



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ESTUDIO DE INFECCIONES
ASINTOMÁTICAS POR *Plasmodium vivax*
EN LA AMAZONÍA PERUANA A NIVEL
EPIDEMIOLÓGICO Y DE RESPUESTA
INMUNE DE ANTICUERPOS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA VIDA

ELIZABETH MELISA VILLASIS MAYURI

LIMA – PERÚ

2023

ASESORA

Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo

CO ASESORA

Prof. Anna Rosanas-Urgell

JURADO DE TESIS

DRA. MARITZA MERCEDES CALDERON SANCHEZ

PRESIDENTE

DR. KEVIN RICARDO MAISEY MUÑOZ

VOCAL

DR. ELMER ALEJANDRO LLANOS CUENTAS

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi hermosa familia (mis papas Miguel Villasís y Ofelia Mayurí de Villasís, mis hermanas Yackelyn, Karen, Leslie y mis preciosas sobrinas Amanda y Rebecca), a mis asesoras (la Dra. Katherine Torres y Dr. Anna Rosana-Urgell), miembros del jurado de tesis y colaboradores en Perú y en todo el mundo, a mis mentoras y amigas (la Dra. Dionicia Gamboa y la Dra. Katherine Torres), compañeros de Laboratorio y amigos por todo su apoyo en la realización de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios, por darme la vida

E. Villasis agradece el apoyo financiero del Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [08-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales].

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

- Este trabajo fue financiado principalmente por la Beca Fogarty Training Grant - D43TW007120 del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.
- Este trabajo fue también financiado por el Centro de Excelencia de Investigación en Malaria de la Amazonía (ICEMR) U19AI089681, del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.
- E. Villasis reconoce el apoyo financiero del Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [08-2018-FONDECYT/BM-Programas de Doctorados en Áreas Estratégicas y Generales].

ESTUDIO DE INFECCIONES ASINTOMÁTICAS POR Plasmodium vivax EN LA AMAZONÍA PERUANA A NIVEL EPIDEMIOLÓGICO Y DE RESPUESTA INMUNE DE ANTICUERPOS

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.frontiersin.org Fuente de Internet	7%
2	www.mdpi.com Fuente de Internet	3%
3	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
4	repository.uantwerpen.be Fuente de Internet	1%
5	D. Herbert Opi, Liriye Kurtovic, Jo-Anne Chan, Jessica L. Horton, Gaoqian Feng, James G. Beeson. "Multi-functional antibody profiling for malaria vaccine development and evaluation", Expert Review of Vaccines, 2021 Publicación	<1%
6	Lis R. Antonelli, Caroline Junqueira, Joseph M Vinetz, Douglas T. Golenbock, Marcelo U. Ferreira, Ricardo T. Gazzinelli. " The	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN GENERAL	01
I.1. Malaria en el Perú y en el mundo	01
I.2. Biología de <i>P. vivax</i>	02
I.3. Malaria asintomática en la Amazonía	05
I.4. Respuesta inmune a malaria vivax	08
I.5. Seromarcadores para detección de infecciones por <i>P. vivax</i>	10
I.6. Proteínas candidatas a vacunas para <i>P. vivax</i>	13
I.7. Estudios de anticuerpos en individuos infectados con <i>P. vivax</i>	14
I.7.1. Inmunoglobulina M (IgM)	14
I.7.2. Inmunoglobulina G (IgG)	16
I.7.3. Subclases de IgG	18
I.7.4. Ensayos funcionales de anticuerpos en malaria	20
I.7.4.1. Activación del Sistema del Complemento vía anticuerpos en malaria:	22
I.7.4.2. Receptores Fc γ R	24
I.7.4.3. Fagocitosis opsónica	26
I.7.4.4. Inhibición celular dependiente de anticuerpos	26
I.7.4.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	27
I.7.4.6. Inhibición del proceso de invasión del merozoíto vía anticuerpos en <i>P. vivax</i>	28
I.8. Estudios de respuesta de anticuerpos en individuos asintomáticos infectados por <i>P. vivax</i>	30

I.9. Estudios aplicativos del uso de anticuerpos en detección de exposición a infecciones por <i>P. vivax</i> en el Perú	31
I.10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
I.11 JUSTIFICACIÓN	35
I.12. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	41
I.13. HIPÓTESIS	41
I.14. OBJETIVOS:	42
CAPÍTULO 1: Descripción de infecciones asintomáticas por <i>P. vivax</i> en la Amazonía peruana	43
CAPÍTULO 2: Evaluación de PvMSP8 como nuevo seromarcador de infecciones de <i>Plasmodium vivax</i> en la Amazonía peruana	81
CAPÍTULO 3: Caracterización de la función de anticuerpos de individuos infectados con <i>P. vivax</i> en la Amazonía peruana	110
DISCUSIÓN GENERAL	152
CONCLUSIONES	171
LIMITACIONES	174
ESTUDIOS A FUTURO	175
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	177
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

TABLA 1. Funciones de anticuerpos en Malaria	19
--	----

CAPÍTULO 1

TABLA 1. Tabla resumen del número de individuos con seguimientos realizados durante el estudio longitudinal.	56
--	----

TABLA 2. Resultados de la autocorrelación espacial global sobre el número de casos asintomáticos de <i>P. vivax</i> por vivienda	67
--	----

TABLA 3. Resumen de cambio de estatus de individuos Asin a Sin en el transcurso de los 21 días de seguimiento.	70
--	----

CAPÍTULO 2

TABLA 1. Características basales de los participantes del estudio transversal	96
---	----

TABLA 2. Participantes del estudio transversal clasificados por grupos de edad y condición de exposición a <i>P. vivax</i>	98
--	----

CAPÍTULO 3

TABLA 1. Valores de niveles anticuerpos en densidad óptica (DO) obtenidos mediante ELISAs para las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8.	125
--	-----

TABLA 2. Porcentajes de individuos seropositivos mediante ELISAs	128
--	-----

DISCUSIÓN GENERAL

TABLA 1: Resumen de resultados de hallazgos del capítulo 3	162
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i> .	5
FIGURA 2. Respuesta inmune contra la infección por <i>Plasmodium vivax</i>	10
FIGURA 3: Aplicaciones de metodologías de detección de parásitos (microscopía, PDR y PCR) y detección de anticuerpos (MES) en infección por <i>P. vivax</i>	12
FIGURA 4: Proteínas candidatas a vacuna de estadios sanguíneos de <i>P. vivax</i>	14
FIGURA 5. Representación esquemática de mecanismos propuestos mediados por anticuerpos en la inmunidad a estadios sanguíneos de <i>P. falciparum</i>	20
FIGURA 6. Lista de antígenos de merozoítos de <i>P. falciparum</i> que se unen a la proteína de complemento C1q vía anticuerpos y que estuvieron asociadas significativamente con protección contra la malaria clínica en un estudio de cohorte longitudinal de niños de Papua Nueva Guinea.	24
FIGURA 7. Descripción general de la integración de los objetivos descritos en los capítulos de la tesis	40

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Áreas de estudio en la región Loreto, Amazonía peruana.	49
FIGURA 2: Flujograma de trabajo del estudio epidemiológico a partir de la información colectada en los estudios transversales o tamizajes poblacionales	51
FIGURA 3: Esquema resumen de los criterios de inclusión y exclusión para el enrolamiento de individuos Sin, Asin con infección por <i>P. vivax</i> e individuos controles.	56
FIGURA 4. Porcentajes de infecciones por <i>P. vivax</i> según el método de detección y estado clínico	65
FIGURA 5. Resultados más relevantes de la comparación de analitos clínicos bioquímicos y hematológicos de individuos por grupo de estudio	72

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Mapa de las comunidades del estudio transversal	86
FIGURA 2. Evaluación de antigenicidad de proteína PvMSP8.	94

FIGURA 3. Curvas de características operativas del receptor (ROC) validadas de forma cruzada y áreas bajo la curva (AUC) de las respuestas serológicas IgG anti-PvMSP8 para detectar la exposición a infección por *P. vivax* 100

FIGURA 4. Curvas de características operativas del receptor (ROC) validadas de forma cruzada y áreas bajo la curva (AUC) de las respuestas serológicas contra PvMSP8 para detectar la exposición a la malaria por *P. vivax* entre individuos < 15 años y entre aquellos > 15 años. 101

FIGURA 5. Respuestas serológicas contra PvMSP8 en individuos expuestos y no expuestos de las comunidades de Mazán 102

FIGURA 6. Respuesta de anticuerpos IgG anti Pv-MSP8 en individuos Sin, Asin infectados con *P. vivax* y controles de la Amazonía peruana, y seguimientos al tercer y sexto mes post-enrolamiento 104

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Respuesta de anticuerpos IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3 en individuos Sin, Asin infectados con *P. vivax* y controles generados por las proteínas PvMSP8, PvAMA1 y PvRBP2b y correlaciones entre niveles de anticuerpos IgM/IgG e Ig1/IgG3 131

FIGURA 2. Inducción de anticuerpos fijadores de C1q por las proteínas PvMSP8, PvAMA1 y PvRBP2b, y correlación con niveles de anticuerpos anti-C1q con anticuerpos IgM, IgG, IgG1 e IgG3. 134

FIGURA 3. Respuestas de anticuerpos con capacidad de unión a FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa inducidos por las proteínas PvMSP8, PvAMA1, y PvRBP2b y correlación con niveles de anticuerpos IgG y subclases IgG1 e IgG3 en individuos infectados con *P. vivax* de la Amazonía peruana 136

FIGURA 4. Correlación entre niveles de anticuerpos (DO) generados por las proteínas PvAMA1, PvRBP2b, y PvMSP8 y parasitemias en individuos infectados con *P. vivax* de la Amazonía peruana 140

FIGURA 5. Respuesta de anticuerpos IgG contra las proteínas: PfMSP2 (cepa FC27) y PfMSP2 (cepa 3D7), en individuos infectados con *P. vivax* y controles y correlación entre niveles de anticuerpos y parasitemias en individuos infectados. 142

DISCUSIÓN GENERAL

FIGURA 1. Resumen de los principales hallazgos descritos en el Capítulo 1. 156

FIGURA 2. Aportes de la tesis en relación con el modelo de respuesta inmunológica en infecciones por *P. vivax* 169

Lista de abreviaturas

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Ac	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADCI	Inhibición celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Fosfatasa alcalina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina transaminasa
AMA1	Antígeno de la membrana apical 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARP	Proteína rica en asparagina
Asin	Asintomático
AST	Aspartato aminotransferasa
B cell	Célula B
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C1q	Primer componente de la vía clásica de complemento
C3b	Componente del complemento 3 (opsonina)
C5b-9	Complejo de ataque de membrana (MAC)
CBM	Células B de memoria
CD147	Grupo de diferenciación 147 (Basigina)
CD4	Linfocitos CD4
CD71	Grupo de diferenciación 71
CD8	Linfocitos CD8
CD98hc	Cadena pesada de grupo de diferenciación 98
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
CR1	Receptor de Complemento 1
CSP	Proteína de circunsporozoito
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
CyRPA	Antígeno protector rico en cisteína
DAC	Detección Activas de Casos
DARC	Receptor de Antígeno Duffy para Quimiocinas
DBP	Proteína de unión a Duffy
DBP-II	Proteína de unión a Duffy II
DC	Célula dendrítica
DIRESA	Dirección Regional de Salud de Loreto
DPC	Detección Pasiva de Casos
EBA	Antígeno de unión a eritrocito
EBA-140RII	Antígeno de unión a eritrocito 140, región II
EBA-175	Antígeno de unión a eritrocito 175
EBA175RII	Antígeno de unión a eritrocito 175, región II
EBA175RII-V	Antígeno de unión a eritrocito 175, región II-V

EBA-181	Antígeno de unión a eritrocito 181
EBP-2/EBPII	proteínas de unión a eritrocito 2
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISAs	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
ETRAMP	Proteína de membrana de transcripción temprana
ETRAMP	Proteína de membrana transcrita tempranamente
Fc	Cadena pesada de Inmunoglobulina o fragmento cristalizante
FcR	Receptores de la cadena constante de anticuerpos
Fc γ R	Receptores de cadena pesada de anticuerpos gamma
Fc γ RI	Receptor de cadena pesada de anticuerpo gamma I
Fc γ RIIa	Receptor de cadena pesada de anticuerpo gamma IIa
Fc γ RIIb	Inhibidor de receptor Fc γ R
Fc γ RIIc	Receptor de cadena pesada de anticuerpo gamma IIc
Fc γ RIIIa	Receptor de cadena pesada de anticuerpo gamma IIIa
Fc γ RIIIb	Receptor de cadena pesada de anticuerpo gamma IIIb
GAMA	Antígeno micronemal anclado a GPI
GIA	Ensayos de inhibición del crecimiento de parásitos
GPB	Glicoforina B
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
IAP	Infección Asintomática Plasmodial
ICEMR	Centro de Excelencia de Investigación en Malaria de la Amazonía
IFN-gamma/IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Inmunoglobulina G subclase 1
IgG3	Inmunoglobulina G subclase 3
IgM	Inmunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-21	Interleucina 21
IL-6	Interleucina 6
MAC	Complejo de ataque de membrana
MAELB	Proteína de unión a eritrocitos adhesiva de merozoíto
MES	Marcador de exposición serológica
MINSA	Ministerio Salud del Perú
MRO	Oxígeno reactivo mitocondrial
MSP-1	Proteína de superficie del merozoíto 1
MSP-10	Proteína de superficie del merozoíto 10
MSP-11	Proteína de superficie del merozoíto 11

MSP-1 ₁₉	Fragmento de 19kDa de la proteína de superficie del merozoíto 1
MSP1-42	Proteína de superficie del merozoíto 1
MSP-3	Proteína de superficie del merozoíto 3
MSP3.10	Proteína de superficie del merozoíto 3.10
MSP3b	Proteína de superficie del merozoíto 3b
MSP3 α	Proteína de superficie del merozoíto 3 alfa
MSP4	Proteína de superficie del merozoíto 4
MSP-4	Proteína de superficie del merozoíto 4
MSP-5	Proteína de superficie del merozoíto 5
MSP-6	Proteína de superficie del merozoíto 6
MSP-7	Proteína de superficie del merozoíto 7
MSP-9	Proteína de superficie del merozoíto 9
MSPDBL1	Ligando de unión duffy de proteína de superficie de merozoíto 1
n	Tamaño muestral
NK	Células asesinas naturales
OMS	Organización mundial de la salud
P12	Proteína de superficie de <i>P. vivax</i> 12
P41	Proteína de <i>P. vivax</i> 41
Par/par	Parasitemia
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PDR	Prueba de diagnóstico rápido
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pf113	Proteína de superficie P113 de <i>P. falciparum</i>
PfEMP1	Proteína de membrana de eritrocitos 1 de <i>P. falciparum</i>
PfGLURP	Proteína rica en glutamato de <i>P. falciparum</i>
PfMSP-2/ PfMSP2	Proteína de superficie de merozoíto 2 de <i>P. falciparum</i>
PfSERP	Proteína rica en serina de <i>P. falciparum</i>
PNCM	Programas Nacionales de Control de la Malaria
PNG	Papúa Nueva Guinea
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
Pv50	Proteína de <i>P. vivax</i> de 50 kDa
PvAMA1/ PvAMA-1	Antígeno de membrana apical de <i>P. vivax</i>
PvDBPSal1	Proteína de unión Duffy, región 2, cepa Sal1 <i>P. vivax</i>
PvEBP	Proteínas de unión a eritrocitos de <i>P. vivax</i>
PvMSP	Proteínas de superficie del merozoíto de <i>P. vivax</i>
PvMSP8/ PvMSP-8	Proteína de superficie de merozoíto 8 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg_2	Antígeno rico en triptófano 2 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg_28	Antígeno rico en triptófano 28 de <i>P. vivax</i>

PvTRAg22	Antígeno rico en triptófano 22 de <i>P. vivax</i>
PVTRAg26.3	Antígeno rico en triptófano 22.3 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg33.5	Antígeno rico en triptófano 33.5 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg34	Antígeno rico en triptófano 34 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg35.2	Antígeno rico en triptófano 35.2 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg36	Antígeno rico en triptófano 36 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg38	Antígeno rico en triptófano 38 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg40	Antígeno rico en triptófano 40 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg69.4	Antígeno rico en triptófano 69.4 de <i>P. vivax</i>
PvTRAg74	Antígeno rico en triptófano 74 de <i>P. vivax</i>
PvTRAgS	Antígenos ricos en triptófano de <i>P. vivax</i>
qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real
RALP1	Proteína tipo cremallera de leucina 1 asociada a rofria
RAMA	Antígeno de membrana asociado a rotfria
RANTES	Ligando 5 de quimiocina (motivo C-C)
RBP	Proteína de unión a reticulocitos
RBP1a	Proteína de unión a reticulocitos 1a
RBP1b,	Proteína de unión a reticulocitos 1b
RBP2a	Proteína de unión a reticulocito a
RBP2b	Proteína de unión a reticulocito 2b
RBP2c	Proteínas de unión a reticulocitos 2c
RBP2cNB	Proteína de unión a reticulocitos 2c sin dominio de unión a eritrocito
RBP2P1	Proteína de unión a reticulocito 2-P1
RBP2-P2	Proteína de unión a reticulocito 2 (aa 161–641)
RBSA	Antígeno de superficie de unión a reticulocitos
Rh1	Proteína homóloga de reticulocito 1
Rh2	Proteína homóloga de reticulocito 2
Rh2a	Proteína homóloga de reticulocito 2a
Rh2b	Proteína homóloga de reticulocito 2b
Rh4	Proteína homóloga de reticulocito 4
Rh5	Proteína homóloga de reticulocito 5
RIFIN	Familia intercalada de polipéptidos
Ripr	Proteína de interacción con proteína de unión a reticulocitos homólogo 5
RON2	Proteína del cuello de la rotfria 2
RON4	Proteína del cuello de la rotfria 4
RON5	Proteína del cuello de la rotfria 5
RTS, S	Vacuna aprobada por la OMS contra infección por <i>P. falciparum</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Sin	Sintomático

SOD	Superóxido dismutasa
Tfh	Células T foliculares Helper
TfR1	Receptor de transferrina 1
TIM-3	Inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina-3
TMB	3,3',5,5'- tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP	Tamizaje poblacional
Treg	Células T regulatorias
VCM	Volumen corpuscular medio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIR	Proteínas variantes intercaladas
WGCF	Producción de proteínas, sin células, basado en germen de trigo

RESUMEN

Este estudio parte de la hipótesis de que individuos asintomáticos (Asin) infectados con *P. vivax* (Pv) de la Amazonía peruana presentan diferentes características epidemiológicas, clínicas y una respuesta inmune adaptativa diferente a nivel de anticuerpos, predictivas de inmunidad clínica en comparación con individuos sintomáticos (Sin). En total se enrolaron 29 individuos Asin y 49 individuos Sin con infección por Pv, a partir de 11 estudios transversales realizados en 13 comunidades de la Amazonía peruana y colección pasiva en 6 centros de salud de la ciudad de Iquitos (2018-2021). Las características de estos individuos fueron comparadas con 30 individuos controles sanos (no infectados), residentes de la ciudad Amazónica de Iquitos. Se observaron niveles mayores de eosinófilos y menores niveles de hemoglobina en individuos Asin. Los anticuerpos IgG anti-PvMSP8 demostraron ser un buen seromarcador para detección de infección reciente por Pv a nivel poblacional en la Amazonía peruana. Se evaluó el rol funcional de anticuerpos inducidos por las proteínas de merozoíto de Pv (PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8). Los resultados demostraron una alta proporción de individuos Asin con altos niveles de anticuerpos IgG3 anti-PvMSP8 y anti-PvAMA1, en comparación a individuos Sin. Los individuos infectados con Pv demostraron niveles más altos de anticuerpos IgM, IgG, IgG1, IgG3 y anticuerpos funcionales capaces de promover la activación de la vía clásica de complemento y unión a receptores Fcγ para la mayoría de las proteínas evaluadas, en comparación con individuos controles.

Palabras claves: asintomática, infección, *P. vivax*, anticuerpos, PvMSP8

ABSTRACT

This study is based on the hypothesis that asymptomatic individuals (Asym) infected with *P. vivax* (Pv) from the Peruvian Amazon present different epidemiological and clinical characteristics and a different adaptive immune response at the antibody level, predictive of clinical immunity compared to individuals symptomatic (Sym). In total, 29 Asym individuals and 49 Sym individuals with Pv infection were enrolled, from 11 cross-sectional studies carried out in 13 communities in the Peruvian Amazon and passive collection in 6 health centers in Iquitos city (2018-2021). The characteristics of these individuals were compared with 30 healthy control individuals (not infected), residents of the Amazonian city of Iquitos. Higher levels of eosinophils and lower levels of haemoglobin were observed in Asym individuals. IgG anti-PvMSP8 antibodies demonstrated to be a good seromarker for detecting recent Pv infection at the population level in the Peruvian Amazon. Finally, the functional role of antibodies induced by proteins representative of the merozoite stage of Pv (PvAMA1, PvRBP2b and PvMSP8) was evaluated in individuals with Pv infection. The results demonstrated a high proportion of Asym individuals with high levels of anti-PvMSP8 and anti-PvAMA1 IgG3 antibodies, compared to Sym individuals. Sym and Asym individuals demonstrated higher levels of IgM, IgG, IgG1, IgG3 and functional antibodies capable of promoting the activation of the classical complement pathway and binding to Fcγ receptors for most of the proteins evaluated, compared to controls individuals.

Keywords: asymptomatic, infection, *P. vivax*, antibodies, PvMSP8

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Malaria en el Perú y en el mundo

P. vivax (Pv) es el parásito predominante en las Américas y representó el 72% de los casos de malaria en este continente para el año 2022 (1). Es la segunda causa más frecuente de malaria en todo el mundo y la principal causa de malaria fuera de África. La enfermedad clínica por malaria vivax puede ser debilitante e impone importantes impactos económicos y de salud en las poblaciones afectadas. La biología única de Pv y el progreso limitado en el desarrollo de experimentos y herramientas de investigación, ha dificultado por décadas el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas contra este parásito (2). Además, existen informes crecientes sobre casos complicados, de gravedad clínica y letales de malaria vivax que desafían la percepción de la malaria vivax como benigna (3).

Para el 2023, en Perú, se reportaron 22,363 casos de malaria, el 85% debido a Pv y el 15% debido a *P. falciparum* (Pf). El 98% de los casos de malaria estuvieron concentrados en las regiones de Loreto y Amazonas (4). La transmisión de la malaria, en la Amazonía peruana, es perenne y caracterizada por incrementos estacionales y epidémicos de casos clínicos detectados mediante Detección Pasiva de Casos (DPC), en la mayoría de las zonas endémicas. Las personas más afectadas viven en zonas periurbanas empobrecidas y pueblos rurales escasamente distribuidos a lo largo de las redes fluviales asociadas como afluentes del Río Amazonas (5,6). También se reportan casos esporádicos en la costa norte del

Pacífico, en la selva alta, central y en Madre de Dios, donde la intensidad de transmisión es baja, sumando el 2% del total de casos de malaria reportados en el Perú hasta el año pasado. *Anopheles darlingi* sigue siendo el vector de malaria más extendido en la Amazonía, incluyendo Perú (6).

I.2. Biología de *P. vivax*

Como todos los parásitos del género Plasmodium, *P. vivax* se desarrolla a través de un ciclo de vida complejo que involucra a dos huéspedes: el mosquito *Anopheles* hembra y un huésped humano (Figura 1). Cuando el mosquito pica a una persona, los esporozoítos que residen en las glándulas salivales se inyectan en la piel humana. Los esporozoítos penetran en los vasos sanguíneos dérmicos y son transportados al hígado a través de la circulación sanguínea, donde infectan a los hepatocitos (2).

En los hepatocitos, los parásitos se multiplican asexualmente (replicación mitótica) y se diferencian durante un período de 7 a 9 días en esquizontes hepáticos que al madurar y romperse liberan miles de merozoítos al torrente sanguíneo. Alternativamente, *P. vivax* y *P. ovale* pueden formar estadíos latentes (hipnozoítos) en el hígado, los cuales son estadíos de larga duración que pueden causar infecciones recurrentes (recaídas) semanas, meses o incluso años después de la infección (2). Múltiples estudios han demostrado que la mayoría de los episodios de recaída son causados por una población de parásitos distinta de la infección primaria (7,8).

Cuando los esquizontes hepáticos se rompen, sus merozoítos se liberan en la circulación sanguínea periférica, donde invaden glóbulos rojos inmaduros,

denominados reticulocitos. Esto marca el comienzo del ciclo eritrocitario o del estadio sanguíneo durante el cual aparecen los síntomas de la malaria. El parásito madura en un período de 48 horas desde un trofozoíto inmaduro (conocido como "etapa de anillo" según su morfología), hasta convertirse en un trofozoíto y luego se multiplica asexualmente para convertirse en un esquizonte. En comparación con Pf, los parásitos Pv adoptan una forma más ameboidea, aumentan la deformabilidad y el tamaño de sus células huésped, y se visibilizan los gránulos de Schüffner en tinción con Giemsa. Estos últimos están asociados con complejos caveola-vesícula específicos, cuya función aún se desconoce (9). La deformabilidad de los reticulocitos infectados por Pv ayuda a evitar su eliminación en el bazo (10). Por el contrario, los glóbulos rojos infectados por Pf se vuelven más rígidos durante la maduración del parásito, pero son secuestrados a través de la citoadhesión (glóbulos rojos infectados se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos) y la formación de rosetas (unión de glóbulos rojos infectados a glóbulos rojos no infectados) para evitar la eliminación en el bazo. Pv también utiliza la formación de rosetas, pero rara vez se observa citoadhesión (11,12). Finalmente, los reticulocitos infectados con esquizontes estallan y los merozoítos son liberados a la circulación sanguínea, donde invadirán nuevamente reticulocitos e iniciarán un nuevo ciclo eritrocitario. Mientras que los parásitos Pf pueden infectar glóbulos rojos de todas las edades, los parásitos de Pv invaden exclusivamente reticulocitos, prefiriendo a los reticulocitos más jóvenes con alta expresión superficial de CD71 (transferrina) (13).

En cada ciclo eritrocitario, una proporción de parásitos está preprogramada para convertirse en los llamados esquizontes comprometidos sexualmente. Después de

la invasión, los merozoítos de esos esquizontes comprometidos sexualmente se convierten en gametocitos (estadíos asexuales). Aunque no se conoce el tiempo y la ubicación exactos de la maduración de los gametocitos de Pv, se pueden observar gametocitos maduros de Pv en el torrente sanguíneo, después de 2 o 3 días de la aparición de los estadíos asexuales, en contraste, la maduración de los gametocitos de Pf tarda de 10 a 12 días y ocurre en la médula ósea (14,15). Los gametocitos son las únicas etapas que pueden infectar a los mosquitos Anopheles después de una ingesta de sangre y, por lo tanto, son esenciales para la transmisión.

En el epitelio del intestino medio del mosquito, los gametocitos masculinos y femeninos se desarrollan en micro y macrogametos y se fusionan para formar un cigoto diploide. Este es el único momento en que se produce la recombinación sexual, lo que permite el intercambio de material genético. Se genera diversidad genética adicional si los gametos fusionados se originan de dos cepas diferentes (ingeridos de 2 huéspedes infectados diferentes o de 1 huésped con una infección policlonal). El cigoto se diferencia en un ooquinetto móvil, que se mueve a través del epitelio del intestino medio y luego se transforma en un oocisto inmóvil. La replicación esporogónica asexual da como resultado miles de esporozoitos haploides infecciosos que migran a las glándulas salivales, listos para ser transmitidos a un nuevo huésped humano durante la picadura de un mosquito (16,17) (Figura 1).

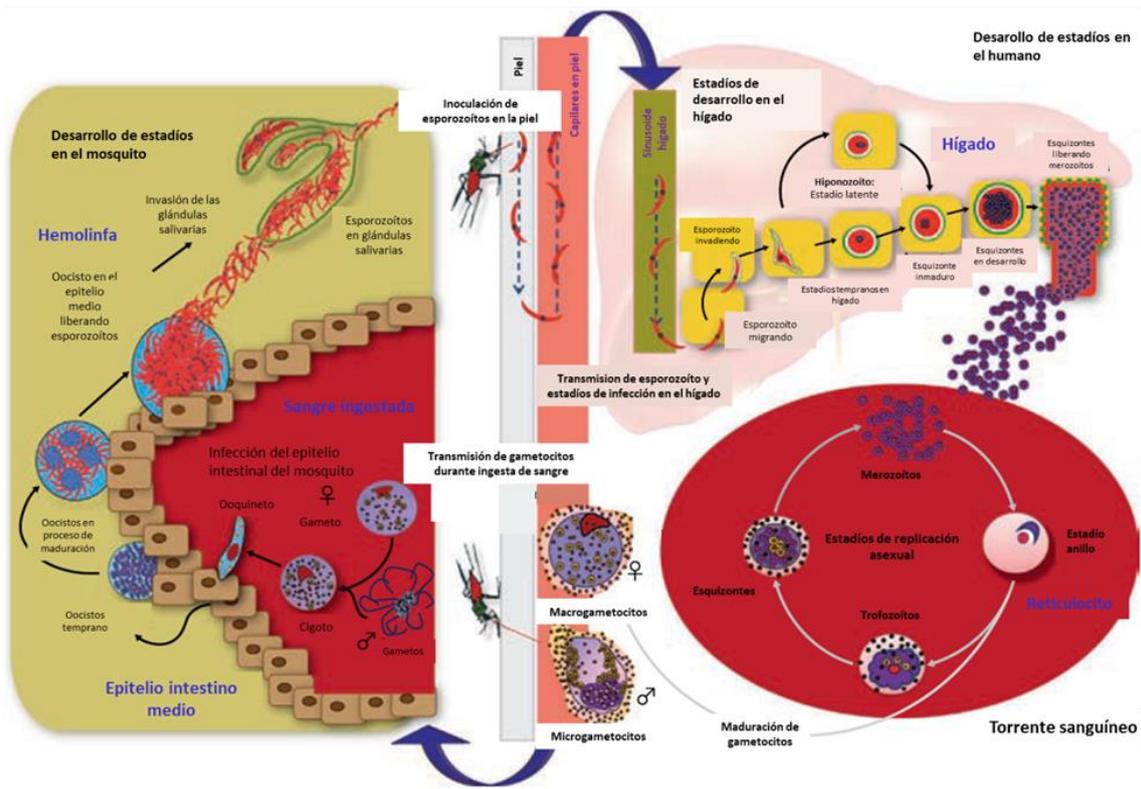


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*. Adaptado de (16).

I.3. Malaria asintomática en la Amazonía:

En Perú y Brasil, independientemente de las características geográficas y sociodemográficas de las locaciones de estudio, se ha encontrado una alta prevalencia (58.5% a 92.6%) de infecciones asintomáticas por *P. vivax* (17). Este hallazgo desafía la creencia tradicional predominante hasta la década de 1990 que las poblaciones expuestas en zonas hipoendémicas rara vez desarrollaban inmunidad clínica (18).

Consistentemente se han encontrado que las infecciones asintomáticas en la Amazonía son submicroscópicas o de muy baja parasitemia (más del 50% de las infecciones tienen < 10 parásitos/ μ L) y se distribuyen heterogéneamente en las

comunidades peruanas. Estas características hacen que las infecciones asintomáticas pasen desapercibidas durante las actividades de detección activa de casos (DAC) realizadas por el Ministerio Salud del Perú (MINSA), las cuales usan como herramienta principal de diagnóstico a la microscopía (17,19).

Este tipo de infecciones y parasitemias está determinada por muchos factores, que incluyen edad, tiempo vivido en la comunidad y actividades ocupacionales que requieren movilidad a través de áreas endémicas (17,19). Resultados de la aplicación de estas variables en modelos de infección matemáticos, han llevado a investigadores a proponer que existen grupos de individuos con alta incidencia que experimentan suficientes infecciones repetidas para desarrollar inmunidad clínica y constituir un reservorio parasitario asintomático (20).

Aunque la mayoría de los portadores parcialmente inmunes albergan bajas cargas de parásitos (submicroscópicas), un porcentaje pequeño (2.5%) pueden infectar mosquitos (21,22). A la fecha la relación entre la transmisión de malaria en contexto hipoendémicos con la de inmunidad adquirida y enfermedad permanece incierta (23).

Aunque no existe una definición estándar de Infección Asintomática Plasmodial (IAP), los individuos con IAP albergan el parásito y no desarrollan síntomas durante un período de tiempo definido, el cual puede variar de acuerdo a contexto endémico tipo de hospedero y aún es motivo de investigación (24). La IAP puede atribuirse a varios factores, incluidos diferencias entre los parásitos de *Plasmodium spp.* y mecanismos protectores del huésped. La respuesta inmune en IAP a menudo se describe como resistencia a la enfermedad, asociada a una reducción en la carga

parasitaria y protección que reduce el daño tisular e inmunopatología relacionada con infección palúdica (25). Por el contrario, algunas personas pueden controlar la manifestación de la enfermedad a pesar de presentar una alta parasitemia; este fenómeno se describe como tolerancia a la enfermedad (25). La inmunidad a la malaria no necesariamente previene la infección; sin embargo, limita la densidad del parásito y la aparición de síntomas. Los individuos con IAP pueden permanecer infectados por largos períodos, pueden desarrollar enfermedad sintomática si tienen una respuesta inmune desregulada o pueden eliminar al parásito espontáneamente luego de periodo de tiempo (26,27). Está claro que IAP genera una respuesta inmune subyacente, no obstante, las respuestas inmunes en los individuos asintomáticos aún necesitan ser investigadas (28).

Las infecciones asintomáticas en malaria conllevan riesgos para la salud de la persona infectada, incluyendo: anemia crónica, aumento de los riesgos de mortalidad materna y neonatal, deterioro de la competencia inmunológica que resulta en coinfecciones con enfermedades bacterianas invasivas y deterioro cognitivo (29,30). Los portadores asintomáticos también pueden causar malaria importada y malaria por transfusión o trasplante de órganos (31). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de entender la respuesta inmune en individuos asintomáticos con infección por Pv para su mejor control y/o eliminación y elucidar el modelo fisiopatológico de infecciones asintomáticas causadas por enfermedades infecciosas.

I.4. Respuesta inmune a malaria vivax

Un número pequeño de esporozoitos puede inducir una respuesta proinflamatoria fuerte de interferón tipo I, que se cree que es impulsada por la detección del ARN del parásito. La inducción de células gamma-delta contribuyen al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa a estos estadíos. Por el contrario, los parásitos en etapa sanguínea pueden inducir una fuerte respuesta proinflamatoria, que a la vez será contrarrestada por mecanismos reguladores. Los parásitos intactos son detectados relativamente débilmente por células del sistema inmune innato, mientras que las, moléculas aisladas del parásito (en particular ADN y ARN), pueden inducir respuestas inmune innatas fuertes. Por lo tanto, la respuesta inmune innata a Plasmodium representa una compensación entre respuestas proinflamatorias fuertes que pueden potenciar la inmunidad y procesos reguladores que protegen al huésped de las tormentas de citoquinas que pueden inducir a una enfermedad potencialmente mortal (32).

La inmunidad a Pv no es esterilizante y brinda protección a corto plazo, por tanto, los individuos a menudo se vuelven a infectar. Los pacientes expuestos repetidamente al parásito pueden desarrollar inmunidad, pero esta protección solo es parcial, y puede perderse en áreas de baja transmisión. Los individuos que dejan de vivir en entornos endémicos pierden rápidamente memoria inmunológica a nivel de células T y B, lo que sugiere que la exposición continua a los antígenos de Plasmodium es necesaria para la inducción de memoria de células efectoras y su mantenimiento (33).

La activación de las células del sistema inmune innato y las respuestas proinflamatorias son importantes para promover el desarrollo de la respuesta inmune adquirida (34). La respuesta inmunidad adquirida, particularmente la generación de anticuerpos es crítica para controlar la replicación del parásito durante la infección. La inmunidad adquirida naturalmente en individuos de áreas endémicas se cree que está mediada principalmente por anticuerpos específicos para cada estadio sanguíneo. Las respuestas proinflamatorias provocadas durante la infección aguda de glóbulos rojos parasitados son pronunciadas, lo que conduce a una fuerte activación de las células como linfocitos T CD4+, T CD8+ y B. Existen mecanismos reguladores que se activan en las primeras etapas de la infección y pueden limitar la capacidad de las respuestas inmunitarias para controlar la carga parasitaria (33).

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que subyacen a la falla de la respuesta inmunitaria del huésped para evitar que las personas previamente expuestas se vuelvan a infectar con Pv puede proporcionar descubrimientos importantes. Una proporción significativa de estos individuos infectados por *P. vivax* presentan parasitemias submicroscópicas y permanecen asintomáticos durante períodos prolongados. Una hipótesis alternativa para explicar la malaria asintomática es que la inmunidad adquirida previene el crecimiento del parásito por encima de un umbral inflamatorio. Comprender mejor los mecanismos principales que mantienen la parasitemia submicroscópica en individuos asintomáticos y por qué, en algunos individuos, el sistema inmunológico no puede eliminar completamente el parásito puede proporcionar pistas importantes sobre los mecanismos de resistencia a la infección mediados por el sistema inmunológico y

para el diseño una vacuna eficaz para malaria vivax (33). La Figura 2, representa los últimos descubrimientos a la fecha sobre la respuesta inmune en infecciones por *P. vivax* (23)

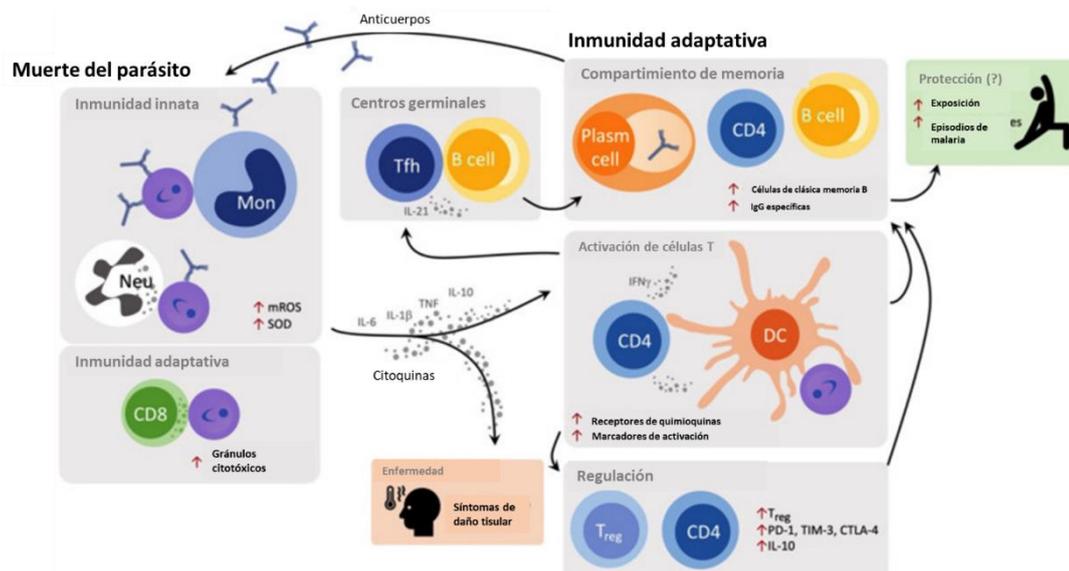


FIGURA 2. Respuesta inmune contra la infección por *Plasmodium vivax*. Los monocitos (Mon), los neutrófilos (Neu) y las células T CD8+ median la destrucción de parásitos a través de la producción de especies de oxígeno reactivo mitocondrial (MRO), superóxido dismutasa (SOD) y gránulos citotóxicos, respectivamente. La destrucción de parásitos vía monocito depende de los anticuerpos. Las citoquinas producidas vía respuesta inmune innata actúan sobre las células del sistema inmune adaptativo, configurando las funciones efectoras de las células CD4+ T helper y Treg. La carga de parásitos y las citoquinas se asocian con síntomas y desencadenan la expresión de quimioquinas, receptores de quimioquinas y activación de moléculas inhibitorias. La producción de IFN-gamma probablemente se ve afectada por este entorno. IL-21 también es inducida por la infección por Pv, lo que lleva a la expansión de células T foliculares Helper (Tfh) y está asociada con la producción de anticuerpos por las células plasmáticas (Plasm cell). El número de episodios de malaria se asocia con mayores frecuencias de células Tfh y células B clásicas de memoria (B cell), probablemente mediando la protección. Adaptado de (23).

I.5. Seromarcadores para detección de infecciones por *P. vivax*

La tasa de reducción de la prevalencia de *P. falciparum* (Pf) se ha estancado desde 2014 y desde 2012 para Pv (35). En áreas donde Pf y Pv son co-endémicos, hay evidencia de que la proporción de casos de Pv aumenta a medida que disminuye el número total de infecciones por malaria falciparum (36,37). Esto pone de relieve que se requieren enfoques novedosos para disminuir el número de casos de

infecciones por Pv, especialmente en contexto co-endémicos. Las herramientas serológicas pueden ofrecer información adicional sobre la intensidad de la transmisión complementando la información obtenida por metodologías entomológicas y de detección parasitológica (microscopía, métodos de detección molecular y pruebas de diagnóstico rápido (PDR)), especialmente a medida que disminuyen los niveles de transmisión o se enfrenta a malaria residual (38).

P. falciparum expresa más de 5000 genes que codifican proteínas. El transcriptoma y proteoma de Pv está menos definido debido a la dificultad de cultivar Pv *in vitro* por periodos prolongados, pero se espera que tenga un número similar de proteínas expresadas a lo largo de su ciclo de vida. Muchas de las proteínas expresadas en el ciclo de vida de Pv son capaces de generar respuestas de anticuerpos adquiridas naturalmente (seromarcadores) que pueden ser detectados en el huésped durante meses o incluso años después de que las infecciones parasitarias se han eliminado de la sangre, lo que permite capturar el historial de exposición a infección por Pv del individuo (38).

Dependiendo de la longevidad de la respuesta de anticuerpos a proteínas específicas (los marcadores serológicos (MES) o seromarcadores), pueden usarse para detectar exposición reciente a infecciones y, reflejar cambios a largo plazo en la intensidad de la transmisión. Los anticuerpos de vida corta pueden reflejar exposición reciente a infecciones, mientras que los anticuerpos de larga duración probablemente reflejen cambios de transmisión a largo plazo o exposición de por vida (Figura 3) (38,39).

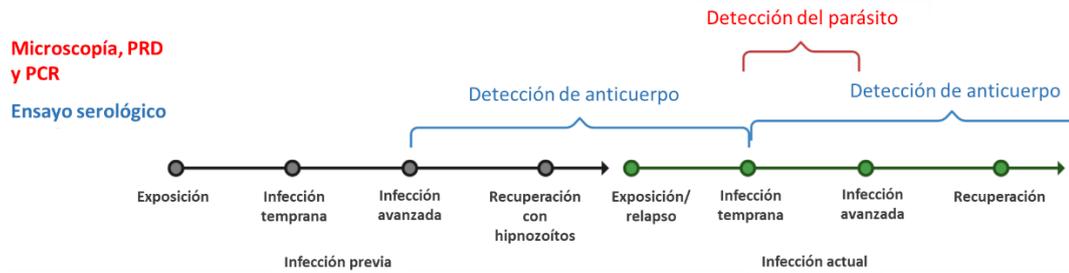


FIGURA 3: Aplicaciones de metodologías de detección de parásitos (microscopía, PDR y PCR) y detección de anticuerpos (MES) en infección por *P. vivax*. La microscopía, PDR y PCR solo capturan parásitos de Pv en estadios sanguíneos en el momento de la toma de muestra de individuos infectados y no pueden detectar hipnozoítos. Los estudios serológicos que usan MES, cuidadosamente diseñados, pueden detectar anticuerpos adquiridos después de infecciones por Pv, que pueden reflejar exposición a infecciones pasadas y actuales. Los anticuerpos generados debido a una infección pueden permanecer en el plasma después de que los parásitos se eliminan de la sangre por tratamiento antimalárico. Las personas que estaban previamente infectadas, pero que no recibieron tratamiento, tienen más probabilidades de tener hipnozoítos y sufrir recaídas. Al identificar a estos individuos, se les puede administrar tratamiento (seroTAT), y de esta forma eliminar la transmisión. Adaptado de (38).

Por tanto, los estudios serológicos son importantes para: a) comprender sobre la longevidad de anticuerpos después de una infección y b) medir anticuerpos contra más de un antígeno para informar con precisión sobre la exposición y/o el estado inmunitario de las poblaciones (38).

La mayoría de los estudios serológicos en malaria han evaluado los anticuerpos contra los antígenos del estadio sanguíneo del parásito, ya que este estadio es fácilmente reconocible por el sistema inmunológico humano. Las familias de proteínas importantes del estadio sanguíneo de Pv incluyen a la proteína de unión a Duffy (DBP), las proteínas de unión a reticulocitos de Pv (RBP), las proteínas de unión a eritrocitos (EBP), las proteínas de superficie del merozoíto (MSP), antígenos ricos en triptófano (TRAGs) y proteínas variantes intercaladas repetidas (VIR). Todas estas proteínas se expresan en los merozoítos y juegan roles en la

invasión a los glóbulos rojos y reticulocitos (revisado (40)). Otra proteína de gran interés es el antígeno de la membrana apical 1 (AMA1), expresada en los orgánulos apicales de estadios sanguíneo-asexuales y conservada en todas las especies de Plasmodium. PvAMA1 es una proteína clave en el proceso de invasión del merozoíto de Pv a los glóbulos rojos (38,41) .

I.6. Proteínas candidatas a vacunas para *P. vivax*

La patología de las infecciones por Pv depende en gran medida de la capacidad del parásito para reconocer e invadir los eritrocitos/reticulocitos, un proceso complejo que depende de una serie de interacciones ligando-receptor altamente específicas y en secuencia entre las proteínas de los merozoítos y las proteínas de la superficie de la célula huésped. Hasta ahora, las vacunas para el estadio sanguíneo se han centrado en inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes contra ligandos de invasión del parásito y bloquear las interacciones con los receptores de la célula huésped, previniendo así la invasión, su crecimiento y la enfermedad clínica. Además de esto, una vacuna de estadio sanguíneo tiene el potencial de reducir la gametocitemia en el huésped e indirectamente reducir la transmisión (42).

A la fecha, los principales candidatos a vacunas también son estudiados como seromarcadores de exposición a infección por Pv, entre ellos: la proteína de unión a Duffy II (PvDBP-II), que interactúa con el receptor de membrana de glóbulos rojos Duffy o DARC; el antígeno de membrana apical-1 (PvAMA1); la proteína de unión a reticulocito 2b (PvRBP2b) que interactúa con el receptor de transferrina 1 o CD78 (TfR1), más abundante en la membrana de reticulocitos; y las principales proteínas de superficie de merozoíto (MSP), que incluyen MSP-1, MSP-3, y MSP-

9 (Figura 4). De estos antígenos, MSP-1 y DBP han recibido la mayor atención, pero solo DBP ha avanzado a ensayos clínicos de Fase Ia (revisado en (43)). En la sección I.7.4.6. Inhibición del proceso de invasión del merozoíto vía anticuerpos en *P. vivax* se discutirá en más detalle estas proteínas.

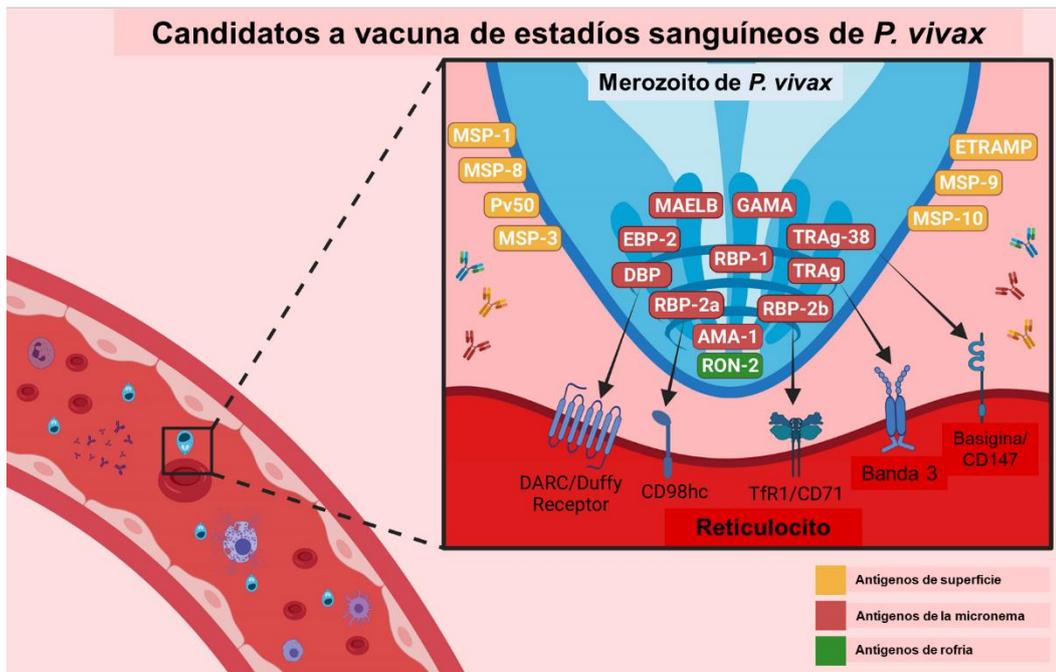


FIGURA 4: Proteínas candidatas a vacuna de estadios sanguíneos de *P. vivax*. Los principales candidatos son PvDBP-II (que interactúa con el receptor DARC/Duffy), PvRBP-2b (interactúan con el receptor Tfr1/CD78), PvAMA-1 y la familia PvMSP, intervienen en el proceso de invasión. Otros se han descrito recientemente, como GAMA, PvTRAg (TRAg-38 interactúa con el receptor Banda 3 y Basigina/CD147), MAELB, ETRAMP, RON2 y EBP-2. Proteínas que se expresan en la superficie (amarillo), micronemas (rojo) o rotfrías (verde) del parásito. Los anticuerpos contra estas proteínas (representadas con “forma de Y” en la figura) podrían inhibir la interacción con los receptores de los reticulocitos/eritrocitos, reduciendo la parasitemia y previniendo los síntomas de la enfermedad. Adaptado de (43)

I.7. Estudios de anticuerpos en individuos infectados con *P. vivax*:

I.7.1. Inmunoglobulina M (IgM)

El rol de los anticuerpos IgM frente a infección por malaria ha sido menos estudiado que el rol de IgG o subclases IgG y se sabe mucho menos sobre la dinámica de

adquisición, duración en el tiempo y la función protectora de los mismos frente a esta enfermedad. La opinión general de la respuesta de anticuerpos IgM es que esta se induce temprano tras una infección (en menos de 15 días), los niveles de anticuerpos IgM decaen rápidamente y luego son "reemplazados" por anticuerpos tipo IgG. Este modelo se han observado en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa de humanos a infecciones por Dengue (44), Virus del Oeste del Nilo (45), y VIH (46), entre otros. Sin embargo, esta dinámica difiere en infecciones naturales de Pf (47)

Recientemente Boyle et al., evaluaron la adquisición, mantenimiento y duración post-infección de anticuerpos IgM específicos a proteínas del estadio de merozoito de Pf. La respuesta IgM fue evaluada en participantes de estudios cohorte, incluidos adultos y niños, de diferentes áreas endémicas y en participantes de ensayos clínicos en fase experimental para evaluación de candidatos a vacuna de estadios sanguíneos de Pf. Los resultados del estudio evidenciaron que la respuesta de anticuerpos IgM específica a proteínas del merozoíto de Pf es rápidamente inducida después de una infección primaria por Pf en adultos sin antecedentes de malaria, y que esta respuesta es capaz de ser mantenida durante el proceso de infección en niños y adultos con historial de infecciones previas de áreas endémicas de Malasia y Papúa Nueva Guinea (PNG). Además, la respuesta IgM puede mantenerse en ausencia de reinfección, aumentar con la edad, y estuvo asociada a protección contra la enfermedad en una cohorte longitudinal de niños expuestos a infecciones naturales (47). También se demostró que los anticuerpos IgM pueden inhibir la invasión de merozoítos de Pf a los glóbulos rojos vía fijación y activación de proteínas del sistema de complemento (47). A la fecha, son pocos los estudios de respuesta IgM

en infecciones por Pv, sin embargo demuestran que dependiendo del antígeno las respuestas IgM en infecciones por Pv son comparables a las de anticuerpos IgG y que los anticuerpos IgM pueden ser mantenidos en el tiempo tras una infección (48–52).

1.7.2. Inmunoglobulina G (IgG)

Se considera que estos anticuerpos proporcionan lo que se conoce como "inmunidad naturalmente adquirida" a malaria. Este argumento se basa en un estudio realizado en 1961 que demostró que la transferencia de sueros de adultos inmunes a infección por Pf a niños, los protegía de enfermedad clínica (53,54). Numerosos estudios inmuno-epidemiológicos demuestran que niveles altos de anticuerpos IgG contra antígenos específicos de parásitos de estadios pre-eritrocíticos y sanguíneos correlacionan con protección a la enfermedad (55,56). La inmunidad clínica puede depender de la adquisición acumulativa de un repertorio de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos del parásito o el desarrollo de respuestas cruzadas de anticuerpos (41).

Una revisión sistemática y de metaanálisis, realizada en el año 2014, sobre seromarcadores de Pv relacionados a exposición e inmunidad, que abarcó 18 estudios (principalmente transversales), reportó que las respuestas de IgG a los antígenos PvCSP, PvMSP-1, PvMSP-9 y PvAMA1 estuvieron asociados a infección por Pv en diferentes poblaciones a nivel mundial, siendo considerados como seromarcadores de exposición infección por Pv. Solo los antígenos PvMSP-1, PvMSP-3 y PvMSP-9 demostraron asociación con protección contra la malaria por Pv (55). Otra revisión sistemática, publicada en el 2017, sobre estudios sero-

epidemiológicos de malaria en Brasil, también reportó asociación entre anticuerpos IgG contra el antígeno PvCSP y exposición a malaria vivax en esta población. Además, cinco de trece estudios transversales evidenciaron una asociación positiva entre anticuerpos IgG contra PvMSP-1₁₉ y exposición a la malaria (56).

La disponibilidad de la secuencia del genoma y el transcriptoma de Pv ha mejorado la comprensión de la biología de este parásito, facilitando la identificación de muchas proteínas que son homólogas a antígenos de Pf. Recientemente la comunidad científica ha reunido esfuerzos para la caracterización integral y sistemática de la respuesta de anticuerpos IgG, en individuos con historial de exposición a malaria por Pv, haciendo uso de plataformas serológicas de alto rendimiento (Luminex®) o matrices de proteínas (57).

Varios estudios demuestran que las respuestas de anticuerpos IgG contra las proteínas del merozoíto de Pv son biomarcadores (seromarcadores) sensibles para medir el nivel de exposición a esta infección a nivel poblacional y cuya versatilidad de aplicación depende del contexto endémico, edad e historial de exposición de los individuos evaluados entre otros factores propios del huésped (57–66). A la fecha se promueven las siguientes aplicaciones para el uso de seromarcadores: 1) identificación de puntos geográficos críticos de transmisión, 2) estimación de niveles de transmisión, 3) monitoreo de los cambios de transmisión de malaria a lo largo del tiempo, 4) medición del impacto de las intervenciones de control de transmisión, 5) confirmación de eliminación y reaparición de la enfermedad, 6) identificación y tratamiento de individuos que potencialmente portan hipnozoítos de Pv (seroTAT) o 7) como biomarcadores de infecciones asintomáticas (39).

1.7.3. Subclases de IgG:

Las subclases IgG determinan la función de los anticuerpos. Se ha demostrado que, en humanos, las subclases IgG1 e IgG3 citofílicas son mediadores importantes de la eliminación de patógenos a través de fagocitosis o lisis mediada por fijación del complemento o de su unión a receptores de la cadena constante de anticuerpos (FcR) en células del sistema inmune (67). Numerosos estudios han informado que los perfiles de subclases de IgG dependen del antígeno evaluado (67). Para algunos antígenos de Pf, como MSP-1₁₉ y MSP-2, se ha observado una predominancia de subclases IgG1 en niños y luego un cambio y aumento de la respuesta de IgG3 en individuos adultos, asociándose esta subclase a la adquisición natural de inmunidad clínica contra malaria. Queda por confirmar si este cambio se debe a un historial de mayor exposición y / o la maduración del sistema inmune. La investigación de las subclases de IgG contra antígenos de Pv, puede ayudar a comprender mejor la importancia del desarrollo de la inmunidad y/o protección contra esta infección (63). La Tabla 1 resume las diferentes funciones de anticuerpos propuestos en malaria. La Figura 5 ilustra los diferentes mecanismos propuestos mediados por anticuerpos en la inmunidad a estadios sanguíneos de Pf.

TABLA 1. Funciones de anticuerpos en Malaria. Adaptado de (68)

Los antígenos expresados en los parásitos o las células infectadas son reconocidos por diferentes isotipos de inmunoglobulinas y diferentes subclases de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG). Esto puede conducir a una serie de diferentes mecanismos efectoros. Por ejemplo, IgG1 e IgG3 media la fagocitosis opsónica mediante la unión de sus cadenas pesadas (Fc) a los receptores de membrana de fagocitos Fc γ RI; e IgG1, IgG3 e IgM son importantes para la fijación del complemento.

Anticuerpos funcionales contra merozoítos

- Inhiben la invasión de merozoítos a los eritrocitos
- Detienen el crecimiento de merozoítos en los eritrocitos
- Oponizan merozoítos para fagocitosis.
- Interactúan con factores del complemento para inhibir la invasión.
- Promueven el estallido respiratorio de neutrófilos

Anticuerpos funcionales dirigidos a los eritrocitos infectados (EIs)

- Bloquear EIs para que no se una a los receptores del huésped
- Oponizar IEs para fagocitosis
- Fijar factores del complemento que promueven la fagocitosis.
- Prevenir la ruptura de esquizontes
- Inhibir la formación de rosetas

Anticuerpos funcionales dirigidos a los esporozoítos

- Reducen el recorrido del esporozoíto en la dermis
- Reducen la invasión de hepatocitos
- Oponizan los esporozoítos para promover la fagocitosis

Anticuerpos funcionales dirigidos a gametocitos

- Reduce la infectividad una vez que los mosquitos lo ingieren

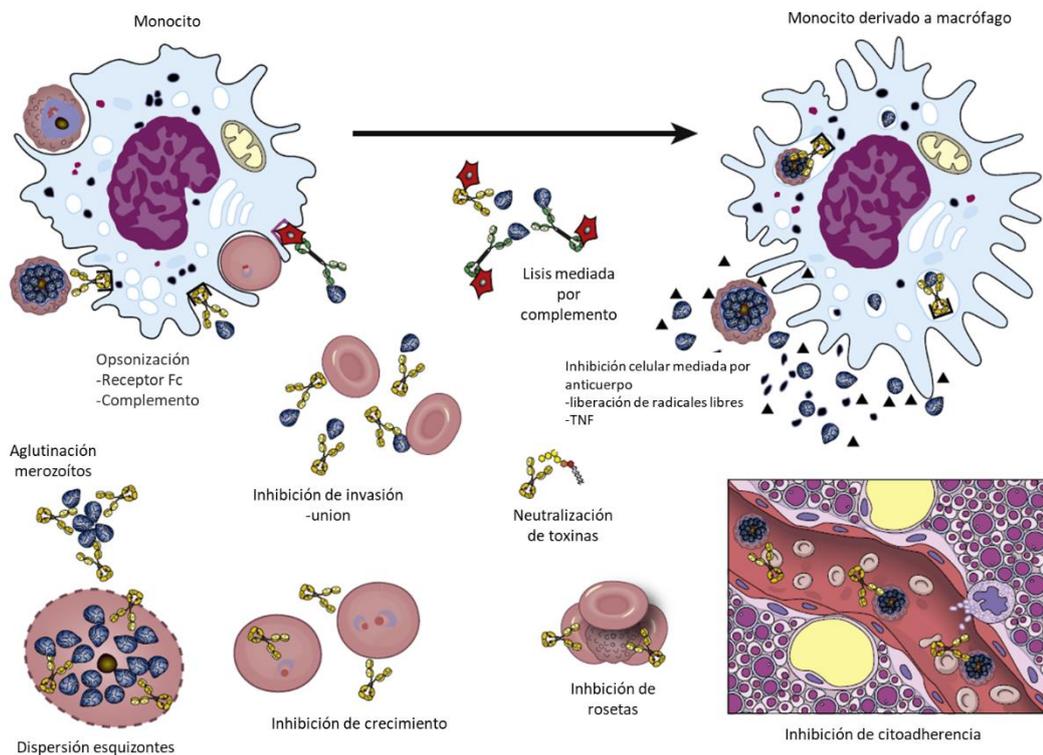


FIGURA 5: Representación esquemática de mecanismos propuestos mediados por anticuerpos en la inmunidad a estadios sanguíneos de *P. falciparum*. Los anticuerpos dirigidos contra los merozoítos pueden prevenir la invasión a los eritrocitos, mediante a fijación del complemento pueden lisar merozoítos; los anticuerpos pueden opsonizar merozoítos para su consumo por células fagocíticas; y estimular monocitos y macrófagos para la liberación de moléculas que lisan eritrocitos infectados con parásitos. Los anticuerpos contra eritrocitos infectados pueden bloquear su citoadherencia, interrumpir las rosetas que eritrocitos infectados forman con células no infectadas, y opsonizarlas para consumo de células fagocíticas. Los anticuerpos también disminuyen el crecimiento de los parásitos dentro de los eritrocitos, y previenen la ruptura de esquizontes. Abreviatura: TNF, factor de necrosis tumoral. Adaptado de (68).

1.7.4. Ensayos funcionales de anticuerpos en malaria

Los anticuerpos contra los parásitos de estadios sanguíneos inhiben la invasión de merozoítos a sus células huésped o la salida de merozoítos de los esquizontes, y la posterior replicación del parásito en la sangre. Los ensayos de inhibición del crecimiento (GIA) miden la capacidad de los sueros inmunes o anticuerpos

purificados (IgG) de inhibir el ingreso de merozoítos a su célula huésped y por tanto la replicación del parásito *in vitro* o *ex vivo*, sin embargo, a la fecha, estos ensayos se realizan en ausencia de células inmunitarias o de las proteínas del sistema del complemento. Los ensayos GIA son actualmente la referencia más utilizada para medir la actividad inhibidora de anticuerpos contra estadíos sanguíneos de los parásitos, sin embargo, no se ha encontrado del todo correlación entre los resultados de GIA y análisis de eficacia de la vacuna RTS, S. Además, algunos candidatos a vacunas del estadio de merozoíto no inducen anticuerpos activos en GIA sin embargo, muestran cierta eficacia protectora en ensayos clínicos o estudios serológicos (67)

Cuantificar las funciones y otras propiedades de los anticuerpos es crucial para evaluar las respuestas a las vacunas y para el diseño y desarrollo de nuevas vacunas. A la fecha en malaria se ha observado que los anticuerpos pueden funcionar uniéndose a los antígenos diana y bloqueando las interacciones ligando-receptor del parásito con su célula huésped, e inhibiendo o neutralizando el proceso de invasión. Adicionalmente, a través del fragmento cristalizante (Fc), anticuerpos unidos a antígenos diana i) puede unirse a los componentes del complemento sérico y activar el sistema del complemento, lo que lleva a la lisis del parásito o célula parasitada, su fagocitosis o una actividad neutralizadora mejorada, y ii) unirse a receptores Fcγ expresados por células inmunitarias, para mediar funciones efectoras que incluyen la fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) e inhibición celular dependiente de anticuerpos (ADCI). A continuación, se describen brevemente los resultados principales obtenidos en estudios de evaluación funcional de anticuerpos en Pf (67).

1.7.4.1. Activación del Sistema del Complemento vía anticuerpos en malaria:

Los anticuerpos dirigidos a los merozoítos de Pf pueden activar la vía clásica del complemento a través de su unión al primer componente de la vía clásica de complemento (C1q), dando como resultado final la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) y lisis de los merozoítos, que en consecuencia inhibe la invasión de merozoítos a sus células huésped. Las interacciones anticuerpo-complemento se cuantifican mediante ensayos funcionales en base al uso de células o en ensayos de placa tipo ELISA que miden niveles de los anticuerpos con capacidad de fijación a proteínas recombinantes del sistema de complemento (C1q/ C3b/ C5b-9). Se ha demostrado que los anticuerpos IgG e IgM activan la vía de complemento para el caso de proteínas de superficie de los estadíos de esporozoítos, merozoítos y glóbulos rojos infectados de Pf. En infecciones por Pf, IgG1 y IgG3 son las subclases más potentes para la activación del sistema de complemento (67,69).

Estudios *in vitro* han demostrado que los anticuerpos policlonales de adultos semi-inmunes inhiben pobremente la invasión de merozoítos al ser evaluados de forma individual, sin embargo, la actividad inhibitoria mejora en gran medida tras la activación del sistema de complemento. La activación de la vía del complemento usando antígenos del estadio de merozoíto ha demostrado estar fuertemente asociada con protección a la malaria clínica y parasitemias de alta densidad en un estudio de cohorte longitudinal de niños de PNG. Además el potencial protector de estos anticuerpos aumenta al usar combinaciones de antígenos (67).

Se han identificado múltiples antígenos de merozoíto de Pf como dianas de anticuerpos fijadores de complemento, que parecen adquirirse con la edad (Figura 6). Estos incluyen antígenos de superficie de merozoítos como MSP1, MSP2, MSP6, MSP7, MSP-DBL1, y proteínas de orgánulos apicales, incluidos los candidatos a vacunas PfRh5 y AMA1, así como ligandos EBA, PfRH2, RALP1 y GAMA. Curiosamente, los anticuerpos contra algunos antígenos y anticuerpos de algunos individuos no fijan ni activan efectivamente el sistema de complemento en infecciones por Pf. Anticuerpos contra algunos antígenos de superficie de merozoítos (p. ej., MSP2, MSP1-bloque-2) no tienen actividad inhibitoria sustancial por su cuenta, y solo son capaces de inhibir efectivamente la invasión del merozoíto al eritrocito en presencia del sistema complemento, lo que sugiere que la activación de la vía de complemento es esencial para mediar la actividad funcional de anticuerpos-antígenos específicos. La tasa de adquisición de anticuerpos contra diferentes antígenos de merozoítos varía y esto puede impactar en la activación del sistema del complemento (69).

Poco se sabe sobre el papel de las interacciones anticuerpo-complemento en inmunidad a Pv, pero recientemente se identificó que la proteína de superficie del merozoíto 3 alfa de Pv (PvMSP3 α) es capaz de generar anticuerpos fijadores del sistema de complemento (70). Sin embargo, debido a las diferencias entre las proteínas de merozoítos entre especies, se debe ser cauteloso al extrapolar los hallazgos de Pf a Pv. Se necesitan estudios adicionales para definir las proteínas clave en la generación de anticuerpos fijadores del complemento y la importancia de esta vía en la inhibición del proceso invasión de merozoítos de Pv en ensayos *ex vivo* (69).

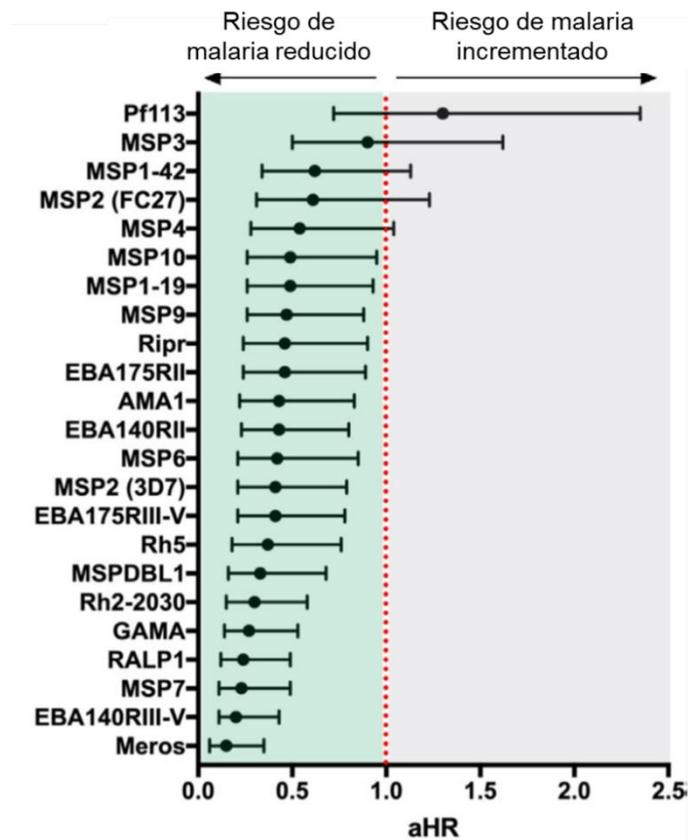


FIGURA 6: Lista de antígenos de merozoítos de *P. falciparum* que se unen a la proteína de complemento C1q vía anticuerpos asociadas significativamente a protección contra la malaria clínica en un estudio de cohorte longitudinal de niños de PNG. n = 206 (se muestra la razón de riesgo a malaria ajustada). Adaptado de (69,71)

1.7.4.2. Receptores *FcγR*

Existen múltiples tipos y variantes polimórficas de receptores *Fcγ* expresados en células inmunitarias clave, como los monocitos, neutrófilos, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Estos receptores reconocen la porción Fc de los anticuerpos IgG y se unen a varias subclases de IgG humana con diferentes afinidades, teniendo más afinidad con las subclases IgG1 e IgG3, alguna con IgG2, y ninguna con IgG4. El perfil de expresión de receptores *Fcγ* difiere entre los tipos de células inmunitarias con el fin de provocar diversas respuestas efectoras. A

través de la unión de anticuerpos, cada receptor Fc γ activa una vía de señalización específica que conduce a una respuesta inmunitaria única, como la fagocitosis opsónica, inhibición celular dependiente de anticuerpos y toxicidad celular dependiente de anticuerpos. Hay cinco tipos de receptores Fc γ en humanos (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb) y un inhibidor de receptor (Fc γ RIIb). Fc γ RI es un receptor de alta afinidad que se une principalmente a IgG y subclases IgG1 e IgG3 monoméricos en suero humano, mientras que Fc γ RIIa/b y Fc γ RIIIa/b son receptores de baja afinidad que se unen a inmunocomplejos IgG multiméricos. A la fecha se sabe que los polimorfismos de receptores Fc γ humanos pueden influir en la afinidad de las interacciones con IgG1 e IgG2 (67).

La inducción de respuestas funcionales de anticuerpos contra la proteína de superficie de circunsporozoito ((CSP), componente principal de la vacuna RTS, S) ha sido cuantificada en adultos sanos sin historial de malaria (n = 45) y vacunados con RTS, S, mediante ensayos de ELISA para medir la unión de anticuerpos anti-CSP a receptores Fc γ (Fc γ R). Los principales hallazgos fueron (1) la vacuna RTS,S, es capaz de inducir anticuerpos con funciones efectoras dependientes de receptores Fc γ (2) los anticuerpos funcionales fueron generalmente más altos después de la segunda dosis de la vacuna, (3) estos anticuerpos funcionales están dirigidos a múltiples regiones de la proteína CSP, (4) los participantes con niveles más altos de anticuerpos funcionales tuvieron menos probabilidad de desarrollar parasitemia tras desafío homólogo (P < 0,05), y (5) los sujetos no protegidos tuvieron niveles más altos de IgM anti-CSP (72).

Similar a Pf, las respuestas de anticuerpos contra proteínas de Pv se caracterizan principalmente por ser de subclases tipo IgG1 e IgG3, lo que promueve el estudio de unión de anticuerpos a receptores Fc γ mediante ensayos de ELISA (67).

1.7.4.3. Fagocitosis opsónica

La correlación entre los resultados de ensayos GIA con los resultados de protección o eficacia a la vacuna RTS, S en ensayos clínicos, no han sido del todo consistentes. Una posible explicación para la falta de concordancia es que los ensayos GIA se realizan en ausencia de células inmunitarias y de la activación del sistema de complemento, también es probable que la actividad funcional de los anticuerpos esté mediada por la unión a receptores Fc γ para promover la fagocitosis opsónica vía neutrófilos y monocitos, entre otras funciones que no son posibles de ser evidenciadas en los GIAs (67).

Recientemente, los neutrófilos fueron identificados como las células inmunitarias predominantes que median la fagocitosis opsónica de estadíos de esporozoítos y merozoítos de Pf a través de los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIII. La fagocitosis opsónica de merozoítos vía anticuerpos citofílicos unidos a las proteínas de la superficie del merozoíto de PfMSP2 y PfMSP3 a través de Fc γ RI en monocitos, han sido asociadas significativamente con la protección contra la malaria clínica y parasitemia de alta densidad en estudios longitudinales de niños de Kenia y PNG. Siendo una proporción de estos anticuerpos trascendentes a cepas de Pf (67).

1.7.4.4. Inhibición celular dependiente de anticuerpos

Los anticuerpos también pueden actuar en conjunto con los monocitos para inhibir el crecimiento del parásito, un fenómeno conocido como inhibición celular

dependiente de anticuerpos (ADCI). En ensayos tipo ADCI las muestras de anticuerpos se incuban con monocitos y parásitos. Los monocitos median su actividad inhibitoria no a través de fagocitosis, pero indirectamente liberando factores solubles que inhiben el crecimiento de parásitos vecinos. La ADCI es dependiente de IgG citofílicas y de los receptores FcγRIIa y FcγRIIIa en monocitos. La ADCI ha sido asociada con protección contra la malaria clínica en un estudio de cohorte longitudinal de niños ghaneses. A la fecha se ha identificado a las proteínas de superficie del merozoíto 3 (PfMSP3) de Pf, la proteína rica en glutamato (PfGLURP) y la proteína rica en serina (PfSERP) como mediadoras de actividad ADCI. Más aún, la vacuna, GMZ2, basada en la fusión de las proteínas de PfMSP3-GLURP, demostró ser segura e inmunogénica en ensayos clínicos fase I en voluntarios alemanes sin historial de exposición a malaria y adultos y niños gaboneses. GMZ2 también indujo actividad citofílica mediada por ADCI en tres ensayos clínicos (67).

1.7.4.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Los anticuerpos también pueden promover la función de citotoxicidad celular (ADCC) en malaria, a través de su interacción con las células asesinas naturales (NK). Por ejemplo, glóbulos rojos infectados opsonizados mediante anticuerpos de adultos malienses fueron capaces de activar células NK primarias, produciendo citocinas que conduce a la lisis de glóbulos rojos parasitados y la inhibición del crecimiento de Pf en glóbulos rojos *in vitro*. Anticuerpos dirigidos contra la proteína PfEMP1 y la familia de proteínas de antígenos expuestos en la superficie de glóbulos rojos parasitados por Pf, RIFIN, median ADCC a través de unión a receptores FcγRIIIa. La presencia de células NK adaptativas en individuos

infectados con Pf se ha asociado con protección contra la malaria clínica, desarrollo de futuros episodios y reducción de la parasitemia. Comprender las interacciones entre los anticuerpos y diferentes receptores Fc γ en Pv es de vital importancia para descubrir nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas contra la malaria (67).

1.7.4.6. Inhibición del proceso de invasión del merozoíto vía anticuerpos en P. vivax

La única interacción esencial ligando-receptor bien caracterizada a la fecha para el proceso de invasión del merozoíto de Pv al eritrocito es la unión de la Proteína de Unión a Duffy (PvDBP) y el Receptor de Antígeno Duffy para Quimiocinas (DARC) en los glóbulos rojos (36). Sin embargo, informes recientes de infecciones por Pv en individuos Duffy negativos, junto a las interacciones receptor-ligando recientemente descritas, pintan un escenario mucho más complejo con múltiples interacciones huésped-parásito aún por caracterizar.

La proteína AMA-1 es una proteína, sintetizada durante las últimas 4 horas de la fase eritrocítica en especies de Plasmodium y otros parásitos apicomplexan, que desempeña un papel importante en el proceso de invasión del parásito a sus células huésped. PvAMA-1 se considera una proteína capaz de inducir respuestas celulares y humorales prolongadamente notables en humanos por lo que es un candidato ideal a vacuna contra malaria vivax (42). A la fecha no se ha identificado a su receptor, pero este conocido por su sensibilidad a las enzimas quimotripsina y neuraminidasa (¿GPB?) (75).

Estudios recientes muestran que el Receptor de transferrina 1 (TfR1 o CD71), en la membrana del reticulocito se une a la proteína de unión al reticulocito 2 de Pv (PvRBP2b) del parásito para mediar una vía crítica de unión hacia los reticulocitos.

Los anticuerpos monoclonales de ratón contra PvRBP2b bloquean la formación de complejos con TfR1 en la superficie de los reticulocitos y han demostrado reducir la invasión de parásitos aislados a partir de sangre infectada de individuos tailandeses y brasileños a reticulocitos en ensayos de invasión *ex vivo* (74). Además, anticuerpos monoclonales humanos (mAb) han sido capaces de bloquear la unión de PvRBP2b a los reticulocitos e inhibir la formación de complejos con TfR1 en ensayos de unión a reticulocitos basados en citometría de flujo (76). Los ligandos PvRBP1a, PvRBP1b, PvRBP2c y la proteína de unión a eritrocitos de Pv (EBP) parecen contribuir también a este tropismo *in vitro*, aunque se desconocen sus posibles receptores de reticulocitos. Basigina y el Receptor de Complemento 1 (CR1) también funcionan como receptores durante la invasión de Pv al reticulocito, aunque sus ligandos en el parásito permanecen sin identificar (77).

Estudios *in vitro* de interacciones de proteínas recombinantes de Pv, y glóbulos rojos maduros, han identificado múltiples candidatos a ligandos como el antígeno micronemal anclado en GPI (PvGAMA) y antígeno de superficie de unión a reticulocitos (RBSA), sin embargo, queda por demostrar si estas interacciones son trascendentales en cultivos *ex vivo* de Pv. También se ha demostrado que los antígenos ricos en triptófano de Pv (PvTRAGs) interactúan con diferentes receptores (incluido Banda 3) en la superficie de los glóbulos rojos maduros. Diez miembros de la familia de proteínas PvTRAG, una familia de proteínas conservadas expresadas en estadios de trofozoítos y esquizontes que inducen respuestas inmunitarias celulares y humorales en pacientes infectados por Pv, han demostrado capacidad de unión de eritrocitos *in vitro* a 5 receptores diferentes. Cada uno de estos 10 PvTRAG reconoce a más de 1 receptor y cada receptor se une a más de una

de estas proteínas. PvTRAg38, PvTRAg36 y PvTRAg22 PVTRAg26.3, PvTRAg33.5, PvTRAg34, PvTRAg35.2, PvTRAg40, PvTRAg69.4 y PvTRAg74 se unen a Banda 3. PvTRAg38 y PvTRAg36 se unen adicionalmente a Basigina, y PvTRAg22 se une a otro receptor desconocido en la superficie de los eritrocitos (77). Otros candidatos a vacunas en investigación son la proteínas de cuello de rotfria 2, 4 y 5 (RON2, RON4 y RON5), la proteína de superficie de merozoíto 1 (MSP-1) (cuyo posible receptor es Banda 3) (75)

Todos estos antecedentes justifican el inicio de estudios funcionales de anticuerpos con el fin de establecer qué proteínas podrían servir como biomarcadores del estado inmune de un individuo, o posibles candidatos a vacunas que justifiquen un mayor desarrollo, o ambos. Los estudios de la respuesta inmune a antígenos de estadios pre-eritrocíticos y sexuales de Pv van más allá del enfoque de este proyecto.

I.8. Estudios de respuesta de anticuerpos en individuos asintomáticos con infección por *P. vivax*

Pocos estudios a la fecha han monitoreado la respuesta de anticuerpos en individuos asintomáticos con infección por Pv. En 2017, Longley et al., uso muestras de plasmas de 22 individuos asintomáticos colectadas en un estudio transversal en una provincia de baja endemicidad de malaria de Tailandia con el fin de evaluar niveles de respuestas IgG contra un panel de 11 proteínas de Pv (CSP, ARP, GAMA, P41, P12, PVX_081550, y cinco miembros de la familia de proteínas PvRBP). Los resultados demostraron niveles más altos de anticuerpos IgG para los individuos asintomáticos con infección por Pv en comparación a los no infectados para las proteínas PVX_081550 o proteína de transferencia de lípidos relacionada con StAR, P41 y RBP2cNB (64). También se ha reportado que los anticuerpos contra

la proteína de transferencia de lípidos relacionada con StAR, y P41 están asociados con protección a malaria clínica en niños de PNG (78).

Más aún, estudios de evaluación de dinámica de anticuerpos IgG contra un panel de 27 seromarcadores, en los mismos individuos asintomáticos, con seguimientos por el periodo de un año, evidencio que las proteínas más seroreactivas para estos individuos fueron: PvRBP2b (PVX_094255A), antígeno de membrana asociado a rotfria (PVX_087885), antígeno rico en triptófano (Pv-fam-a, PVX_090265), MSP1₁₉ (PVX_099980) y la proteína de interacción con Rh5 (PVX_095055) (79). Niveles altos de anticuerpos IgG anti-PvRBP2b también han demostrado estar fuertemente asociados con un menor riesgo de episodios clínicos por Pv en estudios cohorte a gran escala en Tailandia y Brasil (80).

I.9. Estudios aplicativos del uso de anticuerpos en detección de exposición a infecciones por *P. vivax* en el Perú

El uso de seromarcadores (MES) para detección de infecciones por Pv (PvMSP1₁₉, PvAMA1, PvMSP10) en combinación con herramientas de diagnóstico molecular y georreferenciación en estudios transversales, ha permitido la ubicación de “puntos geográficos calientes” o zonas de alta prevalencia de malaria o áreas con un porcentaje alto de individuos con historial de exposición a malaria, que pasan inadvertidos por los métodos de detección convencionales como microscopía o Pruebas Rápidas de Diagnóstico (PDR), comúnmente usadas por el MINSA (19,81). Asimismo, estos estudios han permitido la asociación de niveles de anticuerpos contra estos seromarcadores y factores de riesgos de exposición a infección por Pv, los cuales pueden variar de comunidad en comunidad (82).

Chuquiyaury et al., en el 2015 empleo un panel de 1328 proteínas de estadios asexuales de Pv con el fin de identificar a los antígenos más seroreactivos para individuos residentes en la Amazonía peruana, con diagnóstico confirmado de infección por Pv (por PCR y/o microscopía). Entre los antígenos de Pv más seroreactivos estuvieron las proteínas PvMSP10, PvMSP8, PvMSP7, entre otras proteínas hipotéticas (28). Recientemente, la respuesta IgG al seromarcador PvMSP10 fue validada a nivel poblacional en la Amazonía peruana como un biomarcador para detección de individuos con historial de infección reciente por Pv (menor a 6 meses) (34).

Más aún, el uso de un panel de doce seromarcadores (PvCyRPA, PvRAMA, PvTRAg_2, PvEBPII, PvDBPSal1, PvRBP2b, PvMSP1₁₉, Pvs16, PvMSP8, PvTRAg_28, PvMSP3.10, PvMSP7) ha demostrado su utilidad para discriminar exposición a infecciones por Pv recientes o pasadas en individuos de la Amazonía peruana que vivían en diferentes áreas geográficas, por ejemplo entre distritos de la periferia de la ciudad de Iquitos, capital de la Amazonía peruana versus Mazán (un distrito conformado por comunidades rurales ubicadas a 60 km de la ciudad de Iquitos y solo accesible de forma fluvial). Los individuos de este estudio con historial de incidencia de infecciones por Pv, demostraron tener niveles altos de IgG contra el seromarcador PvRBP2b, durante un seguimiento de 6 meses. Asimismo, niveles altos de IgG contra este mismo seromarcador correlacionaron con incremento en edad en los individuos de estudio (5).

I.10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios clínicos conducidos en diferentes áreas endémicas de Pv han evidenciado la existencia de infecciones graves y mortales por Pv (3) Esta evidencia, junto a preocupaciones sobre la emergente resistencia a medicamentos contra Pv, ha renovado el interés por esta enfermedad tropical desatendida y promovido discusiones concertadas sobre estrategias de eliminación específicas a Pv. El ciclo de vida biológicamente distinto de Pv, su alto potencial de transmisión y el poseer una etapa hepática latente (hipnozoito), deja en claro que las estrategias de control no pueden simplemente transferirse de Pf a Pv (2). Dado que la investigación en Pv, está por detrás de Pf en términos de financiamiento de investigación, el proyecto presentado se incluye directamente como prioridad en la agenda de investigación para la eliminación de malaria, por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La malaria asintomática representa un obstáculo significativo para los esfuerzos de su erradicación y es un problema de salud grave debido que se cree que los individuos con malaria asintomática sirven como reservorios de parásitos, que permiten mantener la transmisión de la enfermedad (22). Está claro que existe una respuesta inmune subyacente en malaria asintomática, no obstante, esta no se conoce del todo y necesita ser investigada y caracterizada. La respuesta serológica contra antígenos de Pf ha sido comparada en individuos sintomáticos y asintomáticos de la Amazonía peruana, no obstante, estos tipos de estudios aún no se han replicado en malaria vivax (83). El presente estudio propone explorar la respuesta de anticuerpos en individuos asintomáticos infectados con Pv en la Amazonía peruana, contra proteínas que han demostrado ser altamente antigénicas en este contexto epidemiológico (5,28,84).

La evaluación de la respuesta anticuerpos a proteínas de Pv dependiendo del contexto endémico y población será útil para definir su potencial inclusión o no en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria en el futuro. Más aún, la evaluación de la respuesta de anticuerpos contra proteínas de Pv en individuos sintomáticos y asintomáticos con infección por Pv, también servirían para definir el rol de proteínas específicas como potenciales biomarcadores del estado inmune de un individuo y como seromarcadores de infecciones por Pv recientes o pasadas, para definir la función protectora o no de anticuerpos y su correlación con carga parasitaria en infecciones.

La caracterización de la respuesta inmune adaptativa a nivel de anticuerpos y la función que estos ejercen en infecciones asintomáticas, es un componente esencial en el estudio de la inmunidad a los agentes infecciosos, incluido *Plasmodium spp.* Se necesitan más estudios para desentrañar el rol que los anticuerpos en malaria en términos de origen, función y la capacidad protectora en individuos expuestos a esta enfermedad en diferentes áreas de transmisión, además de la función que estos despliegan en individuos asintomáticos. Más aún, se necesitan investigaciones para determinar los factores que modulan la generación y mantenimiento en el tiempo de anticuerpos contra esta infección. Esto involucra realizar estudios para la caracterización funcional de los anticuerpos inducidos por proteínas de Pv que han demostrado ser antigénicas a la fecha en la Amazonía peruana (5,28,84).

I.11. JUSTIFICACIÓN

Esta tesis doctoral fue conceptualizada en base a antecedentes de estudios que daban indicios de la función protectora de anticuerpos en individuos con malaria Asin por Pf, de la Amazonía peruana. Villasís et al., 2012 evidencio que individuos Asin con infección por Pf generaban niveles de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG3 más altos que individuos Sin, contra diferentes proteínas del merozoito de Pf, y que estos niveles de anticuerpos estaban inversamente correlacionados con niveles de parasitemias. Tres años más tarde, Torres et al., 2015 corroboró estos resultados a gran escala evaluando las respuestas IgG de estos mismos individuos frente a un panel de 800 proteínas de Pf (83,85). Para evaluar si este modelo era reproducible en infecciones con Pv, el Laboratorio de Malaria de la UPCH, implementó el sistema de producción eucariota de proteínas recombinantes, Baculovirus, con el fin de estar en la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas de Pv y evaluar sus posibles funciones (86,87). La selección de proteínas a producirse se basó en los resultados de una evaluación a gran escala de las respuestas serológicas tipo IgG, en individuos con infección por Pv de la Amazonía peruana, contra un panel de más de 1328 proteínas de Pv usando la plataforma de microarreglos de proteínas. Los resultados indicaron a la proteína PvMSP8 como a uno de los mejores seromarcadores para detección de infecciones por Pv, para ese contexto endémico (28).

Con el fin de poder evaluar la existencia de diferencias en la respuesta inmunológica a nivel adaptativo de anticuerpos entre individuos Sin y Asin con infección por Pv se planteó el enrolamiento de individuos con infección por Pv y su clasificación como Sin y Asin a partir de estudios transversales realizados por el Centro de

Excelencia en la Investigación en Malaria de la Amazonía (ICEMR Amazónico) en diferentes comunidades de la Amazonía peruana, llevados a cabo entre los años 2018 y 2021. Asimismo, se realizaron seguimientos de estos individuos al tercer y sexto mes post-enrolamiento para la evaluación de la evolución de su respuesta inmune post-tratamiento antimalárico, como parte de un pequeño estudio longitudinal (88). En paralelo a esta colección se realizó el enrolamiento de individuos sanos, sin historial de infección por malaria al menos 3 años previos al estudio, y residentes de zonas urbanas de la ciudad de Iquitos, como controles (5,21). Este diseño de estudio es similar al descrito por Torres et al., 2014, para evaluación de respuesta inmunológica innata y adaptativa en individuos Asin y Sin con infección por Pf de la Amazonía peruana (89). Lamentablemente debido a las restricciones de la Pandemia del COVID-19, se perdió la oportunidad de realizar los seguimientos de aproximadamente 85% de los individuos enrolados con infección por Pv, para el estudio longitudinal.

Nuestro estudio clasificó como Asin a individuos con infección continua por Pv confirmada por qPCR y carencia de demostración de síntomas de malaria durante tres semanas de seguimiento post-enrolamiento (90). Es importante mencionar que el tiempo promedio de manifestación de síntomas tras una infección por picadura de mosquito, puede variar entre 7-15 días en el caso de infecciones por Pv o Pf u hasta 30 días en el caso de infecciones *P. malariae* (2). Al plantear al menos un esquema de seguimiento de individuos Asin hasta de 21 días, nuestro estudio trata de aproximarse a la clasificación más correcta de individuos Asin y evitar el sesgo de enrolar individuos en proceso de incubación y/o próxima manifestación de síntomas como individuos Asin.

Dado que no existe un consenso general a la fecha sobre la definición de malaria asintomática en la comunidad científica (21). El **primer capítulo** tuvo como objetivo describir a la población de estudio en base a las características epidemiológicas de las comunidades donde los individuos fueron enrolados, características sociodemográficas, reporte de síntomas, así como parámetros de laboratorio clínico hematológicos y bioquímicos (91,92). Siendo este el primer estudio a la fecha de descripción y comparación de esta información entre individuos Sin y Asin con infección por Pv, e individuos controles en la Amazonía peruana (93). De esta forma se quiso responder a la primera sección de nuestra hipótesis general: *Individuos asintomáticos infectados con Pv presentan diferentes características epidemiológicas y clínicas en comparación a individuos Sin, en el contexto de la Amazonía peruana.*

Desarrollamos los **capítulos 2 y 3** de la presente tesis con el fin de responder a la segunda parte de nuestra hipótesis: *Los individuos Asin con infección por Pv presentan una respuesta inmune adaptativa a nivel de anticuerpos diferente y predictiva de inmunidad clínica en comparación a individuos Sin.* La proteína PvMSP8 producida en nuestro laboratorio fue seleccionada para poder evaluar esta hipótesis, ya que había demostrado ser una proteína altamente antigénica en muestras de plasma de individuos infectados con Pv de nuestro contexto endémico en estudios previos a menor escala (28,87). Además, en paralelo al desarrollo de este trabajo se publicaron reportes sobre el buen rendimiento de esta proteína como seromarcador para detección de individuos con historial de exposición reciente a infección por Pv en otros contextos endémicos como las islas Salomón, Brasil y Tailandia (94). No obstante, era necesario probar si estos resultados eran replicables

en nuestro contexto Amazónico mediante un estudio a gran escala. Para ello la primera parte del **capítulo 2**, de la presente tesis evaluó las respuestas IgG anti-PvMSP8 como seromarcador a infección por Pv a nivel poblacional en la Amazonía peruana, mediante el uso de 1251 muestras de plasma recolectadas durante un estudio transversal poblacional realizado en siete comunidades ribereñas y endémicas a malaria en octubre 2018. Asimismo se evaluó si esta proteína generaba reacción cruzada en muestras de plasma de individuos infectados con Pf, siguiendo las metodologías descritas por Longley et al., 2021 y Rosas-Aguirre et al., 2021 (62,94).

La segunda parte del **capítulo 2**, evaluó si esta proteína era capaz de producir una respuesta de anticuerpos IgG diferencial entre individuos Sin y Asin con infección de Pv, en un intento de búsqueda de biomarcadores de diferenciación o predictores de inmunidad relacionados a protección en infecciones Asin por Pv en nuestro contexto endémico (95). Las respuestas de anticuerpos contra una misma proteína o antígeno pueden variar de un individuo a otro en el tiempo o dependiendo del contexto endémico (21,61). Debido a las limitaciones de actividades que conllevó la Pandemia del COVID-19, solo pudimos obtener un número limitado de participantes con seguimientos al tercer y sexto mes post-enrolamiento, de todas formas, procedimos a usar estas muestras valiosas para evaluar la duración de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 en nuestros individuos de estudio.

La aproximación de evaluación de PvMSP8 como seromarcador para infecciones por Pv en nuestro contexto endémico siguió el diseño y algoritmo de análisis ya descrito en estudios similares para otros contextos endémicos (94). El diseño de estudio, metodologías experimentales para evaluar y comparar niveles de

anticuerpos entre individuos Sin y Asin con infección por Pv, descritos en **capítulo 2 y 3** de esta tesis, siguen los algoritmos para evaluación de proteínas de Pv como biomarcadores para detección de individuos Asin con infección por Plasmodium de acuerdo a Longley et al., 2017, Torres et al., 2015, Finney et al., 2014 y Villasis et al., 2012 (64,83,85,96).

El **capítulo 3**, describe la evaluación del rol de anticuerpos, IgM, IgG, IgG1, IgG3, inducidos por proteínas representativas del estadio de merozoíto de Pv y candidatos a vacunas a infección por Pv (PvRBP2b, PvAMA1 y PvMSP8 (esta última, producida en nuestro laboratorio)), en individuos Asin y Sin con infección por Pv de la Amazonía peruana. Asimismo, se evaluó la producción de anticuerpos funcionales capaces de iniciar la vía clásica del sistema de complemento (unión a la proteína C1q) y con capacidad de unión a receptores Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII para activación de funciones de células del sistema inmune, inducidos por estas mismas proteínas. Se realizó esta evaluación con el fin de poder discriminar la existencia o no de una respuesta a nivel de anticuerpos funcional y diferencial entre individuos Asin y Sin con infección por Pv, en otro intento también de búsqueda de biomarcadores de diferenciación de infecciones Asin en nuestro contexto endémico (93). Las metodologías usadas para el desarrollo de este capítulo son las últimas descritas por la comunidad científica para la evaluación de proteínas de Pv, como candidatos a vacunas (67). Asimismo, se evaluó si los participantes del estudio habían sufrido exposición previa a infección por Pf. Los experimentos se realizaron durante una pasantía en el laboratorio del Grupo de Investigación de Inmunidad y Vacunas contra Malaria, en el Instituto Burnet (Melbourne, Australia), dirigido por el Dr. James Beeson, quien a la fecha lidera los estudios de anticuerpos funcionales

para la vacuna de Pf, RTS, S (72). Siendo este, el primer estudio de este tipo llevado a cabo en Sudamérica. La pasantía fue ejecutada gracias a una subvención del Premio de Becas de Intercambio del Comité Estadounidense de Inmunoparasitología Molecular y Celular (ACMCIP) y la Sociedad Estadounidense de Medicina Tropical e Higiene (ASTMH).

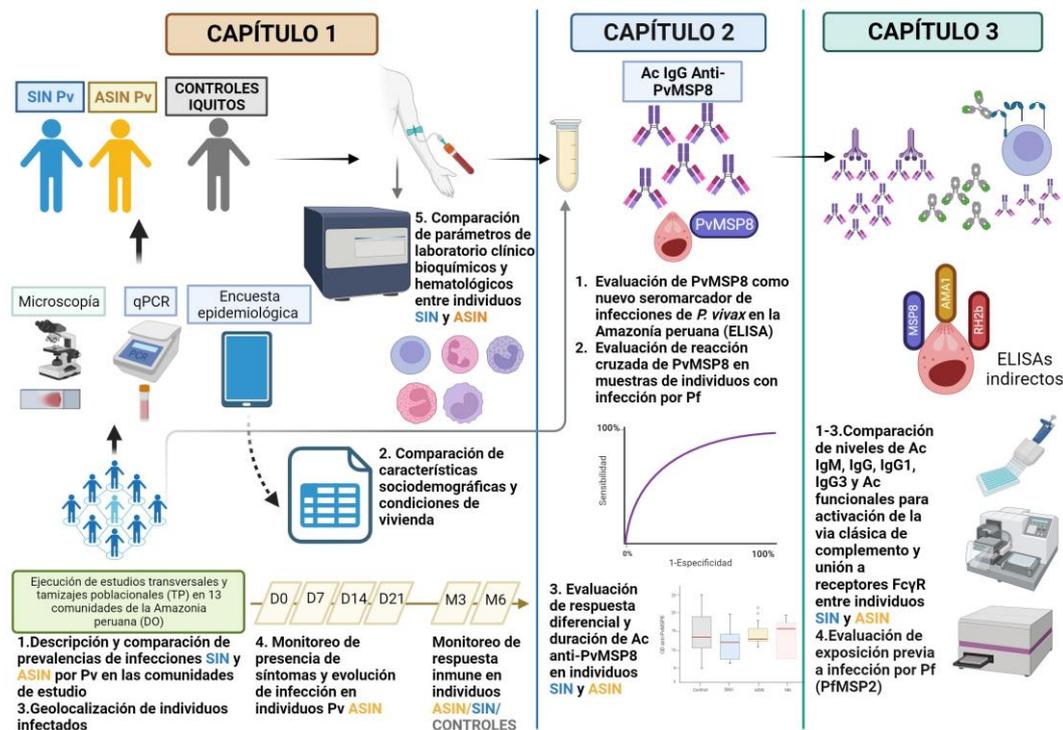


FIGURA 7. Descripción general de la integración de los objetivos descritos en los capítulos de la tesis

La información obtenida tras el desarrollo de los **Capítulos 1, 2 y 3** es complementaria entre sí. Los antecedentes epidemiológicos y clínicos de los individuos enrolados y descritos en el **Capítulo 1** sirven como contexto para poder discutir los resultados de la evaluación de la respuesta de anticuerpos en individuos Sin y Asin con infección por Pv (**capítulos 2 y 3**), e integrar los resultados al modelo existente de respuesta inmunológica en infecciones por Pv (23,33). Por último, esta

tesis discute el potencial de los resultados para su aplicación en plataformas tecnológicas de serológicas que apoyen los programas de control y prevención de malaria.

I.12. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existen diferentes características epidemiológicas, clínicas y una respuesta diferencial inmune adaptativa a nivel de anticuerpos, predictivos de inmunidad clínica entre individuos sintomáticos y asintomáticos infectados con Pv, en el contexto de la Amazonia peruana?

I.13. HIPÓTESIS:

- Individuos asintomáticos infectados con Pv de la Amazonía peruana presentan diferentes características epidemiológicas, clínicas en comparación con individuos sintomáticos infectados con Pv.
- Individuos asintomáticos infectados con Pv de la Amazonía peruana presentan una respuesta inmune adaptativa diferente a nivel de anticuerpos, predictiva de inmunidad clínica en comparación con individuos sintomáticos infectados con Pv.

I.14. OBJETIVOS:

La presente propuesta de investigación propone el estudio de la respuesta inmune adaptativa adquirida mediada por anticuerpos funcionales contra proteínas representativas del merozoíto de Pv en individuos Asin infectados con Pv de la Amazonía peruana. Para esto se realizó lo siguiente: 1) Se diseñó e implemento un estudio para enrolamiento de individuos adultos Sin y Asin con infección por Pv e individuos controles, para descripción de las características de infecciones asintomáticas por Pv en el Amazonía peruana (**Capítulo 1**); 2) Se evaluó al menos un seromarcador para detección de exposición a infección por Pv que pudiera ser útil a nivel poblacional en la Amazonía peruana y capaz de generar una respuesta diferencial a nivel de anticuerpos IgG entre individuos Sin y Asin infectados por Pv (**Capítulo 2**); 3) Se comparó los niveles de las respuesta IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3 en individuos Sin y Asin infectados con Pv, contra proteínas representativas del estadio de merozoíto de Pv (**Capítulo 3**); y 4) se evaluó si individuos Sin y Asin con infección por Pv eran capaces de generar anticuerpos funcionales en el proceso de activación de la vía clásica del complemento y fijación a receptores FcγRI, FcγRII, FcγRIII de células del sistema inmune (**Capítulo 3**). Los objetivos de esta tesis pretenden generar nueva información sobre *¿Cuál es la función de anticuerpos en individuos asintomáticos infectados con Pv de la Amazonía peruana?*, tanto de forma descriptiva como funcional.

CAPÍTULO 1

Descripción de infecciones asintomáticas por *P. vivax* en la Amazonía peruana

Artículo publicado el 31 de agosto 2022 en *Front Cell Infect*.
doi: 10.3389/fcimb.2022.901423.

Cita: **Villasis E***, Garcia Castillo SS*, Guzman M, Torres J, Gomez J, Garro K, Cordova AM, Reategui C, Abanto C, Vinetz J, Gamboa D, Torres K. Epidemiological characteristics of *P. vivax* asymptomatic infections in the Peruvian Amazon. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Aug 31;12:901423. doi: 10.3389/fcimb.2022.901423. PMID: 36118037; PMCID: PMC9471197. *Autores comparten la primera autoría.

I. INTRODUCCIÓN

Plasmodium vivax (Pv) es el parásito de la malaria humana más extendido geográficamente. Sin embargo, en comparación con *P. falciparum* (Pf), los esfuerzos mundiales para reducir la carga de Pv han tenido menos éxito, debido a su biología única y la complejidad de su tratamiento (97). Las características biológicas clave de Pv que contribuyen a su capacidad para eludir las herramientas de control de la malaria existentes incluyen: prevalencia frecuente de baja densidad parasitaria, que la mayoría de veces solo es detectable mediante herramientas moleculares y no mediante metodologías estándar como microscopía y pruebas de diagnóstico rápido, utilizadas convencionalmente por los Programas Nacionales de Control de la Malaria; y la presentación de estadios hepáticos latentes persistentes (hipnozoítos) como reservorios, que a la fecha son indetectables, pero que se reactivan para causar infecciones recurrentes, difíciles de predecir (98–100). La infección por Pv tiene un alto potencial de transmisión causado por la producción continua y temprana de gametocitos, además de una poseer una alta infectividad para los mosquitos y un ciclo de desarrollo más corto en el vector en comparación con otras especies de *Plasmodium* (2,101). Aunque se cree que la infección por Pv causa una infección benigna, esta enfermedad afecta de manera desproporcionada a las personas pobres de regiones rurales remotas, lo que resulta en un impacto económico subestimado pero considerable en la sociedad (101).

El papel de los portadores asintomáticos de *Plasmodium spp.*, en la malaria no se comprende del todo (21). Las infecciones asintomáticas en malaria conllevan riesgos para la salud de la persona infectada, incluyendo: anemia crónica, aumento de los riesgos de mortalidad materna y neonatal, deterioro de la competencia

inmunológica que resulta en coinfecciones con enfermedades bacterianas invasivas y deterioro cognitivo (29,30). Aún está en debate si las infecciones asintomáticas sirven de reservorio para la transmisión del parásito al mosquito. Si bien algunos estudios han demostrado que las infecciones asintomáticas y submicroscópicas contribuyen a la transmisión del parásito a mosquitos, otros estudios han demostrado que estos tipos de infecciones resultan en una infectividad muy limitada en los mosquitos (17,22,102). Sin embargo, los portadores asintomáticos pueden causar malaria importada y malaria por transfusión o trasplante de órganos (31).

A la fecha existe una falta de consenso internacional sobre la definición de malaria asintomática (21). Los resultados de estudios transversales y cohorte a gran escala llevados a cabo recientemente por el ICEMR en la Amazonía peruana, destacan la persistencia y alta prevalencia de infecciones asintomáticas por Pv y han hecho descripción de la heterogeneidad de factores epidemiológicos asociados a este tipo de infecciones, que varían dependiendo de la época y comunidad donde se realiza el estudio (82,90,103,104).

La mayoría de los estudios transversales basan su definición de infecciones asintomáticas bajo el concepto de si los participantes del estudio no reportaron fiebre o malestar general durante la colección de muestra entre 7-0 días antes de la colección de muestra (79,104), sin embargo, estudios recientes cuestiona el uso de esos únicos síntomas como criterios para definir una infección asintomática ya que se ha reportado que los síntomas de la malaria pueden diferir según la región endémica, dependiendo de las enfermedades predominantes.(105,106). Muy pocos estudios han profundizado en la descripción o caracterización de los individuos asintomáticos, en términos de la evaluación de presentación y frecuencia de

síntomas comúnmente reportados en malaria u otros menos reportados, y resultados de medición de parámetros de laboratorio clínico bioquímicos y hematológicos (107). A la fecha no hay estudios en el Perú, que reporten la descripción de parámetros de laboratorio clínico bioquímicos y hematológicos en individuos asintomáticos con infección por Pv (108).

Con el fin de describir mejor las infecciones asintomáticas y ampliar nuestra comprensión de su proceso biológico, el cual es fundamental para la exploración de la respuesta inmunológica de estos individuos, realizamos once estudios de corte transversal en un total de trece comunidades de la Amazonía peruana entre los años 2018 y 2021 para buscar individuos con infección por Pv. A partir de los estudios transversales, se invitó a participar a individuos sintomáticos (Sin), asintomáticos (Asin) con infección por Pv a un estudio longitudinal durante 6 meses. De igual forma se procedió a enrolar individuos sanos de zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Iquitos como controles (21). Para este estudio planteamos la hipótesis que los individuos Asin infectados con Pv presentaban diferentes características epidemiológicas, clínicas y/o tienen diferencias de resultados tras la medición de diferentes parámetros de laboratorio clínico bioquímico y hematológico como consecuencia del desarrollo de inmunidad clínica, en comparación con individuos Sin.

I.1. Hipótesis:

Individuos Asin con infecciones por Pv presentan diferentes características epidemiológicas, clínicas y/o diferentes parámetros de laboratorio clínico bioquímico y hematológico predictivos de inmunidad clínica en comparación con individuos Sin.

I.2. Objetivos

1. Comparar la prevalencia de infecciones Sin y Asin por Pv en 13 comunidades de la Amazonía peruana, sitios de ejecución de estudios transversales llevados a cabo entre los años 2018-2021.
2. Comparar las características sociodemográficas y del hogar de individuos con infecciones Sin y Asin por Pv, en 13 comunidades de la Amazonía peruana, sitios de ejecución de estudios transversales llevados a cabo en los años 2018-2021.
3. Realizar un análisis geoespacial para ubicación de puntos calientes o concentración de casos de individuos con infecciones Asin por Pv en en 13 comunidades de la Amazonía peruana, sitios de ejecución de estudios transversales llevados a cabo entre los años 2018-2021.
4. Determinar la evolución parasitológica y clínica en individuos con infección Asin por Pv confirmada durante 21 días
5. Evaluar y comparar parámetros de laboratorio clínico bioquímico y hematológico de individuos Sin y Asin con infecciones por Pv de la Amazonía peruana.

II. METODOLOGIA

II.1. *Áreas de estudio*

Se realizaron once tamizajes poblacionales (TP) en trece comunidades ribereñas diferentes de la Amazonía peruana, entre septiembre de 2018 y noviembre de 2021. Seis ubicadas cerca de la ciudad de Iquitos: Tarapoto (-73.4070° O, -3.8046° S), Santa Rita (3.7321° S, 73.3241° O), San José de Lupuna (3.745° S, 73.323° O), Llanchama (3.8591° S, 73.4106° O) y San Pedro (3.7508° S, 73.3324° O), ubicadas en la cuenca del río Nanay y la comunidad de Centro Fuerte (3.6251° S, 73.3275° W) ubicada en el río Momon. Las otras siete comunidades estuvieron ubicadas en el distrito de Mazán: Libertad (3.496° S, 73.234° O), Primero de Enero (3.479° S, 73.199° O) y Puerto Alegre (3.510° S, 73.116° O) ubicadas en la cuenca del río Mazán; y Huaman Urco (-73.2164° O, -3.3150° S), Salvador (-73.1547° O, -3.4446° S), Urco Miraño (3.361° S, 73.064° O) y Lago Yuracyacu (3.365° S, 72.989° O) ubicadas en la cuenca del río Napo (Figura 1). La selección de las comunidades de estudio cumplió con dos criterios principales: 1) reportes de alto índice de casos de malaria, ocho semanas previas al TP, estos datos fueron obtenidos a través de la Oficina de Notificación Semanal de Epidemiología de la Dirección Regional de Salud de Loreto (DIRESA) y 2) fácil acceso para el seguimiento de las personas, y colección y transporte de muestras.

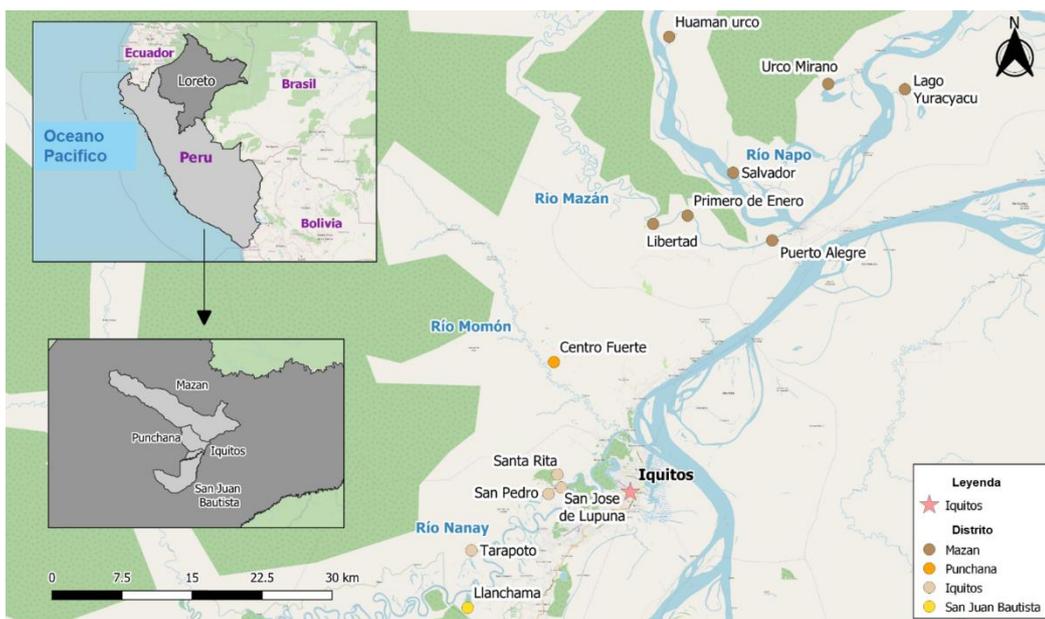


FIGURA 1. Áreas de estudio en la región Loreto, Amazonía peruana. Se incluyeron comunidades de cuatro distritos: Llanchama en el distrito de San Juan Bautista (punto amarillo); Tarapoto, Santa Rita, San José de Lupuna y San Pedro en el distrito de Iquitos (puntos crema); Centro Fuerte en el distrito de Punchana (punto naranja); Libertad, Primero de Enero, Puerto Alegre, Huaman Urco, Salvador, Urco Mirano y Lago Yuracyacu en el distrito de Mazán (puntos marrones).

II.2. Estudios transversales

Con el fin de evitar sesgos de muestreo e incluir en el estudio a todos los residentes de las comunidades, las fechas de ejecución de los estudios transversales fueron comunicadas por carta a las autoridades de las comunidades con anticipación, previamente a los tamizajes poblacionales (TP). Unos días antes a los TP, se realizaron visitas a las comunidades para presentar al equipo de investigación y explicar a los miembros de la comunidad sobre la importancia de la ejecución del estudio y su participación. Los tamizajes poblacionales (TP), duraron entre 3 a 5 días. Durante estos días se realizó la búsqueda de los residentes en sus viviendas casa por casa para enrolar a los participantes, en caso uno o más miembros de la familia no se encontrasen al momento de la visita, se realizaron dos visitas

adicionales en un día y horario diferente con el fin de captar a toda la población. Todas las personas (>18 años) que aceptaron participar en el estudio, después de firmar el consentimiento informado, completaron una encuesta integral relacionada con su historial y síntomas de malaria, además accedieron a dar una muestra de sangre por punción digital para detección de *Plasmodium spp.* por microscopía y qPCR (el día de la TP también se denominó Día 0, D0). Para evitar sesgos, a los individuos no se les dio a escoger alternativas de una lista de síntomas; en cambio, se registraron los síntomas referidos por cada participante. La detección de *Plasmodium spp.* por microscopía y qPCR se realizó dentro de las 24 horas posteriores a la colección de la muestra de sangre.

Los individuos Sin se clasificaron como personas que presentaban al menos un síntoma de malaria (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos), un resultado de microscopía positivo o negativo para Pv y/o un resultado de qPCR positivo para Pv al momento del TP (D0). Los individuos Pv Asin no presentaron síntomas de malaria durante los siete días previos a la TP, tuvieron un resultado de microscopía positivo o negativo para Pv y un resultado de qPCR positivo para Pv en el momento del TP (D0). Tras la colección de la muestra para el estudio, los individuos Sin con infección por *Plasmodium spp.*, por microscopía o qPCR, fueron derivados a centros de salud para recibir tratamiento, siguiendo las Directrices del Ministerio de Salud del Perú (109). Se obtuvieron resultados de microscopía y qPCR para un total de 2159 individuos.

II.2.1 Colección de muestras:

Se colectaron muestras de sangre por punción digital para elaboración de láminas de gota gruesa y frotis sanguíneos para análisis microscópico. Durante las primeras

cuatro TP, se colectó sangre total a partir de punción digital en papeles filtro para análisis por qPCR (62); a partir del quinto TP, se colectaron muestras de sangre total por punción digital utilizando microtubos con EDTA para su procesamiento posterior por qPCR (Vacutest, Kima ®, Padua, Italia). Las muestras de sangre en microtubos se centrifugaron para separar los glóbulos rojos del plasma y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento (62). Los qPCR fueron realizados dentro de las 24 horas posteriores a la colección de la muestra (22). La información y muestras colectadas durante los estudios transversales se usaron para el cumplimiento de los **objetivos 1,2 y 3** de este capítulo (Figura 2)

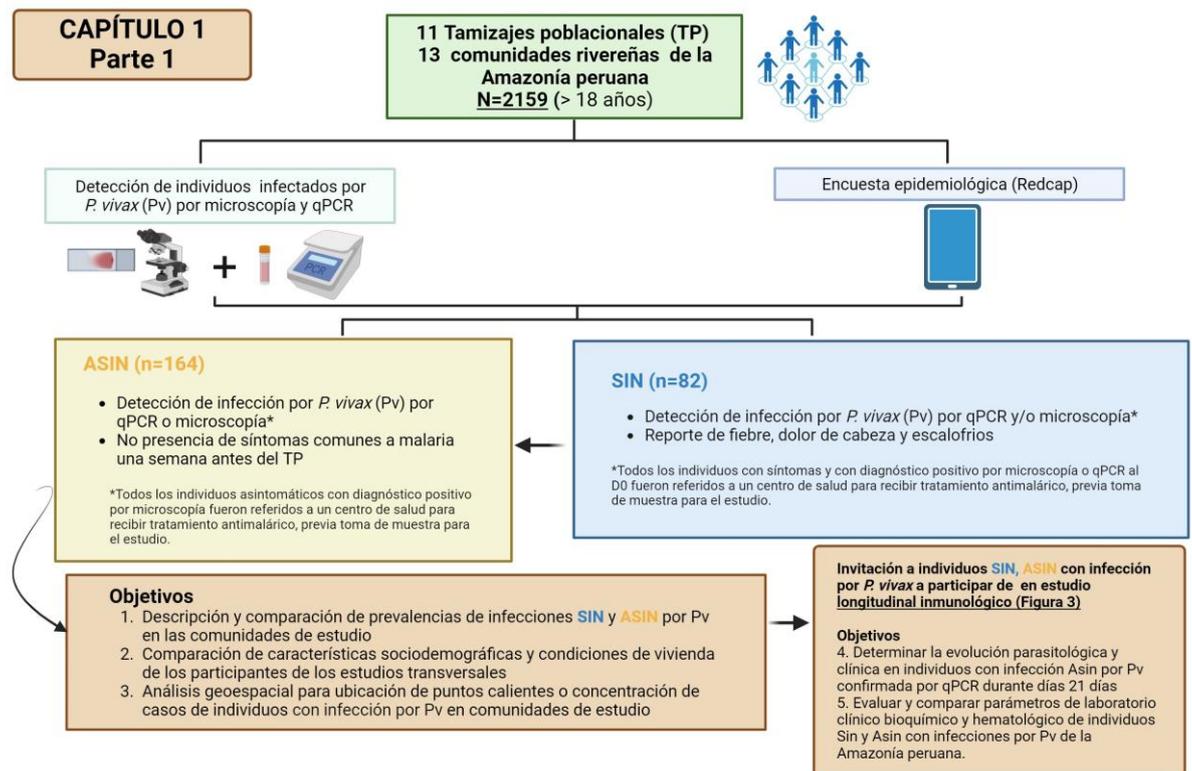


FIGURA 2: Flujograma de trabajo del estudio epidemiológico a partir de la información colectada en los estudios transversales o tamizajes poblacionales

II.3. Enrolamiento de individuos Sintomáticos, Asintomáticos con infección por Pv e individuos controles (estudio longitudinal inmunológico)

Los participantes de los estudios transversales que fueron clasificados como individuos Sin y Asin y con reporte de infección por Pv por microscopia o qPCR fueron invitados a participar en un pequeño estudio longitudinal para seguimiento. al tercer y sexto mes post-enrolamiento, con el fin de evaluar la evolución de su respuesta inmune post-tratamiento antimalárico, (Figura 2).

En paralelo se realizó el enrolamiento de individuos sanos residentes de zonas urbanas de la ciudad de Iquitos como controles. Se usó este criterio, en base a la premisa de que no había forma de corroborar el reporte oral de no historial de infección por malaria suministrada por individuos provenientes de las mismas comunidades donde se realizaban los estudios transversales. Dado su contexto de residencia, es probable que estos individuos fueran potencialmente individuos Asin (capaces de controlar parasitemias debajo del umbral de detección de las técnicas de diagnóstico empleadas en el estudio) al momento de la toma de muestra (52). Por motivos de financiamiento, logística y duración de tiempo de la tesis, solo podíamos realizar seguimientos al tercer y sexto mes, para monitoreo de la evolución de infección por Plasmodium en estos individuos, y dependíamos de la información brindada por los participantes durante la encuesta epidemiológica para monitorear su historial de exposición a infección. Por tanto, se decidió usar como controles a individuos sanos residentes en zonas urbanas de la ciudad de Iquitos, con probabilidades de exposición a contextos endémico de malaria de acuerdo actividades o historial de movilización, pero con menos riesgo o probabilidad de tener una infección por Plasmodium durante el transcurso del estudio por residir en

un área donde no existe transmisión activa de malaria. El diseño de estudio es similar al descrito por Almeida et al., 2021 en base a una decisión en consenso por parte de los investigadores del proyecto inmunológico del ICEMR, con el fin de hacer los estudios inmunológicos realizados en Brasil y Perú comparables entre sí (21) (Figura 3).

Los participantes de los TP con resultado positivo a infección por Pv por qPCR y/o microscopía fueron invitados a participar en un estudio longitudinal por 6 meses si cumplían con los criterios de inclusión. Los criterios generales de exclusión fueron estar embarazada, diagnóstico de infección mixta detectados por qPCR o microscopía, e informe oral de antecedentes de enfermedades crónicas o infecciosas comunes como diabetes, HIV o inmunosupresión. Los individuos Pv Asin no presentaron síntomas comunes de malaria durante los siete días previos al TP, tuvieron un resultado de microscopía positivo o negativo a Pv y un resultado de qPCR positivo a Pv en el momento de la TP (D0) o cualquiera de los días de seguimiento (D7, D14, D21), además no reportaron antecedentes de tratamiento antimalárico durante el último mes (89,90). Los individuos Pv Sin se clasificaron como personas que presentaban al menos un síntoma de malaria (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos), un resultado de microscopía positivo o negativo para Pv y un resultado de qPCR positivo para Pv en el momento del TP (D0) o cualquiera de los días de seguimiento (92) (Figura 3).

Los controles sanos fueron individuos con residencia en la ciudad de Iquitos, sin antecedentes de tratamiento antimalárico o historial de infecciones por malaria durante los últimos tres años, tuvieron resultados negativos a infección por

Plasmodium spp. por microscopía y qPCR, y durante la entrevista no informaron de antecedentes de comorbilidades o infecciones crónicas (Figura 3).

El día de colección de muestra, se invitó a los individuos Sin (n = 49) y Asin (n = 29) con infección por Pv e individuos de controles (n = 30) a donar 60 mL de sangre para ensayos inmunológicos, y pruebas de laboratorio clínico bioquímicas hematológicas. Un médico llevó a cabo una evaluación médica completa antes de la colección de la muestra. Después de la toma de muestra, los individuos Sin con infección por *Plasmodium spp.*, detectados por microscopía o qPCR en el D0 o cualquier día del seguimiento, fueron referidos a los centros de salud para recibir tratamiento adecuado inmediato, siguiendo las Directrices del Ministerio de Salud del Perú (109). A todos los individuos Asin se les indicó que buscarán atención médica en un centro de salud en caso presentaran síntomas durante el período de seguimiento, las muestras para el estudio fueron colectadas antes de que las personas recibieran tratamiento antimalárico. Después de la colección de muestras, todos los participantes con resultado positivo a infección por Plasmodium por qPCR fueron referidos al centro de salud más cercano para recibir tratamiento antimalárico siguiendo las Directrices del Ministerio de Salud del Perú (109). El tratamiento por infección por Pv de malaria no complicada en adultos fue llevado a cabo mediante la administración de Cloroquina 10 mg/Kg los días 1 y 2, y 5 mg/Kg el día 3, más Primaquina 0.5 mg/Kg/día durante siete días; la infección por Pf en malaria no complicada en adultos se trató usando Mefloquina 12.5 mg/Kg/día por 2 días, más Artesunato 4 mg/kg/día por 3 días, más Primaquina 0.75 mg/Kg/día por 1 día (109).

Como estrategia paralela para alcanzar nuestro tamaño muestral en un período de tiempo más corto, también se reclutaron a individuos con infección por Pv Sin mediante detección pasiva de casos en diferentes centros de salud de la ciudad de Iquitos (n = 10/49). Luego de la toma de muestra para el estudio, los participantes recibieron atención inmediata y el tratamiento adecuado en los centros de salud, siguiendo las Directrices del Ministerio de Salud del Perú (109).

Adicionalmente los participantes del estudio fueron seguidos al mes 3 (M3) y mes 6 (M6) post-enrolamiento. Durante estos puntos de seguimiento se colectó 20 mL de sangre total por individuo para monitoreo de infección por Pv por microscopía y qPCR y estudios inmunológicos. Debido a la pandemia del COVID-19, los seguimientos se vieron interrumpidos drásticamente. En total, solo se pudo realizar seguimientos al M3 a 22 individuos y 21 individuos al M6 (Tabla 1). Todos los individuos a los cuales pudimos realizar los seguimientos no tuvieron síntomas y no se les detectó infección por *Plasmodium spp.* por microscopía o qPCR al momento de toma de muestra a excepción de uno como indicado en la Tabla 1. No se pudo realizar colección de muestras correspondiente al seguimiento de M3 a los individuos controles debido a restricciones de actividades por la pandemia del COVID-19 (Tabla 1).

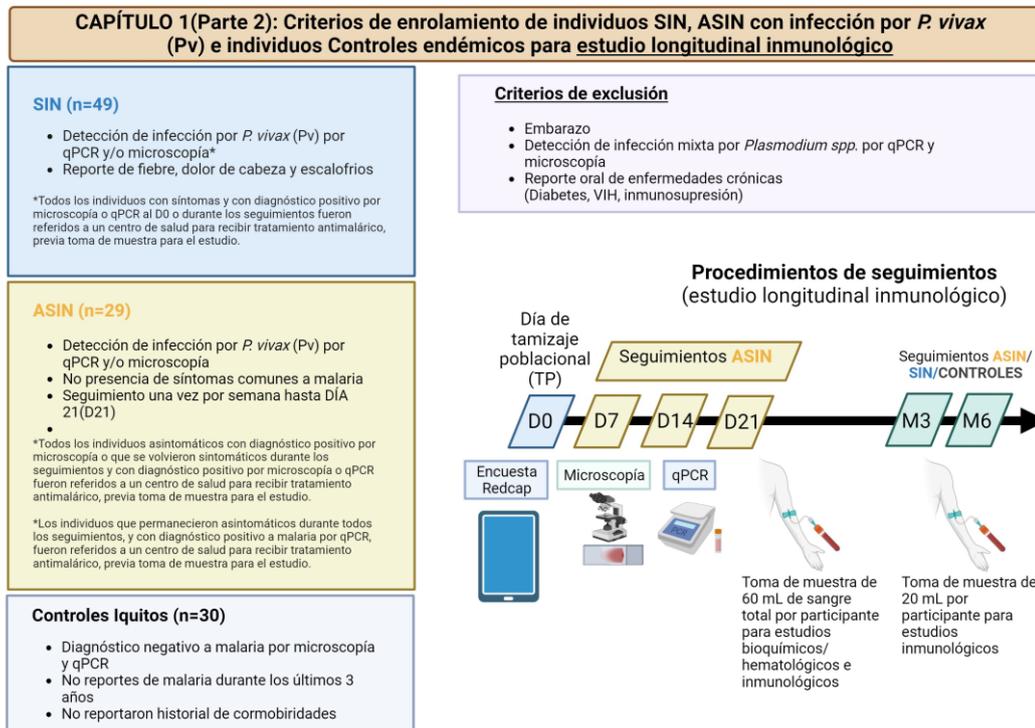


FIGURA 3: Esquema resumen de los criterios de inclusión y exclusión para el enrolamiento de individuos Sin, Asin con infección por *P. vivax* e individuos controles.

Tabla 1. Tabla resumen del número de individuos con seguimientos realizados durante el estudio longitudinal.

Estatus participante	MES 3 post-enrolamiento (M3)	MES 6 post-enrolamiento (M6)
ASIN (n =29)	13	6*
SIN (n =49)	9	3
Controles Iquitos (n=30)	0	12
TOTAL	22	21

* 1 de los 6 individuos con seguimiento al sexto mes post-enrolamiento, se le detectó infección por Pv al momento de la colección de muestra. El resto de los individuos a los cuales pudimos realizar los seguimientos no tuvieron síntomas y no se les detectó infección por *Plasmodium spp.* por microscopía o qPCR al momento de toma de muestra.

II.4. Procedimientos de laboratorio

II.4.1. Microscopía óptica: Las láminas de gota gruesa y frotis sanguíneo fueron fijadas en metanol y teñidas durante 10 minutos con solución de Giemsa al 10 %. La densidad de parásitos se calculó después de contar el número de parásitos en un total de 200 glóbulos blancos en la gota gruesa, asumiendo una concentración de 8000 glóbulos blancos/ μL . Las láminas fueron leídas en el sitio de colección y luego nuevamente por un experto en microscopía en nuestro laboratorio satélite en la ciudad de Iquitos. Una lámina se declaraba negativa si no se encontraban parásitos de malaria después de examinar 200 campos (110). Se realizó un control de calidad a ciegas para todas las láminas positivas y el 10% de láminas negativas elegidas al azar, por un microscopista experto del Laboratorio de Referencia de la Dirección Regional de Salud de Loreto (DIRESA). Los resultados discordantes fueron reevaluados por un segundo microscopista experto senior.

II.4.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR): Se usó el Kit E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit (Omega Bio-tek®, Georgia, EE. UU.) para extraer ADN genómico de 40 μL de paquete globular con EDTA o 0.72 cm^2 de papel de filtro impregnado con sangre total, usando las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones (adición de tampón TEN (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA, pH 8.0; 0.2 M NaCl) complementado con SDS 10 % p/v). El ADN extraído se almacenó a 4 °C para su uso inmediato y a -20 °C para análisis posteriores.

La detección de *Plasmodium spp.* en las muestras de papel filtro y paquete globular se realizó mediante una qPCR dirigida a la detección del gen mitocondrial citocromo oxidasa III (COX-III) (216 pb) de *Plasmodium spp.* mediante SYBR Green. Brevemente, se mezclaron 5 μL de ADN extraído con 0.2 μM de los

siguientes cebadores COXIIIIF: 5'-CGGTAGATAGGGAACAAACT-3' y COXIIIR: 5'-CTTTGCCTGGAGGTTACG-3'; 12.5 µL de PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® y 6.5 µL de agua de grado PCR por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Real-Time PCR CFX96™ Bio-Rad (Bio-Rad, EE. UU.) utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de una amplificación durante 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60°C, y 15 s a 68°C, y una extensión final de 3 min a 70°C. A la amplificación le siguió inmediatamente un programa de fusión que consistía en un aumento gradual de la temperatura de 70 °C a 90 °C con un aumento de 0.5 °C/s hasta un total de 5 s. Se agregaron controles positivos, negativos y blancos a cada placa. Se añadió el mismo control positivo a cada placa para garantizar la comparabilidad entre ensayos. El análisis de las diferencias en las curvas de fusión proporcionó una diferenciación precisa entre muestras positivas y negativas a *Plasmodium spp.*

Las muestras positivas a *Plasmodium spp.* fueron procesadas luego en otro qPCR para la identificación de especies Pv y Pf mediante la detección de la subunidad pequeña del ARNr (18S) de las mismas, usando las sondas descritas anteriormente con pequeñas modificaciones (111,112). Brevemente, se mezclaron 5 µL de ADN extraído con 0.1 µM de los cebadores 5'- GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA - 3' y 5' - AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA - 3'. Además, se agregaron las siguientes sondas Taqman específicas de especie en reacciones separadas: Pv 5' VIC – AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT- QSY 3' y Pf 5' FAM – AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT – Q SY 3' a una concentración de 0.08 µM. Finalmente, se agregaron 10 µL de TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems) y 4.44 µL de agua de grado

molecular por reacción. Las reacciones se realizaron en un termociclador Real-Time PCR CFX96™ Bio-Rad (Bio-Rad, EE. UU.) utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min y una amplificación durante 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 60 s a 60°C. Se prepararon diluciones en serie a partir de muestras estándares de pacientes con diagnóstico confirmado por mono-infección de Pf y Pv (producidos y distribuidos por la OMS y el Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control (Potters Bar, Hertfordshire, Inglaterra, 3QG)) a cinco concentraciones entre 20 y 2 par/μL. Se utilizó una curva estándar para calcular el número de par/μL en una muestra de sangre (22,113).

II.4.3. Laboratorio clínico:

Se evaluaron los siguientes parámetros de laboratorio clínico hematológico: leucocitos, glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hb), hematocrito, plaquetas, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. También se evaluó los siguientes parámetros clínicos bioquímicos: alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), urea, creatinina, fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, gamma-glutamyl transpeptidasa, glucosa, proteínas, potasio, y sodio. El analizador hematológico automatizado Pentra 60C (Horiba, Kioto, Japón) y el analizador automatizado Cobas c311 (Laboratorios Roche, Basilea, Suiza) fueron usados para medir los analitos hematológicos y bioquímicos, respectivamente. Los 26 analitos se midieron utilizando kits comerciales recomendados para la misma marca de analizadores automatizados. Para la

evaluación se aplicaron valores de referencias internacionales. Todos los procedimientos siguieron las normas de control de calidad de laboratorio clínico.

II.5. Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico R (Versión 4.0.0) y el software RStudio (Versión 1.2.5042) y los paquetes de modelos "rstatix", "stats", "epiR" y "UTPetR". Para todos los análisis, los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para los estudios transversales, se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar las diferencias en la proporción de casos de malaria en los momentos de TP en las comunidades con más de una TP. Los análisis univariados y multivariados se ajustaron a variables socio demográficas como: sexo, edad, tipo de infección, estacionalidad, historial de viajes y ocupación; y de características de vivienda: como estación, número de dormitorios, tipo de material de construcción en techo y piso, fuente agua, última fumigación y uso de mosquiteros impregnado o no impregnado. El análisis de regresión logística multivariable solo incluyó factores del análisis univariable con resultados significativos de valor $p < 0.25$ (103). Los modelos predictivos finales mostraron todas las variables potenciales significativamente asociadas con infección Asin por Pv (valores $p < 0.05$). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los resultados entre los grupos de estado clínico (Asin, Sin y controles), y la prueba de Dunn y post-hoc cuando era necesario.

El análisis geográfico se realizó utilizando el programa QGIS (v. 3.03) y los paquetes de R 'sp', 'spdep' y 'sf'. Primero, se construyeron mapas de calor con el número de casos de malaria Pv Sin y Pv Asin confirmados por qPCR por casa en cada comunidad empleando una estimación de densidad kernel (KDE) en QGIS. Se

evaluó la autocorrelación espacial global del número de casos Asin en cada sitio mediante el cálculo del I Global de Moran. Se usó el I Local de Moran y Getis Ord para evaluar la autocorrelación espacial local del número de casos Asin en cada sitio (114). Si una comunidad tenía más de una visita, se calcularon los índices para cada una de ellas. Como nuestro conjunto de datos estaba compuesto por coordenadas, definimos a los vecinos por la distancia entre ellos. Para evitar hogares aislados (sin vecinos), calculamos la distancia umbral a la que se encontraba cualquier punto que tuviera al menos un vecino dentro de su propia comunidad. A partir de aquí, realizamos 99 999 permutaciones de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) para evaluar la significancia de nuestro índice global de Moran. Finalmente, para evaluar la autocorrelación espacial local, calculamos el I local de Moran y Getis Ord utilizando la misma distancia mínima para cada comunidad y corrigiendo por la razón de descubrimientos falsos (FDR). Este proceso nos permitió clasificar las casas en cinco categorías: Alto - Alto, casas con un alto número de casos Asin rodeadas de un alto número de Asin; Bajo - Bajo, casas con bajo número de casos Asin rodeadas de casas con bajo número de Asin, valores atípicos, Alto – Bajo, Bajo – Alto y no significativo (ns) (82,103).

II.6. *Ética:*

Los estudios con participantes humanos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú). Los participantes dieron su consentimiento informado por escrito al inicio del estudio durante los TP (código SIDISI 101518 aprobado el 27/10/2017) y para participar en el estudio longitudinal (código SIDISI 101497 aprobado el 26/10/2017).

III. RESULTADOS

III.1. Características sociodemográficas y del hogar de la población

Un total de 2159 personas (≥ 18 años) y 688 hogares de 13 comunidades, con diferentes condiciones de vida de la Amazonía peruana (Anexo 1 y 2) participaron en los 11 estudios transversales realizados entre 2018 y 2021. El 50.7% (1094/2159) eran mujeres, la mediana de edad de los participantes fue 43 años (IQR = 31 – 57 años). El 50.4 % (1088/2159) reportó tener educación primaria, oscilando entre el 33.8% y el 71.7% en las comunidades, y el 34.0 % educación secundaria (734/2159). Más de la mitad de los participantes (57.2 %, 1236/2159) reportaron trabajar en actividades al aire libre, como la tala, la pesca o la agricultura. La mayoría de los participantes no informaron el historial de viajes fuera de sus comunidades durante el mes anterior al TP (66.9%, 1444/2159) (Anexo 1).

Más de la mitad de los hogares seleccionados tenían la característica de tener al menos una habitación con cuatro paredes y un techo (62.9 %, 433/688), poseían al menos un dormitorio (52.6 %, 362/688) y no más de dos camas (53.1 %, 365/688) por casa. El material predominante para paredes y pisos fue la madera en 91.9% (632/688) y 57.6% (396/688), respectivamente; los techos eran principalmente de calamina o estaño (69.6%, 479/688). La disponibilidad de agua potable era escasa en la mayoría de las comunidades (4.1 %, 28/688), y la principal fuente de agua para beber se obtenía de los ríos adjuntos o de la lluvia (53.1 %, 365/688). La proporción de hogares que poseían más de un mosquitero tratado con insecticida fue alta (80.4 %, 553/688), y una baja proporción de residentes informó que sus casas fueron rociadas con insecticida (34.0 %, 234/688) (Anexo 2).

III.2. Las infecciones asintomáticas por Pv son predominantes y no se detectan en los diagnósticos rutinarios para detección de malaria

A lo largo del estudio, el diagnóstico microscópico subestimó el número de infecciones por Pv hasta en seis veces en comparación a los resultados obtenidos por qPCR (2% (45/2159) frente a 11.4% (246/2159)); por lo tanto, qPCR fue usado como método de referencia para la confirmación de infecciones por Pv para todos los análisis (Figura 4, Anexo 3). En general, dos de cada tres infecciones detectadas por qPCR fueron Asin (66.7%, 164/246). Las infecciones Asin se detectaron principalmente durante la estación seca o vaciante de ríos 70.7% (116/164). Curiosamente, la mayoría de los individuos Asin fueron del sexo masculino 53.7% (88/164), mayores de 48 años (30.5%, 50/164), y presentaron parasitemias submicroscópicas 82.9% (136/164).

San José de Lupuna fue la comunidad con mayor número de infecciones por Pv (25.4% (31/122), en junio/julio de 2019); sin embargo, seis meses después, entre enero/febrero de 2020, esta prevalencia disminuyó significativamente al 11.5% (15/130) (prueba exacta de Fisher, $p = 0.005$) (Figura 4, Anexo 3). La proporción de infecciones Asin detectadas por qPCR disminuyó (77.4% (24/31) frente a 60% (9/15)) durante el último TP, y la proporción de infecciones Sin se duplicó (22.6% (7/31) frente a 40% (6/15)) (Anexo 3). El número de infecciones por Pv en la comunidad Libertad también disminuyó significativamente desde septiembre de 2019 (23.4%, 22/94) a octubre de 2021 (2.6%, 3/114) (prueba exacta de Fisher, $p < 0.001$) (Figura 4). Sin embargo, la proporción de infecciones Asin (64%, 14/22 y 67%, 2/3) y Sin (36.4, 8/22 y 33%, 1/3) detectadas por qPCR permanecieron constantes durante el primer y el último TP respectivamente (Anexo 3). La misma

tendencia se observó en la comunidad de Urco Miraño, manteniéndose un alto porcentaje de infecciones Asin (86%, 6/7 y 100%, 5/5) en noviembre/diciembre 2019 y marzo 2020 respectivamente (Figura 4, Anexo 3).

Es de notar que el porcentaje de infecciones por Pv apenas se redujo en la comunidad de Santa Rita, de acuerdo a los resultados de los TP realizados entre noviembre/diciembre de 2018 (23.3%, 32/137), junio/julio de 2019 (22.7%, 25/119) y enero/ febrero de 2020 (19.9%, 29/146) (prueba exacta de Fisher, $p = 0.7902$), demostrándose la persistencia de transmisión de malaria en esta comunidad específica en comparación a las otras comunidades (Figura 4). La proporción de infecciones Sin y Asin fue más dinámica en esta comunidad, variando en un rango de 59.4% (19/32) a 72% (18/25) a 48.3% (14/29) para Asin y de 40.6% (13/32) a 28% (7/25) a 51.7% (15/29) en el caso de infecciones Sin (Anexo 3). Debido a los criterios de selección de los sitios de estudio y las restricciones de la pandemia de COVID-19, solo pudimos realizar un TP para el resto de las comunidades. Las comunidades de Primero de Enero (100%, 5/5), Huaman Urco (77,8%, 14/18) y Llanchama (42.9%, 9/21) presentaron la mayor prevalencia de infecciones Asin (Anexo 3). En general, durante este estudio, las infecciones Pv fueron de prevalencia baja, predominantemente submicroscópicas (82.9%, 201/246), y asintomáticas (66.7%, 164/246) (Anexo 3).

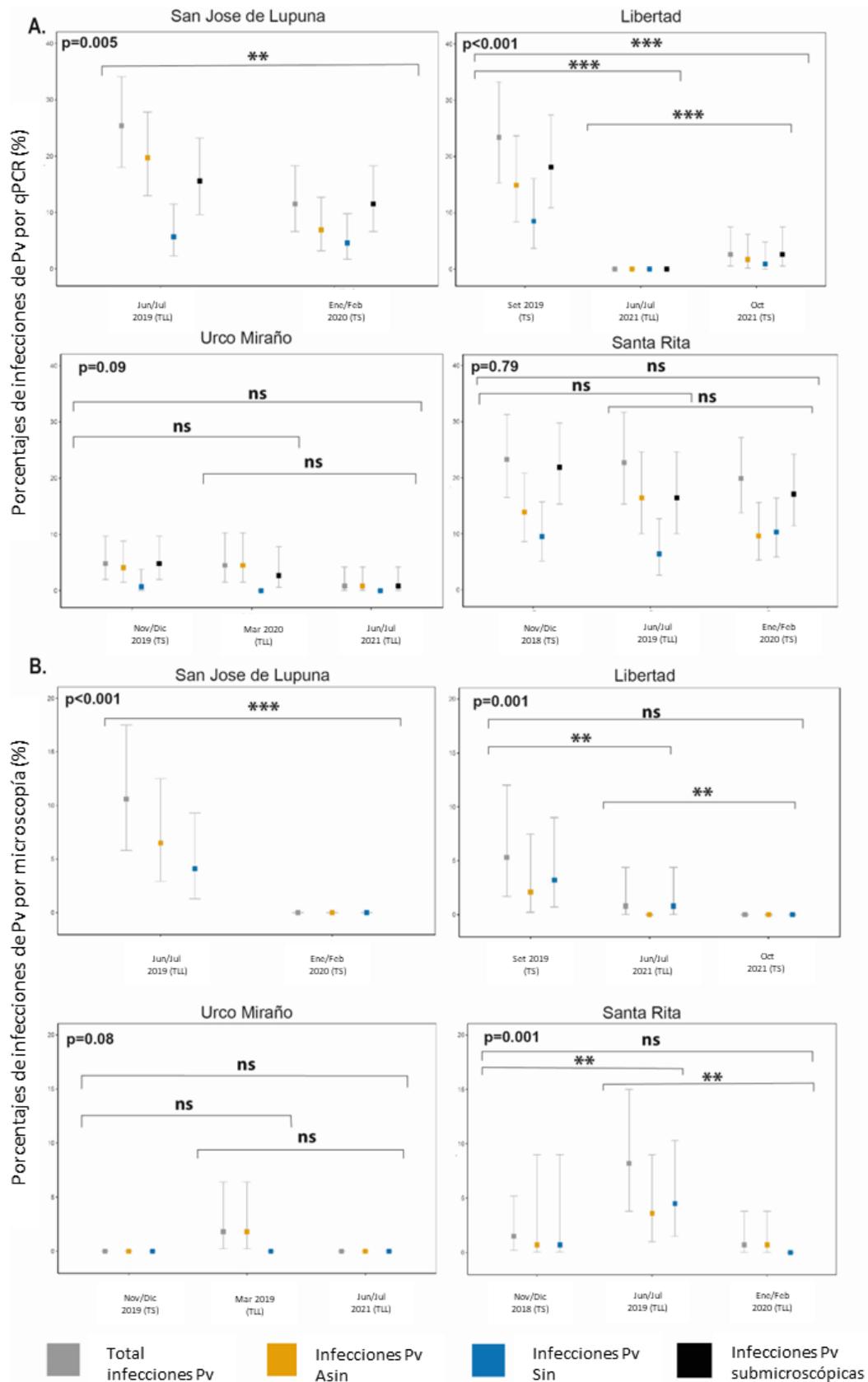


FIGURA 4. Porcentajes de infecciones por *P. vivax* y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, según el método de detección [qPCR (A) y microscopía (B)] y de acuerdo con estado clínico (Asin y Sin) de las comunidades con múltiples TP durante todo el estudio. En corchetes se visualizan los resultados de las comparaciones entre las mismas categorías por TP * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns, no significativo, prueba de Kruskal Wallis, pos hoc: prueba de Dunn. TLL, temporada de lluvias; TS, temporada seca.

Los análisis espaciales usando el I Global de Moran no revelaron la presencia de puntos calientes o agrupación geoespacial de individuos Asin con infección por Pv durante los TP (Tabla 2). Los análisis geoespaciales locales usando Getis-Ord, revelaron la ubicación de solo un punto caliente de casos Asin en la comunidad de Urco Mirañó durante el TP8 (Anexo 4). Los análisis geoespaciales usando el índice local de Moran identificaron puntos críticos visuales, pero no significativos de casos Asin por casa en comunidades como Santa Rita (TP2, TP4 y TP7), San José de Lupuna (TP4 y TP7), San Pedro (TP7) y Libertad (TP5 y TP11). Simultáneamente, Urco Mirañó, Tarapoto, Llanchama, Primero de Enero, Puerto Alegre, Huaman Urco y Centro Fuerte mostraron una distribución uniforme de estos casos, con puntos discretos a lo largo de la extensión de la comunidad. La comunidad Lago Yurac Yacu no presentó ningún caso Asin durante el octavo TP (TP8) (93).

TABLA 2. Resultados de la autocorrelación espacial global sobre el número de casos asintomáticos de *P. vivax* por vivienda

Comunidad	TP	Fechas	N° Casas	Distancia umbral (m)	Global Moran's I	valor p
Tarapoto	1	Agosto-Setiembre 2018	33	284	-0,051751	0.6826
Santa Rita	2	Agosto-Setiembre 2018	66	76	-0.088259	0.8673
Llanchama	3	Abril-Mayo 2019	35	337	-0.088146	0.8871
Santa Rita	4	Junio-Julio 2019	56	68	0.052678	0.1716
San José de Lupuna	4	Junio-Julio 2019	58	154	-0.087922	0.9618
Libertad	5	Setiembre 2019	43	1148	-0.09498	0.8593
Primero de Enero	5	Setiembre 2019	16	241	-0.055455	0.4788
Puerto Alegre	5	Setiembre 2019	29	293	-0.035856	0.6352
Huaman Urco	6	Noviembre-diciembre 2019	54	409	-0.018318	0.4184
Urco Miraño	6	Noviembre-diciembre 2019	49	98	-0.071699	0.7115
San José de Lupuna	7	Enero-febrero 2020	64	63	-0.061181	0.672
Santa Rita	7	Enero-febrero 2020	69	114	-0.017692	0.4703
San Pedro	7	Enero-febrero 2020	46	58	0.00027952	0.3839
Salvador *	8	Marzo 2020	80	-	-	-

Lago Yuracyacu *	8	Marzo 2020	29	-	-	-
Urco Miraño	8	Marzo 2020	48	107	-0.04413	0.5558
Libertad *	9	Junio-Julio 2021	56	-	-	-
Urco Miraño	9	Junio-Julio 2021	51	215	-0.011814	0.09763
Centro Fuerte	10	Setiembre 2021	37	1266	-0.043627	0.8889
Libertad	11	Octubre 2021	54	1148	-0.029374	0.8627

*No se detectaron casos asintomáticos durante los TP, por tanto, no fue posible realizar el análisis de autocorrelación espacial

III.3. Factores sociodemográficos asociados a infección asintomática por Pv

Se realizó un análisis multivariable ajustado para determinar la asociación de factores como: estación, sexo, edad, estado de diagnóstico, antecedentes de viaje y ocupación, a infección Asin por Pv. Encontramos que las infecciones de Asin no estaban asociadas a la época de lluvias (odds ratio ajustado [AOR] = 0.56, IC del 95% [0.32 – 0.96], p=0.370). Tampoco encontramos asociación con variables como sexo, edad, ocupación, ni antecedentes de viaje en el mes anterior. Además, abordamos la relevancia de las características del hogar para la presencia de al menos un miembro de la familia Asin por casa mediante la realización de un segundo análisis multivariable ajustado. Los individuos Asin se encontraron principalmente en casas con paredes de madera (AOR = 6.07, 95% CI [1.81 - 21.44], p=0.004). Curiosamente, incluso el tener un mosquitero sin insecticida ejerció un efecto protector en las casas ya que estas familias tenían un 56% menos de probabilidad de presentar un miembro de la familia Asin (AOR = 0.44, 95 % CI [0.20 – 0.94], p=0.039).

III.4. Evolución de las características clínicas de las infecciones sintomáticas y asintomáticas por P. vivax en la Amazonía peruana

De las 82 infecciones Sin identificadas durante el estudio transversal, el 91.5% (75/82) de las personas experimentaron dolores de cabeza (Kruskal wallis test, $p < 0.0001$) y solo el 23.2% (19/82) informaron fiebre; el 18.3% (15/82) informó mareos y el 17.1% (14/82) dolor muscular. Otros también informaron malestar general (17.1%, 14/82) y escalofríos (14.6%, 12/82), y síntomas como pérdida de apetito, dolor abdominal, fatiga, dolor de estómago, diarrea y dolor en los ojos. El 86% (141/164) de los participantes Asin no reportaron síntomas comúnmente asociados con malaria; sin embargo, reportaron síntomas como dolor muscular (6.7%, 11/164), mareos (4.3%, 7/164), malestar general (2.44%, 4/164) y dolor ocular.

De los 246 individuos infectados con Pv detectados por qPCR durante las TP (D0), solo 78 individuos aceptaron participar en el estudio y donar sangre último día de seguimiento para ensayos inmunológicos, hematológicos y bioquímicos. El 44.9% (35/78) se clasificaron como Sin en D0; sin embargo, el 17.9% (14/78) de los individuos Asin clasificados como tal el D0 experimentaron síntomas de malaria durante las semanas de seguimiento (28.6% (4/78) en el D7, 21.4% (3/14) en el D14, 21.4% (3/14) en el D21) y 28.6% (4/14) en el último día de colección de muestras y, por tanto, fueron agregados al grupo sintomático. El 37% (29/78) de los individuos permanecieron Asin durante todos los seguimientos; dentro de este grupo, cinco infecciones (17.2 % (5/29)) se volvieron detectables por microscopía (40% (2/5) en el D7 y 60% (3/5) en el D14) (Tabla 3). En resumen, se enrolaron 29 individuos Asin, 49 Sin y 30 controles.

Tabla 3. Resumen de cambio de estatus de individuos Asin a Sin en el transcurso de los 21 días de seguimiento

Estatus	D0 (%)	D7 (%)	D14 (%)	D21 (%)	Ultimo día de seguimiento
Sin	35 (45%)	39 (50%)	42 (54%)	45 (58%)	49 (63%)
Asin	43 (55%)	39 (50%)	36 (46%)	33 (42%)	29 (37%)
Total	78 (100%)	78 (100%)	78 (100%)	78 (100%)	78 (100%)

El D0, los individuos con infecciones Asin demostraron parasitemia significativamente menores por qPCR (mediana=1.22 par/ μ L, IQR:0.31-5.58) en comparación con las infecciones Sin (mediana=31.49 par / μ L, IQR:6.01-5268.62) (prueba Kruskal-Wallis, $p < 0.001$). Otro hallazgo clave fue la fluctuación de la parasitemia en los individuos Asin durante el seguimiento. El 17.2% (5/29) de las infecciones Asin por Pv detectadas inicialmente por qPCR durante los seguimientos se volvieron detectables por microscopía, pero siguieron siendo Asin. Los individuos que permanecieron Asin durante todas las semanas de seguimiento (n = 29) presentaron una parasitemia significativamente menor (mediana=0.79 par/ μ L, IQR:0.27-2.74) por qPCR en comparación con los individuos que se volvieron Sin (n = 49, mediana=54.55 par/ μ L, IQR:6.49 -6432.33) el último día de toma de muestra (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.001$). Solo se detectaron gametocitos en infecciones por Pv Sin por microscopía (mediana = 1862.1 par/ μ L, IQR: 841 – 4043.55). La falta de detección de gametocitos para infecciones por Asin se debió a que estas parasitemias estaban por debajo del umbral normal de cuantificación microscópica. Durante este estudio, no se realizó RT-qPCR para cuantificación de ARNm de gametocitos Pv (115).

III.5. Características bioquímicas y hematológicas de individuos infectados por P. vivax

Se evaluaron trece analitos clínicos bioquímicos y trece hematológicos para los individuos Sin (n = 49) y Asin (n = 29) con infección por Pv e individuos controles (n = 30). La mayoría de los valores de medianas de estos parámetros mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, sin embargo, los resultados estuvieron dentro del rango normal y no demostraron tener relevancia clínica (Anexo 5, 6 y 7). En contraste, los valores de la enzima hepática gamma-glutamyl transpeptidasa, bilirrubina total y bilirrubina directa fueron más altos y fuera del rango normal para los individuos Sin en comparación con los individuos Asin ($p < 0.05$) (Figura 5, Anexo 7). Los individuos Asin mostraron valores significativamente más bajos y fuera del rango normal para los analitos clínicos de hematocrito y hemoglobina (Figura 5). Estos valores fueron aún más bajos en el caso de las mujeres Asin en comparación con los otros grupos de estudio ($p < 0.01$) (Figura 5). Se observaron niveles altos de eosinófilos para los individuos Asin en comparación con los individuos Sin ($p < 0.01$) y los individuos de control ($p < 0.001$) (Figura 5) (93)

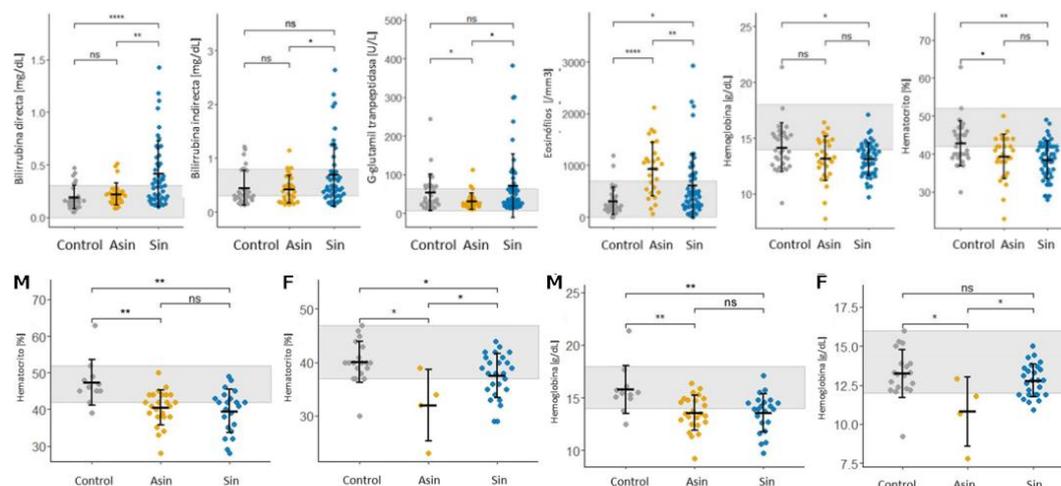


FIGURA 5. Resultados más relevantes de la comparación de analitos clínicos bioquímicos y hematológicos de individuos por grupo de estudio (Sin/Asin/Controles). El área gris representa los valores de rango normal. En la gráfica se observan las medianas y Q1 y Q3 del rango intercuartil (RIQ). En corchetes se visualizan los resultados de las comparaciones por grupos de estudio * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns, no significativo, prueba de Kruskal Wallis, pos hoc: prueba de Dunn. Sexo Masculino (M) y Femenino (F)

IV. DISCUSIÓN

Se realizaron once tamizajes poblacionales en trece comunidades de la Amazonía peruana entre 2018 y 2021 en busca de individuos Asin con infección por Pv. Los resultados revelaron una prevalencia heterogénea de infecciones por Pv en las comunidades [0.8% - 25.4%], donde la mayoría de las infecciones fueron Asin (66.7 %) y submicroscópicas (82.9 %).

Los resultados de los TP en las comunidades de Santa Rita, San José de Lupuna y San Pedro, ubicadas en la cuenca del río Nanay, mostraron una mediana de prevalencia de infecciones por Pv por qPCR de 21.3% (IC 95% [11.5 – 25.4]) y 1.25 % (IC 95 % [0 – 10.6]) por microscopía, donde la prevalencia más alta se encontró en junio-julio de 2019 y la más baja en enero-febrero de 2020. Las proporciones de individuos Asin versus Sin infectados con Pv mostraron un incremento del 2019 (~3.0) al 2020 (~4.5). Además, el análisis de estos resultados

reveló un cambio del 2018 al 2020 en Santa Rita, donde la prevalencia de Pv encontrada por qPCR disminuyó solo en un 15%, mientras que la prevalencia de Pv encontrada por microscopía disminuyó a la mitad. La evaluación de las infecciones por Pv en las comunidades de Tarapoto y Llanchama, también ubicadas cerca de la cuenca del río Napo, y la comunidad de Centro Fuerte (cerca del río Momón) mostraron resultados similares, baja prevalencia de infecciones por Pv y altas proporciones de individuos Asin. La evaluación de la prevalencia de malaria en comunidades del distrito de Mazán, como Libertad, Primero de Enero y Urco Miraño halladas en este estudio junto con sus registros históricos (82,104,116) también han demostrado que aunque la cantidad de infecciones por Pv detectadas por microscopía han disminuido desde 2017, los casos de Pv detectados por qPCR pueden ser hasta cuatro veces más altos, siendo estos Asin y submicroscópicos. Una contribución de este estudio fue la inclusión de comunidades del distrito de Mazán como Puerto Alegre, Huaman Urco, Salvador y Lago Yuracyacu, donde encontramos la misma tendencia de resultados.

Debido a la falta de consenso internacional sobre la definición de malaria asintomática (117), decidimos reevaluar la frecuencia y el orden de los síntomas reportados por individuos Sin y Asin con infección por Pv. Un hallazgo principal de este estudio fue que una alta proporción de individuos reporto dolor de cabeza como el síntoma principal, seguido de fiebre, mareos, dolor muscular, malestar general y escalofríos. Sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan la fiebre como criterio principal para clasificar a los individuos sintomáticos con malaria (106). El dolor de cabeza ha sido reportado como un síntoma clave asociado con recurrencias de infección por *Plasmodium ssp.* en individuos del oeste de Tailandia

(118). La mayoría de las personas Asin no informaron ningún síntoma el D0 o durante los seguimientos, pero algunos desarrollaron síntomas como mareos, dolor muscular y malestar general, los cuales no formaban parte de nuestros criterios de definición para infecciones Sin; a pesar de estos síntomas, estas personas aún podían realizar actividades diarias.

En general, los individuos Asin mostraron una parasitemia más baja que los individuos Sin por qPCR (mediana = 0.79 par/ μ L frente a 54.55 par/ μ L). Resultados de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en las mismas comunidades en el 2015 estimaron una media geométrica de parasitemia de infecciones por Pv de 90 par/ μ L (IC 95 % [42–190]) donde el 50 % de ellos tenía menos de 10 par / μ L (19), indicándose así una aparente tendencia a la baja de parasitemias en los últimos años en la Amazonía peruana. Las infecciones por Pv son capaces de inducir una adquisición más temprana de la inmunidad clínica y un control más eficaz de la parasitemia en comparación con las infecciones por Pf.

(119). Las bajas densidades de parásitos de Pv también pueden explicarse por la preferencia de Pv de invadir reticulocitos, los cuales representan menos del 1% del recuento total de glóbulos rojos en torrente sanguíneo (120). Sin embargo, trabajos recientes también han demostrado la presencia de una proporción sustancial de biomasa de trofozoítos y esquizontes de Pv en los espacios extravasculares de la médula, el bazo y el hígado, lo que podría promover la condición de malaria crónica asintomática (121–123). La baja prevalencia y parasitemia encontradas en la mayoría de los sitios de estudio en este trabajo respaldan el uso de la serología como el siguiente paso para monitorear la prevalencia de malaria en la Amazonía peruana a medida que trabajamos hacia la eliminación de esta enfermedad en el Perú (124).

Un 44.9% (35/78) de las personas fueron clasificadas como Sin el D0. El 17.9 % (14/78) de las personas clasificadas como Asin al D0 experimentaron síntomas de malaria durante las semanas de seguimiento y, por lo tanto, fueron agregadas al grupo de Sin (49/78), soloun 37% (29/78) permaneció Asin a lo largo de todos los seguimientos. Además, el 17.2% (5/29) de las infecciones Asin detectadas por qPCR se volvieron detectables por microscopía, pero permanecieron Asin y solo el 6.1 % (3/49) se convirtieron en Sin en el último día de seguimiento. Pocos estudios longitudinales en la Amazonía han reportado datos sobre la evolución clínica de la parasitemias Asin (21,125,126). Lamentablemente, no pudimos alcanzar el tamaño muestral originalmente calculado, debido a las limitaciones de trabajo de campo a causa de la Pandemia del COVID-19. Sin embargo, hallazgos similares a los nuestros fueron previamente reportados por Moreno-Gutierrez et al., 2018 en un estudio llevado a cabo durante junio y julio de 2015 en el distrito de Mazán. Este estudio encontró que de 179 personas infectadas con Pv por qPCR, el 16.8% de las personas Asin experimentaron síntomas de malaria durante el seguimiento. El 40.8% permaneció Asin durante todos los seguimientos, y una pequeña proporción (13.8%) de las infecciones submicroscópicas con resultados qPCR positivo pero negativas por microscopía se hicieron patentes y detectables por microscopía en visitas posteriores, lo que sugiere la persistencia de portadores submicroscópicos del parásito (90). Durante este estudio, las densidades de parásitos en individuos Pv Asin a menudo fluctuaron entre bajas e indetectables (29,120,127). Se requiere más investigación sobre la evolución clínica de las infecciones Asin para aclarar el papel de la inmunidad en estos individuos, la protección contra la malaria clínica y los

mecanismos involucrados en la regulación de infecciones subclínicas y eventos de eliminación espontánea del parásito (22,128).

En este estudio, las infecciones Asin prevalecieron durante la estación seca o de menos lluvia o llamada también vaciante de ríos. Otros estudios cohorte a gran escala también han reportado con frecuencia una alta prevalencia de infecciones Asin por Pv durante la estación seca con una duración de hasta 9 meses, y parasitemias oscilantes entre densidades ultra bajas y altas que pueden durar más allá de la estación seca y que podrían convertirse en una fuente potencial de transmisión durante la temporada de lluvias (29). Dado que las personas Asin no acuden a los centros de salud, la búsqueda de portadores Asin durante la estación de vaciante de ríos mediante herramientas serológicas podría ayudar en el rediseño de estrategias más efectivas de control y/o eliminación de la malaria (117,129).

Se encontraron más individuos Asin en casas con paredes de madera, y la posesión de al menos un mosquitero no impregnado tuvo un efecto protector en la casa. Nuestros resultados son similares a los de un estudio realizado en 2009 en personas que vivían en el bosque del centro de Vietnam, con condiciones de vida similares a las de los participantes de nuestro estudio (130). No obstante, en este estudio las casas de madera fueron construidas por el gobierno, lo cual no necesariamente reflejaba el estado socioeconómico real de los habitantes de Vietnam (130). En nuestros sitios de estudio, las casas están hechas principalmente de paredes de madera, techo de hojalata y pisos de tierra, lo que refleja el bajo nivel socioeconómico de sus habitantes, sin embargo, las paredes de madera fueron el único material de la casa asociado a la infección por malaria Asin. Curiosamente, incluso tener un mosquitero sin insecticida por casa mostró un efecto protector de

tener un miembro de la familia Asin, destacando nuevamente el uso adecuado de los mosquiteros como medida de protección contra infección por malaria (130). Los estudios actuales, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, están explorando más en detalle las características sociodemográficas y el comportamiento o hábitos de estos individuos en la búsqueda de otros factores asociados a la malaria Asin.

También exploramos las características clínicas entre individuos Asin y Sin infectados con Pv comparando sus parámetros bioquímicos y hematológicos. Estudios previos han reportado diferentes niveles de parámetros clínicos hematológicos y bioquímicos en infecciones agudas por Pv, la mayoría de estos parámetros regresaron a valores normales durante la convalecencia o después de la administración del tratamiento antimalárico (131–137). Individuos con malaria Asin han reportado bajo recuentos de plaquetas ($<150 \times 10^9/L$) y niveles elevados de proteína C reactiva (138,139). Recientemente, Almeida et al. 2021, no encontró alteraciones relevantes de parámetros hematológicos y bioquímicos entre individuos Sin y Asin con infección por Pv e individuos controles de Brasil, excepto signos de linfopenia y trombocitopenia junto con altos niveles de Proteína C Reactiva, así como niveles más bajos de colesterol en individuos Sin (21). Los valores como plaquetas ($\geq 185\ 000$ células/ μL), proteína C reactiva (≤ 2 mg/dL) y bilirrubina total (≤ 0.28 mg/dL) se han sugerido como una herramienta complementaria para estimar la probabilidad de tener un diagnóstico microscópico negativo a malaria (140)

Este es el primer estudio que evalúa indicadores de laboratorio hematológicos y bioquímicos en individuos Sin y Asin infectados con Pv de la Amazonía peruana

versus individuos controles. Uno de los hallazgos clave fue que los individuos Asin mostraron valores bajos de hematocrito y hemoglobina, y estos valores fueron aún más bajos en mujeres Asin (media Hb = 11.25 g/dL; parasitemia: mediana = 1.54 par/ μ L), categorizándolas con anemia leve (141), sin embargo, no podemos demostrar esto de manera concluyente debido al bajo tamaño muestral (n=4). La presencia de anemia en mujeres adultas con infección submicroscópica por Pf ha sido reportada previamente (142,143), sin embargo, esto aún debe investigarse para las infecciones submicroscópicas por Pv e individuos Asin. Los altos niveles de eosinófilos encontrados en los individuos de este estudio podrían también estar asociados con los reportes orales de los mismos individuos de diagnóstico de parásitos intestinales en el 35 % y el 53 % de los individuos Asin y Sin respectivamente (144). Los valores de enzima hepática gamma-glutamyl transpeptidasa y bilirrubina fueron más altos y estaban fuera del rango normal en el caso de los individuos Sin en comparación con los individuos Asin ($p < 0.05$). Se han reportado niveles altos de las enzimas hepática gamma-glutamyl transpeptidasa y fosfatasa alcalina en relación con lesión hepática en malaria no complicada (145). Además, se ha sugerido que la bilirrubinemia es un marcador común de infección aguda por Pv y un predictor de la gravedad de la infección (21,136,146).

Los resultados adicionales de las evaluaciones físicas de los participantes mostraron un índice de masa corporal normal y no se informaron hígados y bazo palpables (datos no mostrados). Por tanto, las infecciones Asin por Pv podrían pasar desapercibidas en los exámenes de rutina de laboratorio o durante evaluación clínica (21). Los parámetros clínicos hematológicos y bioquímicos fuera del rango normal en los individuos infectados con Pv pueden ser atribuibles también a las

condiciones de vida específicas en estas áreas endémicas, estado nutricional u otras comorbilidades no reportadas por los participantes porque no lo sabían en el momento del estudio. Este estudio demuestra que los individuos Asin aun siendo portadores silenciosos de bajas parasitemias presentan condiciones de enfermedad. Aunque el estudio tiene limitaciones de tamaño muestral, los resultados demuestran la importancia de la búsqueda e identificación de individuos Asin, la cual debería ser incluida en los programas nacionales de control y eliminación de la malaria.

Estudios futuros asociarán los resultados de parámetros clínicos hematológicos y bioquímicos con biomarcadores de respuesta inmune innata y adaptativa en infección por Pv. La generación de más resultados sobre parámetros de laboratorio clínico hematológicos y bioquímicos en infecciones por malaria Asin serán útiles para su incorporación en el diseño de algoritmos para su diagnóstico, seguimiento en la respuesta a tratamiento y diferenciación de otras enfermedades febriles agudas en estos entornos endémicos (107).

Una de las principales limitaciones de este estudio fue la ausencia de pruebas de laboratorio para detección de otros patógenos, la exploración de las deficiencias de micronutrientes y los antecedentes inmunológicos y genéticos de los participantes. Esta información sólo fue registrada por entrevista y pudo haber sido fundamental para la interpretación de los parámetros clínicos hematológicos y bioquímicos entre individuos Sin y Asin. Estudios futuros integrarán los datos epidemiológicos con los resultados de estudios inmunológicos en muestras de PBMC, plasma y suero de los mismos individuos para caracterizar mejor la respuesta inmunológica innata y adquirida de los individuos Sin y Asin con infección por Pv en la Amazonía

peruana. Esta información es relevante para aumentar el conocimiento general de la condición asintomática en enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO 2

Evaluación de PvMSP8 como nuevo seromarcador de infecciones de *Plasmodium vivax* en la Amazonía peruana

Artículo publicado el 2 marzo 2021 en *Pathogens*. doi:
10.3390/pathogens10030282.

Cita: **Villasis E***, Garro K*, Rosas-Aguirre A*, Rodríguez P, Rosado J, Gave A, Guzman-Guzman M, Manrique P, White M, Speybroeck N, Vinetz JM, Torres K, Gamboa D. PvMSP8 as a Novel *Plasmodium vivax* Malaria Sero-Marker for the Peruvian Amazon. *Pathogens*. 2021 Mar 2;10(3):282. doi: 10.3390/pathogens10030282. PMID: 33801386; PMCID: PMC7999794.

*Autores comparten la primera autoría

I. INTRODUCCIÓN:

En diferentes países donde la malaria es endémica, se pueden lograr reducciones importantes en la incidencia de la malaria con medidas de control intensivas e integrales (147). Sin embargo, estas reducciones a menudo no son homogéneas en los países co-endémicos con infección por Pf y Pv, observándose comúnmente un impacto mayor y más rápido de disminución de casos de Pf en comparación con Pv (6). En línea con los objetivos de eliminación de malaria establecidos por la OMS, el Gobierno Peruano, ha decidido implementar el “Plan hacia la eliminación de la Malaria en el Perú”, con la meta de eliminar la malaria en el país para el 2030 (148).

Desde 2017, el MINSA viene implementado medidas de control intensivas (entrega de mosquiteros con insecticidas de larga duración, fumigación de casas, DAC y tratamiento de personas con infecciones microscópicamente confirmadas) en varias comunidades de la Amazonía peruana, con el objetivo de reducir la incidencia de la malaria en más del 70% (primera fase del plan). Notoriamente, el número de casos de malaria notificados en 2019 disminuyó casi un 47% en comparación con el 2018, observándose un aumento en la relación entre los casos de Pv y Pf de 3.6/1 en 2018 a 4.6/1.9 en 2019 (149,150).

No obstante, la transmisión de parásitos Pv persiste en la Amazonía peruana, esto se atribuye al porcentaje de infecciones asintomáticas y submicroscópicas aún detectadas a la fecha, por estudios epidemiológicos que usan herramientas moleculares (93). Por tanto, urge la búsqueda de biomarcadores de infecciones asintomáticas/submicroscópicas que puedan ser implementadas en plataformas de uso pragmático como ELISAs o de punto de contacto como pruebas serológicas de

diagnóstico rápido, y que sirvan como herramientas complementarias de ayuda a los Programas Nacionales de Control de la Malaria (PNCM). Recientemente, Longley et al., 2017, haciendo uso de una plataforma serológica a gran escala (Luminex®), reportó niveles de anticuerpos IgG más altos en 22 individuos Asin con infección por Pv, enrolados en un estudio transversal en una provincia de baja endemicidad de malaria de Tailandia, para nueve antígenos de Pv (PVX_081550, GAMA, P12, P41, RBP1a y b, RBP2a, RBP2cNB y RBP2-P2) (64).

Dado que los anticuerpos contra las proteínas del parásito pueden persistir en la sangre (incluso después de toma tratamiento antimalárico), estos pueden usarse como marcadores de exposición serológica (MES) para identificar infecciones en curso y pasadas. La medición de la exposición reciente a malaria usando anticuerpos podrían apoyar la toma de decisiones para mejorar o reorientar la ejecución de estrategias de control de malaria de forma más eficiente (39). Los PNCM podrían usar los MES para documentar la ausencia de transmisión de malaria en áreas definidas, estratificar el riesgo de transmisión, evaluar el efecto de las intervenciones, informar sobre una respuesta inmediata a los equipos de control de malaria en el campo, e identificar potencialmente a individuos que portan hipnozoítos de Pv y darles tratamiento (seroTAT) (94).

El primer estudio a gran escala para identificar MES para detección de infecciones por Pv para el contexto de Amazonía peruana, evaluó las respuestas de anticuerpos IgG contra más de 1328 antígenos de Pv, en muestras de plasma de individuos sintomáticos infectados con Pv, haciendo uso de la metodología de microarreglos de proteínas. Los resultados apuntaron a la Proteína de Superficie del Merozoíto 8 (PvMSP8) entre las cinco proteínas más seroreactivas para esta población (28).

Tomando en cuenta estos antecedentes, para este capítulo de la tesis, decidimos evaluar las respuestas IgG a la proteína recombinante PvMSP8 como MES a infección por Pv a nivel poblacional en la Amazonía peruana, para lo cual se usaron 1251 muestras de plasma colectadas durante un estudio transversal poblacional realizado en siete comunidades ribereñas y endémicas a malaria de la Amazonía peruana en octubre 2018.

Asimismo, en un intento de búsqueda de biomarcadores de diferenciación de individuos con infección Asin por Pv en el contexto de la Amazonía peruana, se decidió evaluar el posible rol de PvMSP8, como proteína capaz de generar una respuesta diferencial de anticuerpos IgG entre individuos Sin vs Asin (43). Para ello se procedió a evaluar la respuesta IgG en muestras de plasma de individuos Sin (n= 49) y Asin (n= 29) infectados por Pv e individuos controles (n= 30), de la Amazonía peruana, cuyas características se describieron en detalle en el primer capítulo de la tesis (93). Más aún, se procedió a evaluar la duración de las respuestas IgG anti-PvMSP8 en estos individuos al tercer (n= 22) y sexto mes (n= 21) post-enrolamiento.

I.1. Hipótesis

La respuesta de anticuerpos IgG contra la proteína recombinante PvMSP8 producida en el sistema de expresión de proteínas eucariota, Baculovirus, sirve como biomarcador de exposición a infección por Pv y/o para distinción de infecciones Sin vs Asin por Pv en la Amazonía peruana.

I.2. Objetivos

1. Evaluar la capacidad discriminatoria de las respuestas IgG anti-PvMSP8 (medida por ELISA) como MES para detección de individuos con exposición a infección por Pv, a nivel de poblacional, utilizando 1251 muestras de plasma recolectadas durante un estudio transversal poblacional en siete comunidades ribereñas y endémicas a malaria en la Amazonía peruana.
2. Evaluar la reacción cruzada de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 en muestras de plasmas de individuos infectados con Pf
3. Evaluar la respuesta diferencial y duración de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 (medida por ELISA) entre individuos Asin vs Sin con infección por Pv, enrolados en un estudio longitudinal provenientes de diferentes comunidades de la Amazonía peruana.

II. METODOLOGÍA

II.1 Población, muestra u objeto de estudio

II.1.1. Estudio transversal poblacional para evaluación de PvMSP8 como MES a infección por P. vivax en la Amazonia peruana:

En octubre de 2018 se realizó un estudio transversal poblacional en siete comunidades del distrito de Mazán, que incluyó a todos los individuos mayores de tres años que consintieron participar en el estudio. Las comunidades donde se ejecutó el estudio fueron: Gamitanacocha (3.428° S, 73.318° O), Libertad (3.496° S, 73.234° O), Primero de Enero (3.479° S, 73.199° O), Urco Miraño (3.361° S,

73.064° O), Yuracyacu (3.365° S, 72.989° O), Salvador (3.444° S, 73.155° O) y Puerto Alegre (3.510° S, 73.116° O) (Figura 1). La transmisión en el distrito de Mazán es inestable y estacional, con picos de malaria entre mayo y septiembre y predominan los casos de Pv sobre los de Pf (relación Pv/Pf: 3.5/1). En 2018 se notificó un total de 1360 casos de malaria en este distrito (82,150).

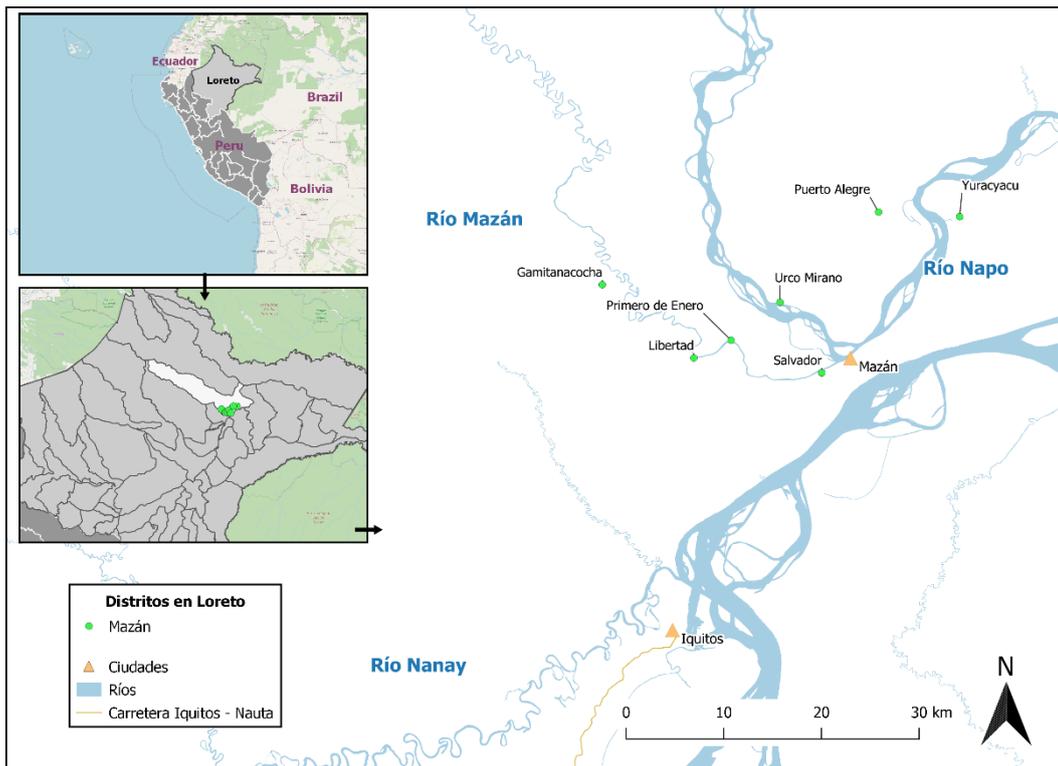


FIGURA 1: Mapa de las comunidades del estudio transversal

II.2 Procedimientos y técnicas

II.2.1 Toma de muestra durante el estudio transversal poblacional

Durante el estudio transversal, a los participantes se les procedió a medir la temperatura axilar y registrar síntomas compatibles con malaria mediante encuesta. Luego se colectaron muestras de sangre total por punción digital en microtubos con EDTA (Vacutest, Kima®, Padua, Italia) para la detección de infección por *Plasmodium spp.* por microscopía y qPCR. La muestra de sangre total se centrifugó

para separar los glóbulos rojos del plasma, y ambos componentes se transportaron a 4 °C desde las comunidades al laboratorio satélite de la ciudad de Iquitos, para ser almacenados a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras de plasma solo se descongelaron una vez para el inventario y una segunda vez para el procesamiento ELISA. Un total de 1251 individuos tuvieron resultados disponibles para microscopía, qPCR y ELISA.

II.2.2 Microscopía

Las láminas de gota gruesa y frotis sanguíneo se tiñeron durante 10 min con solución de Giemsa al 10 %. La densidad de parasitaria (parasitemia) se calculó después de contar el número de parásitos asexuales en un total de 200 glóbulos blancos (GB) en la gota gruesa, y asumiendo una concentración de 8000 GB/ μ L. Las láminas de microscopía fueron leídas por un microscopista el mismo día de colección en las comunidades y luego nuevamente por un experto en microscopía en nuestro laboratorio satélite en la ciudad de Iquitos. Una lámina era declarada como negativa si en ella no se encontraba parásitos después de examinar 100 campos (110). Un microscopista experto del Laboratorio de Referencia de la DIRESA realizó un control de calidad a ciegas a todas las láminas positivas y el 10% de láminas negativas elegidas al azar. Los resultados discordantes fueron reevaluados por un segundo microscopista experto senior.

II.2.3 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se usó el kit E.Z.N.A.® Blood DNA (Omega Bio-tek®, Norcross, GA, EE. UU.) para extraer ADN de glóbulos rojos siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones (adición de tampón TEN (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; EDTA

2 mM, pH 8,0; NaCl 0,2 M) suplementado con SDS al 10 % p/v). El ADN extraído se almacenó a 4 °C para uso inmediato y a -20 °C para análisis posteriores.

La detección molecular de *Plasmodium spp.*, se realizó mediante un método de PCR cuantitativo en tiempo real dirigido a la región del gen 18s rRNA del parásito, siguiendo el protocolo reportado previamente por Manrique et al. (151). Se utilizaron como cebadores: 5'-TAACGAACGAGATCTTAA-3' y 5'-GTTCTCTAAGAAGCTTT-3'. Las condiciones de qPCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de una amplificación durante 45 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 52 °C y 30 s a 68 °C. La amplificación fue seguida inmediatamente por un programa de fusión que constaba de 5 s a 65 °C y un aumento gradual de la temperatura de 0.5 °C/s hasta 95 °C. El análisis de las diferencias en las curvas de fusión proporcionó una diferenciación precisa entre las especies de *Plasmodium spp.*

II.2.4 Proteína recombinante

PvMSP8 es una proteína inmunogénica conservada y codificada por un gen de una sola copia (acceso GenBank PVX_097625) y expresada en los estadios sanguíneos asexuales de todas las especies de *Plasmodium spp* (152). La expresión de PvMPS8 siguió los procedimientos descritos previamente por Bendezú et al., (86) y no incluyó los dominios de señal y transmembrana.

II.2.5 ELISA

Se detectaron los niveles de IgG total contra la proteína PvMSP8 en las muestras de plasma colectadas durante estudio transversal utilizando el protocolo ELISA descrito previamente (86) con ligeras modificaciones. Los pocillos de las placas de

ELISA (Costar® High Binding), fueron recubiertos con 0.5 µg/mL de proteína PvMSP8 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7.4 toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa una vez con 200 µL/pocillo de PBS-T (0.05% Tween 20), se agregó 200 µL/pocillo de solución de bloqueo (PBS 0.1% BSA) y se incubó por una hora a temperatura ambiente (TA). Luego, se lavaron las placas con PBS-T tres veces y se agregó 100 uL/pocillo de los plasmas a una dilución 1/400 en solución AB (0.15 M NaH₂PO₄ (dibásico); 0.15 M Na₂HPO₄ (monobásico), 0.5 M NaCl; 0.05% Tween 20, 0.05% BSA, 1.5% Leche descremada) por duplicado, y se dejó incubar las muestras por dos horas a TA. Las placas se lavaron cuatro veces con solución PBS-T, se adicionó el conjugado IgG total anti-Humano con HRP (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, EE. UU.; Cat # 109-035-098) a dilución 1/2000 v/v en solución AB) y se incubó a TA protegido de la luz. Se lavaron las placas tres veces con solución PBS-T y se usó como sustrato de revelado 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB, BD OptEIA) por 7 minutos. Los valores de densidad óptica (DO) de los pocillos se leyeron a 450 nm (en el lector de microplacas ELISA iMARK, BioRad) y se corrigieron restando de ellos la media de los valores de DO en pocillos en blanco (donde las muestras de plasma se reemplazaron con solución AB).

Los plasmas de dos individuos infectados confirmados (por mono infección por Pv o Pf) se usaron como control positivo. Como control negativo se usó una mezcla de plasmas de cinco individuos sanos sin exposición previa a la malaria (no provenientes de áreas no endémicas, sin historial de viajes a áreas endémicas y con resultados negativos a infección por *Plasmodium spp.* confirmados por qPCR).

II.2.6. Muestras:

La antigenicidad de PvMSP8 se evaluó de forma preliminar utilizando 40 muestras de individuos con mono-infección por Pv confirmada mediante qPCR de la Amazonia peruana, y se comparó con 40 muestras de individuos sanos sin antecedentes de infección por *Plasmodium spp.*, y qPCR negativa a *Plasmodium spp.*

Para evaluar el rendimiento de PvMSP8 como MES (Objetivo 1) para detección de individuos con exposición a infección por Pv, a nivel de poblacional en la Amazonía peruana, se procesaron mediante ELISA las 1251 muestras de plasma colectadas durante el estudio transversal poblacional llevado a cabo en siete comunidades ribereñas y endémicas a malaria de la Amazonía peruana en el año 2018, descritas en las secciones de metodología y de procedimientos de este capítulo

Con el fin de cumplir el objetivo 2, se realizó un ensayo para evaluar la posible generación de reactividad cruzada de anticuerpos IgG contra la proteína recombinante PvMSP8 en plasmas de individuos con mono-infección con Pf. Los niveles IgG anti-PvMSP8 obtenidos tras la evaluación por ELISA de 20 muestras de plasma de sujetos adultos senegaleses con mono-infección documentada por Pf en los últimos 2 a 3 meses se compararon con los obtenidos en 20 muestras de plasma de individuos de la Amazonía peruana infectados con Pf, 20 muestras de individuos de la Amazonía peruana con infección por Pv confirmados por qPCR y 20 muestras de individuos sanos.

Para el objetivo 3, se procesaron las muestras de suero colectadas durante el estudio longitudinal descritos en el capítulo 1, y disponibles a la fecha de marzo 2022: 29 muestras de sueros de individuos Asin, 49 de individuos Sin, 30 controles de la ciudad amazónica de Iquitos, y 22 y 21 muestras de correspondientes a seguimiento

al tercer (M3) y sexto mes (M6) post-enrolamiento respectivamente. Todas las muestras correspondientes a los seguimientos tuvieron un diagnóstico negativo por microscopía y qPCR negativo a detección de *Plasmodium spp.*, a excepción una muestra correspondiente al sexto mes post-enrolamiento, que luego fue excluida del análisis.

II.3 Consideraciones éticas

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú (códigos SIDISI = 101518 aprobado el 10/ 27/2017 y 101497 aprobado el 26/10/2017).

II.4. Plan de análisis

Los datos demográficos, parasitológicos y serológicos se ingresaron dos veces y se cotejaron en Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA, EE. UU.). Los análisis se realizaron con el software R v.2.15 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) y GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Para la evaluación de muestras del estudio transversal poblacional, la exposición a Pv se definió como un individuo con resultado parasitológico positivo para Pv por microscopía y/o qPCR en el momento de la toma de muestra y en el último mes antes de la toma de muestra (antecedente de malaria).

Se usaron modelos logísticos de validación cruzada para evaluar la relación entre las respuestas antígeno-anticuerpo (es decir, DO) y el historial de exposición a Pv (expuesto/no expuesto) utilizando un método de remuestreo (100 veces), mediante

el cual dos tercios de las muestras de plasma fueron seleccionadas al azar para el entrenamiento del modelo, y el tercio restante para evaluación. La validación cruzada de las curvas de características operativas del receptor (ROC) se promediaron utilizando el paquete ROCR en R para caracterizar las compensaciones de sensibilidad/especificidad del clasificador binario. Las áreas bajo la curva (AUC) con el correspondiente 95 % de DeLong IC [62] evaluaron la eficiencia discriminatoria del modelo.

Para cada muestra, se calculó la diferencia entre la DO de cada muestra y la media de la DO de los controles negativos (mezcla de plasmas de cinco individuos sanos sin historial de malaria y con resultados negativos a infección por *Plasmodium spp.* confirmados por qPCR). Se usó el valor de tres desviaciones estándar (DE) del valor medio correspondiente de los controles negativos, para la clasificación dicotomizada de las muestras como seropositivas (mayor que o igual al límite de 3 DE, valor de corte $DO \geq 1.0$) y seronegativas (menor que el límite de 3 SD) (62). Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar las diferencias en los valores de DO entre los grupos para la evaluación de antigenicidad de la proteína PvMSP8 y reacción cruzada. Las diferencias de niveles de anticuerpos entre individuos Sin, Asin y controles y seguimientos al mes 3 y mes 6 post-enrolamiento se evaluó mediante las pruebas de Kruskal-Wallis, la prueba de Dunn y post-hoc cuando era necesario. Los datos con un valor de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Se calcularon los indicadores de rendimiento de los resultados serológicos dicotomizados (seropositivos o seronegativos) para la identificación de la exposición a la malaria (es decir, sensibilidad (S_n), especificidad (S_p), valor

predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV)), y sus intervalos de confianza (IC) bilaterales del 95% estimados mediante el método de puntuación de Wilson.

III. RESULTADOS

III.1. Evaluación de antigenicidad y reacción cruzada de la proteína PvMSP8 producida en el sistema de expresión Baculovirus

La proteína recombinante PvMSP8 fue producida en el Laboratorio de Malaria de la UPOCH utilizando el sistema de expresión de proteínas eucariote, Baculovirus. Los ensayos de inmunotransferencia de la proteína o western blots, utilizando un anticuerpo de detección anti-His, confirmaron la presencia de una banda de ~ 54 kDa, correspondiente al peso molecular de PvMSP8 (Figura 2A). Se obtuvo 0.428 mg/mL de proteína en un volumen de cultivo celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) de 170 mL. Mediante ensayo de ELISA se detectaron valores de densidad óptica (DO) de anticuerpos IgG más altos en individuos infectados con mono-infección por Pv (n = 40) confirmado por qPCR, en comparación a muestras de plasma de individuos sanos o controles. (n = 40) (Prueba de Mann-Whitney $p < 0.05$) (Figura 2B).

Dado que las infecciones por Pf y Pv coexisten en la región Amazónica peruana, se realizó un ensayo de ELISA para evaluar la posible reactividad cruzada de la proteína recombinante PvMSP8 en muestras de plasma de individuos infectados por Pf de Senegal (país que reporta solo prevalencia de infecciones por Pf) y en muestras de plasma de individuos infectados con Pf de la Amazonía peruana. Los valores de DO de anticuerpos IgG anti-PvMSP8, no fueron diferentes entre sujetos

senegaleses infectados con Pf (n = 20) e individuos sanos (p = 0.91). Sin embargo, cuando se compararon las muestras de individuos infectados por Pf (n = 20) e individuos infectados por Pv de la Amazonía peruana (n = 20) versus controles negativos, se observaron mayores valores de DO en los individuos infectados por Pv de Amazonía peruana en comparación con lo infectados con Pf del mismo contexto endémico (p < 0.001) (Figura 2C).

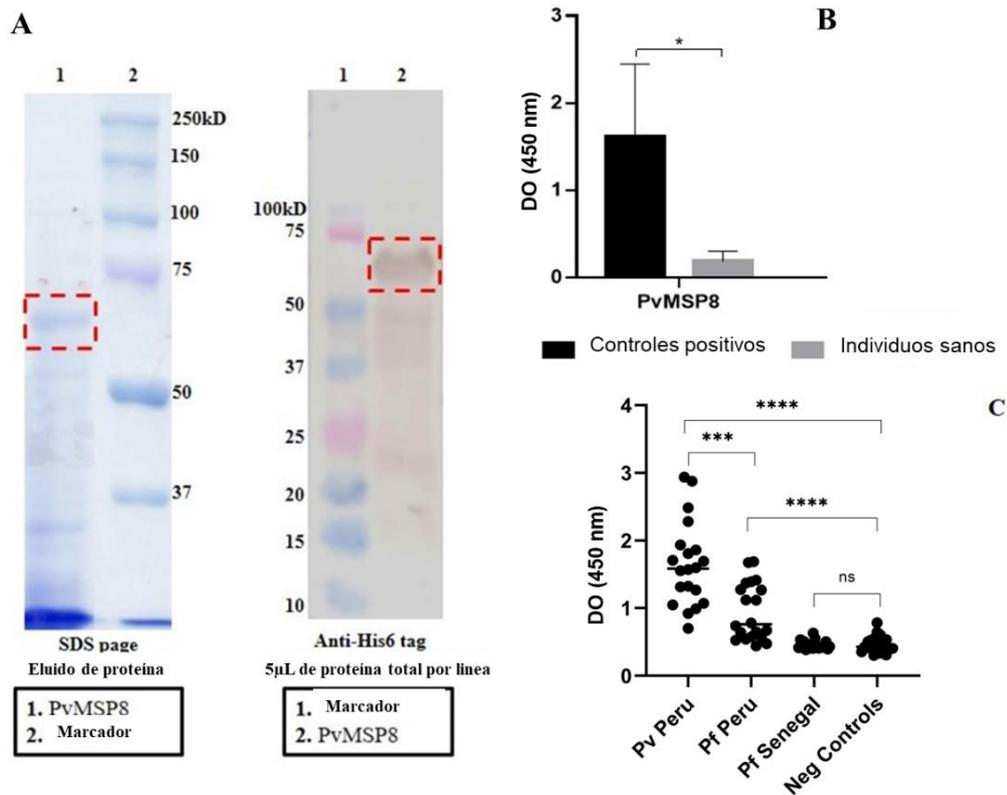


FIGURA 2. Evaluación de antigenicidad de proteína PvMSP8. (A) Producción de proteína recombinante PvMSP8. La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad con níquel a partir de sobrenadantes de cultivo. El análisis del SDS-PAGE (con tinción con azul de Coomassie) y Western blot (usando anticuerpo monoclonal anti-His6) demostró la proteína del tamaño esperado (54 kDa). (B) Evaluación de las respuestas de IgG frente a la proteína recombinante PvMSP8 mediante ELISA. Niveles totales de IgG de muestras de plasma de individuos con infección confirmada por Pv (controles positivos) en comparación con individuos sanos. (C) Ensayos de reactividad cruzada para la evaluación de respuestas de anticuerpos IgG específicas a PvMSP8 mediante ELISA. Niveles totales de IgG en muestras de plasma de sujetos senegaleses infectados con Pf (Pf Senegal), individuos infectados con Pf de la Amazonía peruana (Pf Perú), individuos infectados con Pv de la Amazonía peruana (Pv Perú)

e individuos sanos (controles negativos) frente a PvMSP8. La línea horizontal de cada grupo muestra la mediana. La significancia estadística de una diferencia entre grupos se indica en corchetes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ns no significativo.

III.2. *Evaluación de PvMSP8 como seromarcador de exposición a infección por P. vivax*

Las muestras de plasma colectadas durante el estudio transversal poblacional en siete comunidades del distrito de Mazán (realizado en octubre de 2018) fueron analizadas por ELISA para medir las respuestas de anticuerpos IgG específicos a la proteína PvMSP8 producida en el sistema baculovirus. Las características de referencia de los 1251 participantes encuestados se muestran en la Tabla 1. La proporción de mujeres superó ligeramente a los hombres (proporción mujeres/hombres = 1.06); y la mitad (50.8%, 634/1251) de la población tenía menos de 15 años.

Solo 6.5% (81/1251 /) participantes tuvieron diagnóstico confirmado de infección por Pv por microscopía y/o qPCR en el momento de la colección de la muestra de plasma (primera definición de exposición Pv). Treinta (2.4%, 30/1251) participantes adicionales informaron haber tenido un episodio de malaria por Pv confirmado microscópicamente en el último mes, lo que sumado al grupo anteriormente descrito conformó un total de 111 individuos expuestos a Pv según diagnóstico parasitológico en el momento de la toma de muestra y/o antecedentes de malaria en el último mes (segunda definición de exposición a Pv). La composición de los grupos expuestos y no expuestos según las dos definiciones utilizadas para la exposición a Pv se muestra en la Tabla 2.

TABLA 1. Características basales de los participantes del estudio transversal (N=1,251)

	Tota l		Primero de Enero		Urco Mirano		Libertad		Puerto Alegre		Salvador		Gamitanac ocha		Lago Yuracyacu	
	n	%	n=93	%	n=23	%	n=230	%	n=192	%	n=334	%	n=70	%	n=109	%
Género																
Mujer	643	51.4	41	44.1	109	48.9	112	48.7	98	51.0	182	54.5	44	62.9	57	52.3
Hombre	608	48.6	52	55.9	114	51.1	118	51.3	94	49.0	152	45.5	26	37.1	52	47.7
Grupo etario (años)																
<15	634	50.7	45	48.4	117	52.5	101	43.9	103	53.6	178	53.3	33	47.1	57	52.3
≥15	617	49.3	48	51.6	106	47.5	129	56.1	89	46.4	156	46.7	37	52.9	52	47.7
Ocupación principal (≥18 años)																
Ninguna	257	20.5	15	16.1	43	19.3	65	28.3	29	15.1	61	18.3	19	27.1	25	22.9
Obrero	1	0.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.9
Leñador	6	0.5	1	1.1	0	0.0	2	0.9	3	1.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Pescador	16	1.3	0	0.0	0	0.0	3	1.3	3	1.6	0	0.0	0	0.0	10	9.2

Ganadero	1	0. 1	0	0.0	0	0.0	0	0.	0	0.0	0	0.	0	0.0	1	0.9
Granjero	435	34 .8	35	37.6	76	34. 1	95	41 .3	68	35. 4	111	33 .2	29	41.4	21	19.3
Comerciante	5	0. 4	0	0.0	0	0.0	0	0.	1	0.5	2	0. 6	0	0.0	2	1.8
Ama de casa	53	4. 2	3	3.2	4	1.8	14	6. 1	8	4.2	15	4. 5	2	2.9	7	6.4
Estudiante	465	37 .2	38	40.9	97	43. 5	49	21 .3	79	41. 1	141	42 .2	20	28.6	41	37.6
Otro	12	1. 0	1	1.1	3	1.3	2	0. 9	1	0.5	4	1. 2	0	0.0	1	0.9

TABLA 2. Participantes del estudio transversal clasificados por grupos de edad y condición de exposición a *P. vivax* (N=1,251)

		Total		Primero de Enero n=93		Urco Mirano n=23		Libertad n=230		Puerto Alegre n=192		Salvador n=334		Gamitana n=70		Lago Yuracyacu n=109			
		To tal	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Grupo etarios (años)	Primera definición*	<15	No-expuesto	603	48.2	42	45.2	115	51.6	85	37.0	100	52.1	176	52.7	28	40.0	57	52.3
		Expuesto	315	2.5	3	3.2	2	0.9	16	7.0	3	1.6	2	0.6	5	7.1	0	0.0	
	≥15	No-expuesto	567	45.3	44	47.3	103	46.2	109	47.4	83	43.2	1	45.1	28	40.0	49	45.0	
		Expuesto	500	4.0	4	4.3	3	1.3	20	8.7	6	3.1	5	1.5	9	12.9	3	2.8	
	Segunda definición°	<15	No-expuesto	587	46.9	40	43.0	115	51.6	76	33.0	100	52.1	176	52.7	24	34.3	56	51.4
		Expuesto	478	3.8	5	5.4	2	0.9	25	10.9	3	1.6	2	0.6	9	12.9	1	0.9	
	≥15	No-expuesto	553	44.2	40	43.0	103	46.2	104	45.2	80	41.7	151	45.2	27	38.6	48	44.0	
		Expuesto	641	5.1	8	8.6	3	1.3	25	10.9	9	4.7	5	1.5	10	14.3	4	3.7	

		Antecedente de malaria (mes previo a toma de muestra)																
<15	No	61	49	43	46.2	117	52	90	39	103	53.	178	53	29	41.	56	51.	
		6	.2				.5		.1		6		.3		4		4	
	Si	18	1.	2	2.2	0	0.	11	4.	0	0.0	0	0.	4	5.7	1	0.9	
			4				0		8				0					
≥15	No	60	48	44	47.3	106	47	124	53	86	44.	156	46	36	51.	51	46.	
		3	.2				.5		.9		8		.7		4		8	
	Si	14	1.	4	4.3	0	0.	5	2.	3	1.6	0	0.	1	1.4	1	0.9	
			1				0		2				0					

* La primera definición de exposición a Pv estuvo basada en el reporte de un resultado positivo de infección por Pv (por microscopía y/o PCR) en el momento de la colección de la muestra de plasma

° La segunda definición incluyó individuos con resultado positivo y/o antecedente de infección por Pv en el último mes

Las respuestas IgG anti-PvMSP8 para discriminar entre individuos expuestos y no expuestos a infección por Pv arrojaron un AUC de 0.76 ([IC 95 % = 0.70–0.81]) cuando se utilizó la primera definición de exposición, y un AUC de 0.79 ([IC 95 % = 0.74–0.83]) cuando se utilizó la segunda definición ($p > 0.05$) (Figura 3).

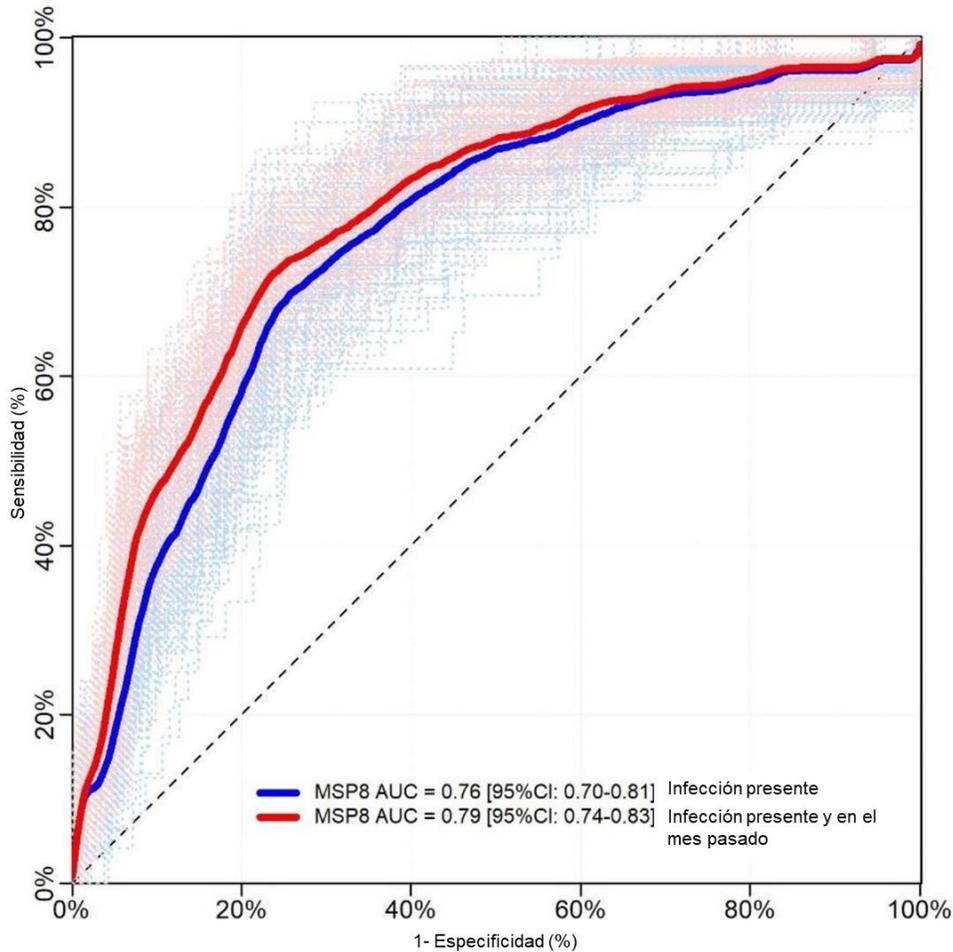


FIGURA 3. Curvas de características operativas del receptor (ROC) validadas de forma cruzada y áreas bajo la curva (AUC) de las respuestas serológicas IgG anti-PvMSP8 para detectar la exposición a infección por *P. vivax*. Las respuestas serológicas contra PvMSP8 se midieron por ELISA en una población de 1251 individuos de comunidades ribereñas del distrito de Mazán. Una primera definición de exposición a Pv fue tener un resultado positivo de Pv (por microscopía y/o qPCR) en el momento de la colección de la muestra (línea azul), mientras que una segunda definición incluyó individuos con un resultado positivo y/o el antecedente de infección por Pv en el último mes (línea roja). No se encontraron diferencias significativas entre los resultados ($p > 0.05$).

Además, los análisis de la curva ROC por grupos de edad (manteniendo la segunda definición de exposición a Pv) mostraron que las respuestas IgG anti-PvMSP8 discriminaron mejor entre individuos expuestos y no expuestos entre los participantes <15 años (AUC = 0.843 [IC 95% = 0.768– 0.914]) que en los ≥ 15 años (AUC = 0.711 [IC 95% = 0.746-0.780]) (Figura 4)

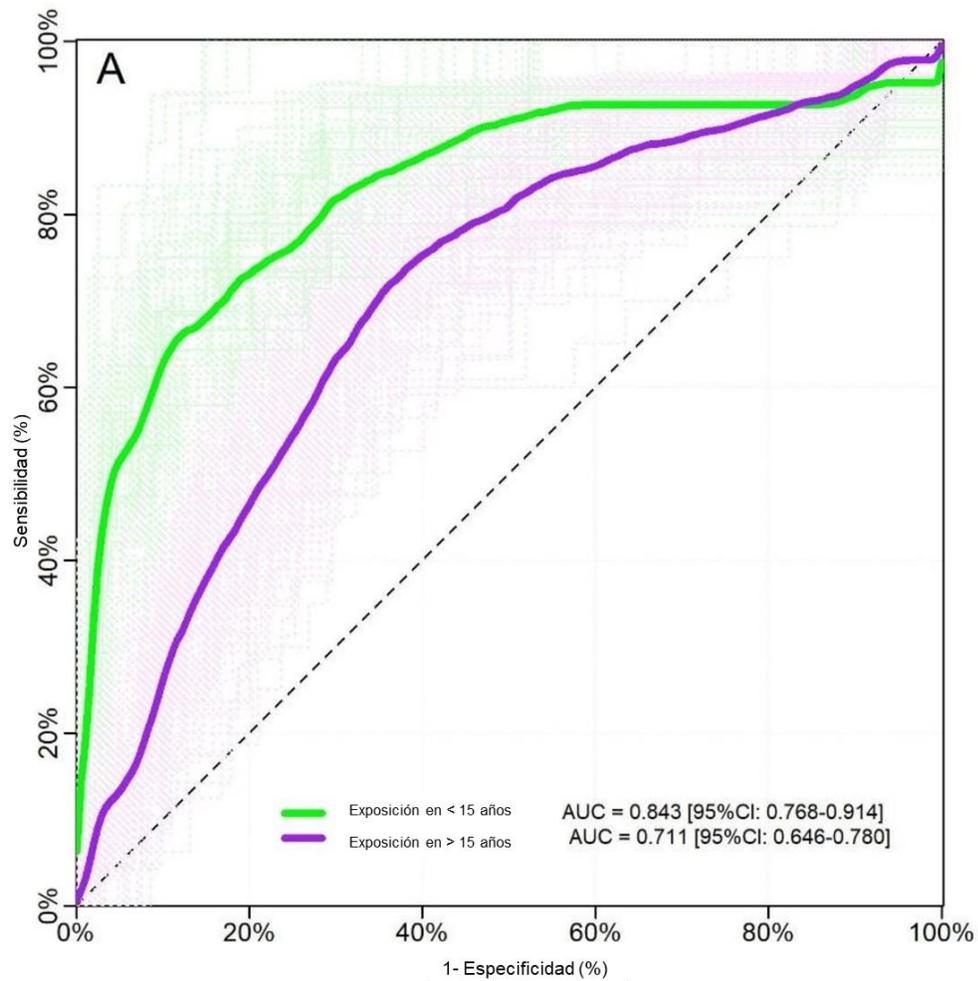


FIGURA 4. Curvas de características operativas del receptor (ROC) validadas de forma cruzada y áreas bajo la curva (AUC) de las respuestas serológicas contra PvMSP8 para detectar exposición a malaria por Pv entre individuos < 15 años y entre aquellos > 15 años. Se encontraron diferencias significativas entre los resultados ($p = 0.01$). La exposición se definió mediante un diagnóstico confirmado de Pv por qPCR y/o microscopía al colectarse la muestra de plasma y el antecedente de infección por Pv en el último mes (segunda definición).

Las DO IgG anti-PvMSP8 corregidas fueron significativamente mayores en las personas expuestas (mediana = 1.78 y IQR = 1.37) en comparación con las personas sin historial de exposición (mediana = 0.48 y IQR = 0.80) y personas sanas o controles negativos (mediana = 0.34 y IQR = 0.32) (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.001$). De manera similar, la seropositividad a PvMSP8 fue significativamente mayor en el grupo expuesto (77%, IC 95 % = 67–84) en comparación con el grupo no expuesto (31%, IC 95 % = 29–34) ($p < 0.001$) (Figura 5).

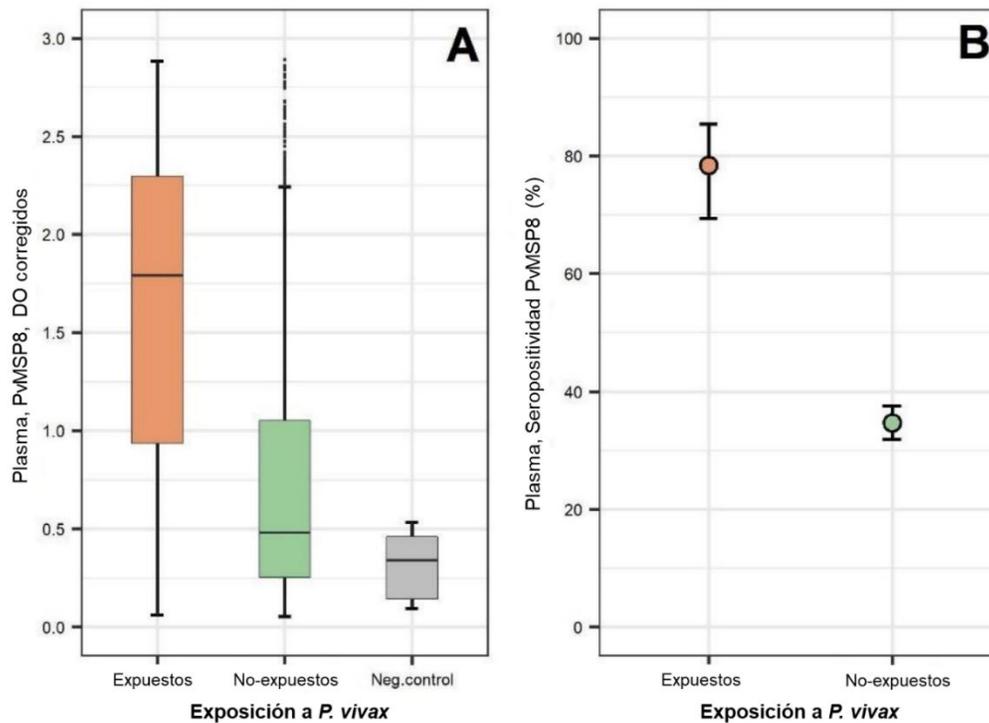
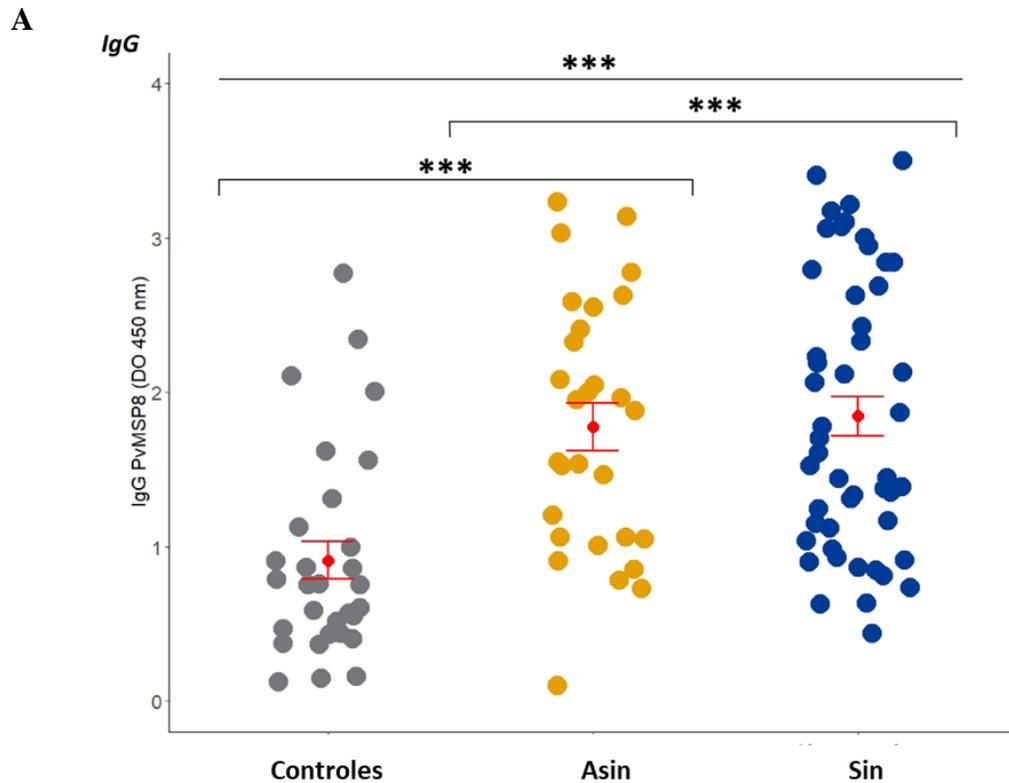


FIGURA 5. Respuestas serológicas contra PvMSP8 en individuos expuestos y no expuestos de las comunidades de Mazán. (A) Diagramas de caja (percentiles 25 a 75) de valores de densidad óptica corregidos (DO) para IgG anti-PvMSP8. Las barras horizontales dentro de los cuadros representan la mediana de los valores DO en cada grupo; (B) Gráficos de puntos de la sensibilidad de los resultados serológicos dicotomizados para PvMSP8 en la detección de exposición a infección por Pv, mostrando la media y los límites de confianza del 95% en cada grupo estimados por el método de puntuación de Wilson. La exposición se definió como un diagnóstico confirmado de Pv por qPCR y/o microscopía y antecedente de infección por Pv en el último mes (segunda definición).

III.3. PvMSP8 no genero respuesta diferencial de anticuerpos IgG entre individuos Sin y Asin

No se encontraron diferencias significativas de niveles de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 entre individuos Sin (mediana = 1.61 y RIQ = 1.57) y Asin (mediana = 1.9 y RIQ = 1.35) (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.84$), pero si al comparar ambos grupos versus los controles de Iquitos (mediana = 1.8 y RIQ = 0.65) (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.01$). Los niveles de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 descendieron significativamente al sexto mes post-enrolamiento (prueba de Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) (Figura 6).



B

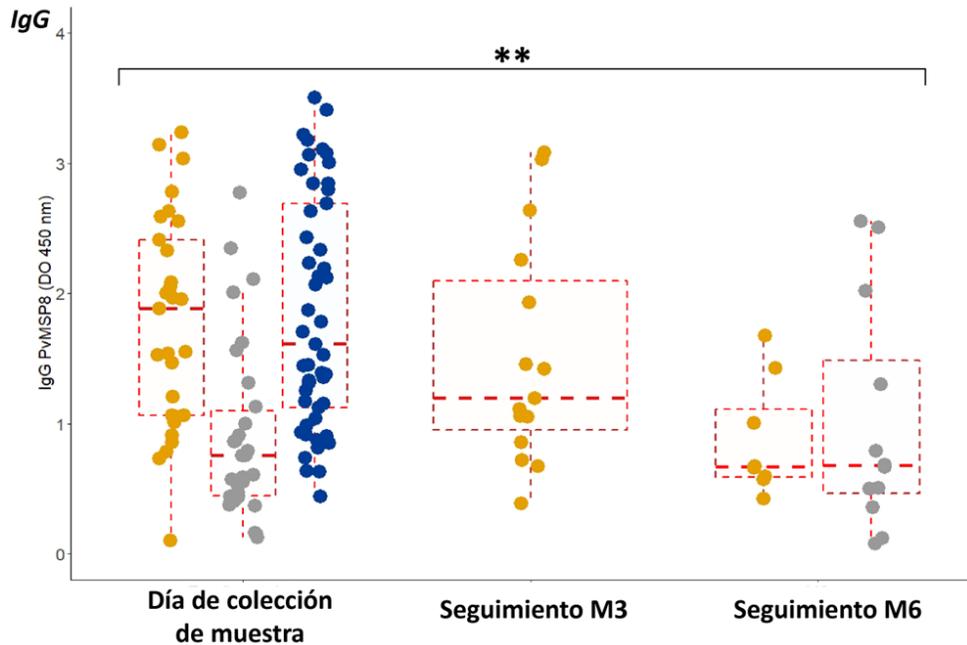


FIGURA 6. Respuesta de anticuerpos IgG anti Pv-MSP8 en individuos Sin (puntos azules), Asin (puntos amarillos) infectados con *P. vivax* y controles de la ciudad amazónica de Iquitos (puntos plomo) (A), y seguimientos al tercer y sexto mes post-enrolamiento (B). En corchetes se visualizan las comparaciones de niveles de anticuerpos entre dos grupos con diferencias significativas. (** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$). Las líneas rojas se representa la mediana de valores de DO y rango intercuartil (RIQ) para los grupos de estudio evaluados

IV. DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la respuesta IgG humana específica contra la proteína recombinante de *Plasmodium vivax* PvMSP8, expresada en nuestro laboratorio, resulto ser un MES útil, específico y eficaz para identificar infecciones recientes por Pv en la Amazonía peruana. Por tanto, sugerimos el uso potencial de las respuestas de anticuerpos IgG contra PvMSP8 como un marcador de vigilancia serológica de

aexposición reciente a Pv en entornos co-endémicos y de transmisión baja a moderada como el de la Amazonía peruana.

Durante el estudio transversal poblacional, el desempeño de PvMSP8 como marcador de exposición reciente de infección por Pv en individuos con antecedente de infección por Pv en el último mes y con diagnóstico por microscopía y/o qPCR a infección por Pv en el momento de la toma de muestras, mostró un valor aceptable (AUC = 0.79). Nuestros resultados fueron similares a los informados por Longley et al., en 2020, quien haciendo uso de una plataforma serológica a gran escala (Luminex®), demostró el buen desempeño de la proteína recombinante PvMSP8 (AUC = 0.69) expresada en el sistema de producción de proteínas, sin células, basado en germen de trigo (WGCF), como parte de un panel validado de MES para la detección de infecciones recientes por Pv (menor a 9 meses). En ese mismo estudio, PvMSP8 mostró un buen desempeño como MES en tres estudios cohortes observacionales longitudinales, realizados en Tailandia (AUC = 0.76), Brasil (AUC = 0.72) e Islas Salomón (AUC = 0.69) (94). Más aún, el rendimiento de PvMSP8 junto con otros siete MES (RBP2b, RAMA, MSP1-19, Pv-fam-a, PvTRAg_28, EBPII y MSP3.10) alcanzó una sensibilidad y especificidad del 80% para detección de individuos con infección reciente por Pv (94).

La intensidad de las respuestas serológicas en infecciones por malaria tiende a aumentar con la edad como resultado de la exposición acumulativa en personas que viven en áreas endémicas. Si esta exposición es continua y frecuente, los niveles de anticuerpos pueden llegar a una meseta (94). Este fenómeno podría explicar el buen desempeño de serología para discriminar exposición a malaria en áreas de baja

transmisión en comparación a los resultados obtenidos en áreas de transmisión moderada a alta (donde las señales de anticuerpos podrían ser altas y duraderas para todas las edades) (94,153). Debido a esto las respuestas serológicas IgG anti-PvMSP8 fueron más discriminantes en menores de edad que en adultos en el área de transmisión moderada a alta de Mazán (5).

Resultados previos de la evaluación del rendimiento de PvMSP8 en un estudio cohorte del ICEMR, llevado a cabo desde setiembre 2012 a enero 2013, que evaluó la dinámica de anticuerpos IgG mediante (Luminex®) contra esta proteína en 422 individuos con infección en el momento de la toma de muestras o historial de infección por Pv durante el transcurso del estudio cohorte, demostró que la sensibilidad de PvMSP8 como MES para detección de exposición a Pv fue más alta en individuos con infecciones que ocurrieron de siete a 30 días (79%) antes de la colección de plasma, en comparación con individuos con infecciones que ocurrieron >60 días (59%). Los niveles altos de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 duraron menos de 6 meses, lo que indica una posible diferencia de la cinética de anticuerpos entre esta proteína y otras, que deberá investigarse en próximos estudios que incluyan el seguimiento de individuos infectados con Pv durante un período de tiempo más largo y muestreos en intervalos de tiempo más cortos (95).

En el futuro, esperamos mejorar el desempeño de PvMSP8 como MES en combinación con otras proteínas que ya demostraron ser altamente seroreactivas en individuos infectados por Pv de la Amazonía peruana, como PvMSP4, PvMSP7, Pv-fam-a y PvAMA1, o PvRPBP2 (5,28). Durante este estudio optamos por el uso de la técnica

ELISA para la evaluación de PvMSP8 como MES a nivel poblacional, en un primer paso para evaluar la potencial implementación de esta plataforma en establecimientos de centros de salud de la Amazonía peruana.

PvMSP8 fue descrito por primera vez por Pérez-Leal y colaboradores en 2004 y desde entonces solo unos pocos estudios han evaluado su antigenicidad (154). Cheng et al., en 2017, produjo esta proteína en el sistema WGCF y demostró el buen rendimiento de anticuerpos IgG contra la misma para discriminar a individuos sintomáticos infectados con Pv de Myanmar y Tailandia usando la metodología de microarreglo de proteínas (73.2% de sensibilidad y 96.2% de especificidad) (66). Luego demostraron que la respuesta de anticuerpos IgG anti-PvMSP8, en residentes de Myanmar, se incrementaba hasta siete días después de la primera toma de muestra y disminuía ligeramente tras un mes. Asimismo se ha detectado respuestas de anticuerpos IgG y células B de memoria (CBM) específicas a PvMSP8 en individuos de Tailandia hasta cuatro años post-infección por Pv (155). La quimera PvMSP8-PvMSP1₁₉, también se postula como candidato a vacuna (156)

No encontramos una respuesta diferencial IgG anti-PvMSP8 entre individuos Sin (n = 49) y Asin (n = 29) con infección por Pv de la Amazonía peruana. Estos resultados son diferentes a los reportados por Longley et., al 2017, quien demostró altos niveles de anticuerpo IgG para las proteínas (PVX_081550, GAMA, P12, P41, RBP1a y b, RBP2a, RBP2cNB y RBP2-P2) en individuos Asin (n = 22) (47), sin embargo, durante este estudio no se evaluó a la proteína PvMSP8. Estos resultados marcan un inicio en la exploración de respuestas de anticuerpos diferenciales frente a proteínas de Pv en

individuos Asin de la Amazonía peruana. La disminución significativa de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 al 6to mes post-enrolamiento (n = 21), confirma la característica de esta proteína de inducir anticuerpos de duración menor a 9 meses (94).

No se detectaron anticuerpos IgG contra PvMSP8 en muestras de plasma de individuos infectados por Pf de Senegal, lo que indica la especificidad de esta proteína para la detección de infecciones por Pv. Se detectó anticuerpos IgG anti-PvMSP8 en algunas muestras de plasma de individuos infectados por Pf de la Amazonía peruana; siendo estos niveles de anticuerpos significativamente menores en comparación a los hallados en individuos con infección por Pv de este mismo contexto co-endémico, apuntando así la probable presencia de anticuerpos circulantes resultantes de una exposición previa a Pv en individuos con infección reciente por Pf (62,86). Desafortunadamente, una de las limitaciones de este estudio fue la falta de información de antecedentes de infecciones previas por Pv para los individuos con infección por Pf de la Amazonía peruana, además del pequeño tamaño muestral, debido a la baja prevalencia de infección por Pf en esta región.

Estudios futuros incluirán la evaluación de las respuestas funcionales IgM e IgG y de subclases IgG, además de las respuestas de células B de memoria contra esta proteína, y su papel, si lo hay, en la protección contra la infección. El estudio de fragmentos de esta proteína o de péptidos, diversidad antigénica y mejora del rendimiento de este MES junto con otros MES en términos de sensibilidad y especificidad en base a su aplicación a diferentes escenarios de uso (prevalencia) serán motivo para otros estudios. Por último, sería interesante también evaluar el papel funcional de los

anticuerpos contra estas proteínas en estudios de invasión *ex vivo* de Pv e *in vitro* de Pf.

CAPÍTULO 3

Caracterización de la función de anticuerpos de individuos infectados con *P. vivax* en la Amazonía peruana

Antibody parameters of P. vivax asymptomatic infections in the Peruvian Amazon.
Elizabeth Villasis, Katherine Garro, Kaitlin Pekin, Mitchel Guzman, Julian Torres, Joseph Vinetz, Dionicia Gamboa, Herbert Opi, James Besson y Katherine Torres.
Resumen ganador de beca de viaje para presentación de poster en la conferencia: Molecular Approaches to Malaria 2024 (MAM2024) “Malaria in a Changing World”. 18-22 febrero 2024 Lorne, Victoria, Australia.

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos juegan un papel crucial en la inmunidad, protección contra infección, desarrollo de enfermedad y reducción de parasitemia y la transmisión de la malaria (85,157). La mayoría de los estudios de anticuerpos en Pv a la fecha se ha centrado en gran medida en la cuantificación de respuestas IgG a antígenos de Pv usando las técnicas de ELISA y la evaluación de anticuerpos, sobre todo IgG, frente a paneles grandes de proteínas usando las plataformas tecnológicas de matrices de proteínas o ensayos serológicos a gran escala basados en perlas acopladas a antígenos (38).

Estudios de revisión reportan consistentemente la asociación de niveles de IgG contra las proteínas PvAMA1, PvMSP1, PvMSP3, PvMSP9, PvRBP2b y PvDBP, con protección a malaria clínica por Pv (43,55); sin embargo, los mecanismos de acción de los anticuerpos contra estas proteínas del parásito no son del todo conocidos. Dada la limitación de cultivos a largo plazo de Pv *in vitro*, solo se ha reportado la inhibición del proceso de invasión *ex vivo* de merozoítos a glóbulos rojos y/o reticulocitos mediante el uso de anticuerpos IgG contra las proteínas PvDBP, PvAMA1 y PvRBP2b, asimismo se ha reportado la capacidad bloqueo de transmisión de gametocitos de Pv a mosquitos mediante anticuerpos dirigidos a la proteína Pvs25 (67)

Similar a Pf, los anticuerpos IgG de Pv se caracterizan principalmente por ser tipo IgG1 e IgG3, por lo tanto, se cree que podrían activar el sistema de complemento y mediar funciones de células del sistema inmune vía receptores Fc γ . Sin embargo, hasta la fecha, sólo se ha podido evaluar la activación de la vía clásica del sistema complemento mediante anticuerpos IgG e IgM inducidos por las proteínas PvMSP3 α y PvRBP2P1

(158,159). El uso de los ensayos de cuantificación de inhibición directa del proceso de invasión mediada por anticuerpos (GIA) o ensayos complementarios mediante el uso de plataformas ELISA, para medición de anticuerpos con capacidad de fijación a proteínas recombinantes del sistema del complemento y receptores Fc γ , podría en gran medida ampliar nuestra comprensión de los mecanismos de acción de anticuerpos protectores contra Pv y la selección de proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas contra Pv (67).

Las infecciones Asin por Pv son muy comunes en la Amazonía peruana, especialmente durante la estación seca o vaciante de ríos, son de baja parasitemia, y solo detectables por herramientas moleculares (93). Los individuos asintomáticos son mayoritariamente adultos con historial de episodios previos de malaria y residencia en lugares endémicos (160). En la Amazonía, la adquisición de inmunidad clínica contra infección por Pv, puede desarrollarse de forma rápida (en dos años), especialmente en adultos, y puede requerir pocas infecciones. Aunque la inmunidad a malaria clínica no es esterilizante puede desarrollarse en regiones de baja transmisión. Comprender los mecanismos inmunitarios mediante los cuales los seres humanos infectados controlan la parasitemia en ausencia de síntomas tiene implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias de vacunas contra la malaria y para la comprensión de la biología básica de las infecciones asintomáticas (85).

Estudios llevados a cabo en la Amazonía peruana, usando matrices de proteínas y ensayos a gran escala basados en perlas acopladas a antígenos indican que la proteína de superficie del merozoíto 8 (PvMSP8) y la proteína de unión al reticulocito 2b

(PvRBP2b) son seromarcadores potenciales para la detección de individuos expuestos a infecciones por Pv en este contexto endémico. Estas proteínas también han sido asociadas a la generación de adquisición de inmunidad clínica y por lo tanto son candidatas para el diseño de una vacuna contra Pv (46,47). Queda por elucidar si estos antígenos son fundamentales para el proceso de invasión en los parásitos Pv de la Amazonía peruana y si provocan la inducción de anticuerpos funcionales y protectores en individuos con infección por Pv.

Como último capítulo de la tesis, se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos generados en individuos Sin y Asin infectados con Pv contra dos de las proteínas candidatas a vacuna más importantes del estadio eritrocitario de Pv (PvAMA1 y PvRBP2b) (43) para su comparación con la capacidad funcional de anticuerpos generados por la proteína producida en nuestro laboratorio, PvMSP8. Para ello se evaluaron los niveles de las respuestas IgM, IgG, y subclases IgG1 e IgG3 generados por estas proteínas y la capacidad funcional de estos anticuerpos de unirse a las proteínas recombinantes C1q para activación de la vía clásica de complemento y a receptores Fc γ de células del sistema inmune efectoras. Además, evaluamos la exposición previa de individuos con infección por Pv a infección por Pf mediante la evaluación de anticuerpos IgG contra la proteína de superficie de merozoito 2 (PfMSP2) específica de Pf.

I.1 Hipótesis

Los individuos asintomáticos infectados con Pv de la Amazonía peruana presentan diferentes niveles de anticuerpos funcionales en comparación a individuos sintomáticos infectados con Pv.

I.2. Objetivos

1. Evaluar y comparar los niveles de anticuerpos IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3 contra las proteínas PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 en individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana.
2. Evaluar y comparar la capacidad de anticuerpos contra las proteínas PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 de fijarse a la proteína activadora de la vía clásica de complemento C1q en individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana.
3. Evaluar y comparar la capacidad de anticuerpos IgG contra las proteínas PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 de unirse a los receptores Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII en individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana.
4. Evaluar la exposición previa a infecciones por Pf, mediante la detección de anticuerpos IgG anti-PfMSP2 en individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana

II. METODOLOGÍA:

II.1. Población, muestra u objeto de estudio

Para este estudio se usaron las muestras de suero de los individuos Sin y Asin con infección por Pv e individuos controles (Iquitos) colectadas durante el estudio longitudinal descrito en el **capítulo 1**. La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Inmunidad y Vacunas contra la Malaria del Instituto Burnet (Melbourne, Australia), que a la fecha lidera los estudios de evaluación de anticuerpos funcionales para el candidato a vacuna de Pf, RTS, S. Por motivos logísticos y de presupuesto solo se llegaron a procesar las siguientes muestras: (28/29) muestras de sueros de individuos Asin, (30/49) de individuos Sin, (30/30) individuos controles de la ciudad Amazónica de Iquitos, (8/9) muestras de sueros de individuos con seguimiento completo hasta el sexto mes post-enrolamiento y 21 muestras de individuos australianos sanos sin historial de exposición a malaria, como controles negativos

II.2. Procedimientos y técnicas

II. 2.1. Proteínas

II.2.1.1. PvAMA1: El antígeno de la membrana apical 1 (AMA-1) es una proteína 66 kDa (83 kDa en *Pf*), ubicada en las micronemas, sintetizada durante las últimas 4 horas de la fase eritrocítica de especies de *Plasmodium* y otros parásitos apicomplexan, y desempeña un papel importante en el proceso de invasión del parásito a sus células huésped. AMA-1 es una proteína de membrana integral de 556–563 aminoácidos y 16

residuos de cisteína, tiene un dominio ectoplasmático, un dominio transmembrana, un dominio C-terminal, y un dominio citoplasmático basado en patrón de enlaces disulfuro. PvAMA-1 es una proteína capaz de inducir respuestas celulares y humorales notables en humanos, por lo que es un candidato ideal a vacuna contra malaria vivax (42). Para este estudio se usó la proteína completa PvAMA1 producida en sistema *E. coli* descrito en (161) (Número de acceso GenBank: VUZ96005.1), por el Grupo de Investigación de Inmunidad y Vacunas contra la Malaria, del Instituto Burnet (Melbourne, Australia) liderado por el Dr. James Beeson.

II.2.1.2. PvRBP2b: Proteína miembro de la familia de proteínas de unión a reticulocitos de Pv (PvRBP). Tiene un peso molecular aproximado de 280 kDa (1-2806 aa), posee un péptido señal en el extremo N-terminal (169-470 aa) y un supuesto dominio transmembrana en el extremo C-terminal. Las regiones de unión al reticulocito se encuentran a lado de la región N-terminal (161-1454 aa). Estudios recientes muestran que el Receptor de transferrina 1 (TfR1) se une a PvRBP2b para mediar una vía crítica de unión hacia los reticulocitos. Para este estudio se utilizó el fragmento de proteína 161-1454 aa, producido en el sistema de expresión *E. coli*, descrito en (74) (Número de acceso GenBank PVX_094225B), por el Laboratorio de la Dra. Wai Hong Tham, en el Instituto Médico de Investigación Walter y Eliza Hall (Melbourne, Australia).

II.2.1.3. PvMSP8: Proteína inmunogénica conservada y codificada por un gen de una sola copia (Número de acceso GenBank PVX_097625) y expresada en los estadios sanguíneos asexuales de todas las especies de *Plasmodium spp* (152). La proteína PvMSP8 fue producida en el sistema de expresión de proteínas eucariote, Baculovirus,

en el Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, de acuerdo a los procedimientos descritos previamente (86). La producción no incluyó los dominios de señal y transmembrana. Recientemente esta proteína ha demostrado su capacidad de detectar exposición reciente a infecciones de Pv a nivel poblacional en la Amazonía peruana (95).

II.2.1.4. PfMSP2: La proteína de superficie de merozoíto de 2 (MSP2), únicamente expresada en Pf, es una proteína anclada en glicosilfosfatidilinositol (GPI) presente en la superficie del merozoíto que consta de aproximadamente de 200 a 250 aminoácidos, codificados por un solo exón en el cromosoma 2. Contiene regiones conservadas N- y C-terminal (C) que flanquean una región altamente polimórfica de repetición central. Una región dimórfica (D) semiconservada no repetida define las dos familias alélicas de MSP2: 3D7 y FC27. Se ha demostrado que los anticuerpos contra la proteína MSP2 son predominantemente citófilicos. Por lo tanto, se cree que estos anticuerpos desempeñan un papel importante en los mecanismos de eliminación de parásitos mediados por anticuerpos. Asimismo, esta proteína es postulada como candidato a vacuna contra Pf (162). Para este estudio se usaron las proteínas PfMSP2 alelo 3D7 y PfMSP2 alelo FC27 descritas en (163) (Número de acceso Gene bank N248383 y JN248384 respectivamente), y producidas por Grupo de Investigación de Inmunidad y Vacunas contra la Malaria, en el Instituto Burnet (Melbourne, Australia) liderado por el Dr. James Beeson.

II.2.2. ELISAs indirectos

II.2.2.1. ELISAs IgM y IgG:

Para todos los ELISAs indirectos, placas de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp (Nunc, EE. UU) se recubrieron de forma individual con 50 μ L de antígenos recombinantes PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 [1 μ g/mL] en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con 200 μ L/pocillo de PBS-Tween al 0.05% y se bloquearon con 200 μ L de caseína al 0.1% (Sigma-Aldrich, EE. UU) en PBS 1X durante 2 horas a 37 °C. 50 μ L de muestras de suero (dilución 1:100) se incubaron en caseína al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente, luego las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween al 0.05%. A continuación, se agregó 50 μ L de anticuerpo secundario proveniente de cabra para detección de IgM (Millipore, EE. UU) o IgG humano conjugado con HRP (Invitrogen, EE. UU) diluido a 1/2500 y a 1/1000 en caseína al 0.1% respectivamente. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, y lavadas tres veces con PBS-Tween al 0.05%. La reacción fue revelada usando 50 μ L de sustrato ABTS para HRP (Life technologies, EE. UU), y las DO leídas a 405 nm usando un fotómetro (Thermo Fischer, EE. UU) tras 1 hora de reacción. Siguiendo este mismo protocolo, se midieron las respuestas IgG anti-PfMSP2 (3D7) y PfMSP2 (FC27) [1 μ g/mL] (163), con el fin evaluar la exposición previa de individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana a infecciones por Pf en ese contexto co-endémico (47).

II.2.2.2. *ELISAs IgG1, IgG3*

Placas de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp (Nunc®, EE. UU) se recubrieron de forma individual con 50 µL de antígenos recombinantes PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 [1 µg/mL] en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron tres veces con 200 µL/pocillo con PBS-Tween al 0.05% y se bloquearon con 200 µL de caseína al 0.1% (Sigma-Aldrich®, EE. UU) en PBS durante 2 horas a 37 °C. 50 µL de muestras de suero (dilución 1:100) se incubaron en caseína al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente, luego las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.05%. A continuación, se agregó 50 µL de anticuerpo secundario proveniente de ratón para detección de IgG1 (Invitrogen, EE. UU) o IgG3 humana conjugado con HRP (Invitrogen, EE. UU) diluidos 1/1000 respectivamente. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, y lavadas tres veces con PBS-Tween 0.05 %. Para detección de esta reacción se agregó (50 µl/pocillo) de un anticuerpo IgG anti-ratón proveniente de cabra conjugado con HRP (Millipore, EE. UU) a dilución 1/1000 en caseína 0.1% y se procedió a incubar las placas 1 hora a temperatura ambiente. La reacción fue revelada usando 50 µL de sustrato ABTS para HRP (Life technologies, EE. UU), y las DO leídas a 405 nm usando un fotómetro (Thermo Fischer, EE. UU) tras 1 hora de reacción (71)

II.2.2.3. *ELISAs para detección de fijación de anticuerpos a la proteína de complemento C1q*

Placas de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp (Nunc®, EE. UU) se recubrieron de forma individual con 50 µL de antígenos recombinantes PvRBP2b, PvMSP8 y

PvAMA1 [1 µg/mL] en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron tres veces con 200 µL/pocillo PBS-Tween al 0.05% y se bloquearon con 200 µL de caseína al 1 % (Sigma-Aldrich, EE. UU) en PBS 1X durante 2 horas a 37 °C. 50 µL de muestras de suero (dilución 1:100) se incubaron en caseína al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente, luego las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.05%. A continuación, se agregó 30 µL de proteína purificada humana C1q (Millipore, EE. UU) a concentración final [10 µg/mL] en caseína 0.1%. Las placas fueron incubadas durante 30 min hora a temperatura ambiente y luego lavadas tres veces con PBS-Tween 0.05 %. Luego se agregó un anticuerpo anti-C1q proveniente de ratón (DAKO®, EE. UU) y se procedió a incubar las placas 1 hora a temperatura ambiente, para luego lavarlas tres veces con PBS-Tween 0.05%. Para detección de esta reacción se usó (50 µl/pocillo) un anticuerpo IgG anti-ratón proveniente de cabra conjugado con HRP (Biorad, EE. UU) a dilución 1/3000 en caseína 0.1% y se procedió a incubar las placas 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se agregó 50 µL de sustrato TMB para HRP (Life technologies, EE. UU), la reacción fue detenida con 50 µL 1M H₂SO₄ y las DO leídas a 450 nm usando un fotómetro (Thermo Fischer, EE. UU) tras 1 hora de reacción (47).

II.2.2.4. *ELISAs para detección de unión de anticuerpos a proteínas recombinantes FcγRI, FcγRII, FcγRIII*

Placas de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp (Nunc®, EE. UU) se recubrieron de forma individual con 50 µL de antígenos recombinantes PvRBP2b, PvMSP8 y PvAMA1 [1 µg/mL] para detección de FcγRI y con 50 µL de PvRBP2b y PvAMA1 [1

$\mu\text{g/mL}$] en PBS 1X durante toda la noche a 4°C , para detección de Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa (no hubo suficiente volumen de proteína PvMSP8 para su uso). Al día siguiente se lavaron tres veces con 200 μL /pocillo PBS-Tween al 0.05% y se bloquearon con 200 μL de caseína al 0.1% (Sigma-Aldrich, EE. UU) en PBS 1X durante 2 horas a 37°C . Se incubó 50 μL de muestras de suero a dilución 1:250 para detección de Fc γ RI. Se usó una dilución 1:100 para las reacciones correspondientes a Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa. Los sueros fueron diluidos en 1% BSA diluido en PBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente, luego las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween al 0.05%. A continuación, se agregó 50 μL de las proteínas recombinantes Fc γ RI o CD64a (SinoBiological, China) a concentración final [0.125 $\mu\text{g/mL}$] o Fc γ RIIa o CD32a (producida en el Instituto Burnet, Melbourne, Australia) a concentración final [0.2 $\mu\text{g/mL}$] o Fc γ RIIIa o CD16a (producida en el Instituto Burnet, Melbourne, Australia) a concentración final [0.1 $\mu\text{g/mL}$] en 1% BSA. Se procedió a incubar las placas por 1 hora a 37°C , luego las placas fueron lavadas con PBS-Tween 0.05%. Se agregó un conjugado de estreptavidina-HRP de alta sensibilidad (Thermo Scientific™, EE. UU) diluido 1/10000 en 1% BSA y se procedió a incubar las placas 1 hora a temperatura a 37°C , protegida de la luz. Por último, se agregó 50 μL de sustrato TMB para HRP (Life technologies, EE. UU). La reacción fue detenida con 50 μL 1M H 2SO_4 y las DO leídas a 450 nm usando un fotómetro (Thermo Fischer, EE. UU) tras 30 min de reacción (72). Las DO de los pocillos blancos (pocillos sin plasma, solo conteniendo la solución de dilución de las muestras de suero) se restaron de todos los valores de los demás pocillos. Como controles positivos en cada placa se usó un grupo de sueros de individuos

infectados con Pv de la Amazonía peruana, con resultados altamente seroreactivos para IgG total. Se usaron como controles negativos muestras de suero de residentes de Australia, sin historial de malaria o viajes a zonas endémicas (n=21) (47). El valor de corte se fijó en 3 desviaciones estándar por encima de la media de la DO de sueros de individuos controles negativos (Melbourne, Australia) e individuos controles de la ciudad Amazónica de Iquitos (Perú) (21,79).

II.3. Consideraciones éticas: Como se describió en el **capítulo 1**, el estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú). Código SIDISI 101497 aprobado el 26/10/2017

II.4. Plan de análisis

Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn's para comparaciones múltiples con el fin de hallar diferencias de niveles de anticuerpos entre los grupos de estudio. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (tablas de contingencia 2x2) para comparar las diferencias de proporciones de seropositivos entre los grupos de estudio. Se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman para evaluar las correlaciones entre niveles de anticuerpos y parasitemias (164). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism v. 10.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

III. RESULTADOS

III. 1. *Respuesta de anticuerpos IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3*

En total se evaluaron 30 sueros de individuos Sin y 28 individuos Asin con infección por Pv confirmada por qPCR, 8 sueros de individuos con seguimiento al 6to mes post-enrolamiento (M6), 30 individuos controles de Iquitos y 21 individuos de Australia como controles negativos. Los individuos Sin y Asin no mostraron diferencias significativas de niveles IgG y subclases IgG1 e IgG3 para los antígenos evaluados (Tabla 1), pero si fueron significativamente más altos en comparación a los controles de Iquitos y negativos ($p < 0.05$) (Figura 1). No hubo diferencias de niveles de anticuerpos IgM anti-PvAMA1 o seropositividad entre los grupos de estudios (Tabla 1 y 2). La mayoría de los niveles de anticuerpos evaluados en individuos Sin y Asin inducidos por las proteínas PvAMA1 y PvRBP2b se mantuvieron hasta el sexto mes post-enrolamiento a excepción de anticuerpos IgG3 anti-PvAMA1 y IgM anti-PvRBP2b (Figura 1). Todos los niveles de anticuerpos descendieron significativamente para PvMSP8 ($p \leq 0.01$) (Figura 1A). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de anticuerpo IgG e IgM (Figura 1D) pero si se encontró una correlación moderada entre niveles IgG1 e IgG3 para las proteínas evaluadas (Figura 1E). Se observó más porcentaje de individuos Sin seropositivos para anticuerpos IgM anti-PvMSP8 (27.0%, 8/30%) ($p = 0.04$) (Tabla 2). Notablemente, se observó más porcentaje de individuos Asin seropositivos para anticuerpos IgG3 anti-PvMSP8 (71%, 20/28) ($p = 0.0001$) y anti-PvAMA1 (75% 21/28) ($p = 0.002$) (Tabla 2).

TABLA 1. Valores de niveles anticuerpos en densidad óptica (DO) obtenidos mediante ELISAs para las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y el test de Dunn's para calcular las diferencias de DO entre grupos (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$). RIQ abreviatura de Rango interquantil

		PvAMA1				PvRBP2b				PvMSP8			
		Contr oles Iquito ss	Asin	Sin	Segui miento M6	Contr oles Iquito s	Asin	Sin	Segui miento M6	Cont roles Iquito os	Asin	Sin	Segui miento M6
		(n = 30)	(n = 28)	(n = 30)	(n = 8)	(n = 30)	(n = 28)	(n = 30)	(n = 8)	(n = 30)	(n = 28)	(n = 30)	(n = 8)
IgM	Med iana	0.96	1.18	1.1	0.91	0.73	1.49	1.63	0.45	0.98	1.4	1.69	0.63
	[RI Q]	0.81 - 1.19	1.05 - 1.47	0.83 - 1.3	0.54 - 1.08	0.495 - 0.97	1.25 - 1.95	1.1 - 1.97	0.203 - 1.25	0.75 - 1.19	1.23 - 1.71	1.37 - 1.9	0.25 - 1.07
	Sin vs Asin valor <i>p</i>	ns				ns				ns			
IgG	Med iana	0.11	0.98	0.93	0.39	0.15	1.49	1.35	0.32	0.25	0.62	0.59	0.23
	[RI Q]	0.09 - 0.178	0.35 - 1.49	0.31 - 1.44	0.1 - 1.44	0.12 - 0.28	1.18 - 1.64	1.04 - 1.67	0.13 - 1.47	0.19- 0.34	0.50 - 0.92	0.41 - 0.95	0.20 - 0.35
	Sin vs Asin valor <i>p</i>	ns				ns				ns			
IgG1	Med iana	0.03	0.26	0.29	0.09	0.035	1.48	1.74	0.29	0.02	0.105	0.1	0.025
	[RI Q]	0.02 - 0.04	0.05 - 1.36	0.047 - 1.06	0 - 0.77	0.027 - 0.1	1.00 - 2	0.97 - 2.31	0.072 - 2.29	0.02 - 0.05	0.07 - 0.15	0.06 - 0.20	0.02 - 0.06

	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns				ns		
IgG3	Med iana	0.005	0.05	0.04	0.01	0.02	0.17	0.14	0.06	0.01	0.05	0.03	0.01
	[RI Q]	0 - 0.01	0.02 - 0.86	0.01 - 0.38	0 - 0.055	0.01 - 0.02	0.07 - 0.4	0.05 - 0.3	0.04 - 0.16	0 - 0.01	0.02 - 0.86	0.01 - 0.38	0 - 0.06
	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns				ns		
C1q	Med iana	0.02	0.05	0.08	0.01	0.025	0.19	0.25	0.03	0.05	0.11	0.12	0.04
	[RI Q]	0.01 - 0.03	0.02 - 0.28	0.03 - 0.15	0 - 0.07	0.02 - 0.04	0.11 - 0.36	0.1 - 0.39	0.01 - 0.51	0.03 - 0.08	0.08 - 0.19	0.06 - 0.39	0.023 - 0.08
	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns				ns		
Fcγ RI	Med iana	1.42	2.7	2.6	2.17	1.34	2.41	2.49	1.91	1.66	2.54	2.63	2.08
	[RI Q]	1.17 - 1.76	2.16 - 2.99	2.17 - 2.81	1.5 - 3.01	1.09 - 1.81	2.26 - 2.74	2.22 - 2.7	1.24- 2.65	1.33 - 1.85	2.16 - 2.83	2.32 - 2.79	1.78 - 2.45
	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns				ns		

Fcy RIIa	Med iana	0.07	0.21	0.16	0.63	0	1.13	1.26	0.68
	[RI Q]	0.04 - 0.09	0.07 - 3.14	0.07 - 2.3	0.013 - 3.75	0 - 0.03	0.63 - 1.82	0.43 - 1.77	0 - 2.14
	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns		
Fcy RIII a	Med iana	0.08	0.67	0.68	0.5	0.02	2.16	1.84	0.01
	[RI Q]	0.05 - 0.13	0.16 - 3.45	0.14 - 3.24	0.14 - 2.09	0.01 - 0.04	1.26 - 3.71	1.11 - 2.83	0 - 1.75
	Sin vs Asin valor <i>p</i>		ns				ns		

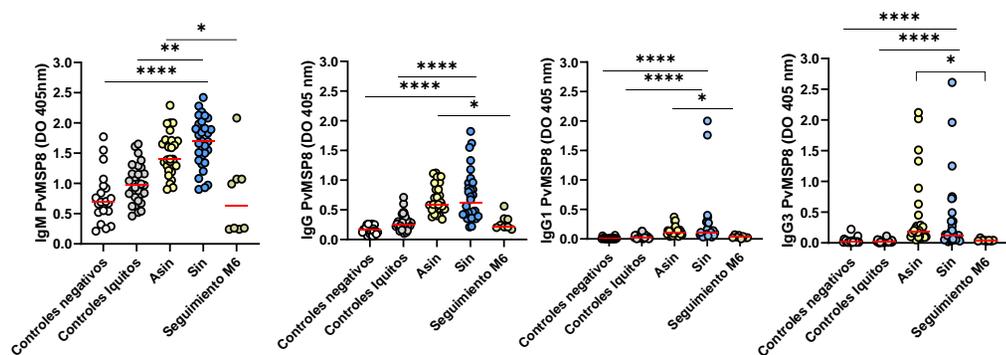
TABLA 2. Porcentajes de individuos seropositivos mediante ELISAs. (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$). nd, no determinado

ELISA	A	PvAMA1				PvRBP2b				PvMSP8			
		Controles Iquitos	Asin	Sin	Seguimiento M6	Controles Iquitos	Asin	Sin	Seguimiento M6	Controles Iquitos	Asin	Sin	Seguimiento M6
IgM	%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	36%	50%	13%	0.0%	14.3%	27.0%	13%
	Seropositivos	0/30	0/28	0/30	0/8	0/30	10/28	15/30	1/8	0/30	4/28	8/30	1/8
	Valor de corte		2.0				1.6				1.9		
	Sin vs Asin p (Prueba Fisher)		ns				ns				0.04*		
IgG	%	3%	68%	67%	50%	3.0%	100%	100%	38%	3.00%	43%	50%	0%
	Seropositivos	1/30	19/28	20/30	4/8	1/30	28/28	30/30	3/8	1/30	12/28	15/30	0/8
	Valor de corte		0.58				0.55				0.6		
	Sin vs Asin p (Prueba Fisher)		ns				ns				ns		
IgG1	%	3%	57%	63%	38%	3.00%	96%	97%	38%	7%	39%	33%	0.00%
	Seropositivos	1/30	16/28	19/30	3/8	1/30	27/28	29/30	3/8	2/30	11/28	10/30	0/8
	Valor de corte		0.18				0.45				0.1		

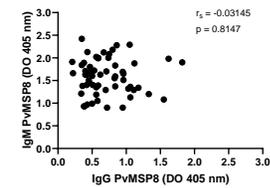
			Sin vs Asin					Sin vs Asin					Sin vs Asin	
			<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba	
			Fisher)					Fisher)					Fisher)	
			ns					ns					ns	
IgG3	%	3.00%	75%	53%	25%	0.0%	71%	60%	38%	3%	71%	43%	0%	
	Seropositivos	1/30	21/28	16/30	2/8	0/30	20/28	18/30	3/8	1/30	20/28	13/30	0/8	
	Valor de corte		0.02				0.08				0.13			
			0.002**				ns				0.0001***			
			Sin vs Asin					Sin vs Asin					Sin vs Asin	
			<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba	
			Fisher)					Fisher)					Fisher)	
C1q	%	3.00%	25%	23%	12.50%	0.00%	21%	23%	37.50%	3.00%	18%	33%	0%	
	Seropositivos	1/30	7/28	7/30	1/8	0/30	6/28	7/30	3/8	1/30	5/28	10/30	0/8	
	Valor de corte		0.2				0.37				0.27			
			ns				ns				0.02*			
			Sin vs Asin					Sin vs Asin					Sin vs Asin	
			<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba	
			Fisher)					Fisher)					Fisher)	
FcγR I	%	0.0%	32%	20%	25%	0.0%	29%	27%	25%	0.00%	11%	17%	0%	
	Seropositivos	0/30	9/28	6/30	2/8	0/30	8/28	8/30	2/8	0/30	3/28	5/30	0/8	
	Valor de corte		2.9				2.7				3			
			ns				ns				ns			
			Sin vs Asin					Sin vs Asin					Sin vs Asin	
			<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba					<i>p</i> (Prueba	
			Fisher)					Fisher)					Fisher)	

FcγR IIa	%	0.0%	46%	30%	50%	7%	92 %	87%	38%	nd	nd	nd	nd
	Seropositivos	0/30	13/28	9/30	4/8	2/30	26/28	26/30	3/8				
	Valor de corte		0.67					0.18					
	Sin vs Asin p (Prueba Fisher)		ns					ns					
FcγR IIIa	%	7%	57%	60%	50%	7%	93 %	90%	38%	nd	nd	nd	nd
	Seropositivos	2/30	16/28	18/30	4/8	2/30	26/28	27/30	3/8				
	Valor de corte		0.44					0.41					
	Sin vs Asin p (Prueba Fisher)		ns					ns					

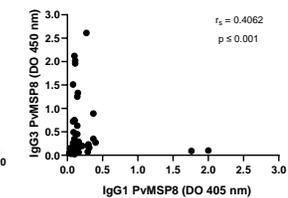
A



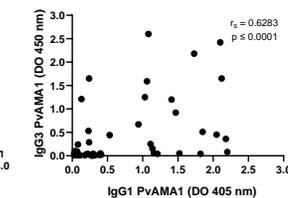
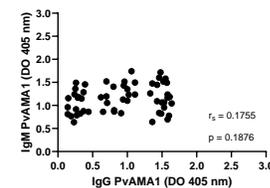
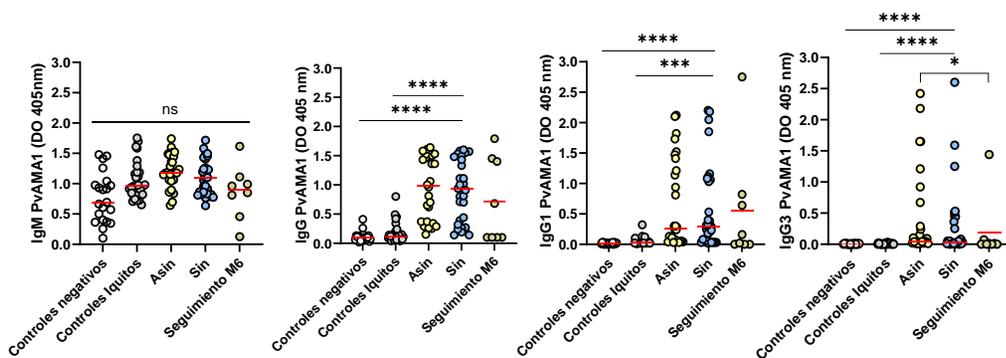
D



E



B



C

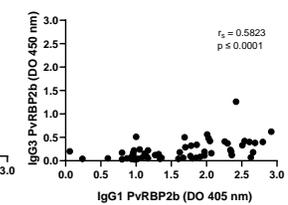
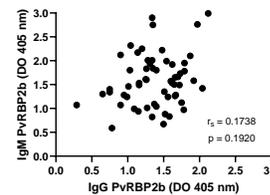
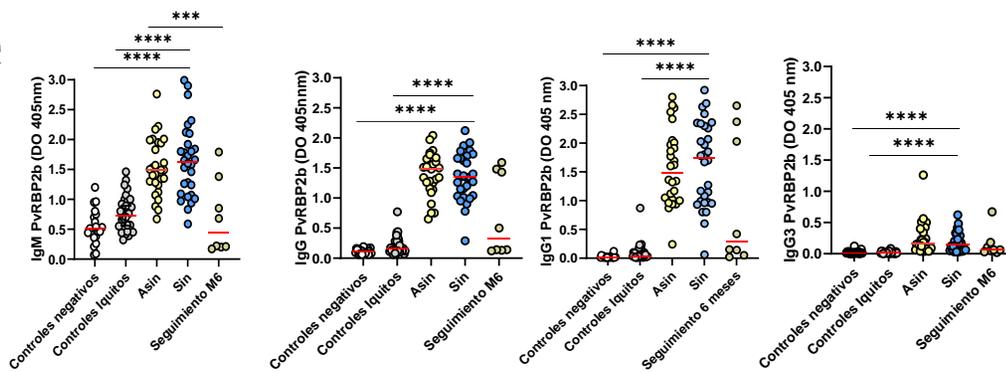


FIGURA 1. Respuesta de anticuerpos IgM, IgG y subclases IgG1 e IgG3 en individuos Sin, Asin infectados con *P. vivax* y controles generados por las proteínas PvMSP8 (A), PvAMA1 (B) y PvRBP2b (C) y correlaciones entre niveles de anticuerpos IgM/IgG (D) e Ig1/IgG3 (E). En corchetes se visualizan las comparaciones de niveles de anticuerpos entre dos grupos con diferencias significativas y los asteriscos encima de una línea recta muestran las diferencias significativas entre los grupos Sin y Asin versus los seguimientos al M6 o grupos control. (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). La línea roja representa la mediana de valores de DO para los grupos de estudio evaluados. r_s , abreviatura de coeficiente de correlación de Spearman y valor p .

III. 2. Respuesta de funcional de anticuerpos fijadores de proteína C1q en individuos con infección por *P. vivax*

Medimos la capacidad de las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8 de inducir anticuerpos capaces de fijarse a la proteína recombinante C1q (como primer paso en la activación de la vía clásica del complemento). No se encontraron diferencias significativas de niveles de anticuerpos fijadores de la proteína C1q entre individuos Sin y Asin para los antígenos evaluados, solo hubo diferencias significativas de niveles de anticuerpos entre individuos Sin y Asin en comparación con los individuos controles de Iquitos y negativos (Tabla 1). Sin embargo, se observó más porcentaje de individuos Sin con anticuerpos anti-PvMSP8 con capacidad de fijación de la proteína C1q (33%, 10/30) ($p = 0.02$) (Tabla 2). Los niveles de anticuerpos funcionales fijadores de C1q solo descendieron significativamente para la proteína PvMSP8, tras 6 meses post-infección ($p \leq 0.01$) (Figura 2A). La fijación de la proteína Cq1 depende de anticuerpos IgM y/o IgG y subclases IgG, por tanto, exploramos las asociaciones entre niveles de anticuerpos IgM e IgG y subclases IgG con niveles de anticuerpos fijadores de C1q. No encontramos correlaciones entre niveles de anticuerpos IgM con anticuerpos fijadores de C1q para las proteínas evaluadas. Se evidenció una correlación fuerte entre

anticuerpos IgG/IgG1 anti-PvAMA1 (Figura 3B) y anticuerpos IgG1 anti-PvRBP2b con anticuerpos con capacidad de fijación a C1q (Figura 3C).

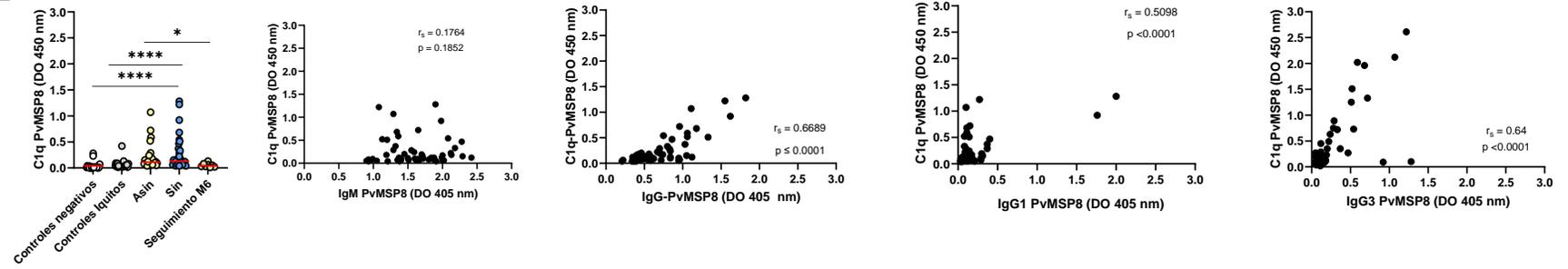
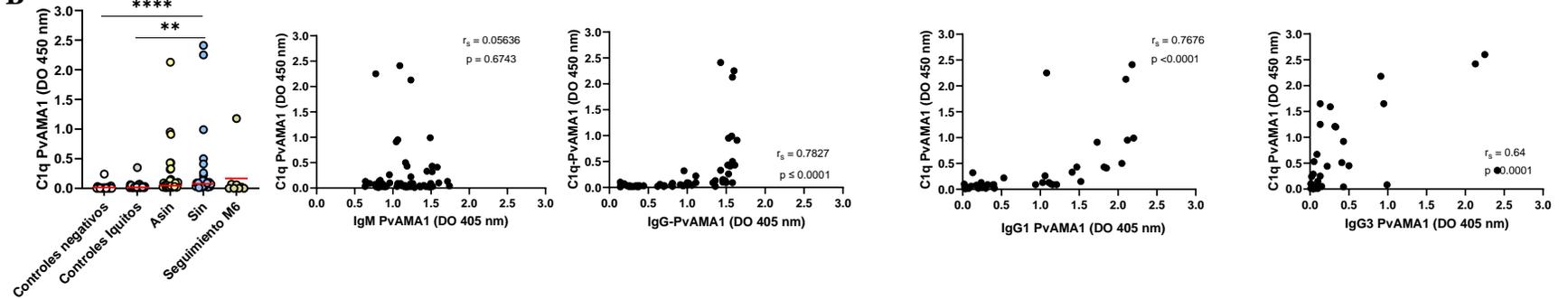
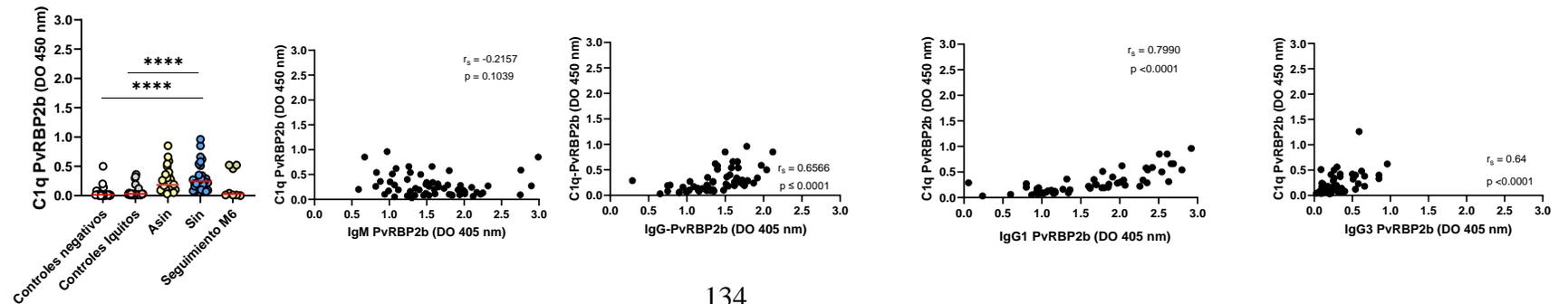
A**B****C**

FIGURA 2. Inducción de anticuerpos fijadores de C1q por las proteínas PvMSP8 (A), PvAMA1(B) y PvRBP2b (C), y correlación con niveles de anticuerpos anti-C1q con anticuerpos IgM, IgG, IgG1 e IgG3. Niveles de anticuerpos fijadores de C1q en individuos Sin, Asin infectados con Pv y controles de la Amazonía peruana. Una línea recta muestra las diferencias significativas entre los grupos Sin y Asin versus los seguimientos al M6 o grupos control (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). La línea roja representa la mediana de valores de DO para los grupos de estudio evaluados r_s , abreviatura de coeficiente de correlación de Spearman y valor p .

III. 3. Respuesta de anticuerpos de unión a receptores FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa en individuos infectados con P. vivax

Medimos la capacidad de las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8 de inducir anticuerpos capaces de unirse a las proteínas recombinantes FcγRIa, FcγRIIa y FcγRIIIa y potencialmente provocar diversas respuestas efectoras en células del sistema inmune. No se encontraron diferencias significativas de niveles de anticuerpos con capacidad de unión a receptores FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa o de seropositividad entre individuos Sin y Asin para los antígenos evaluados (Tabla 1, 2 y Figura 3). Sin embargo, se observó una alta proporción de individuos Sin y Asin con capacidad de producir anticuerpos anti- PvRBP2b de unión a FcγRIIa (87% y 92%) y FcγRIIIa (90% y 93%) (Tabla 2). Los niveles de anticuerpos anti-PvRBP2b con capacidad de unión al receptor FcγRIIIa disminuyeron significativamente tras 6 meses post-enrolamiento (Figura 3A y 3C). Los receptores FcγR reconocen la porción Fc de los anticuerpos IgG y en el caso de FcγRa con mayor afinidad a las subclases IgG1 e IgG3, por tanto, exploramos las asociaciones entre niveles de anticuerpos IgG y las subclases IgG1 e IgG3 con niveles de anticuerpos con capacidad de unión a receptores FcγR. Notablemente, se evidenciaron correlaciones positivamente fuertes entre anticuerpos

IgG e IgG1 anti-PvAMA1 y FcγRI e FcγRIIIa ($P \leq 0.0001$, Figura 3B); y la de anticuerpos IgG1 anti-PvRBP2b y FcγRIIIa ($P \leq 0.0001$, $r_s = 0.8348$, Figura 3C).

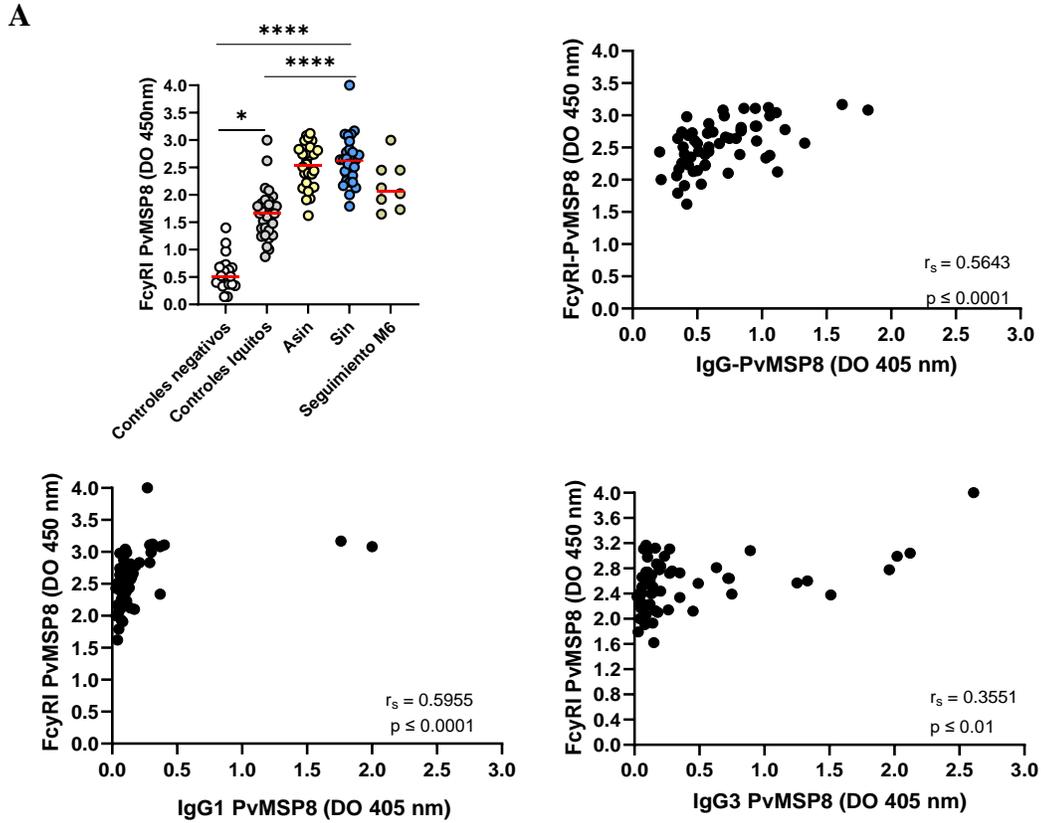
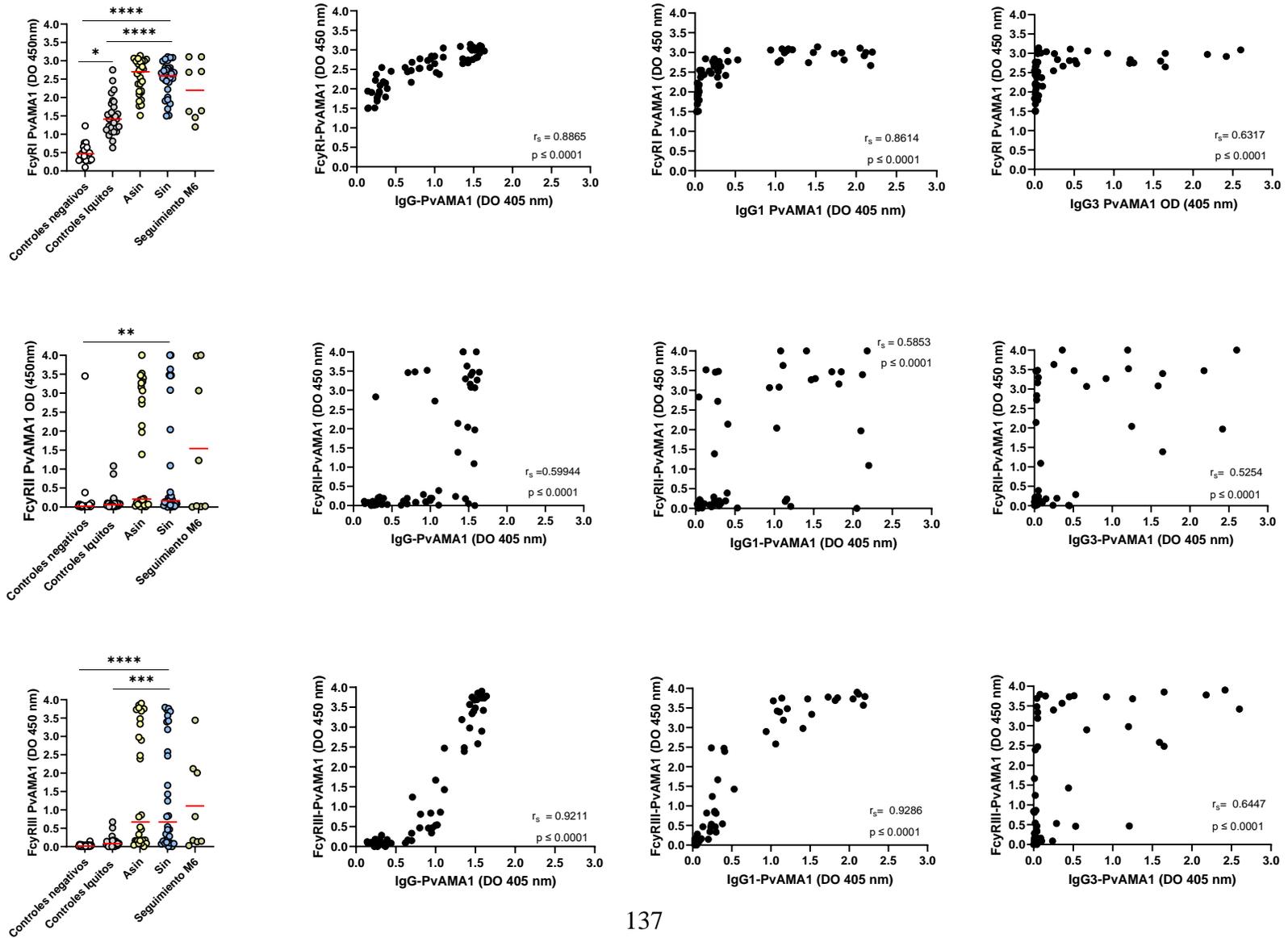
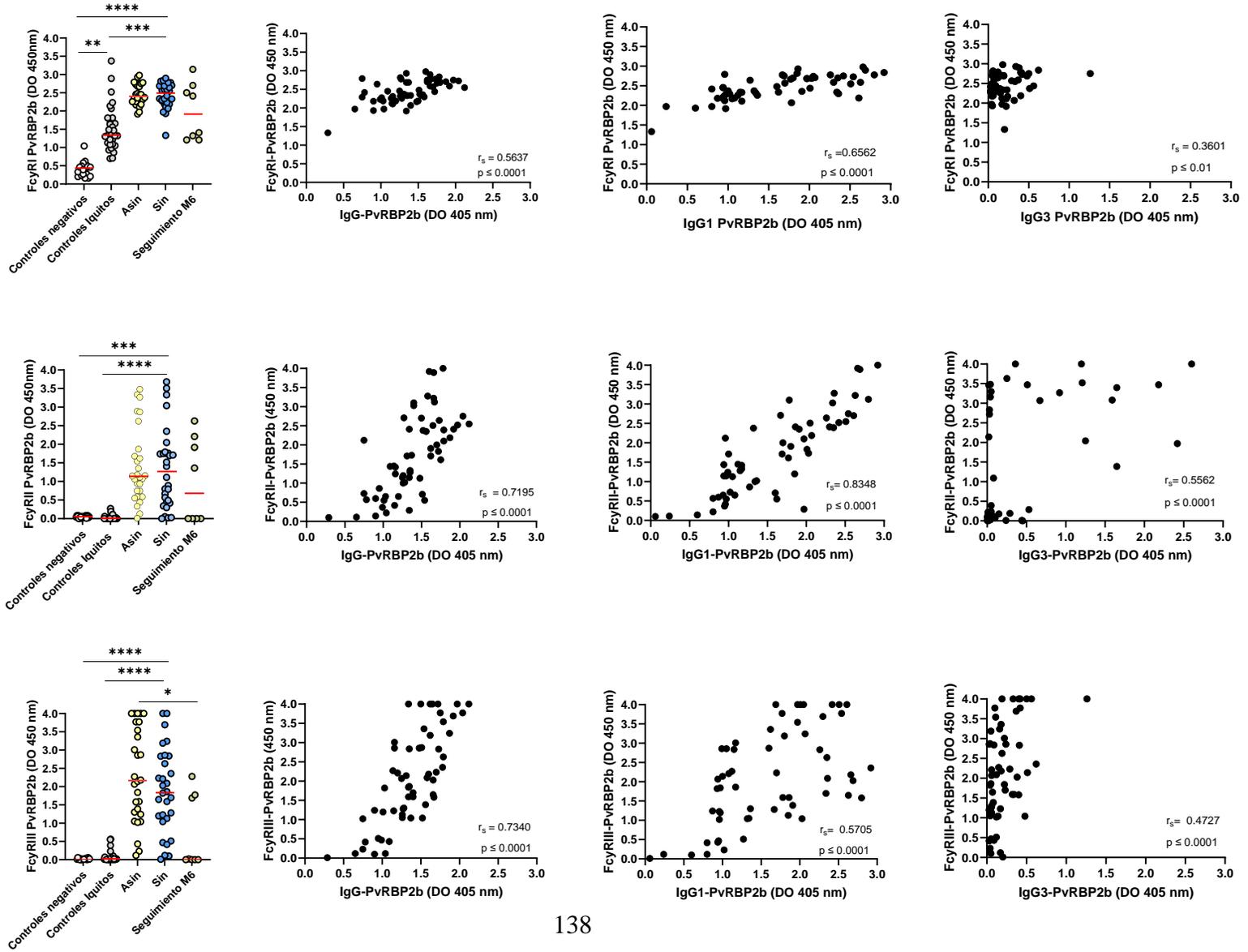


FIGURA 3. Respuestas de anticuerpos con capacidad de unión a FcγRI, FcγRIIIa y FcγRIIIa inducidos por las proteínas PvMSP8 (A), PvAMA1 (B), y PvRBP2b (C) y correlación con niveles de anticuerpos IgG y subclases IgG1 e IgG3 en individuos infectados con *P. vivax* de la Amazonía peruana. Niveles de anticuerpos funcionales en individuos Sin, Asin infectados con Pv y controles de la Amazonía peruana. Una línea roja muestra las diferencias significativas entre los grupos Sin y Asin versus los seguimientos al M6 o grupos control (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). La línea roja representa la mediana de valores de DO para los grupos de estudio evaluados. r_s , abreviatura de coeficiente de correlación de Spearman y valor p

B



C



III. 4. Correlación entre niveles de anticuerpos y parasitemias en individuos infectados con P. vivax

Se exploró la asociación entre todos los niveles de anticuerpos en individuos infectados con Pv y parasitemias determinadas por qPCR (Par/ μ L [Log]). En general no se encontró asociaciones entre niveles de anticuerpos y parasitemias. Sin embargo, los niveles de anticuerpos con capacidad de unión a Fc γ RIIIa, inducidos por la proteína PvRBP2b estuvieron negativa y significativamente asociados a bajas parasitemias ($P = 0.01$, $r_s = -0.34$), mientras que los niveles de anticuerpos funcionales con capacidad de unión a Fc γ RI, inducidos por la proteína PvMSP8, estuvieron positivamente asociados a incremento de parasitemia ($p = 0.01$, $r_s = 0.3227$) (Figura 4).

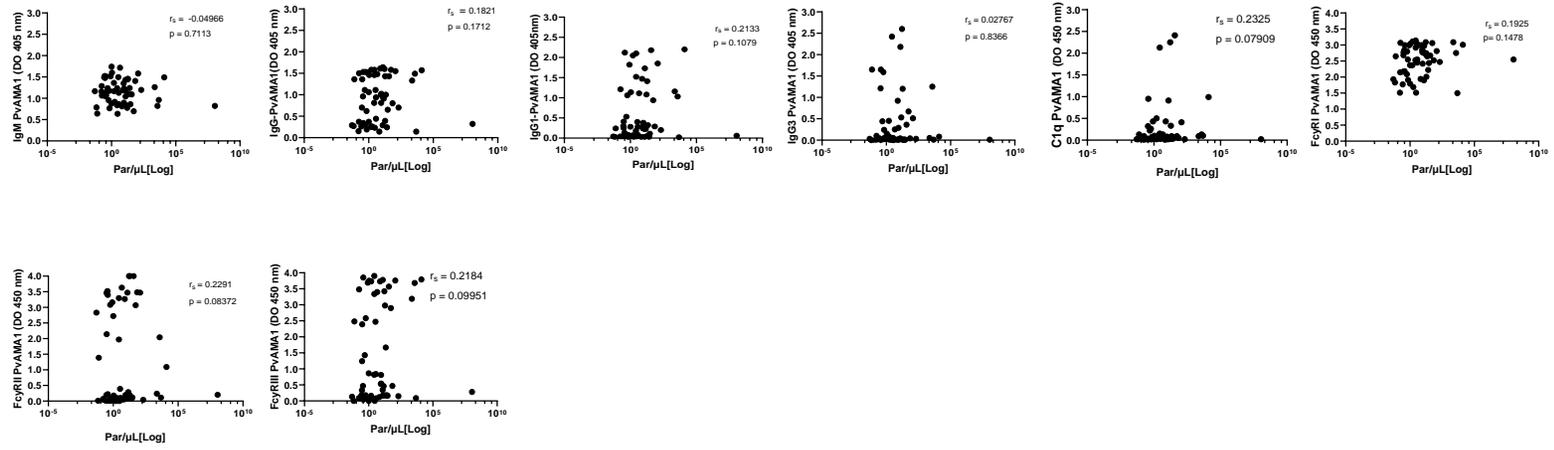
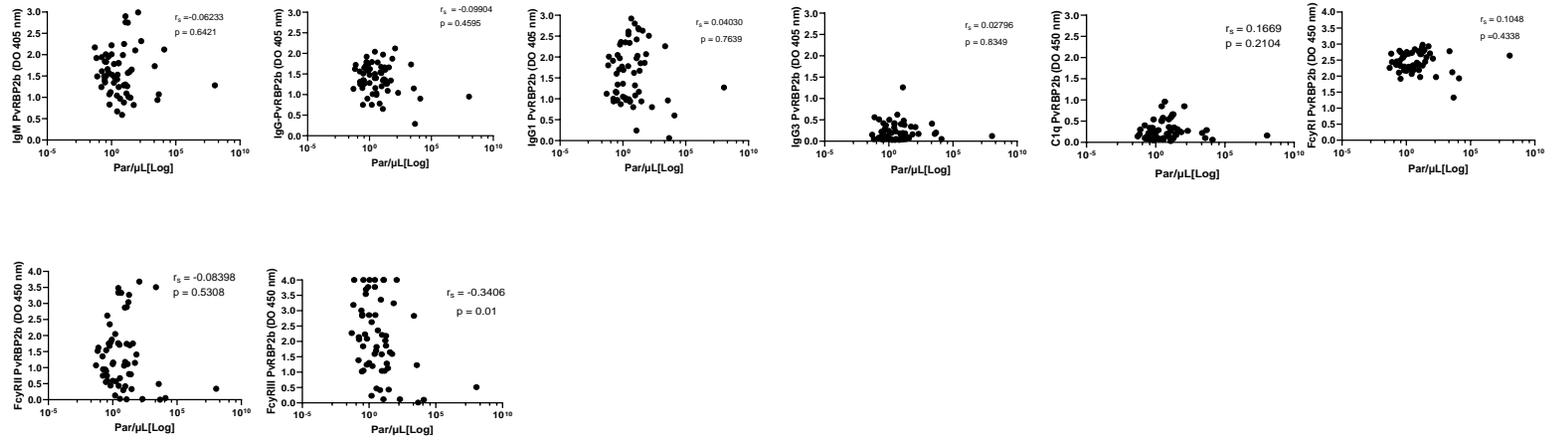
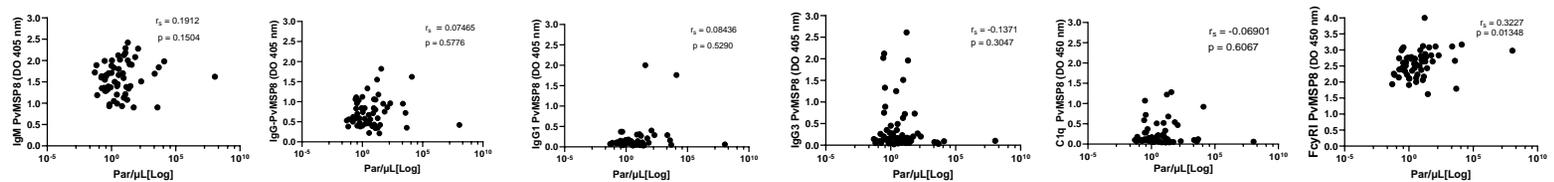
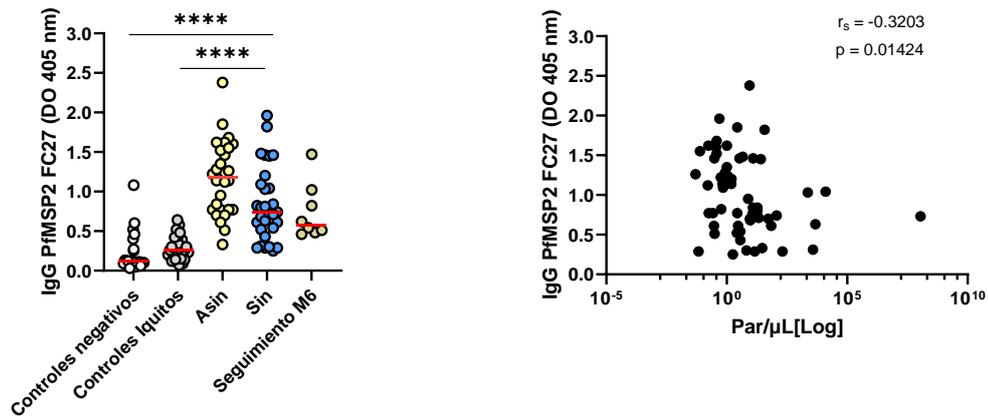
A**B****C**

FIGURA 4. Correlación entre niveles de anticuerpos (DO) generados por las proteínas PvAMA1 (A), PvRBP2b (B), y PvMSP8 (C) y parasitemias en individuos infectados con *P. vivax* de la Amazonía peruana. La parasitemia se determinó por qPCR y se expresó como Par/ μ L [Log]. rs, abreviatura de coeficiente de correlación de Spearman y valor p

III. 5. Exposición a infección por Pf

Además, con el fin evaluar la exposición previa de individuos Asin y Sin infectados con Pv de la Amazonía peruana a infecciones por Pf en este contexto co-endémico, se evaluaron las respuestas de anticuerpos IgG contra las proteínas PfMSP2 (cepa 3D7) y PfMSP2 (cepa FC27), proteínas únicamente expresada en la especie Pf (163). Se observaron altos niveles de anticuerpos IgG frente a las proteínas PfMSP2 (cepa FC27) y PfMSP2 (cepa 3D7) en individuos con infección por Pv en comparación con los individuos controles ($p < 0.0001$) (Figura 5A y B). También se observó a una proporción mayor de individuos Asin con anticuerpos IgG anti-PfMSP2 (cepa FC27) (82%, 23/28) en comparación de individuos Sin (53%, 16/30) ($p < 0.0001$). Asimismo, los niveles de anticuerpos IgG anti - PfMSP2 (cepa FC27) estuvieron negativamente pero débilmente asociados a parasitemia ($p \leq 0.01$, $rs = -0.3203$) (Figura 5A). Los niveles de anticuerpos IgG contra la proteína PfMSP2 en individuos Sin y Asin con infección por Pv no disminuyeron significativamente al sexto mes post-infección (Figura 5A y B). En base a esta información podríamos concluir que los participantes con infección por Pv de nuestro estudio tenían historial de exposición previa a infección por Pf (Figura 5).

A



B

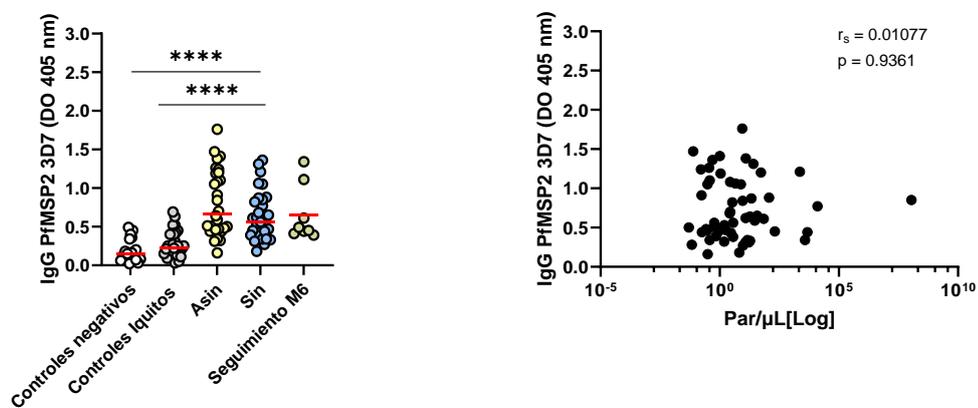


FIGURA 5. Respuesta de anticuerpos IgG contra las proteínas: A) PfMSP2 (cepa FC27) y B) PfMSP2 (cepa 3D7), en individuos infectados con *P. vivax* y controles y correlación entre niveles de anticuerpos y parasitemias en individuos infectados. Una línea recta muestra las diferencias significativas entre los grupos Sin y Asin versus los seguimientos al M6 o grupos control (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). La parasitemia se determinó por qPCR y se expresó como Par/ μ L [Log]. r_s , abreviatura de coeficiente de correlación de Spearman y valor p. La línea roja representa la mediana de valores de DO para los grupos de estudio evaluados

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que individuos infectados con Pv de Amazonía peruana producen mayores niveles de anticuerpos IgM, IgG, IgG1 e IgG3 y anticuerpos promotores de la activación de la vía clásica de complemento y con capacidad de unión a receptores Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa, contra las proteínas candidatas a vacunas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8, en comparación

con individuos controles (no infectados). No se observaron diferencias significativas de niveles de anticuerpos entre individuos Sin y Asin infectados con Pv.

La proteína PvMSP8 indujo mayores niveles de anticuerpos IgM, IgG, IgG1, IgG3, anticuerpos de unión a C1q y anticuerpos de unión a FcγRI en individuos con infección aguda por Pv en comparación a individuos controles (por limitaciones en la producción de proteína no se pudo realizar ELISAs para la evaluación de FcγRIIa y FcγRIIIa). Todos los niveles de anticuerpos disminuyeron significativamente al 6to mes post-enrolamiento, a excepción de anticuerpos de unión a FcγRI. Estos resultados en conjunto con los demostrados y discutidos en el **capítulo 2** de esta tesis, confirman el rol de esta proteína como MES para detección de individuos con historial de infección reciente por Pv en nuestro contexto endémico dado que esta proteína es capaz de generar anticuerpos IgG de duración menor a 9 meses (38,94). Sin embargo, también se han detectado respuestas IgG anti-PvMSP8 en individuos de China tras 12 años post-infección (66). Asimismo se ha detectado respuestas de anticuerpos IgG y células B de memoria (CBM) específicas a PvMSP8 hasta cuatro años post-infección en individuos de Tailandia (155). A la fecha, la quimera PvMSP8- PvMSP1₁₉ se postula como candidato a vacuna para Pv (156).

PvAMA1, indujo anticuerpos de larga duración (a excepción de IgG3) en individuos infectados con Pv. Asimismo, se evidencio correlaciones positivas fuertes entre anticuerpos fijadores de C1q y niveles de anticuerpos IgG e IgG1. Más aún, anticuerpos IgG1 anti-PvAMA1 e IgG3 anti-PvAMA1 evidenciaron correlaciones fuertemente positivas con anticuerpos de unión a FcγRI e FcγRIIIa respectivamente. La proteína AMA1, es uno de los más candidatos a vacuna más

prometedores para prevenir la infección por Pv y Pf. Se ha descrito que AMA1 se asocia al complejo de proteínas de cuello de la rotfria (RON) el cual se une a la proteína RON2, interacción esencial para la invasión del merozoíto a su célula huésped. Es conocido que los niveles de anticuerpo IgG anti - AMA1 pueden durar por largo tiempo (> 6 meses) y están asociados a protección de enfermedad. Sin embargo, una de las limitaciones es que la generación de inmunidad contra esta proteína es dependiente de la cepa del parásito que la induce (42). Se ha reportado que PfAMA1 induce anticuerpos fijadores de C1q asociados a protección de enfermedad en niños de un estudio cohorte en PNG (71).

PvRBP2b generó anticuerpos de larga duración (a excepción de IgM y anticuerpos de unión a Fc γ RIIIa). Se encontró una correlación fuerte y positiva entre anticuerpos fijadores de proteína C1q e IgG1 y entre anticuerpos de unión a Fc γ RIIa e IgG1. PvRBP2b es capaz de mediar una vía fundamental de unión de merozoítos a reticulocitos vía el Receptor de transferrina 1 (TfR1) (74). Al igual que PvAMA1, altos niveles de anticuerpos IgG anti-PvRBP2b han sido asociados a protección de enfermedad en niños de PNG, en individuos con infección por Pv en Brasil a nivel poblacional, y en individuos con historial de incidencia de infecciones por Pv en un estudio cohorte en Perú (una característica común de individuos Asin) (5,78,80). Además, PvRBP2b encabezó la lista de proteínas más seroreactivas en un estudio de dinámica de anticuerpos IgG en individuos Asin que fueron seguidos por más de 10 meses en una zona hipoendémica de Tailandia (79). PvRBP2b y PvMSP8 forman parte de un panel de seromarcadores validado para detección de individuos con exposición a infección reciente por Pv y de posibles portadores de hipnozoítos

(94). Asimismo, PvRBP2b y PvAMA1 también son consideradas como candidatos a vacunas para su inclusión en una vacuna de múltiepitopica contra Pv (42).

Los estudios que han evaluado la respuesta IgM en infecciones por Pv y han demostrado que dependiendo del antígeno, las respuestas IgM son comparables a las de anticuerpos IgG y que los anticuerpos IgM pueden ser mantenidos en el tiempo tras una infección (48–52). Los niveles de anticuerpos PvAMA1 en sueros de individuos Sin, Asin y sus respectivos seguimientos al M6 vs controles no fueron significativamente diferentes. Esto no es sorprendente dados los reportes de alto niveles de anticuerpos IgM en muestras de controles endémicos (165) y larga duración de respuesta de anticuerpos IgM anti-PvAMA1 en individuos con infección por Pv en India (166). PvRBP2b y PvMSP8 fueron capaces de generar altos niveles de anticuerpos IgM en la fase aguda de infección en los participantes, sin embargo, estos niveles decayeron al sexto mes de seguimiento. Asimismo, reportamos un mayor porcentaje de individuos Sin con anticuerpos IgM anti-PvMSP8. Recientemente Longley et al., 2021, propusieron a las respuestas IgM contra un panel de 20 antígenos de Pv (incluyendo PvMSP8 y PvRBP2b) como seromarcadores de exposición a infección a Pv más reciente, por ser estas respuestas de menor longevidad (duración de 1 a 6 meses post-infección) en comparación a las de anticuerpos IgG (hasta 9 meses post-infección) (165).

Liu et al., 2022, a la fecha ha publicado el único estudio que ha evaluado la dinámica de anticuerpos IgG contra proteínas de Pv en individuos Asin (n=30), como continuación del estudio descrito previamente por Longley et al., 2017 (64,79). Durante este estudio, individuos Asin fueron seguidos por un año (2013–2014), y se procedió a realizar tomas de muestras para medición de anticuerpos en intervalos

de 2 - 4 semanas. Al final del estudio cada individuo Asin tuvo al menos 10 muestras para seguimiento, sin reportes de infección por *Plasmodium spp.* por qPCR. El análisis de niveles de anticuerpos IgG se estableció sobre un punto de corte generado en base al promedio de niveles de anticuerpo IgG (>1DS) de una mezcla de controles negativos, compuesta de muestras de plasmas de individuos sin historial de malaria de la Cruz Roja de Tailandia y Australia. Los resultados evidenciaron una mayor producción de anticuerpos IgG en individuos Asin contra 21/27 proteínas de Pv (incluyendo PvMSP8 y PvRBP2b). Entre las cinco proteínas más seroreactivas para individuos Asin estuvieron: PvRBP2b (PVX_094255A), antígeno de membrana asociado a rotfria (PVX_087885), antígeno rico en triptófano (Pv-fam-a, PVX_090265), MSP1-19 (PVX_099980) y la proteína de interacción con Rh5 (PVX_095055). En comparación, los individuos Sin (n = 34) demostraron seroreactividad a 25/27 proteínas del panel y la duración de sus anticuerpos decayó drásticamente después del tercer mes de seguimiento. Entre las proteínas más inmunogénicas para individuos Sin estuvieron el antígeno rico en triptófano (Pv-fam-a, PVX_090265) y dos proteínas hipotéticas (PVX_097715 y PVX_090970) (79).

A diferencia de este estudio, nuestros resultados no demostraron respuestas diferenciales a nivel de anticuerpos IgG entre individuos Sin (n = 30) y Asin (n = 28) mediante la técnica de ELISA. Futuros estudios profundizaran en la evaluación de respuesta diferencial de anticuerpos entre individuos Asin y Sin descritas en este estudio haciendo uso de plataformas serológicas más sensibles y a gran escala y un número mayor de proteínas de Pv.

Los estudios de respuestas de anticuerpos de subclases IgG contra proteínas de Pv son importantes con el fin de caracterizar la respuesta funcional que estas proteínas pueden inducir en individuos infectados (63,167–169). Notablemente, identificamos a un porcentaje significativamente mayor de individuos Asin seropositivos a anticuerpos IgG3 anti-PvMSP8 y anti-PvAMA1. Solo un estudio ha explorado la respuesta IgG3 en individuos con infección por Pv de la Amazonía peruana, bajo la premisa que estos serían mejores seromarcadores de exposición reciente a infección por Pv en comparación a las respuestas IgG. Tras la evaluación de respuestas IgG3 contra un panel de 29 proteínas (incluyendo PvMSP8, PvAMA1 y PvRBP2b), se observó que los niveles de anticuerpos IgG3 anti-PvMSP8 y anti-PvAMA1 aumentaban con la edad en hombres con historial de más de tres infecciones por Pv (frecuentemente Asin), enrolados en un estudio longitudinal cohorte, llevado a cabo durante 13 meses (diciembre 2014 y diciembre 2015) (52). El análisis de estos resultados en conjunto con los nuestros nos induce a considerar la seropositividad a anticuerpos IgG3 contra las proteínas PvMSP8 y PvAMA1, como posibles biomarcadores de diferenciación de individuos Asin, en el contexto endémico de la Amazonía peruana y de ampliar los estudios de estas subclases de anticuerpos frente a otros paneles de proteínas.

A la fecha solo existen dos estudios que han explorado la respuesta funcional de anticuerpos en la activación del sistema de complemento en infecciones por Pv. Oyong et al., 2019 reportó una alta seroprevalencia de anticuerpos contra la región central de la proteína PvMSP3 α con capacidad para fijación de la proteína C1q, en niños y adultos de un estudio cohorte en Malasia. Además, niveles de anticuerpos IgG1, IgG3 e IgM correlacionaron significativamente con niveles de anticuerpos

con capacidad de fijación a C1q. Los niveles de anticuerpos fijadores a C1q fueron similares entre los grupos de edad, sin embargo, la respuesta de anticuerpos IgM predominó en niños y la de IgG3 en los adultos. Asimismo, se observó que los niveles de anticuerpos fijadores de C1q aumentaron después de la infección aguda hasta los 7 días posteriores a tratamiento con antimaláricos y disminuyeron rápidamente al día 28 (158). Hietanen et al., 2021 reportó que individuos con infección Asin por Pv, participantes de un estudio cohorte en Tailandia, también produjeron anticuerpos con capacidad de unirse a la proteína C1q, contra un nuevo miembro de la familia de proteínas de unión a reticulocito de Pv (PvRBP2P1) (159). Observándose una correlación débil positiva pero significativa entre niveles de anticuerpos IgG1 y niveles de anticuerpos fijadores de la proteína C1q (159). Es de destacar que ambos estudios hicieron uso del mismo protocolo de ELISA descrito para esta tesis.

En nuestro estudio, observamos que adultos con infección por Pv producían anticuerpos con capacidad de fijación a la proteína C1q, contra las proteínas PvAMA1 y PvRBP2b hasta el sexto mes post-infección, a excepción de PvMSP8. Asimismo, observamos un porcentaje de individuos Sin seropositivos a anticuerpos anti-PvMSP8 con capacidad de fijación a la proteína C1q significativamente mayor en comparación a individuos Asin. También, se demostró una correlación fuerte entre anticuerpos IgG1 anti-PvAMA1 y anti-PvRBP2b con anticuerpos con capacidad de fijación a la proteína C1q, y para todas las proteínas evaluadas se observó un valor de correlación moderado con niveles de anticuerpos IgG3 ($r_s = 0.64$, $p < 0.0001$). En el futuro esperamos evaluar más profundamente el rol funcional de anticuerpos purificados IgG e IgM de individuos Sin y Asin con

infección por Pv y el de la activación del sistema de complemento en ensayos de inhibición del proceso de ingreso del merozoito al reticulocito/eritrocito en cultivos *ex vivo/in vitro* de Pv y/o *P. knowlesi* y/o Pf (47).

Los anticuerpos con capacidad de unión a receptores Fc actúan como un puente entre la respuesta inmunológica adaptativa y la innata, donde el anticuerpo proporciona la especificidad del sistema inmune adaptativo (a través de sus regiones Fab), y la unión de la región Fc a receptores Fc en células del sistema inmune activa la respuesta inmune innata (170). Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio que evalúa la presencia de anticuerpos con capacidad de unión a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa en individuos con infección con Pv de la Amazonía peruana. No se observaron altas proporciones de individuos con infección por Pv seropositivos con capacidad de producir anticuerpos de unión a Fc γ RI, sin embargo, se observó una alta proporción de individuos Sin y Asin con capacidad de producir anticuerpos anti-PvRBP2b de unión a Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa. Asimismo, observamos una fuerte correlación de anticuerpos IgG1 con anticuerpos anti-Fc γ RI y Fc γ RIIIa inducidos por la proteína PvAMA1 y anticuerpos IgG1 con anticuerpos anti-Fc γ RIIa inducidos por la proteína PvRBP2b. La plataforma ELISA usada para la ejecución de estos experimentos también han sido usada para detección de estos tipos de anticuerpos en participantes de ensayos clínicos para evaluación del rendimiento de la vacuna contra Pf RTS, S, ya aprobada para su uso en niños en África por la OMS (72,171). Siendo este estudio uno de los primeros intentos de desentrañar la función de estos anticuerpos dentro del modelo de respuesta inmunológica descrita a la fecha para Pv.

Los individuos Asin presentaron parasitemias significativamente menores por microscopía y qPCR en comparación a los individuos Sin. Por tanto, se decidió evaluar la posible correlación entre niveles de anticuerpos con parasitemias en los individuos infectados con Pv. Los resultados demostraron que para la mayoría de las proteínas evaluadas no hubo correlación entre niveles de anticuerpos y parasitemias. Solo se halló una correlación negativamente débil entre niveles de anticuerpos con capacidad de unión a FcγRIIIa inducidos por la proteína PvRBP2b ($p \leq 0.01$, $r_s = -0.33$) y una correlación débil pero positiva entre niveles de anticuerpos con capacidad de unión a FcγRI inducidos por la proteína PvMSP8 ($P \leq 0.01$, $r_s = 0.32$), asociados a incremento de parasitemia. Estos resultados son diferentes a los reportados por Villasis et al., 2012, quien reportó altos niveles de anticuerpos IgG, IgG1 e IgG3 contra las proteínas PfRh1, PfRh2a y b, PfRh5, EBA-175, EBA-181 y PfMSP-1₁₉, y una correlación negativa de grado débil a moderado asociados a bajas parasitemias detectadas por microscopía, en individuos Asin con infección por Pf de la Amazonía peruana (85). Hasta donde sabemos, no se han reportado otros resultados de asociación de niveles de anticuerpos con parasitemias en infecciones por Pv. En el futuro, evaluaremos las asociaciones de los niveles de anticuerpos encontrados con otras variables epidemiológicas descritas en este estudio.

La evaluación de anticuerpos IgG anti-PfMSP2 en los individuos infectados con Pv de nuestro estudio, demostró la exposición previa de estos a infecciones por Pf. Mas aún, se evidencio a un porcentaje significativo de individuos Asin con anticuerpos IgG anti- PfMSP2 (cepa FC27). Por último, también se halló una correlación significativa, negativa pero débil entre anticuerpos IgG anti-PfMSP2 (cepa FC27)

con parasitemias. Esta evaluación es el primer paso en el inicio de estudios de proteínas de Pf capaces de inducir una respuesta posiblemente protectora y/o funcional en individuos infectados con Pv, en contexto co-endémicos de estas especies, como la Amazonía peruana (172,173).

DISCUSIÓN GENERAL

El primer capítulo de la tesis describe las características epidemiológicas, clínicas, hematológicas y bioquímicas de individuos Sin y Asin con infección por Pv, e individuos control de la Amazonía peruana, en la búsqueda de biomarcadores de inmunidad clínica a infección por Pv (93).

Nuestros datos revelaron una prevalencia de Pv baja, pero heterogénea en las diferentes comunidades donde se enrolo a los participantes del estudio. La mayoría de las infecciones fueron Asin y submicroscópicas, y más frecuentes durante la temporada de vaciante de ríos (93). Estos resultados respaldan los hallazgos previos reportados por ICEMR durante los últimos 10 años en la Amazonía peruana, donde la tendencia fue encontrar una predominancia de infecciones submicroscópicas y asintomáticas independientemente del diseño o tamaño de estudio llevado a cabo (23,104).

En general, los individuos Pv Asin mostraron una parasitemia más baja que los individuos Pv Sin por qPCR (mediana = 0.79 par/ μ L frente a 54.55 par/ μ L). Durante las tres semanas de seguimientos de individuos Asin, el 37% (29/78) permaneció Asin, reportando parasitemias fluctuantes entre niveles bajos e indetectables por qPCR. Solo una pequeña proporción de los individuos originalmente enrolados como Asin durante los tamizajes poblacionales se volvieron detectables por microscopía (17.2%, 5/29) o Sin (17.9%, 14/78) (93). De manera similar a nuestros hallazgos, un estudio anterior realizado por Moreno-Gutierrez et al., 2018 entre junio y julio de 2015 en el distrito de Mazán, encontró que de 179 personas infectadas con Pv por qPCR, el 40.8% permaneció Asin

durante todos los seguimientos, el 16.8% de las personas inicialmente clasificadas como Asin luego experimentaron síntomas de malaria en el transcurso de los seguimientos, y de este grupo una pequeña proporción (13.8%) de las infecciones submicroscópicas se volvieron detectables por microscopía en visitas posteriores (90). Una limitante de nuestro estudio es que solo pudimos seguir a los individuos Asin durante tres semanas consecutivas tras su enrolamiento y solo tener 2 puntos de seguimiento post-enrolamiento (al tercer y sexto mes) para los individuos que decidieron participar en el estudio longitudinal.

Uno de los estudios cohortes más grandes para seguimientos de individuos Asin con infección por Pv fue realizado Vietnam (313 participantes fueron seguidos por 2 años). En él se reportó una mediana de duración de infección Asin por Pv de 6 meses (de 3-9 meses), con densidades de parásitos oscilantes entre ultrabajas (detectadas solo por PCR ultrasensible) a indetectables. La mayoría de las infecciones sintomáticas se desarrollaron con frecuencia en individuos con parasitemias de alta densidad. Asimismo se reportó que las infecciones Asin pueden durar más allá de la estación seca y que podrían convertirse en una fuente potencial de transmisión durante la temporada de lluvias (29). Aun así, se requiere más investigación sobre la evolución clínica de las infecciones Asin para aclarar el papel de la inmunidad en estos individuos, protección contra malaria clínica y los mecanismos involucrados en la regulación de infecciones subclínicas y eventos de eliminación espontánea del parásito (29,128). Dado que las personas Asin no buscarán tratamiento, la búsqueda de portadores Asin durante la estación de vaciante de ríos o seca mediante uso de herramientas serológicas en nuestro contexto epidemiológico será de gran ayuda para el rediseño de estrategias más

efectivas de control y/o eliminación de la malaria (117,124,129). Esta necesidad fue un importante antecedente para el desarrollo del **capítulo 2**.

La mayoría de los estudios utilizan la fiebre como criterio principal para clasificar a los individuos sintomáticos con malaria (106). Sin embargo, durante la ejecución de nuestros estudios transversales para la búsqueda activa de participantes, la mayoría de los individuos reportó dolor de cabeza como síntoma principal (93). Mas aún, resultados de análisis de encuestas de síntomas en individuos enrolados durante un estudio cohorte a gran escala llevado a cabo por el ICEMR durante los años 2011-2015 (104), en nuestra misma región de estudio también reportaron como síntoma principal el dolor de cabeza (Torres et al., manuscrito en revisión)

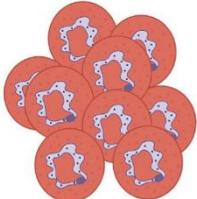
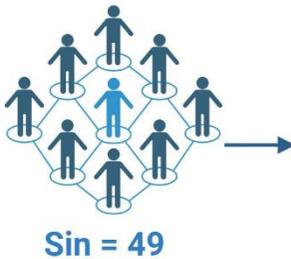
También en el **capítulo 1**, describimos que las infecciones por Pv Asin no generan cambios drásticos en niveles de la mayoría de los parámetros hematológicos y bioquímicos clínicos en comparación a los controles de la ciudad amazónica de Iquitos. Estos resultados son comparables a los obtenidos por nuestros colaboradores en Brasil (21). Al igual que Almeida et al., 2021 en nuestro estudio evidenciamos signos de trombocitopenia y linfopenia en individuos Sin en comparación con individuos Asin. Sin embargo, en nuestro estudio, las medianas de estos parámetros hematológicos estaban dentro del rango normal. Ambos estudios reportaron altos niveles de bilirrubina en individuos. Nuestro estudio también evidenció que los individuos Asin tiene mayores niveles de eosinófilos y menores niveles de hemoglobina, más notorio aun en mujeres, en comparación a individuos Sin. Sin embargo, es difícil de inferir más conclusiones sobre este último hallazgo debido al pequeño tamaño muestral para el grupo de mujeres Asin (n=4) (93). Esperamos que estos resultados sean de utilidad a los programas nacionales

de control de enfermedades febriles, para el diseño de algoritmos de diagnóstico y seguimiento de respuesta a tratamiento de enfermedades infecciosas y diferenciación entre enfermedades febriles en entornos co-endémicos como el de la Amazonía peruana (Figura 1) (91,92,107).

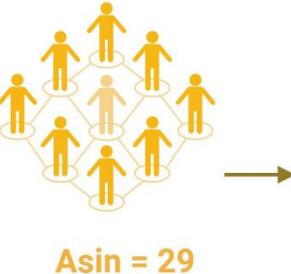
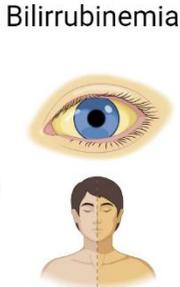
En el **capítulo 2**, evaluamos a nivel poblacional el rol de la proteína PvMSP8, sintetizada en nuestro laboratorio mediante el sistema de expresión eucariote Baculovirus, como seromarcador de infecciones por Pv en la Amazonía peruana, usando un protocolo de ELISA indirecto, también estandarizado en nuestro laboratorio (86,87). Posteriormente se usó esta metodología para evaluar la respuesta de anticuerpos IgG entre individuos Sin y Asin con infección por Pv, en una primera aproximación de búsqueda de biomarcadores para diferenciación entre individuos Sin y Asin con infección por Pv.

Enrolamiento de participantes apartir de tamizajes poblacionales en 13 comunidades de la Amazonía Peruana y colección pasiva en centros de salud de la ciudad de Iquitos (2018-2021)

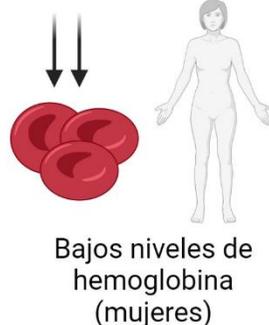
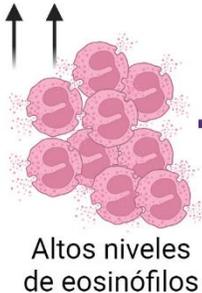
Evolución de infecciones asintomáticas por *P. vivax*



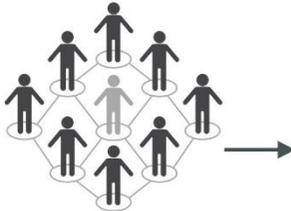
Parasitemias promedio = 50 par/uL (qPCR)



17.2% (5/29) de infecciones Asin se volvieron **detectables a microscopía**



Parasitemias promedio = 1 par/uL (qPCR)



- Sin síntomas
- No historial de infección por malaria

Valores de parámetros bioquímicos y hematológicos normales

FIGURA 1. Resumen de los principales hallazgos descritos en el Capítulo 1

A la fecha la comunidad científica se encuentra en proceso de descubrimiento de nuevas proteínas de Pv y la evaluación de su potencial rol aplicativo en diferentes contextos endémicos (38). Es importante mencionar que dependiendo del sistema de producción de proteínas y la metodología usada para medir los niveles de anticuerpos, los resultados pueden variar. Debido a ello la comunidad científica está haciendo grandes esfuerzos para estandarizar estas metodologías a escala mundial y estar en la capacidad de evaluar la seroreactividad de antígenos de Plasmodium en condiciones reproducibles, en donde la única variable sería el origen de la muestra a ser evaluada (61).

Longley et al. 2017 comparo la respuesta serológica (IgG) contra un panel de 307 proteínas de Pv producidas en el sistema de producción de proteínas WGCF, usando muestras de individuos sintomáticos con infección por Pv de PNG (n=524), Tailandia (n=57) y de Brasil (n=91), colectadas en estudios cohortes. Independientemente del contexto endémico se observó que la mayoría de las proteínas seroreactivas en todos los sitios de estudio, indujeron respuestas de anticuerpos de corta duración con vidas medias estimadas menor a 6 meses, reflejándose así las características individuales de las proteínas. No obstante, también se observó respuestas de mayor duración para otras proteínas. Tal fue el caso por ejemplo de las proteínas de circunsporozoito (PVX_086150) y antígeno rico en triptófano (Pv-fam-a) (PVX_112670), con tiempo de duración de anticuerpos de 713 y 650 días para individuos de un contexto endémico de baja transmisión de Tailandia y de 346 y 317 días respectivamente, para individuos de

un contexto endémico de baja transmisión de Brasil. Estos resultados enfatizan la reevaluación de las características de las proteínas de Pv, de acuerdo a zona endémica, en términos de tasas de seropositividad y capacidad de generar anticuerpos en el tiempo (longevidad) para futuros usos aplicativos, ya que los resultados publicados en una determinada área endémica de malaria no necesariamente serán reproducibles en otras (61).

Los resultados del **capítulo 2** señalan a la proteína recombinante PvMSP8 (producida en nuestro laboratorio) como un buen seromarcador para detección de individuos con exposición reciente a Pv (AUC = 0.79) a nivel poblacional, en el contexto endémico de la Amazonia peruana (95). Nuestros resultados fueron similares a los reportados por Longley et al., en 2020, quien demostró el buen desempeño de la proteína recombinante PvMSP8 como MES en tres estudios cohortes a gran escala, realizados en Tailandia (AUC = 0.76), Brasil (AUC = 0.72) e Islas Salomón (AUC = 0.69) (94).

La publicación de estos resultados nos permiten promover la implementación del protocolo de ELISA descrito en el **capítulo 2** como una herramienta serológica alternativa de ayuda para el desarrollo de los Programas de Control de Malaria llevados a cabo por el MINSA (148). Estudios a futuro trabajaran en el escalamiento de PvMSP8 para su uso como MES en una plataforma de punto de contacto o prueba rápida serológica, para detección de individuos expuestos recientemente a infección por Pv o posibles portadores de hipnozoitos en nuestro contexto endémico (94,95).

Con el fin de iniciar la búsqueda de biomarcadores de inmunidad clínica o de protección en individuos Asin, decidimos evaluar si la proteína PvMSP8 era capaz de generar una respuesta diferencial a nivel de anticuerpos IgG entre individuos Sin (n=49) y Asin (n=29) con infección por Pv de la Amazonía peruana. Sin embargo, los resultados revelaron que la proteína PvMSP8, no generaba una respuesta diferencial de anticuerpos IgG entre estos individuos y que esta decaía drásticamente al sexto mes post-enrolamiento. Confirmándose así el rol de las respuestas IgG contra esta proteína como MES a infección reciente por Pv en nuestro contexto endémico (94).

Longley et al., 2017 reportó niveles de anticuerpos IgG más altos en 22 individuos Asin con infección por Pv, enrolados en un estudio transversal en una provincia de baja endemicidad de malaria de Tailandia, para nueve antígenos de Pv (PVX_081550, GAMA, P12, P41, RBP1a y b, RBP2a, RBP2cNB y RBP2-P2). El criterio de clasificación de Asin en este estudio difirió del nuestro en el sentido que Longley et al., 2017 clasificó como Asin a individuos con infección por Pv confirmada por qPCR, con ausencia de fiebre o historial de no haberse sentido saludables 2 días antes de la toma de muestra (64), mientras que nuestro estudio clasificó como Asin a individuos con infección continua por Pv confirmada por qPCR y con carencia de demostración de síntomas de malaria durante tres semanas de seguimiento previos a la colección de muestra de plasmas. Es importante mencionar que el tiempo promedio de manifestación de síntomas tras infección por picadura de mosquito en malaria, puede variar entre 7-15 días en el caso de infecciones por Pv o Pf u hasta 30 días en el caso de infecciones *P. malariae* (2). Al plantear un esquema de seguimiento 21 días de individuos Asin, nuestro estudio

trata de aproximarse a la clasificación más correcta de individuos Asin y evitar clasificar individuos en proceso de incubación y/o próxima manifestación de síntomas como Asin.

Asimismo, es importante destacar, que a pesar de que no se pudo alcanzar un tamaño muestral equitativo para los grupos de estudio en comparación (Sin, Asin y controles) y completar los seguimientos correspondientes a 3er y 6to mes post-enrolamiento para el estudio longitudinal, debido a las limitaciones de trabajo de campo que planteo la Pandemia del COVID-19. Nuestros tamaños muestrales para estudios inmunológicos de individuos Sin y Asin con infección por Pv son similares a los pocos estudios reportados a la fecha en esta temática en la literatura científica (21,64,79). A la fecha estamos trabajando en la medición de niveles de anticuerpos anti-*Plasmodium spp.* en muestras de plasmas de individuos provenientes de múltiples comunidades de la Amazonia peruana, colectadas en estudios transversales consecutivos a gran escala.

Los resultados descritos en el último capítulo de la tesis, a la fecha, son los primeros reportes de exploración de las respuestas en conjunto de anticuerpos IgM, IgG, IgG1, IgG3 y anticuerpos funcionales con capacidad de activar la vía clásica del sistema de complemento y de unión a receptores FcγR, con el fin de hallar biomarcadores para detección de individuos Asin con infección por Pv en la Amazonía peruana (Tabla 1). Los resultados destacan la respuesta diferencial funcional que cada una de estas proteínas (PvMSP8, PvRBP2b y PvAMA1) puede evocar en individuos con infección por Pv de acuerdo a contexto endémico. La exploración en conjunto de estas respuestas de anticuerpos, son un adelanto en la caracterización de las proteínas estudiadas, la caracterización de la respuesta

inmunológica de individuos con infección Asin por Pv y en el entendimiento de la respuesta inmunológica adaptativa y humoral en infecciones Asin. (23,33,67).

Tabla 1: Resumen de resultados de hallazgos del capítulo 3. Se describen los niveles de anticuerpos de acuerdo proteína evaluada en flechas hacia arriba, comparando individuos infectados con Pv y controles. En paréntesis el grupo de estudio (Sin o Asin) con mayores porcentajes de seropositividad. Se describen las correlaciones de anticuerpos funcionales con anticuerpos IgM/IgG y subclases IgG1/IgG3. ns, niveles no significativos comparados con grupos controles. # representa los niveles de anticuerpos que descendieron en los participantes al 6to mes post-enrolamiento

Anticuerpos							
Proteína	IgM	IgG	IgG1	IgG3	Unión a C1q (activación de la vía clásica de complemento) y correlación con Ac IgM/ IgG/IgG1/IgG3	Unión a receptores FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y correlación con Ac IgG/IgG1/IgG3	Función celular vía receptores FcγR- anticuerpos unidos a proteínas de merozoitos Pf
PvMSP8	↑↑(Sin) [#]	↑↑ [#]	↑↑ [#]	↑↑↑ [#] (Asin)	↑↑C1q [#] /IgG3 (Sin)	↑ FcγRI/ IgG1	Fagocitosis opsónica vía neutrófilos/macrófagos y eosinófilos (174–176)
PvAMA1	ns	↑↑	↑↑	↑↑↑ [#] (Asin)	↑ C1q/IgG/IgG1	↑ FcγRI/ IgG/ IgG1	Fagocitosis opsónica vía neutrófilos/macrófagos y eosinófilos (174–176)
						↑↑ FcγRIIa/ IgG/ IgG1	Fagocitosis opsónica vía neutrófilos y monocitos/ producción de ROS vías neutrófilos (176,177)
						↑↑ FcγRIIIa/ IgG/ IgG1	ADCC vía NK (178)
PvRBP2b	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑ C1q/IgG1	↑ FcγRI/ IgG1	Fagocitosis opsónica vía neutrófilos/macrófagos y eosinófilos (174–176)
						↑↑↑ FcγRIIa/ IgG1	Fagocitosis opsónica vía neutrófilos y monocitos/

producción de ROS vías
neutrófilos (176,177)

↑↑↑ FcγRIIIa[#]/
IgG/IgG1

ADCC vía NK(178)

Creemos que uno de los grandes aportes de esta tesis es la identificación de un significativo alto porcentaje de individuos Asin seropositivos a anticuerpos IgG3 anti-PvMSP8 (71%, 20/28) ($p = 0.0001$) y anti-PvAMA1 (75%, 21/28) ($p = 0.002$). Tayipto et al., 2022, recientemente reportó que las proteínas PvAMA1 y PvMSP8 son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos IgG3 que aumentó con la edad en hombres con historial de más de tres infecciones por Pv, en el transcurso de 1 año de seguimiento durante estudio cohorte, realizado por el ICERM en la comunidad de Lupuna (también parte de nuestro estudio) en la Amazonía peruana durante los años (2014-2015) (52). Tomando en cuenta que las infecciones por Pv en las comunidades de nuestro estudio son mayoritariamente Asin (**Capítulo 1**) (93), proponemos que las respuestas de anticuerpos IgG3 para algunas proteínas, como PvMSP8 y PvAMA1, en individuos adultos de nuestro contexto endémico podrían ser serían mejores biomarcadores para diferenciación de individuos Asin con infección por Pv, en comparación de las respuestas IgG (64,79). Más aún, Tayipto et al., 2022 propuso a las proteínas PvMSP5, Pv-fam-a (PVX_125728 y PVX_096995) y PvMSP3b, como atractivos seromarcadores para estudios de respuestas IgG3, dada su capacidad de inducir altos niveles de estos anticuerpos en individuos con infección por Pv en la Amazonía peruana (52).

También observamos un porcentaje mayor y significativo de individuos Sin con anticuerpos IgM anti-PvMSP8 (27.0%, 8/30%) ($p = 0.04$) y anticuerpos anti-PvMSP8 con capacidad de fijación a la proteína C1q (33%, 10/30) ($p = 0.02$). Este es el primer estudio que amplía la descripción de respuestas de anticuerpos anti-PvMSP8, más allá del estudio de las respuestas IgG e IgM (66,79,94,155,156,165). Las respuestas IgM anti-PvMSP8 han sido propuestas como MES para detección

de infección reciente por Pv en comparación a respuestas IgG (165), sin embargo, las respuesta IgM no han sido exploradas como biomarcador de diferenciación de individuos Sin y Asin con infección por Pv, siendo este el primer estudio realizado en nuestro contexto endémico.

La proteína PfMSP2 es expresada únicamente en Pf y esta postulada como candidato a vacuna contra infecciones por Pf (162). La detección de anticuerpos IgG anti-PfMSP2 en los individuos infectados con Pv de nuestro estudio, demostró previa exposición a infecciones por Pf. Los resultados revelaron a un porcentaje significativo de individuos Asin con presencia de anticuerpos IgG anti-PfMSP2 (cepa FC27). También se halló una correlación significativa, negativa pero débil con parasitemias. Esta evaluación es el primer paso en el inicio de estudios de proteínas de Pf capaces de inducir una respuesta posiblemente protectora y/o funcional en individuos infectados con Pv, en contexto co-endémicos de estas especies de Plasmodium, como la Amazonía peruana (172,173).

No encontramos diferencias significativas de niveles de anticuerpos IgG o proporciones de seropositivos entre individuos Sin y Asin infectados con Pv, para las proteínas evaluadas (PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8) mediante ELISA. Ambos grupos mostraron niveles de anticuerpos significativamente más altos en comparación a los controles de Iquitos y controles negativos de Australia. Estos resultados, son diferentes a los descritos por Longley et al., 2017, quien reportó altos niveles de anticuerpos IgG en individuos Asin con infección por Pv de un área hipoendémica de Tailandia (n = 22), para nueve antígenos de Pv (PVX_081550, GAMA, P12, P41, RBP1a y b, RBP2a, RBP2cNB y RBP2-P2) (64). Liu et al., 2022, continuando el estudio de Longley et al., 2017, exploró la dinámica de anticuerpos

IgG durante aproximadamente 10 meses, para los mismos individuos y reportó altos niveles de anticuerpos para 21/28 proteínas evaluadas (incluyendo a PvRBP2b y PvMSP8), señalando a PvRBP2b como una de las proteínas más inmunogénicas para individuos Asin en el contexto hipoendémico de Tailandia (79).

Estos resultados demuestran diferencias entre las respuestas de anticuerpos IgG en individuos Asin con infección por Pf y Pv, en el contexto de la Amazonia peruana, y diferencias de respuestas IgG contra una misma proteína entre individuos Asin con infección por Pv provenientes de diferentes zonas endémicas de malaria (2,61,83,85). Estudios a futuro, confirmaran los resultados de respuestas IgG obtenidos por ELISAs y descritos en el **capítulo 3**, haciendo uso de plataformas serológicas a gran escala para de esta manera expandir la evaluación de respuestas de anticuerpos frente a un número mayor de proteínas.

En base a nuestros resultados, proponemos que los participantes de nuestro estudio, adultos con infección por Pv (edad promedio: 43 años) enrolados de diferentes comunidades de la Amazonía peruana, a pesar de vivir en contextos endémicos de transmisión baja a moderada (85), en el transcurso de su vida son capaces de adquirir una respuesta inmune adaptativa a nivel de anticuerpos rápida y efectiva (23), capaz de activar una respuesta inmune adaptativa funcional casi inmediata y prolongada (> a 6 meses post infección) para mediar la eliminación del parásito Pv haciendo uso de anticuerpos IgG3 e IgG1 para la activación de la vía clásica del complemento y células inmunes efectoras (NK, eosinófilos, monocitos y neutrófilos) a través su unión a receptores FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa (174,177,178).

Más aún, proponemos que las proteínas del merozoito (PvAMA1, PvMSP8 y PvRBP2b) son capaces de inducir la producción de anticuerpos IgG y subclases IgG1 e IgG3 capaces de unirse a la proteína C1q para inicio de la activación vía clásica del complemento y consecuente lisis del parásito. Asimismo, anticuerpos IgG1, inducidos por estas proteínas, se unen potencialmente a receptores FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa en células inmunes, para la ejecución de diferentes funciones inmunológicas como: 1) fagocitosis opsónica (vía macrófagos, neutrófilos u eosinófilos) mediada por receptores FcγRI y fagocitosis opsónica (vía monocitos y neutrófilos) mediada por receptores FcγRIIa (174–176); 2) producción de ROS vías neutrófilos y mediada por receptores FcγRIIa (176,177) y 3) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) vía células natural killer (NK) y mediada por receptores FcγRIIIa (178). Un modelo bastante favorable para controlar parasitemias y fiebres en individuos Asin con infección por Pv (174,177,178). Sin embargo, todos los mecanismos de acción inmunológicos mediados por anticuerpos propuestos en el **capítulo 3** deben ser aun corroboradas en ensayos celulares.

Los resultados de la evaluación de parámetros hematológicos de los individuos de estudio revelaron altos niveles de eosinófilos en los individuos Asin en comparación a individuos Sin y controles (**Capítulo 1**) (93). Estudios preliminares, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, en la medición de secreción de citoquinas/quimioquinas en muestras de plasmas de estos mismos individuos, demostraron altos niveles de quimioquinas secretadas por eosinófilos. Las citoquinas RANTES y Eoxantina fueron secretadas en niveles más altos en individuos Asin e IL-10 en individuos Sin (Torres et al., 2022, presentación oral en ICPvR 2022). En base a esto postulamos que los eosinófilos pueden desempeñar un

rol importante de secreción de citoquinas como RANTES para quimiotaxis de leucocitos (NK, monocitos, células T) y Eotaxina para quimiotaxis de más eosinófilos (175).

Como siguiente paso a este trabajo doctoral, se corroborarán los resultados del **capítulo 3**, haciendo uso de plataformas serológicas más sensibles y a gran escala para evaluación de respuesta de anticuerpos funcionales frente a un número mayor de proteínas. Estos resultados podrían ayudarnos a llegar a conclusiones más profundas sobre la capacidad de la respuesta inmune que las proteínas de Pv pueden evocar en nuestros individuos de estudio y discernir que respuestas de anticuerpos en conjunto en el tiempo podrían estar relacionadas a protección o apuntar a ser biomarcadores para distinción de individuos Asin. Siendo esta, una información valiosa a ser usada a nuestro favor en el futuro de forma aplicativa, en estrategias de control y eliminación de esta enfermedad (38).

Asimismo, se realizará un análisis integral de los resultados descritos en la tesis con estudios de respuesta inmune celular y respuesta inmune innata en los mismos individuos de estudio, con el fin de ganar conocimiento sobre el perfil de la respuesta inmune asintomática en individuos con malaria vivax en nuestro contexto endémico. Estudios serológicos a nivel de laboratorio evaluarán la exposición de los participantes a otros patógenos también prevalentes en esta zona endémica y la posible influencia de estos o no en el desarrollo de tolerancia a infecciones por Pv en individuos Asin de la Amazonía peruana.

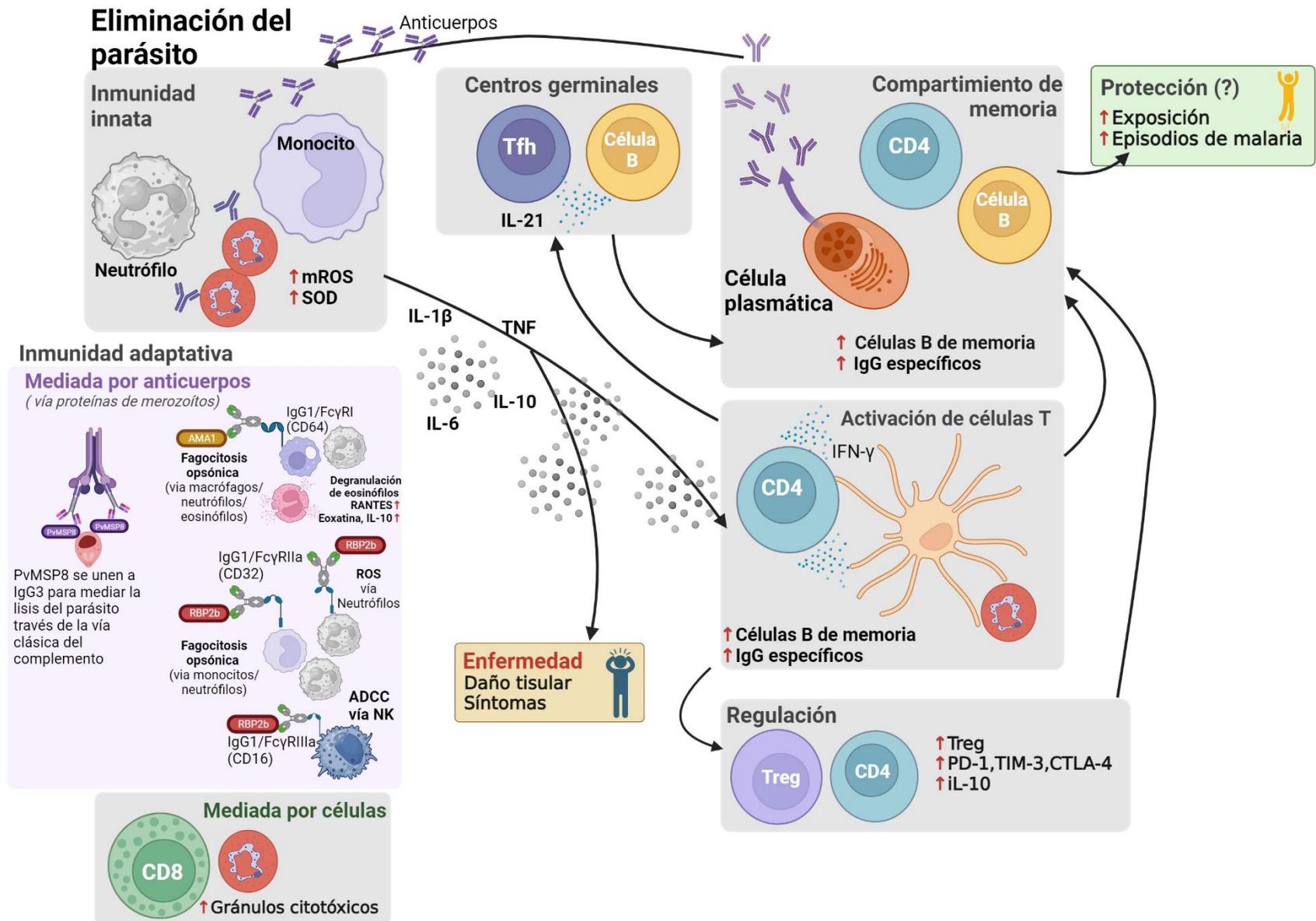


Figura 2: Aportes de la tesis en relación con el modelo de respuesta inmunológica en infecciones por *P. vivax*. Los monocitos, los neutrófilos y las células T CD8⁺ median destrucción de glóbulos rojos parasitados a través de la producción de especies de oxígeno reactivo mitocondrial (MRO), superóxido dismutasa (SOD) y gránulos citotóxicos, respectivamente. La destrucción de los glóbulos rojos parasitados vía monocito depende de los anticuerpos (Ac). De acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis, mediante ELISAs. Las proteínas del merozoito (PvAMA1, PvMSP8 y PvRBP2b) inducen la producción de anticuerpos IgG/IgG1/IgG3 capaces de unirse a la proteína C1q para inicio de la vía clásica del complemento y consecuente fagocitosis del parásito. Anticuerpos IgG1, inducidos por estas proteínas, se unen a receptores FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa, con el fin de potencialmente ejecutar diferentes funciones inmunológicas como: 1) fagocitosis opsónica (vía macrófagos, neutrófilos u eosinófilos) mediada por receptores FcγRI y fagocitosis opsónica (vía monocitos y neutrófilos) mediada por receptores FcγRIIa (174–176); 2) producción de ROS vías neutrófilos y mediada por receptores FcγRIIa (176,177) y 3) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) vía células natural killer (NK) y mediada por receptores FcγRIIIa (178). Estudios preliminares de nuestro grupo de investigación, en la medición de secreción de citoquinas en muestras de plasmas de estos mismos individuos demostraron altos niveles de quimioquinas secretadas por eosinófilos como RANTES y Eotaxina en individuos Asin e IL-10 en individuos Sin (Presentación oral en ICPvR 2022). Los resultados de evaluación de parámetros hematológicos en individuos Asin revelaron altos niveles de eosinófilos fuera del rango normal. En base a esto postulamos que los eosinófilos pueden desempeñar un rol importante de secreción de citoquinas como RANTES para quimiotaxis de leucocitos (NK, monocitos, células T) y Eotaxina para quimiotaxis de más eosinófilos. Todas las respuestas celulares mediadas por receptores Fcγ propuestas en este modelo deben ser aun corroboradas en ensayos celulares para el modelo de Pv. Las citoquinas producidas vía respuesta inmune innata actúan sobre las células del sistema inmune adaptativo, configurando las funciones efectoras de las células CD4⁺ T helper y células Treg. La carga de parásitos y secreción de citoquinas se asocian con síntomas y desencadenan la expresión de quimioquinas, receptores de quimioquinas y activación y moléculas inhibitorias. La producción de IFN-gamma probablemente se ve afectada por este entorno. La IL-21 también es inducida en la infección por Pv, lo que lleva a la expansión de células T foliculares Helper (Tfh) y está asociada con la producción de anticuerpos por las células plasmáticas. El número de episodios de malaria se asocia con mayores frecuencias de células Tfh y células B clásicas de memoria, probablemente mediando la protección vía anticuerpos. Adaptado de (23)

CONCLUSIONES

1. Los resultados de los estudios transversales llevados a cabo en 13 comunidades de la Amazonía peruana entre los años 2018-2021, revelaron una prevalencia de infecciones por Pv heterogénea [0.8% - 25.4%], mayoritariamente compuesta por infecciones Asin (66.7%, 164/246) y submicroscópicas (82.9%, 136/164), y frecuentes durante temporada seca o vaciantes de ríos (70.7%, 116/164).
2. Los individuos Sin con infección por Pv reportaron como síntoma principal dolor de cabeza (91.5%, 75/82) (Kruskal wallis test, $p < 0.0001$)
3. Durante las tres semanas de seguimientos de individuos Asin con infección por Pv, se observó una fluctuación de parasitemias entre niveles bajos e indetectables por qPCR. Una pequeña proporción de individuos Asin se volvieron detectables por microscopía (17.2%, 5/29). Dado que el tamaño muestral de individuos Asin para nuestro estudio fue pequeño ($n=29$), nuestros resultados deberán ser confirmados en estudios de seguimiento de individuos Asin a gran escala.
4. La comparación de parámetros bioquímicos y hematológicos entre individuos Sin ($n=49$) y Asin ($n=29$) infectados por Pv sugiere la presencia de mayores niveles de eosinófilos en individuos Asin ($p < 0.01$) y bajos niveles de hemoglobina, siendo esto más notorio en mujeres ($n=4$) ($p < 0.01$). Los resultados de esta tesis demuestran que los Asin aun siendo portadores silenciosos de bajas parasitemias, están enfermos. Aunque el estudio tiene limitaciones de tamaño muestral, los resultados evidencian la importancia de la identificación y caracterización de individuos Asin, por

tanto, la búsqueda e identificación de estos individuos debe ser incluida en los programas de control y eliminación de la malaria.

5. Los resultados del estudio confirman el rol de anticuerpos IgG anti-PvMSP8 como seromarcador de exposición a infecciones recientes por Pv a nivel poblacional en la Amazonía peruana (AUC = 0.79).
6. Las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8 inducen mayores niveles de anticuerpos IgM, IgG, IgG1 e IgG3 en individuos infectados con Pv de la Amazonía peruana en comparación con individuos control ($p < 0.01$).
7. Las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8 inducen anticuerpos funcionales, promotores de la activación de la vía clásica de complemento a través de su fijación a la proteína C1q vía IgG1 e IgG3, en individuos infectados con Pv de la Amazonía peruana, en comparación con individuos control ($p \leq 0.01$).
8. Se demostró que las proteínas PvAMA1, PvRBP2b y PvMSP8 inducen anticuerpos de unión a receptores Fc γ RI vía IgG1 ($p < 0.001$); y que las proteínas PvAMA1, PvRBP2b también inducen anticuerpos de unión a receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa vía IgG1, en individuos infectados con Pv de la Amazonía peruana, en comparación con individuos control ($p \leq 0.01$).
9. Se observó una alta proporción de individuos Asin seropositivos a IgG3 anti-PvMSP8 (71%, 20/28) ($p = 0.0001$) y anti-PvAMA (75%, 21/28) ($p = 0.002$), sugiriéndose a estas respuestas de anticuerpos como potenciales biomarcadores de individuos Asin con infección por Pv en la Amazonia peruana.

10. La detección de anticuerpos IgG anti-PfMSP2 en los participantes del estudio evidencia su exposición previa a infección por Pf ($p < 0.0001$).

LIMITACIONES

1. Debido a las limitaciones de ejecución del estudio que creó la Pandemia del COVID-19, limitaciones de presupuesto y tiempo del estudio, no se pudo alcanzar un tamaño muestral equitativo para los grupos en comparación (Sin, Asin y controles) y completar los seguimientos correspondientes a 3er y 6to mes post-enrolamiento para el estudio longitudinal.
2. Debido a limitaciones de presupuesto, no se pudo evaluar o confirmar mediante laboratorio la coexistencia de co-infecciones en los individuos enrolados en el estudio.
3. Debido a limitaciones en la producción de la proteína PvMSP8, no se pudo ejecutar los ensayos de ELISA para detección de anticuerpos con capacidad de unión a FcγRIIa y FcγRIIIa.
4. Algunas de las proteínas usadas para el desarrollo del **capítulo 3** fueron producidas en diferentes sistemas de expresión. No obstante, esto no fue una limitante para la evaluación de niveles de anticuerpos en las muestras de nuestro estudio, dado que se observaron diferencias significativas entre niveles de anticuerpos de los individuos controles negativos, controles de Iquitos e individuos infectados con Pv. Se detectaron niveles de anticuerpos más bajos para los controles negativos y de Iquitos en comparación a los individuos infectados con Pv. Todas las proteínas usadas en este estudio ya habían sido reportadas en publicaciones científicas previas.

ESTUDIOS A FUTURO

1. Se ampliará la evaluación de respuesta de anticuerpos descritas para este estudio haciendo uso de plataformas serológicas más sensibles y a gran escala y un número mayor de proteínas de Pv.
2. Se evaluará el rol funcional de anticuerpos purificados IgG e IgM de individuos Sin y Asin con infección por Pv y el rol de la activación del sistema de complemento en ensayos de inhibición del proceso de ingreso del merozoito al reticulocito/eritrocito en cultivos *ex vivo/in vitro* de Pv y/o *P. knowlesi* y/o Pf.
3. Se evaluará a nivel serológico la exposición de los participantes de nuestro estudio a otros patógenos también prevalentes en esta zona endémica y la posible influencia de estos o no en el desarrollo de tolerancia a infecciones por Pv en individuos Asin de la Amazonía peruana.
4. Se evaluará la producción de células secretoras de anticuerpos específicas a la proteína PvMSP8, sintetizada en nuestro laboratorio, usando muestras de PBMCs de los individuos Sin, Asin con infección con Pv y controles de Iquitos, con el fin de evaluar de manera indirecta la producción de células B de memoria y la duración de anticuerpos anti-PvMSP8 en las muestras de seguimiento de los participantes.
5. Se procederá a fenotipificar por citometría de flujo los PBMCs de los individuos Sin, Asin con infección con Pv y controles de Iquitos.
6. Se procederá a realizar un análisis integral de los resultados descritos en la tesis, incluyendo estudios de respuesta inmune celular y respuesta inmune

innata, con el fin de ampliar los conocimientos del perfil de respuesta inmune en individuos *Asin* con malaria vivax en nuestro contexto endémico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. World malaria report 2023 [Internet]. [citado 1 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240086173>
2. Adams JH, Mueller I. The Biology of Plasmodium vivax. Cold Spring Harb Perspect Med. 1 de septiembre de 2017;7(9):a025585.
3. Baird JK. Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute Plasmodium vivax Malaria. Clin Microbiol Rev. enero de 2013;26(1):36-57.
4. Reporte de Análisis del comportamiento epidemiológico | Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. CDC - Perú [Internet]. [citado 1 de marzo de 2024]. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/salasisituacional/sala/index/SALA_VIGILA/141
5. Rosado J, Carrasco-Escobar G, Nolasco O, Garro K, Rodriguez-Ferruci H, Guzman-Guzman M, et al. Malaria transmission structure in the Peruvian Amazon through antibody signatures to Plasmodium vivax. PLoS Negl Trop Dis. 9 de mayo de 2022;16(5):e0010415.
6. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of Plasmodium vivax Malaria in Peru. Am J Trop Med Hyg. 28 de diciembre de 2016;95(6 Suppl):133-44.
7. Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, et al. Plasmodium vivax Sub-Patent Infections after Radical Treatment Are Common in Peruvian Patients: Results of a 1-Year Prospective Cohort Study. PLoS ONE. 28 de enero de 2011;6(1):e16257.
8. de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-Clone Activation of Hypnozoites Is the Leading Cause of Relapse in Plasmodium vivax Infection. PLoS ONE. 21 de noviembre de 2012;7(11):e49871.
9. Barnwell JW, Ingravallo P, Galinski MR, Matsumoto Y, Aikawa M. Plasmodium vivax: malarial proteins associated with the membrane-bound caveola-vesicle complexes and cytoplasmic cleft structures of infected erythrocytes. Exp Parasitol. enero de 1990;70(1):85-99.
10. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The deformability of red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum and P. vivax. J Infect Dis. 15 de enero de 2004;189(2):190-4.
11. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. J Infect Dis. 15 de agosto de 2010;202(4):638-47.
12. Lee WC, Russell B, Rénia L. Evolving perspectives on rosetting in malaria. Trends Parasitol. octubre de 2022;38(10):882-9.
13. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. Blood. 19 de febrero de 2015;125(8):1314-24.

14. McCarthy JS, Griffin PM, Sekuloski S, Bright AT, Rockett R, Looke D, et al. Experimentally induced blood-stage *Plasmodium vivax* infection in healthy volunteers. *J Infect Dis.* 15 de noviembre de 2013;208(10):1688-94.
15. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2011;24(2):377-410.
16. Flannery EL, Markus MB, Vaughan AM. *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* julio de 2019;35(7):583-4.
17. Ferreira MU, Corder RM, Johansen IC, Kattenberg JH, Moreno M, Rosas-Aguirre A, et al. Relative contribution of low-density and asymptomatic infections to *Plasmodium vivax* transmission in the Amazon: pooled analysis of individual participant data from population-based cross-sectional surveys. *Lancet Reg Health Am.* mayo de 2022;9:100169.
18. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop.* marzo de 2012;121(3):281-91.
19. Carrasco-Escobar G, Miranda-Alban J, Fernandez-Miñope C, Brouwer KC, Torres K, Calderon M, et al. High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malar J.* 16 de octubre de 2017;16:415.
20. Corder RM, Ferreira MU, Gomes MGM. Modelling the epidemiology of residual *Plasmodium vivax* malaria in a heterogeneous host population: A case study in the Amazon Basin. *PLOS Comput Biol.* 13 de marzo de 2020;16(3):e1007377.
21. Almeida GG, Costa PAC, Araujo M da S, Gomes GR, Carvalho AF, Figueiredo MM, et al. Asymptomatic *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: Submicroscopic parasitemic blood infects *Nyssorhynchus darlingi*. *PLoS Negl Trop Dis.* octubre de 2021;15(10):e0009077.
22. Moreno M, Torres K, Tong C, García Castillo SS, Carrasco-Escobar G, Guedez G, et al. Insights into *Plasmodium vivax* Asymptomatic Malaria Infections and Direct Skin-Feeding Assays to Assess Onward Malaria Transmission in the Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 13 de julio de 2022;107(1):154-61.
23. Torres K, Ferreira MU, Castro MC, Escalante AA, Conn JE, Villasis E, et al. Malaria Resilience in South America: Epidemiology, Vector Biology, and Immunology Insights from the Amazonian International Center of Excellence in Malaria Research Network in Peru and Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* octubre de 2022;107(4 Suppl):168-81.
24. de Mendonça VR, Barral-Netto M. Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* diciembre de 2015;110(8):945-55.

25. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science*. 24 de febrero de 2012;335(6071):936-41.
26. Garcia Castillo SSA. Características de las infecciones recurrentes submicroscópicas por *Plasmodium vivax* detectadas durante un estudio cohorte de 3 años en la Amazonía peruana. 2021 [citado 7 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/10008>
27. Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia | PLOS Neglected Tropical Diseases [Internet]. [citado 7 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003109>
28. Chuquiyaury R, Molina DM, Moss EL, Wang R, Gardner MJ, Brouwer KC, et al. Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. *Am J Trop Med Hyg*. 7 de octubre de 2015;93(4):801-9.
29. Nguyen TN, Seidlein L von, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis*. 1 de mayo de 2018;18(5):565-72.
30. Nyarko PB, Claessens A. Understanding Host-Pathogen-Vector Interactions with Chronic Asymptomatic Malaria Infections. *Trends Parasitol*. marzo de 2021;37(3):195-204.
31. Sato S. *Plasmodium*-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol*. 7 de enero de 2021;40(1):1.
32. Pohl K, Cockburn IA. Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. *Front Immunol*. 19 de agosto de 2022;13:914598.
33. Antonelli LR, Junqueira C, Vinetz JM, Golenbock DT, Ferreira MU, Gazzinelli RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev*. enero de 2020;293(1):163-89.
34. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol*. noviembre de 2014;14(11):744-57.
35. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet*. julio de 2019;394(10195):332-43.
36. Price RN, Commons RJ, Battle KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. *Trends Parasitol*. junio de 2020;36(6):560-70.
37. Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol*. 1 de abril de 2004;20(4):192-8.
38. Tayipto Y, Liu Z, Mueller I, Longley RJ. Serology for *Plasmodium vivax* surveillance: A novel approach to accelerate towards elimination. *Parasitol Int*. abril de 2022;87:102492.

39. Greenhouse B, Smith DL, Rodríguez-Barraquer I, Mueller I, Drakeley CJ. Taking Sharper Pictures of Malaria with CAMERAs: Combined Antibodies to Measure Exposure Recency Assays. *Am J Trop Med Hyg.* noviembre de 2018;99(5):1120-7.
40. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol Today.* 1 de enero de 1996;12(1):20-9.
41. Longley RJ, Sattabongkot J, Mueller I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology.* febrero de 2016;143(2):154-70.
42. De SL, Ntumngia FB, Nicholas J, Adams JH. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. *Expert Rev Vaccines.* febrero de 2021;20(2):97-112.
43. Veiga GTS da, Moriggi MR, Vettorazzi JF, Müller-Santos M, Albrecht L. *Plasmodium vivax* vaccine: What is the best way to go? *Front Immunol* [Internet]. 2023 [citado 3 de marzo de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.910236>
44. Dengue: a continuing global threat | *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2460>
45. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis.* 1 de octubre de 2008;198(7):984-93.
46. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol.* diciembre de 2008;82(24):12449-63.
47. Boyle MJ, Chan JA, Handayani I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et al. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Adv.* 25 de septiembre de 2019;5(9):eaax4489.
48. Medeiros CMP, Moreira EUM, Pires CV, Torres LM, Guimarães LFF, Alves JRS, et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. *PloS One.* 2020;15(5):e0232786.
49. Lima BAS, Fernandes GM, Torres LM, Pires CV, Alves JRS, Moreira-Nascimento SL, et al. Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. *PLoS Negl Trop Dis.* junio de 2022;16(6):e0010493.
50. Schappo AP, Bittencourt NC, Bertolla LP, Forcellini S, da Silva ABIE, Dos Santos HG, et al. Antigenicity and adhesiveness of a *Plasmodium vivax* VIR-E protein from Brazilian isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022;116:e210227.
51. Cassiano GC, Furini AAC, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DRL, et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune

response against an N-terminal antigen of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J.* 3 de junio de 2016;15:306.

52. Tayipto Y, Rosado J, Gamboa D, White MT, Kiniboro B, Healer J, et al. Assessment of IgG3 as a serological exposure marker for Plasmodium vivax in areas with moderate-high malaria transmission intensity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:950909.
53. Cohen S, McGREGOR IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 25 de noviembre de 1961;192:733-7.
54. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria - PubMed [Internet]. [citado 7 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1928564/>
55. Cutts JC, Powell R, Agius PA, Beeson JG, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 9 de septiembre de 2014;12:150.
56. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Drakeley CJ, Braga ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malar J.* 7 de marzo de 2017;16(1):107.
57. França CT, Hostetler JB, Sharma S, White MT, Lin E, Kiniboro B, et al. An Antibody Screen of a Plasmodium vivax Antigen Library Identifies Novel Merozoite Proteins Associated with Clinical Protection. *PLoS Negl Trop Dis.* 16 de mayo de 2016;10(5):e0004639.
58. Immunogenicity of the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses | Malaria Journal | Full Text [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-017-2000-z>
59. 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 Immunol.* 2020;42(5):e12705.
60. Frontiers | What Is Known about the Immune Response Induced by Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidates? [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00126/full>
61. Longley RJ, White MT, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Suen CSNLW, et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 Plasmodium vivax proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 de septiembre de 2017;11(9):e0005888.
62. 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. *JCI Insight.* 16 de enero de 2020;5(1):e130769.

63. He WQ, Shakri AR, Bhardwaj R, França CT, Stanisic DI, Healer J, et al. Antibody responses to Plasmodium vivax Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. Sinnis P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 15 de febrero de 2019;13(2):e0006987.
64. Longley RJ, França CT, White MT, Kumpitak C, Sa-angchai P, Gruszczyk J, et al. Asymptomatic Plasmodium vivax infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. Malar J. 28 de abril de 2017;16(1):178.
65. Wang B, Lu F, Cheng Y, Chen JH, Jeon HY, Ha KS, et al. Immunoprofiling of the Tryptophan-Rich Antigen Family in Plasmodium vivax. Infect Immun. agosto de 2015;83(8):3083-95.
66. Cheng Y, Wang B, Changrob S, Han JH, Sattabongkot J, Ha KS, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to Plasmodium vivax merozoite surface protein 8 in patients with P. vivax infection. Malar J. 22 de mayo de 2017;16(1):211.
67. Opi DH, Kurtovic L, Chan JA, Horton JL, Feng G, Beeson JG. Multi-functional antibody profiling for malaria vaccine development and evaluation. Expert Rev Vaccines. octubre de 2021;20(10):1257-72.
68. Teo A, Feng G, Brown GV, Beeson JG, Rogerson SJ. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. Trends Parasitol. noviembre de 2016;32(11):887-98.
69. Kurtovic L, Boyle MJ, Opi DH, Kennedy AT, Tham W, Reiling L, et al. Complement in malaria immunity and vaccines. Immunol Rev. enero de 2020;293(1):38-56.
70. Oyong DA, Kenangalem E, Poespoprodjo JR, Beeson JG, Anstey NM, Price RN, et al. Loss of complement regulatory proteins on uninfected erythrocytes in vivax and falciparum malaria anemia. JCI Insight. 15 de noviembre de 2018;3(22):e124854, 124854.
71. Reiling L, Boyle MJ, White MT, Wilson DW, Feng G, Weaver R, et al. Targets of complement-fixing antibodies in protective immunity against malaria in children. Nat Commun. 5 de febrero de 2019;10(1):610.
72. Kurtovic L, Atre T, Feng G, Wines BD, Chan JA, Boyle MJ, et al. Multifunctional Antibodies Are Induced by the RTS,S Malaria Vaccine and Associated With Protection in a Phase 1/2a Trial. J Infect Dis. 13 de octubre de 2021;224(7):1128-38.
73. Beeson JG, Kurtovic L, Dobaño C, Opi DH, Chan JA, Feng G, et al. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. Sci Transl Med. 9 de enero de 2019;11(474):eaau1458.
74. Gruszczyk J, Kanjee U, Chan LJ, Menant S, Malleret B, Lim NTY, et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. Science. 5 de enero de 2018;359(6371):48-55.

75. Plasmodium vivax in vitro continuous culture: the spoke in the wheel | Malaria Journal | Full Text [Internet]. [citado 1 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2456-5>
76. Chan LJ, Gandhirajan A, Carias LL, Dietrich MH, Vadas O, Visentin R, et al. Naturally acquired blocking human monoclonal antibodies to Plasmodium vivax reticulocyte binding protein 2b. *Nat Commun.* 9 de marzo de 2021;12(1):1538.
77. De Meulenaere K, Prajapati SK, Villasis E, Cuypers B, Kattenberg JH, Kasian B, et al. Band 3-mediated Plasmodium vivax invasion is associated with transcriptional variation in PvTRAg genes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:1011692.
78. Mazhari R, Takashima E, Longley RJ, Ruybal-Pesantez S, White MT, Kanoi BN, et al. Identification of novel Plasmodium vivax proteins associated with protection against clinical malaria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1076150.
79. Liu ZSJ, Sattabongkot J, White M, Chotirat S, Kumpitak C, Takashima E, et al. Naturally acquired antibody kinetics against Plasmodium vivax antigens in people from a low malaria transmission region in western Thailand. *BMC Med.* 9 de marzo de 2022;20(1):89.
80. He WQ, Karl S, White MT, Nguitragool W, Monteiro W, Kuehn A, et al. Antibodies to Plasmodium vivax reticulocyte binding protein 2b are associated with protection against P. vivax malaria in populations living in low malaria transmission regions of Brazil and Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 19 de agosto de 2019;13(8):e0007596.
81. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLOS ONE.* 10 de septiembre de 2015;10(9):e0137458.
82. Carrasco-Escobar G, Gamboa D, Castro MC, Bangdiwala SI, Rodriguez H, Contreras-Mancilla J, et al. Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of P. vivax parasitaemia in riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Sci Rep.* 14 de agosto de 2017;7(1):8082.
83. Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, et al. Genome-Level Determination of Plasmodium falciparum Blood-Stage Targets of Malarial Clinical Immunity in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 15 de abril de 2015;211(8):1342-51.
84. Rosado J, White MT, Longley RJ, Lacerda M, Monteiro W, Brewster J, et al. Heterogeneity in response to serological exposure markers of recent Plasmodium vivax infections in contrasting epidemiological contexts. *PLoS Negl Trop Dis.* 16 de febrero de 2021;15(2):e0009165.
85. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, et al. Anti-Plasmodium falciparum invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malar J.* 30 de octubre de 2012;11:361.

86. 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. *Malar J.* 23 de septiembre de 2019;18(1):327.
87. KATHERINE DANIELA GARRO GAMARRA. EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESTADIO ASEXUAL DE PLASMODIUM SPP. COMO NUEVOS MARCADORES DE SEROPREVALENCIA DE MALARIA EN LA AMAZONIA PERUANA. TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR [Internet]. 2019. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/9055>
88. Caruana EJ, Roman M, Hernández-Sánchez J, Solli P. Longitudinal studies. *J Thorac Dis.* noviembre de 2015;7(11):E537-40.
89. Torres KJ, Villasis E, Bendezú J, Chauca J, Vinetz JM, Gamboa D. Relationship of regulatory T cells to Plasmodium falciparum malaria symptomatology in a hypoendemic region. *Malar J.* 19 de marzo de 2014;13:108.
90. Moreno-Gutierrez D, Llanos-Cuentas A, Luis Barboza J, Contreras-Mancilla J, Gamboa D, Rodriguez H, et al. Effectiveness of a Malaria Surveillance Strategy Based on Active Case Detection during High Transmission Season in the Peruvian Amazon. *Int J Environ Res Public Health.* 27 de noviembre de 2018;15(12):2670.
91. Mathews SE, Bhagwati MM, Agnihotri V. Clinical spectrum of Plasmodium vivax infection, from benign to severe malaria: A tertiary care prospective study in adults from Delhi, India. *Trop Parasitol.* 2019;9(2):88-92.
92. Lisbôa PGS, Medeiros JMR, de Souza AV, Dos Santos BFB, Sanches HOC, da Rocha JLG, et al. Analysis of malaria clinical-epidemiological predictors in individuals from Brazilian Amazon. *Parasitology.* enero de 2022;149(1):10-4.
93. Villasis E, Garcia Castillo SS, Guzman M, Torres J, Gomez J, Garro K, et al. Epidemiological characteristics of P. vivax asymptomatic infections in the Peruvian Amazon. *Front Cell Infect Microbiol.* 31 de agosto de 2022;12:901423.
94. Longley RJ, White MT, Takashima E, Brewster J, Morita M, Harbers M, et al. Development and validation of serological markers for detecting recent Plasmodium vivax infection. *Nat Med.* mayo de 2020;26(5):741-9.
95. Villasis E, Garro K, Rosas-Aguirre A, Rodriguez P, Rosado J, Gave A, et al. PvMSP8 as a Novel Plasmodium vivax Malaria Sero-Marker for the Peruvian Amazon. *Pathogens.* marzo de 2021;10(3):282.
96. Finney OC, Danziger SA, Molina DM, Vignali M, Takagi A, Ji M, et al. Predicting Antidisease Immunity Using Proteome Arrays and Sera from Children Naturally Exposed to Malaria. *Mol Cell Proteomics MCP.* octubre de 2014;13(10):2646-60.
97. World Health Organization. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. 2021.

98. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J.* 15 de abril de 2014;13(1):144.
99. White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 11 de octubre de 2011;10(1):297.
100. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 1 de septiembre de 2009;9(9):555-66.
101. Angrisano F, Robinson LJ. *Plasmodium vivax* - How hidden reservoirs hinder global malaria elimination. *Parasitol Int.* abril de 2022;87:102526.
102. Edwards HM, Dixon R, Zegers de Beyl C, Celhay O, Rahman M, Myint Oo M, et al. Prevalence and seroprevalence of *Plasmodium* infection in Myanmar reveals highly heterogeneous transmission and a large hidden reservoir of infection. *PloS One.* 2021;16(6):e0252957.
103. Rosas-Aguirre A, Moreno M, Moreno-Gutierrez D, Llanos-Cuentas A, Saavedra M, Contreras-Mancilla J, et al. Integrating Parasitological and Entomological Observations to Understand Malaria Transmission in Riverine Villages in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 27 de abril de 2021;223(12 Suppl 2):S99-110.
104. Rosas-Aguirre A, Guzman-Guzman M, Chuquiyaury R, Moreno M, Manrique P, Ramirez R, et al. Temporal and Microspatial Heterogeneity in Transmission Dynamics of Coendemic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Two Rural Cohort Populations in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 23 de abril de 2021;223(8):1466-77.
105. van Eijk AM, Mannan AS, Sullivan SA, Carlton JM. Defining symptoms of malaria in India in an era of asymptomatic infections. *Malar J.* 6 de julio de 2020;19(1):237.
106. Chen J, Wang FK, He ZX, Bai Y. Progress in the Study of Epidemiologic Characteristics and Influencing Factors of Asymptomatic Malaria Infection in Africa. *Altern Ther Health Med.* noviembre de 2021;27(6):52-6.
107. Morang'a CM, Amenga-Etego L, Bah SY, Appiah V, Amuzu DSY, Amoako N, et al. Machine learning approaches classify clinical malaria outcomes based on haematological parameters. *BMC Med.* diciembre de 2020;18(1):375.
108. Hematological profiles of malaria-infected patients in an endemic area of Peru | *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [Internet]. [citado 29 de julio de 2023]. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/11908>
109. Ministerio de Salud del Peru. NORMA TECNICA DE SALUD PARA LA ATENCION DE LA MALARIA Y MALARIA GRAVE EN EL PERU [Internet]. 2015. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4378.pdf>
110. Instituto Nacional de Salud (Perú) V A. Norma Técnica de Salud Para el Control de Calidad del Diagnóstico Microscópico de Malaria; Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud: Lima, Peru, 2010; p. 41. [Internet]. Disponible en:

<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/FINAL%20MALARIA%2028.12.10%5B1%5D.pdf>

111. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatou K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.* diciembre de 2004;42(12):5636-43.
112. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, Corder RM, Malta MB, Sampaio-Silva J, et al. The Hidden Burden of *Plasmodium vivax* Malaria in Pregnancy in the Amazon: An Observational Study in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* julio de 2018;99(1):73-83.
113. Padley DJ, Heath AB, Sutherland C, Chiodini PL, Baylis SA, Collaborative Study Group. Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for *Plasmodium falciparum* DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. *Malar J.* 24 de julio de 2008;7:139.
114. Getis A, Ord JK. The Analysis of Spatial Association by Use of Distance Statistics. *Geogr Anal.* 1992;24(3):189-206.
115. Rovira-Vallbona E, Contreras-Mancilla JJ, Ramirez R, Guzmán-Guzmán M, Carrasco-Escobar G, Llanos-Cuentas A, et al. Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* julio de 2017;11(7):e0005674.
116. Saavedra MP, Conn JE, Alava F, Carrasco-Escobar G, Prussing C, Bickersmith SA, et al. Higher risk of malaria transmission outdoors than indoors by *Nyssorhynchus darlingi* in riverine communities in the Peruvian Amazon. *Parasit Vectors.* 29 de julio de 2019;12(1):374.
117. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther.* junio de 2013;11(6):623-39.
118. Kotepui M, Punsawad C, Kotepui KU, Somsak V, Phiwklam N, PhunPhuech B. Prevalence of malarial recurrence and hematological alteration following the initial drug regimen: a retrospective study in Western Thailand. *BMC Public Health.* 15 de octubre de 2019;19(1):1294.
119. Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, et al. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PloS One.* 4 de febrero de 2010;5(2):e9047.
120. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malar J.* diciembre de 2018;17(1):55.
121. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. von Seidlein L, editor. *PLOS Med.* 26 de mayo de 2021;18(5):e1003632.

122. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Hidden Biomass of Intact Malaria Parasites in the Human Spleen. *N Engl J Med*. 27 de mayo de 2021;384(21):2067-9.
123. Fernandez-Becerra C, Aparici-Herraiz I, Del Portillo HA. Cryptic erythrocytic infections in *Plasmodium vivax*, another challenge to its elimination. *Parasitol Int*. abril de 2022;87:102527.
124. Kattenberg JH, Erhart A, Truong MH, Rovira-Vallbona E, Vu KAD, Nguyen THN, et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* recent exposure in an area of significantly decreased transmission intensity in Central Vietnam. *Malar J*. diciembre de 2018;17(1):180.
125. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*. 23 de junio de 2005;4:27.
126. da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the " symptomatic " vs " asymptomatic " dichotomy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. junio de 2007;102(3):341-7.
127. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto TJ, Lwin KM, Vihokhern B, et al. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *J Infect Dis*. 15 de abril de 2016;213(8):1322-9.
128. Roe MS, O'Flaherty K, Fowkes FJI. Can malaria parasites be spontaneously cleared? *Trends Parasitol* [Internet]. 4 de marzo de 2022 [citado 14 de marzo de 2022];0(0). Disponible en: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(22\)00035-6](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(22)00035-6)
129. Bhowmick IP, Nirmolia T, Pandey A, Subbarao SK, Nath A, Senapati S, et al. Dry Post Wintertime Mass Surveillance Unearths a Huge Burden of *P. vivax*, and Mixed Infection with *P. vivax P. falciparum*, a Threat to Malaria Elimination, in Dhalai, Tripura, India. *Pathogens*. octubre de 2021;10(10):1259.
130. Thanh PV, Van Hong N, Van Van N, Van Malderen C, Obsomer V, Rosanas-Urgell A, et al. Epidemiology of forest malaria in Central Vietnam: the hidden parasite reservoir. *Malar J*. diciembre de 2015;14(1):86.
131. Kotepui M, Piwkham D, PhunPhuech B, Phiwklam N, Chupeerach C, Duangmano S. Effects of Malaria Parasite Density on Blood Cell Parameters. Przyborski JM, editor. *PLOS ONE*. 25 de marzo de 2015;10(3):e0121057.
132. O'Connell EM, Nutman TB. Eosinophilia in Infectious Diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*. agosto de 2015;35(3):493-522.
133. Tobón-Castaño A, Mesa-Echeverry E, Miranda-Arboleda AF. Leukogram Profile and Clinical Status in *vivax* and *falciparum* Malaria Patients from Colombia. *J Trop Med*. 2015;2015:1-11.

134. Awoke N, Arota A. Profiles of hematological parameters in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria patients attending Tercha General Hospital, Dawuro Zone, South Ethiopia. *Infect Drug Resist.* marzo de 2019;Volume 12:521-7.
135. Gupta P, Guddattu V, Saravu K. Characterization of platelet count and platelet indices and their potential role to predict severity in malaria. *Pathog Glob Health.* 17 de febrero de 2019;113(2):86-93.
136. Alves-Junior ER, Gomes LT, Dombroski TCD, Nery AF, Vandresen-Filho S, Nakazato L, et al. New laboratory perspectives for evaluation of vivax malaria infected patients: a useful tool for infection monitoring. *Braz J Infect Dis.* marzo de 2020;24(2):120-9.
137. Ullah Z, Khattak AA, Aziz N, Shafi R, Khan H, Bano R, et al. Haematological outcomes in progression of malaria: A cohort study from district Dera Ismail Khan, Pakistan. *JPMA J Pak Med Assoc.* octubre de 2020;70(10):1830-3.
138. Igbeneghu C, Odaibo AB, Olaleye DO. Impact of Asymptomatic Malaria on Some Hematological Parameters in the Iwo Community in Southwestern Nigeria. *Med Princ Pract.* 2011;20(5):459-63.
139. de Mast Q, Brouwers J, Syafruddin D, Bousema T, Baidjoe AY, de Groot PG, et al. Is asymptomatic malaria really asymptomatic? Hematological, vascular and inflammatory effects of asymptomatic malaria parasitemia. *J Infect.* noviembre de 2015;71(5):587-96.
140. Leli C, Matteo LD, Gotta F, Vay D, Cavallo V, Mazzeo R, et al. Clinical Utility of Platelet Count for Screening of Malaria. :4.
141. World Health Organization. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1) [Internet]. 2011. Disponible en: (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed [1/20/2022]).
142. Pava Z, Handayuni I, Trianty L, Utami RAS, Tirta YK, Puspitasari AM, et al. Passively versus Actively Detected Malaria: Similar Genetic Diversity but Different Complexity of Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 6 de diciembre de 2017;97(6):1788-96.
143. Woolley SD, Marquart L, Woodford J, Chalon S, Moehrle JJ, McCarthy JS, et al. Haematological response in experimental human Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria. *Malar J.* 20 de diciembre de 2021;20(1):470.
144. Sánchez-Arcila JC, de França MM, Pereira VA, Vasconcelos MPA, Têva A, Perce-da-Silva D de S, et al. The influence of intestinal parasites on Plasmodium vivax-specific antibody responses to MSP-119 and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malar J.* diciembre de 2015;14(1):442.
145. Reuling IJ, de Jong GM, Yap XZ, Asghar M, Walk J, van de Schans LA, et al. Liver Injury in Uncomplicated Malaria is an Overlooked Phenomenon: An Observational Study. *EBioMedicine.* octubre de 2018;36:131-9.

146. Odedra A, Webb L, Marquart L, Britton LJ, Chalon S, Moehrle JJ, et al. Liver Function Test Abnormalities in Experimental and Clinical Plasmodium vivax Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 17 de agosto de 2020;103(5):1910-7.
147. Tizifa TA, Kabaghe AN, McCann RS, van den Berg H, Van Vugt M, Phiri KS. Prevention Efforts for Malaria. *Curr Trop Med Rep.* 1 de marzo de 2018;5(1):41-50.
148. Ministerio de Salud del Peru. DOCUMENTO TECNICO:PLAN HACIA LA ELIMINACION DE LA MALARIA EN EL PERU 2022-2030. RESOLUCION MINISTERIAL-N° 034-2022-MINSA [Internet]. Disponible en: Norma_compressed.pdf.pdf (www.gob.pe)
149. Ministerio de Salud del Peru (MINSA). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades—MINSA. Sala de situación de salud Perú a la SE 52-2019. [Internet]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2019/salaSE52.zip>
150. Ministerio de Salud del Peru (MINSA). Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades MINSA. Sala de situación de salud Perú a la SE 52-2018 [Internet]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/salaSE52.zip>
151. Manrique P, Miranda-Alban J, Alarcon-Baldeon J, Ramirez R, Carrasco-Escobar G, Herrera H, et al. Microsatellite analysis reveals connectivity among geographically distant transmission zones of Plasmodium vivax in the Peruvian Amazon: A critical barrier to regional malaria elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 de noviembre de 2019;13(11):e0007876.
152. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in Plasmodium spp. *Infect Genet Evol.* 1 de julio de 2012;12(5):978-86.
153. Kobayashi T, Jain A, Liang L, Obiero JM, Hamapumbu H, Stevenson JC, et al. Distinct Antibody Signatures Associated with Different Malaria Transmission Intensities in Zambia and Zimbabwe. *mSphere.* 27 de marzo de 2019;4(2):e00061-19.
154. Perez-Leal O, Sierra AY, Barrero CA, Moncada C, Martinez P, Cortes J, et al. Plasmodium vivax merozoite surface protein 8 cloning, expression, and characterisation. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 de noviembre de 2004;324(4):1393-9.
155. Kochayoo P, Kittisenachai N, Changrob S, Wangriatisak K, Muh F, Chootong P, et al. The acquisition of long-lived memory B cell responses to merozoite surface protein-8 in individuals with Plasmodium vivax infection. *Malar J.* 31 de mayo de 2019;18(1):188.
156. Fonseca JA, Cabrera-Mora M, Singh B, Oliveira-Ferreira J, da Costa Lima-Junior J, Calvo-Calle JM, et al. A chimeric protein-based malaria vaccine candidate induces robust T cell responses against Plasmodium vivax MSP119. *Sci Rep.* 6 de octubre de 2016;6:34527.
157. 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. *FEMS Microbiol Rev.* 1 de mayo de 2016;40(3):343-72.

158. Oyong DA, Wilson DW, Barber BE, William T, Jiang J, Galinski MR, et al. Induction and Kinetics of Complement-Fixing Antibodies Against *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 3 α and Relationship With Immunoglobulin G Subclasses and Immunoglobulin M. *J Infect Dis.* 6 de noviembre de 2019;220(12):1950-61.
159. Hietanen J, Chim-ong A, Sattabongkot J, Nguitragee W. Naturally induced humoral response against *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 2P1. *Malar J.* 3 de junio de 2021;20(1):246.
160. Vinhaes CL, Carmo TA, Queiroz ATL, Fukutani KF, Araújo-Pereira M, Arriaga MB, et al. Dissecting disease tolerance in *Plasmodium vivax* malaria using the systemic degree of inflammatory perturbation. *PLoS Negl Trop Dis.* noviembre de 2021;15(11):e0009886.
161. Drew DR, Sanders PR, Weiss G, Gilson PR, Crabb BS, Beeson JG. Functional Conservation of the AMA1 Host-Cell Invasion Ligand Between *P. falciparum* and *P. vivax*: A Novel Platform to Accelerate Vaccine and Drug Development. *J Infect Dis.* 17 de enero de 2018;217(3):498-507.
162. Balam S, Olugbile S, Servis C, Diakit  M, D'Alessandro A, Frank G, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2: epitope mapping and fine specificity of human antibody response against non-polymorphic domains. *Malar J.* 19 de diciembre de 2014;13(1):510.
163. Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun.* marzo de 2009;77(3):1165-74.
164. Martínez Ortega RM, Tuya Pend s LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, C novas AM. EL COEFICIENTE DE CORRELACION DE LOS RANGOS DE SPEARMAN CARACTERIZACION. *Rev Habanera Cienc M dicas.* junio de 2009;8(2):0-0.
165. Longley RJ, White MT, Brewster J, Liu ZSJ, Bourke C, Takashima E, et al. IgG Antibody Responses Are Preferential Compared With IgM for Use as Serological Markers for Detecting Recent Exposure to *Plasmodium vivax* Infection. *Open Forum Infect Dis.* junio de 2021;8(6):ofab228.
166. Patgaonkar M, Herbert F, Powale K, Gandhe P, Gogtay N, Thatte U, et al. *Vivax* infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol.* octubre de 2018;40(10):e12580.
167. Fan L, Xia J, Shen J, Fang Q, Xia H, Zheng M, et al. An Erythrocyte Membrane-Associated Antigen, PvTRAg-26 of *Plasmodium vivax*: A Study of Its Antigenicity and Immunogenicity. *Front Public Health* [Internet]. 2020 [citado 25 de julio de 2023];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.00148>
168. Kochayoo P, Sanguansuttikul P, Thawornpan P, Wangriatisak K, Adams JH, Ntumngia FB, et al. The presence of circulating antibody secreting cells and long-lived memory B cell responses to reticulocyte binding protein 1a in *Plasmodium vivax* patients. *Malar J.* 20 de diciembre de 2021;20(1):474.

169. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. Parasitol Res. abril de 2005;95(6):420-6.
170. Chung AW. Multifaceted roles of antibody Fc effector functions: from protection to pathology. Immunol Cell Biol. abril de 2020;98(4):251-2.
171. Egbewande OM. The RTS,S malaria vaccine: Journey from conception to recommendation. Public Health Pract Oxf Engl. diciembre de 2022;4:100283.
172. Ayadi I, Balam S, Audran R, Bikorimana JP, Nebie I, Diakité M, et al. P. falciparum and P. vivax Orthologous Coiled-Coil Candidates for a Potential Cross-Protective Vaccine. Front Immunol [Internet]. 2020 [citado 4 de marzo de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.574330>
173. Hall CE, Hagan LM, Bergmann-Leitner E, Tosh DM, Bennett JW, Regules JA, et al. Mosquito Bite-Induced Controlled Human Malaria Infection with Plasmodium vivax or P. falciparum Generates Immune Responses to Homologous and Heterologous Preerythrocytic and Erythrocytic Antigens. Infect Immun. marzo de 2019;87(3):e00541-18.
174. Garcia-Senosian A, Kana IH, Singh S, Das MK, Dziegiel MH, Hertegonne S, et al. Neutrophils dominate in opsonic phagocytosis of P. falciparum blood-stage merozoites and protect against febrile malaria. Commun Biol. 19 de agosto de 2021;4:984.
175. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. Updated 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010. viii+566.
176. Aitken EH, Mahanty S, Rogerson SJ. Antibody effector functions in malaria and other parasitic diseases: a few needles and many haystacks. Immunol Cell Biol. abril de 2020;98(4):264-75.
177. Ofori EA, Garcia-Senosian A, Naghizadeh M, Kana IH, Dziegiel MH, Adu B, et al. Human blood neutrophils generate ROS through FcγR-signaling to mediate protection against febrile P. falciparum malaria. Commun Biol. 18 de julio de 2023;6:743.
178. Odera DO, Tuju J, Mwai K, Nkumama IN, Fürle K, Chege T, et al. Anti-merozoite antibodies induce natural killer cell effector function and are associated with immunity against malaria. Sci Transl Med. 8 de febrero de 2023;15(682):eabn5993.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla 1. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=1096311104>

Anexo 2. Tabla 2. Características de las viviendas de los participantes del estudio

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=2020051584>

Anexo 3. Tabla 3. Proporciones de infecciones por *P. vivax* detectadas por metodologías (microscopía (A) y qPCR (B)), proporciones de estado clínico (infección asintomática, sintomática y submicroscópica) por comunidad

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=1313657038>

Anexo 4: Resultados de análisis geoespacial local usando estadística Getis-Ord

https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1RUqRpzIzZJDldQTB-VMNipBE_byE8ntu

Anexo 5: Tabla 4. Resumen de resultados de analitos bioquímicos y hematológicos

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=771997823>

Anexo 6. Figura 1. Resultados de la evaluación de analitos clínicos hematológicos de individuos por grupo de estudio (Sin/Asin/Controles).

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=2139849834>

Anexo 7. Figura 2. Resultados de la evaluación de analitos clínicos bioquímicos de individuos por grupo de estudio (Sin/Asin/Controles).

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1wS-ryYGronfNgGYZ5VmXBkwbJFOscK1/edit#gid=1200513034>