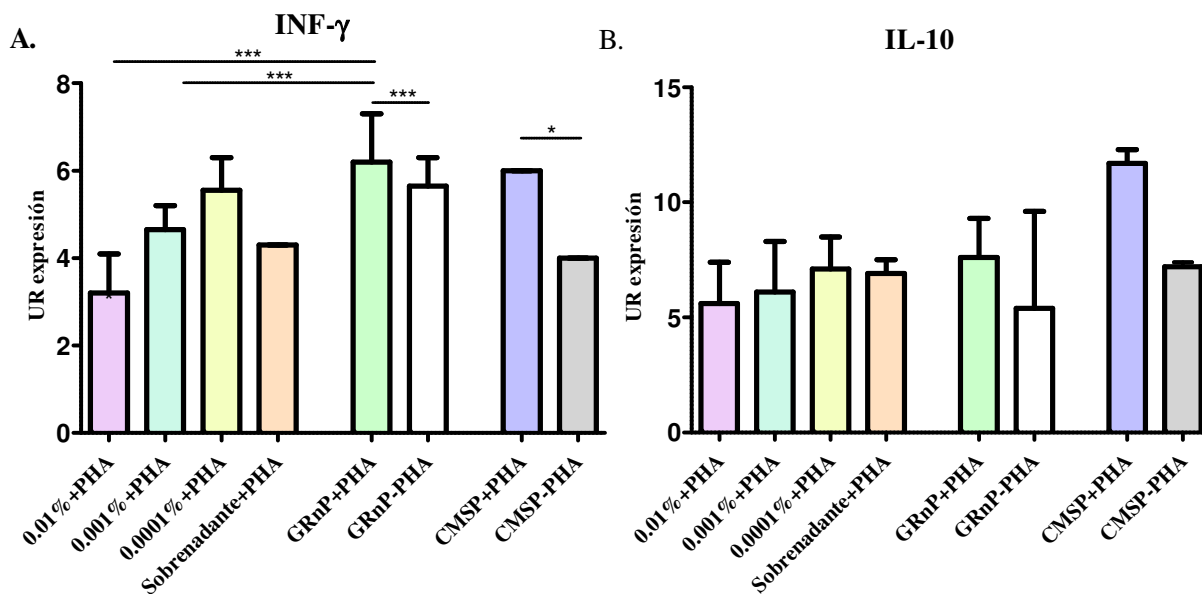
Expresión de citoquinas y moléculas reguladoras

No fue posible determinar la expresión de los mediadores inmunes en el total de muestras recolectadas. Teniendo en cuenta que se usó el mitógeno PHA, inicialmente se tuvo en cuenta la expresión de IFN- γ en los diferentes tratamientos para validar el ensayo *in vitro*. Se incluyeron dos controles que correspondieron a CMSP con glóbulos rojos no parasitados (GRnP) y a CMSP sin ningún tratamiento con glóbulos rojos (CMSP). La expresión de IFN- γ fue evaluada en estos controles con el estímulo (+PHA) o sin el estímulo con PHA (-PHA). Usando la prueba Mann-Whitney U se comparó la expresión entre los GRnP+PHA y las CMSP+PHA ($p=0,7671$) y entre GRnP-PHA y las CMSP-PHA ($p=0,1886$) sin encontrar diferencias significativas. Lo anterior indica que los GRnP no estimulan a las CMSP para la producción significativa de IFN- γ (Figura 3A).

Además, la expresión de IFN- γ en cada control fue comparada con y sin el estímulo con PHA para verificar la funcionalidad de las células. En esta comparación encontramos diferencias con significación estadística en los dos controles (GRnP+PHA versus GRnP-PHA $p < 0,0001$) (CMSP+PHA versus CMSP-PHA $p < 0,05$). De acuerdo a estos resultados, las células además de tener un adecuado porcentaje de viabilidad, respondieron al estímulo con PHA (Figura 3A).

Para determinar si las bajas concentraciones parasitarias y productos solubles del parásito cambiaban la expresión de diferentes mediadores inmunes en las CMSP frente al estímulo con PHA, se comparó la expresión de los mediadores en cada uno de los tratamientos con la cepa 3D7 con la expresión de los mediadores inmunes del control GRnP+PHA. La expresión de IFN- γ fue significativamente menor en las CMSP expuestas a 0,01%+PHA ($p < 0,0001$) y 0,001%+PHA ($p < 0,0001$) de glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* en comparación al control GRnP+PHA (Figura 3A). Cuando se evaluó la expresión de IL-10 en todos los tratamientos en comparación con el control GRnP+PHA no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, tampoco se observaron diferencias al comparar los controles con o sin estímulo con PHA (Figura 3B).

Figura 3. Expresión de las citoquinas IFN- γ e IL-10 en CMSP expuestas a bajas cargas parasitarias de la cepa 3D7 y estimuladas con PHA.

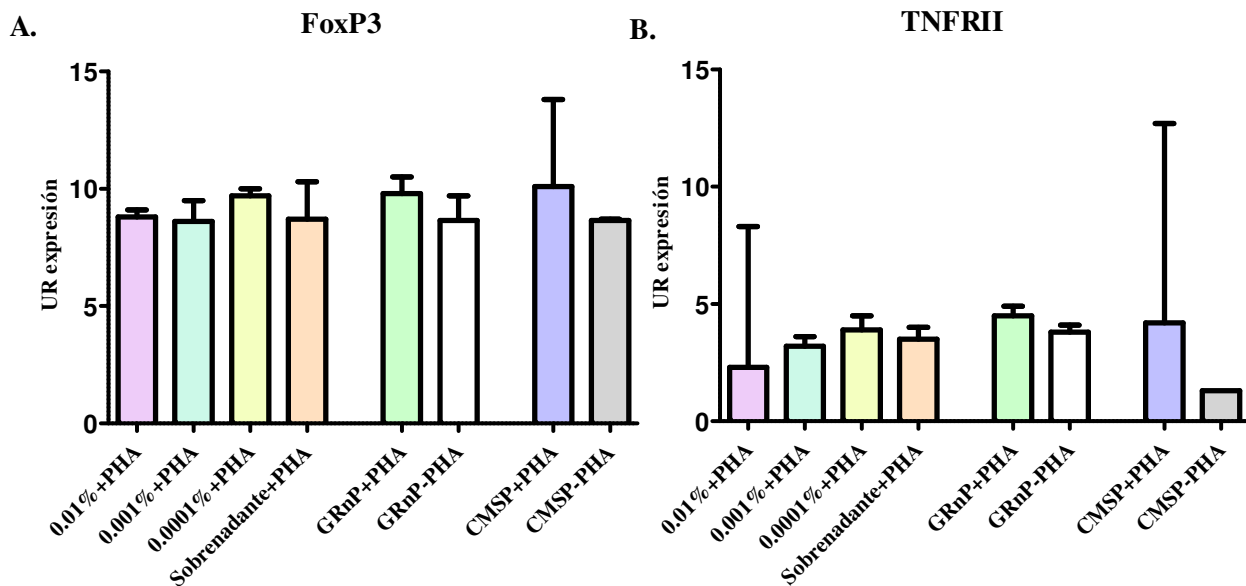


Diferentes tratamientos de la exposición CMSP a la cepa 3D7. Porcentajes de parasitemia 0.01%, 0.001% y 0.0001%. Sobrenadante de cultivo al 1% de *P. falciparum* en estadio de esquizontes. GRnP: glóbulos rojos no parasitados. CMSP células mononucleares de sangre periférica sin exposición al parásito o sus productos. +PHA: estimulados con 10µg/mL de PHA; -PHA: sin estímulo de PHA. Valor de p de acuerdo a la prueba no paramétrica Mann-Whitney *p<0,05, *p<0,0001.**

También se evaluó la expresión de los mediadores FoxP3 y TNFR11 asociados regulación de la respuesta inmune en células Treg. Al comparar la expresión de estos dos mediadores inmunes entre el control GRnP+PHA y los diferentes tratamientos de exposición a la cepa 3D7 de las CMSP estimuladas con PHA no se encontró ninguna diferencia significativa (Figura 4A, B).

Lo anterior indica que tras 24 horas de estímulo con PHA en las CMSP con los diferentes tratamientos con la cepa 3D7 no se observó ninguna diferencia en las moléculas asociadas a regulación inmune (IL-10, Foxp3 y TNFR11).

Figura 4. Expresión de los mediadores inmunes FoxP3 y TNFR11 en CMSP expuestas a bajas cargas parasitarias de la cepa 3D7 y estimuladas con PHA.



Diferentes tratamientos de la exposición CMSP a la cepa 3D7. Porcentajes de parasitemia 0.01%, 0.001% y 0.0001%. Sobrenadante de cultivo al 1% de *P. falciparum* en estadio de esquizontes. GRnP: glóbulos rojos no parasitados. CMSP

células mononucleares de sangre periférica sin exposición al parásito o sus productos. **+PHA:** estimulados con 10µg/mL de PHA; **-PHA:** sin estímulo de PHA.

5. DISCUSIÓN

Las células mononucleares de sangre periférica incluyen los linfocitos (células T, células B y células NK), monocitos y células dendríticas.(24) Estas células tienen receptores que interactúan con *Plasmodium* spp uniéndose a productos del parásito o a moléculas expresadas en los glóbulos rojos parasitados.(25) La interacción entre los mononucleares y el parásito se puede realizar a través de la vía C3b del complemento, opsonización de receptores Fcy con anticuerpos o mediante los TLRs. De este modo, se produce una respuesta proinflamatoria que ayuda a combatir la infección.(26)

Por otro lado, las infecciones plasmodiales submicroscópicas son asintomáticas y no son detectadas mediante la gota gruesa.(19, 27) Estas pueden generar un desequilibrio en el perfil de citoquinas y moléculas que son expresadas por las células inmunes. (6)

Este estudio evaluó la expresión de algunas moléculas asociadas a regulación inmune que contribuyen a ampliar la comprensión de las infecciones submicroscópicas y su efecto sobre la respuesta inmune frente a otros antígenos de manera *in vitro*. Se evaluó la exposición de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con diferentes cargas parasitarias y sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* a PHA. Estas cargas parasitarias fueron seleccionadas de acuerdo a un estudio que expone que el límite de detección de la gota gruesa por un observador experimentado varía entre 10 y 30 parásitos/uL de sangre, lo que equivale a 0.001% de glóbulos rojos parasitados.(28) Por tal razón, en este estudio analizaron tres porcentajes de parasitemia que están entre la infección microscópica y submicroscópica. Por otro lado, el PHA es una lectina que se une a carbohidratos o glicoproteínas en la superficie de las células del sistema inmune y esta unión está implicada en diversas funciones de reconocimiento, aglutinación, adhesión, apoptosis, inflamación, crecimiento y división celular.(29)

Un estudio previo mostró una reducción en la respuesta de IFN- γ en CMSP de niños nacidos de mujeres con malaria placentaria por *P. falciparum* frente al estímulo con PPD.(20) Aunque no es el mismo contexto, en este estudio la exposición de las CMSP a glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* también redujo la respuesta de IFN- γ frente al PHA en las parasitemias de 0.01% y 0.001%. Además, vale la pena resaltar la importancia del IFN- γ en la respuesta inmune, esta molécula es producida principalmente por linfocitos T y células NK, sus principales funciones son: la estimulación de la presentación antigénica, la proliferación celular, la apoptosis, y la diferenciación de células Th1, fundamentales en la respuesta frente a antígenos intracelulares.(30)

También, se comparó la expresión de los mediadores inmunes en CMSP expuestas a sobrenadante de cultivo de *P. falciparum* al 1% tras el estímulo con PHA, con el fin de evaluar el efecto de productos solubles secretados por el parásito al sobrenadante del cultivo, un ejemplo de esto son las vesículas extracelulares. Se ha evidenciado que *Plasmodium* spp. produce vesículas que están implicadas en la activación de la respuesta inmune, estos pueden ser exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos según su tamaño.(31) Las vesículas extracelulares de origen parasitario se ha demostrado que inducen respuestas proinflamatorias, pueden tener efecto inmunomodulador en el hospedero tras su liberación, además, median la comunicación célula-célula entre parásitos de manera *in vitro*.(32) Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ninguna de las moléculas evaluadas cuando las CMSP fueron expuestas a sobrenadante de cultivo.

Diversos autores demuestran que la IL-10 puede ser usada como marcador periférico durante la infección plasmódica, la IL-10 es producida en mayor cantidad, con el fin de reducir la respuesta inflamatoria.(33) En este estudio, a pesar que no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 con respecto al control de GRnP+PHA, si se observó una tendencia a expresar mayor cantidad de IL-10 a mayor parasitemia según se muestra en la figura 3B. Lo anterior puede ser explicado porque durante la respuesta inmune, después de un estímulo, el perfil antiinflamatorio se activa a las 24 horas para contrarrestar el efecto proinflamatorio.(34) En nuestro ensayo, solo se evaluó el estímulo con PHA durante

24 horas, es decir, la respuesta antiinflamatoria posiblemente aún no se podía evidenciar.

En cuanto a la expresión de las moléculas reguladoras, el TNFRII (Receptor de TNF tipo II) es un marcador de activación de las células T reguladoras, este se ha evidenciado con alta expresión *in vitro* en linfocitos T estimulados con glóbulos rojos parasitados por *P. falciparum*.(35) Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias en su expresión entre las CMSP expuestas o no a *P. falciparum* tras el estímulo con PHA. Otra molécula a destacar es el factor de transcripción FoxP3, el cual, es un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células reguladoras TCD4+. (10) Este factor se ha asociado con el crecimiento *in vivo* de *Plasmodium* spp. al ser un regulador negativo de los procesos inflamatorios.(10) En este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de FoxP3 y TNFRII con respecto al control de GRnP+PHA, sin embargo, estas moléculas, se han visto aumentadas en infecciones microscópicas y submicroscópicas en humanos,(19, 36) y en estos casos la exposición al parásito es más prolongada, en este ensayo solo estuvieron expuestas las CMSP durante 28 horas al parásito, es decir, un ciclo incompleto donde solo se madura de anillo a esquizonte, por lo tanto, este tiempo puede ser insuficiente para ver la modulación de la respuesta frente al PHA.

Este ensayo tuvo las siguientes limitaciones: la cantidad de individuos incluidos, que el tiempo de exposición al parásito no es comparable al de una infección submicroscópica *in vivo* y que el ARN de las CMSP tras el PHA solo fue recolectado 24 horas posterior al estímulo, por lo que, es posible que no se hayan podido observar las diferencias en la transcripción de las moléculas evaluadas, además, no fue posible determinar la expresión de los mediadores inmunes en el total de muestras recolectadas.

6. CONCLUSIONES

- *P. falciparum* en bajas cargas parasitarias *in vitro* se asociaron a la reducción de la expresión de IFN- γ en CMSP de individuos sanos tras 24 horas de estímulo con PHA.

- Se requiere realizar nuevos ensayos *in vitro* aumentando el tiempo de exposición al parásito y el tiempo de estímulo con PHA para poder ver el efecto en moléculas de expresión tardía.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi familia por siempre apoyarme.

A mi asesora Catalina Álvarez Larrotta por su orientación, ayuda y paciencia durante todo este proceso.

A los 6 individuos que participaron como voluntarios.

A la profesora Olga María Agudelo García por su acompañamiento y ayuda en la realización del proyecto.

A mis compañeros y amigos del grupo Salud y Comunidad-Cesar Uribe Piedrahita.

Al proyecto de Colciencias código: 111574454975 contrato N° 712-2016 Universidad de Antioquia por suministrarme los materiales necesarios para la ejecución del proyecto.

A la Escuela de Microbiología por fomentar en sus estudiantes la formación investigativa.

DECLARACIONES

Aspectos éticos

Esta investigación se rige por lo dispuesto por el Ministerio de salud Pública en la Resolución No 008430 de 1993, según el artículo 11 en el literal B de esta resolución esta investigación fue catalogada como una investigación con riesgo mínimo. Los individuos fueron informados acerca de las características generales del estudio, sólo se incluirán en él si aceptan participar voluntariamente.

Consentimiento para publicación

No aplica.

Disponibilidad de datos

Todos los datos generados para este análisis están incluidos y publicados en este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores afirman que no tienen ninguna asociación comercial o de otro tipo que pueda suponer un conflicto de intereses.

Financiación

Proyecto de Colciencias código: 111574454975 contrato N° 712-2016 Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. 2019 [Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%204.pdf>].
2. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la salud. Alerta epidemiológica, aumento de casos de malaria Washington D.C2017 [Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=38148(=es.
3. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. *Malaria Journal*. 2012;11(1):392.
4. Gavina K, Gnidehou S, Arango E, Hamel-Martineau C, Mitran C, Agudelo O, et al. Clinical Outcomes of Submicroscopic Infections and Correlates of Protection of VAR2CSA Antibodies in a Longitudinal Study of Pregnant Women in Colombia. *Infect Immun*. 2018;86(4). 1-14.
5. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Molecular detection of malaria at delivery reveals a high frequency of submicroscopic infections and associated placental damage in pregnant women from northwest Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(1):178-83.
6. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15:486.

7. Agudelo OM, Aristizabal BH, Yanow SK, Arango E, Carmona-Fonseca J, Maestre A. Submicroscopic infection of placenta by *Plasmodium* produces Th1/Th2 cytokine imbalance, inflammation and hypoxia in women from north-west Colombia. *Malaria Journal*. 2014;13(1):122.
8. Ibitokou SA, Boström S, Brutus L, Tuikue Ndam N, Vianou B, Agbowai C, et al. Submicroscopic Infections with *Plasmodium falciparum* during Pregnancy and Their Association with Circulating Cytokine, Chemokine, and Cellular Profiles. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014;21(6):859.
9. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells Correlates with More Rapid Parasite Growth in Human Malaria Infection. *Immunity*. 2005;23(3):287-96.
10. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, Landgraf K, Jagne YJ, Noho-Konteh F, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *European Journal of Immunology*. 2010;40(4):1062-72.
11. González Parias JL, Duque Giraldo VE, Velásquez-Lopera MM. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. 2010;29(2):74-84.
12. Saroj P, Verma M, Jha K, Pal M. An overview on immunomodulation. *J Adv Sci Res*. 2012;3.
13. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁺ Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. *PLOS Pathogens*. 2008;4(2):e1000004.
14. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, et al. Parasite-Dependent Expansion of TNF Receptor II-Positive Regulatory T Cells with Enhanced Suppressive Activity in Adults with Severe Malaria. *PLOS Pathogens*. 2009;5(4):e1000402.
15. Chitsanoor S, Somsri S, Panburana P, Mungthin M, Ubalee R, Emyeam M, et al. A novel in vitro model reveals distinctive modulatory roles of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* on naïve cell-mediated immunity. *Malaria Journal*. 2017;16(1):131.

16. Chen L, Tao L, Li Q, Tao Z-Y, Fang Q, Xia H. [Immune response of purified *Plasmodium falciparum* antigen on human peripheral blood T lymphocytes in vitro]. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*. 2014;26:410-4.
17. Troye-Blomberg M, Andersson G, Stoczkowska M, Shabo R, Romero P, Patarroyo ME, et al. Production of IL 2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to *Plasmodium falciparum* or erythrocyte antigens in vitro. *The Journal of Immunology*. 1985;135(5):3498.
18. Cumberland P, Shulman CE, Chris Maple PA, Bulmer JN, Dorman EK, Kawuondo K, et al. Maternal HIV Infection and Placental Malaria Reduce Transplacental Antibody Transfer and Tetanus Antibody Levels in Newborns in Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(4):550-7.
19. Álvarez-Larrotta C, Agudelo OM, Duque Y, Gavina K, Yanow SK, Maestre A, et al. Submicroscopic *Plasmodium* infection during pregnancy is associated with reduced antibody levels to tetanus toxoid. *Clinical & Experimental Immunology*. 2019;195(1):96-108.
20. Walther B, Miles DJC, Waight P, Palmero MS, Ojuola O, Touray ES, et al. Placental malaria is associated with attenuated CD4 T-cell responses to tuberculin PPD 12 months after BCG vaccination. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12(1):6.
21. Moormann AM, Chelimo K, Sumba PO, Tisch DJ, Rochford R, Kazura JW. Exposure to Holoendemic Malaria Results in Suppression of Epstein-Barr Virus-Specific T Cell Immunosurveillance in Kenyan Children. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(6):799-808.
22. Takem EN, Roca A, Cunningham A. The association between malaria and non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. *Malaria Journal*. 2014;13(1):400.
23. Mooney JP, Barry A, Gonçalves BP, Tiono AB, Awandu SS, Grignard L, et al. Haemolysis and haem oxygenase-1 induction during persistent “asymptomatic” malaria infection in Burkinabé children. *Malaria Journal*. 2018;17(1):253.
24. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 161-7.

25. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends in Parasitology*. 2013;29(1):26-34.
26. Alvarez Larrotta C, Carmona-Fonseca J. Consecuencias de la infección malárica gestacional en la función inmune y en la inmunomodulación de la madre y el neonato. *Revista chilena de infectología*. 2019;36:341-52.
27. Lima G, Levi J, Geraldi M, Sanchez MC, Segurado A, Hristov A, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: Comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106:691-700.
28. Blanquiceth YP, Murillo Gómez Ó, Maestre AE, Corredor M. Detección de casos submicroscópicos de *Plasmodium* spp., utilizando técnicas clásicas y moleculares en pacientes gestantes de Córdoba, Colombia. *Iatreia*. 2014;27:278-89.
29. Movafagh A, Ghanati K, Amani D, Mahdavi S, Hashemi M, Abdolahi D, et al. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*. 2013;4.
30. Mata Espinosa DA, Hernandez Pano R. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapeuticos. *Revista de investigación clinica*. 2008;60(5):421-31.
31. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12:347.
32. Sampaio NG, Cheng L, Eriksson EM. The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. *Malaria Journal*. 2017;16(1):245.
33. Requena P, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Umbers AJ, Wangnapi R, et al. Proinflammatory Responses and Higher IL-10 Production by T Cells Correlate with Protection against Malaria during Pregnancy and Delivery Outcomes. *The Journal of Immunology*. 2015;194(7):3275.
34. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 8 ed 2012.
35. Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M. Plasmodium falciparum–Mediated Induction of Human CD25hiFoxp3hi CD4 T Cells Is Independent

of Direct TCR Stimulation and Requires IL-2, IL-10 and TGF β . PLOS Pathogens. 2009;5(8):e1000543.

36. Wammes LJ, Wiria AE, Toenhake CG, Hamid F, Liu KY, Suryani H, et al. Asymptomatic Plasmodial Infection Is Associated With Increased Tumor Necrosis Factor Receptor II–Expressing Regulatory T Cells and Suppressed Type 2 Immune Responses. The Journal of Infectious Diseases. 2013;207(10):1590-9.